

# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE KIT COLORIMÉTRICO E FLUORIMÉTRICO  
PARA IDENTIFICAÇÃO FOSFATASE ÁCIDA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS  
PROVINDOS DE CRIMES SEXUAIS

MARCONE GOMES DOS SANTOS ALCÂNTARA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins 57072-970 – Maceió - AL

MARCONE GOMES DOS SANTOS ALCÂNTARA

DESENVOLVIMENTO DE KIT COLORIMÉTRICO E FLUORIMÉTRICO PARA  
IDENTIFICAÇÃO FOSFATASE ÁCIDA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS  
PROVINDOS DE CRIMES SEXUAIS

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Coorientador: Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

A347d Alcântara, Marcone Gomes dos Santos.

Desenvolvimento de kit colorimétrico e fluorimétrico para identificação fosfatase ácida em fluidos biológicos provindos de crimes sexuais / Marcone Gomes dos Santos Alcântara. – 2023.

68 f. : il color.

Orientador: Josué Carinhonha Caldas Santos.

Co-orientador: Dimas José da Paz Lima.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 57-62.

Apêndices: f. 63-68.

1. Femicídio. 2. Crime sexual. 3. Kit de reagentes para diagnóstico. 4. Sêmen. 5. Marcador molecular fluorescente. 6. Marcador molecular colorimétrico. I. Título.

CDU: 531.763

## RESUMO

Nos últimos anos, os crimes sexuais vêm aumentando exponencialmente, principalmente contra a mulher, com mais de 250 mil casos desde o ano de 2017. Desta forma, a busca por fluidos biológicos na cena do crime pode ser crucial na análise preliminar, no entanto, os métodos atualmente disponíveis demonstram-se pouco práticos e não adequados a todas as realidades, o que consome tempo até a solução desses crimes. Afim de contribuir e auxiliar a mudar essa realidade, este trabalho visa o desenvolvimento de um kit colorimétrico e fluorescente (resposta dual) para identificação de sêmen em fluidos biológicos. A partir de uma reação de fosforilação dos corantes resorufina (**1**) e azo (**7**) utilizando o agente clorofosfato de dietila seguida da desalquilação dos grupos etila utilizando o agente iodo-TMSi, visa a síntese de sondas colorimétricas e fluorescentes que sejam sensíveis à fosfatase ácida presente no sêmen. O mecanismo de detecção foi baseado na reação enzimática da fosfatase ácida com as sondas, resultando em uma mudança de cor e na emissão de fluorescência após exposição a amostras biológicas. A rota sintética utilizada foi efetiva para a síntese das sondas propostas, com rendimentos globais de 28 e 33%, para as sondas **3** e **9**, respectivamente. A primeira sonda sintetizada, derivada do corante resorufina, demonstrou resultados promissores nos testes com a enzima fosfatase ácida, com limite de detecção de até  $0,2 \text{ U L}^{-1}$ , podendo ser usada como sonda colorimétrica ( $\lambda_{\text{abs}} = 572 \text{ nm}$ , pH 8) e fluorimétrica ( $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ , pH 8), atuando por meio de um mecanismo *off-on* em amostras reais de sêmen. As inovações alcançadas neste projeto envolvem o desenvolvimento de um método para detecção de sêmen da fosfatase ácida como marcador, explorando um sistema que venha a ser portátil e de simples manuseio, permitindo a obtenção de resultados confiáveis, rápidos, seletivos e seguros, os quais, podem servir de prova adicional para auxiliar na elucidação de crimes de cunho sexual contra mulheres, crianças e adolescentes.

**Palavras Chave:** Femicídio; crimes sexuais; kit diagnóstico; sêmen; marcadores moleculares fluorescentes e colorimétricos.

## ABSTRACT

In recent years, sexual crimes have been increasing exponentially, mainly against women, with more than 250 thousand cases since 2017. In this way, the search for biological fluids at the crime scene can be crucial in the preliminary analysis, however, currently available methods prove to be impractical and not suitable for all realities, which takes time to solve these crimes. In order to contribute and help to change this reality, this work aims at the development of a colorimetric and fluorescent kit (dual response) for the identification of semen in biological fluids. Based on a phosphorylation reaction of resorufin (**1**) and azo (**7**) dyes using the agent diethyl chlorophosphate followed by the dealkylation of the ethyl groups using the agent iodine-TMSi, it aims at the synthesis of colorimetric and fluorescent probes that are sensitive to phosphatase acid present in semen. The detection mechanism was based on the enzymatic reaction of acid phosphatase with the probes, resulting in a color change and fluorescence emission after exposure to biological samples. The synthetic route used was effective for the synthesis of the proposed probes, with global yields of 28 and 33%, for probes **3** and **9**, respectively. The first synthesized probe, derived from the resorufin dye, showed promising results in tests with the acid phosphatase enzyme, with a detection limit of up to  $0.2 \text{ U L}^{-1}$ , and can be used as a colorimetric probe ( $\lambda_{\text{abs}} = 572 \text{ nm}$ , pH 8) and fluorometric ( $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ , pH 8), acting through an off-on mechanism in real semen samples. The innovations achieved in this project involve the development of a method for detecting acid phosphatase semen as a marker, exploring a system that will be portable and simple to handle, allowing the obtaining of reliable, fast, selective and safe results, which, can serve as additional evidence to assist in the elucidation of crimes of a sexual nature against women, children and adolescents.

**Keywords:** Femicide; sex crimes; diagnostic kit; semen; fluorescent and colorimetric molecular markers.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos principais fluidos que compõe o sêmen. ....	15
Figura 2. Enzima fosfatase ácida prostática (PDB: 1CVI). ....	16
Figura 3. Sítio de ação da enzima fosfatase ácida prostática (PDB: 1CVI). ....	17
Figura 4. Esquema do mecanismo de catálise da enzima fosfatase ácida. ....	17
Figura 5. Esquema de reação de característica do método alfa-naftil fosfato. .	18
Figura 6. Sondas derivadas do corante Resorufina. ....	20
Figura 7. Posições de modificações estruturais da Resorufina. ....	20
Figura 8. Fotoisomerização (E-Z) de compostos azos. ....	21
Figura 9. Fosfonatos mais utilizados em reações de fosforilação. ....	21
Figura 10. Mecanismo de detecção das sondas propostas. ....	23
Figura 11. Esquema da reação de fosforilação do corante Resorufina ( <b>1</b> ) e do corante azo ( <b>7</b> ). ....	25
Figura 12. Esquema da reação de desalquilação dos compostos intermediários <b>2</b> e <b>8</b> . ....	27
Figura 13. Esquema da rota de síntese do corante azo ( <b>7</b> ). ....	28
Figura 14. Esquema de síntese do composto <b>2</b> via reação de fosforilação. ....	32
Figura 15. Mecanismo proposto da reação de fosforilação. ....	33
Figura 16. Sinais referente aos grupos etila no espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>2</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	33
Figura 17. Possibilidades de ataque do agente Imidazol-TMSi. ....	34
Figura 18. Mecanismo proposto de desalquilação do grupo fosfato. ....	35
Figura 19. Esquema de síntese do composto <b>7</b> . ....	36
Figura 20. a) Espectro de absorção em diferentes pH 5 - 9; b) Espectro de excitação e emissão do corante Resorufina em diferentes valores de pH; $\lambda_{ex/em} = 572/580$ nm. ....	37
Figura 21. Espectro de emissão de fluorescência em diferentes valores de pH empregando amostra de sêmen (a) e fosfatase ácida isolada (b); Espectro de absorção em meio ácido com sêmen (d) e fosfatase ácida isolada (d). Condições: [ <b>3</b> ] = 10 $\mu$ M; amostra de sêmen a 0,125% (v/v); fosfatase ácida = 2 U L <sup>-1</sup> ; [tampão acetato] = 40 mM; $\lambda_{em} = 580$ nm. ....	38

Figura 22. Variação na intensidade de fluorescência (a) e absorvância (b) para cada intervalo de pH. ....	39
Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência demonstrando o efeito do da concentração da sonda em pH 5,5 (a) e 8 (b). Espectros de UV-vis demonstrando o efeito da concentração da sonda em pH 5,5 (c) e 8 (d). Condições: pH = 5,5; [Tampão acetato] = 40 mM; [Tampão citrato] = 40 mM; $\lambda_{em}$ = 580 nm. ....	39
Figura 24. Espectros de emissão de fluorescência demonstrando o efeito do tampão acetato (a) e citrato (b). Espectros de UV-vis demonstrando o efeito do tampão acetato (c) e citrato (d). Condições: pH = 5,5; [3] = 10 $\mu$ M; [Tampão acetato] = 40 mM; [Tampão citrato] = 40 mM; $\lambda_{em}$ = 580 nm.....	40
Figura 25. Curva analítica demonstrando o efeito do tampão em pH 5,5 a 40 mM na intensidade de fluorescência. ....	42
Figura 26. Efeito da concentração do tampão citrato na emissão de fluorescência da sonda <b>3</b> (a) e branco (b); Efeito da concentração do tampão citrato na absorvância da sonda <b>3</b> (c) e branco (d). Condições: pH= 5,5; [sonda]= 10 $\mu$ M; fosfatase ácida = 5 U L <sup>-1</sup> ; $\lambda_{em}$ = 580 nm. ....	42
Figura 27. Comparação da variação de fluorescência (a) e absorvância (b) em os tampões acetato, citrato e fosfato.....	43
Figura 28. Inibidores competitivos da fosfatase ácida (PDB: 1CVI). ....	44
Figura 29. Efeito da concentração dos inibidores molibdato de sódio (a), fluoreto de sódio (b) e tungstato de sódio (c) na intensidade de fluorescência e absorvância. Condições: pH= 5,5; [sonda] = 10 $\mu$ M; fosfatase ácida = 5 U L <sup>-1</sup> ; [Tampão citrato] = 40 mM; $\lambda_{em}$ = 580 nm. ....	45
Figura 30. Gráficos de intersecção dos inibidores molibdato de sódio (a), fluoreto de sódio (b) e tungstato de sódio (c). ....	46
Figura 31. Avaliação da cinética e estabilidade da sonda <b>3</b> na ausência (branco) e presença da enzima. Condições: pH = 5,5; [sonda]= 10 $\mu$ M; fosfatase ácida = 5 U L <sup>-1</sup> ; [Tampão citrato] = 40 mM; $\lambda_{em}$ = 580 nm.....	47
Figura 32. Curva analítica nas condições ideais para a sonda <b>3</b> e para fosfatase ácida.....	48
Figura 33. Alteração colorimétrica de amostras de sêmen diluídas; b). Espectro de emissão das amostras. Condições: [3]= 200 $\mu$ M; [Tampão acetato] = 100	

mM; pH= 5,0; $\lambda_{em}$ = 530 nm; c) Amostras sob exposição a luz ultravioleta de 365 nm; d) Amostras sob exposição a luz ultravioleta de 254 nm.....	50
Figura 34. a) Controle negativo; b) Controle positivo; c) Solução com inibidor	51
Figura 35. Simulação utilizando swab com a sonda <b>3</b> em piso contaminado...	52
Figura 36. Simulação utilizando swab contaminado após adição da sonda <b>3</b> ..	53
Figura 37. Soluções a 10% (v/v) com os contaminantes: sêmen (a), sangue (b), urina (c), saliva (d), leite (e), clara de ovo (f) e molho de tomate (g) e espectro de fluorescência destas soluções. Espectro de emissão de fluorescência com interferentes. Condições: [ <b>3</b> ] = 10 $\mu$ M; [Tampão citrato] = 40 mM; pH= 5,5; $\lambda_{em}$ = 580 nm .....	53
Figura 38. Exposição a luz UV de 254 e 365 nm das soluções a 10% (v/v) com os contaminantes: sêmen (a), sangue (b), urina (c), saliva (d), leite (e), clara de ovo (f) e molho de tomate (g). .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Curvas analíticas em pH 5,5 e 8 .....	48
Tabela 2. Comparação entre método com a sonda <b>3</b> e outras disponíveis na literatura. ....	49

## LISTAS DE ABREVIações E ACRôNICOS

PAP	Fosfatase ácida prostática
UV	Ultravioleta
CCD	Cromatografia em camada delgada
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
IV	Infravermelho
nm	Nanômetros
$\lambda_{\text{abs}}$	Comprimento de onda de absorção
$\lambda_{\text{em}}$	Comprimento de onda de emissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado minha família e por todas as oportunidades que foram me dadas.

Agradeço à minha família, meus pais Itamar e Janete, que sempre lutaram pela minha educação e por aconselhar sobre as decisões da vida. Ao meu amor, Kadja, por todo o suporte e por sempre confiar em mim, até quando eu não confio mais.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica Aplicada a Materiais e Compostos Bioativos – LMC e Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica (LINQA). Em especial, Ari, Sara, Luís, Adrielle, Amanda e Verônica pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

Aos professores doutores Dimas Lima e Josué Carinhonha, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho durante a execução do projeto.

Um agradecimento mais que especial ao meu Tio Marquinho (*in memoriam*), que infelizmente nos deixou durante meu período de mestrado, e que sempre se interessou pela minha pesquisa e sempre demonstrou entusiasmo a cada passo que eu dava.

Agradeço aos órgãos de fomento, CAPES pelos recursos destinados a esse projeto e pela aprovação no edital nº 16/2020 - PROCAD - Segurança Pública e Ciências Forenses. A banca julgadora, professora Daniela Anunciação, professora Jadriane Xavier, perito Marek Ekert pelas contribuições na minha formação, e a todos os professores e técnicos do PPGQB que de alguma forma contribuíram para minha formação.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 Crimes sexuais .....	14
2.2 Fluidos biológicos .....	14
2.3 Fosfatase ácida prostática .....	16
2.4 Principais kits utilizados atualmente .....	18
2.5 Corantes com capacidade de atuação como sonda .....	19
2.6 Reações de fosforilação .....	21
2.7 Mecanismo das sondas propostas .....	22
3. OBJETIVOS .....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos .....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1 Planejamento para a síntese.....	25
4.1.1 Reação de fosforilação do corante Resorufina (1) e do corante azo (7) .....	25
4.1.1.1 Dados e caracterização de Dietil(3-oxo-10,10a-di-hidro-3H- fenoxazin-7-il) fosfato (2).....	25
4.1.1.2 Dados e caracterização de ( <i>E</i> )-dietil(4-(fenildiazenil)fenil)fosfato (8) .....	26
4.1.2 Reação de desalquilação do grupo fosfato .....	26
4.1.2.2 Dados e caracterização de ( <i>E</i> )-4-(fenildiazenil)fenil dihidrogenofosfato (9) .....	27
4.1.3 Reação de síntese do corante azo .....	28
4.1.3.1 Dados e caracterização de ( <i>E</i> )-4-(fenildiazenil)fenol (7) .....	28
4.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	29
4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H) 29	
4.4 Procedimento experimental para os ensaios de bioanalíticos .....	29
4.4.1 Reagentes e preparo das soluções.....	29
4.4.2 Estudo da otimização do intervalo de pH para melhor resposta fluorimétrica.....	30
4.4.3 Estudo da interação da enzima fosfatase com a sonda 3 .....	30
4.4.4 Estudo da sonda 3 em amostras reais de sêmen .....	30
4.4.5 Estudo com inibidores de fosfatase.....	31
4.4.6 Determinação das figuras de mérito e limite de detecção (LOD) .....	31

4.4.7 Tratamento dos dados .....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	32
5.1 Síntese das sondas 3 e 9 .....	32
5.1.1 Síntese do corante azo (7) .....	35
5.2 Otimização das condições para a sonda 3 .....	36
5.3 Testes com inibidores de fosfatase ácida .....	44
5.4 Avaliação da cinética e estabilidade da sonda 3 .....	46
5.5 Determinação das figuras de mérito .....	47
5.6 Testes com amostras de sêmen .....	49
5.7 Simulação da aplicação da sonda no <i>kit</i> .....	51
6 CONCLUSÃO .....	55
6. PERSPECTIVAS .....	56
REFERÊNCIAS .....	57
APÊNDICE .....	63

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Lei Nº 12.015, de 7 de agosto de 2009, crimes sexuais consistem em crimes essencialmente dolosos que se consumam com a prática do ato libidinoso sem a anuência da vítima e com o objetivo único de satisfação do agressor ou de terceiros, agindo, portanto, contra a dignidade sexual da pessoa humana (Brasil, 2009). No Brasil, os casos de estupro contra vítimas do sexo feminino chegaram a 70 mil casos em 2019. No ano de 2020, foi registrada uma queda de 14,1% em relação ao ano anterior, o que pode estar ligado à subnotificação de novos casos, em decorrência do início do isolamento social causado pela pandemia da Covid-19 (Brasil, 2023). Adicionalmente, em Alagoas, foram notificados 695 casos de estupro entre janeiro de 2020 e fevereiro de 2021 (BRASIL, 2023).

A coleta e a identificação de fluidos biológicos recuperados de cenas de crimes sexuais é de fundamental importância para a possível identificação de marcadores forenses e para o avanço da investigação criminal (VIRKLER; LEDNEV, 2009). Entre tais fluidos, o sêmen é um dos mais comumente encontrados no local do crime cenas ou até nas próprias vítimas, que pode ser detectado por meio de testes para identificação de alguns marcadores, entre eles a enzima fosfatase prostática, encontrada em alta concentração no plasma seminal em comparação com outros fluidos biológicos (HERMAN; FEINE; GAFNY, 2018).

No intuito de reduzir os problemas associados à detecção e à quantificação de sêmen em fluídos oriundos de crimes sexuais, este projeto visa à síntese e aplicação de novas sondas colorimétricas e fluorescentes em plataformas analíticas para a detecção da enzima fosfatase ácida, a qual está presente no sêmen, de forma a obter informações qualitativas e semiquantitativas com elevada frequência analítica, o que os diferencia dos *kits* disponíveis atualmente no mercado.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Crimes sexuais**

Na área do direito penal, um crime sexual é definido como o crime que age contra a dignidade sexual da vítima através da prática sexual sem consentimento, através de meios intimidatórios ou coercivos, ameaçando a integridade física da vítima. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera este ato como uma grave violação aos direitos humanos e estima que mundialmente cerca de 30% das mulheres já sofreram algum abuso físico ou sexual durante a vida (JORIO, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Segundo o anuário Brasileiro de Segurança Pública (2022), em uma década, mais de meio milhão de pessoas foram vítimas de estupro, com mais de 66 mil casos apenas em 2021 (Brasil, 2023).

O estado de Alagoas apresentou alta no número de casos de estupro entre 2020 e 2021, passando de 676 para 835 casos registrados, indicando um aumento de 23,5%, sendo a terceira maior taxa de aumento de casos do Brasil, ficando atrás do estado da Paraíba (111,3%) e Maranhão (46,3%). Dos 26 estados do Brasil, apenas 8 obtiveram redução no número de casos de violência contra mulher (Brasil, 2023).

Embora no Brasil, a palavra da vítima seja uma ferramenta importante para a condenação de um suspeito, possuindo valor absoluto no julgamento, quando combinada à evidências forenses têm grande impacto na resolução dos casos, o que torna necessária a busca por evidências forenses que atribuam valor ao que foi relatado (MARCAO; GENTIL, 2019). Alguns tipos de vestígios biológicos podem ser deixados caso o agressor seja do sexo masculino, os quais podem ser encontrados no local do crime ou até mesmo na vítima, servindo como potencial evidência durante uma investigação forense de forma a comprovar o envolvimento de um possível suspeito (RODRIGUEZ *et al.*, 2019).

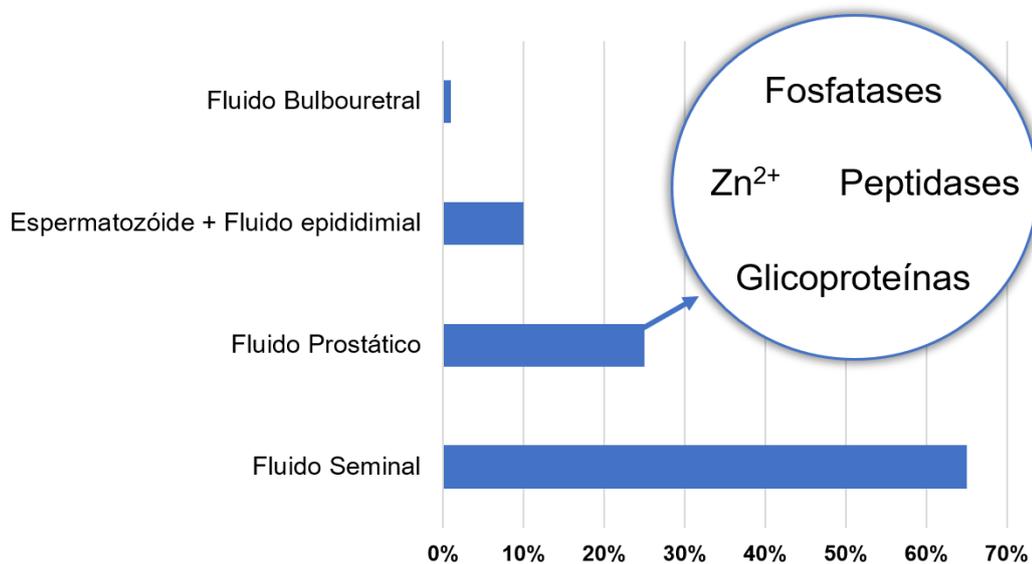
### **2.2 Fluidos biológicos**

As evidências biológicas, incluem desde impressões digitais, fluidos corporais como o sangue, urina e sêmen. As evidências biológicas podem ser encontradas em diversos tipos de superfícies, como no chão, em roupas de

cama, em preservativos, nas roupas ou na vítima. Devido a sua sensibilidade, esses tipos de evidências são classificadas como evidências circunstanciais, sendo coletadas na cena do crime e exigindo cuidados de manuseio logo que podem ser contaminadas ou destruídas (MAGALHÃES *et al.*, 2015).

Entre os principais fluidos corporais mais comumente encontrados estão o sangue, saliva, urina e sêmen, sendo este último de grande valor forense pois permite a busca por material genético, além de possuir outros componentes que também servem como marcadores químicos. O volume do sêmen é composto por cerca de 1% de fluido bulbouretral, 10% de espermatozoides e fluido epididimial, 25% de fluido prostático e 65% de fluido seminal (Figura 1) (ANAMTHATHMAKULA; WINUTHAYANON, 2020). Alguns dos principais componentes do sêmen estão o antígeno prostático específico, enzimas, espermina, zinco, flavina, glicoproteínas, fibrinogênio e alguns constituintes ácidos, como o ácido cítrico, ácido lático e ácido ascórbico (CASEY *et al.*, 2020; GAMBLIN; MORGAN-SMITH, 2020).

Figura 1. Distribuição dos principais fluidos que compõe o sêmen.



Fonte: Adaptado de ANAMTHATHMAKULA; WINUTHAYANON, 2020

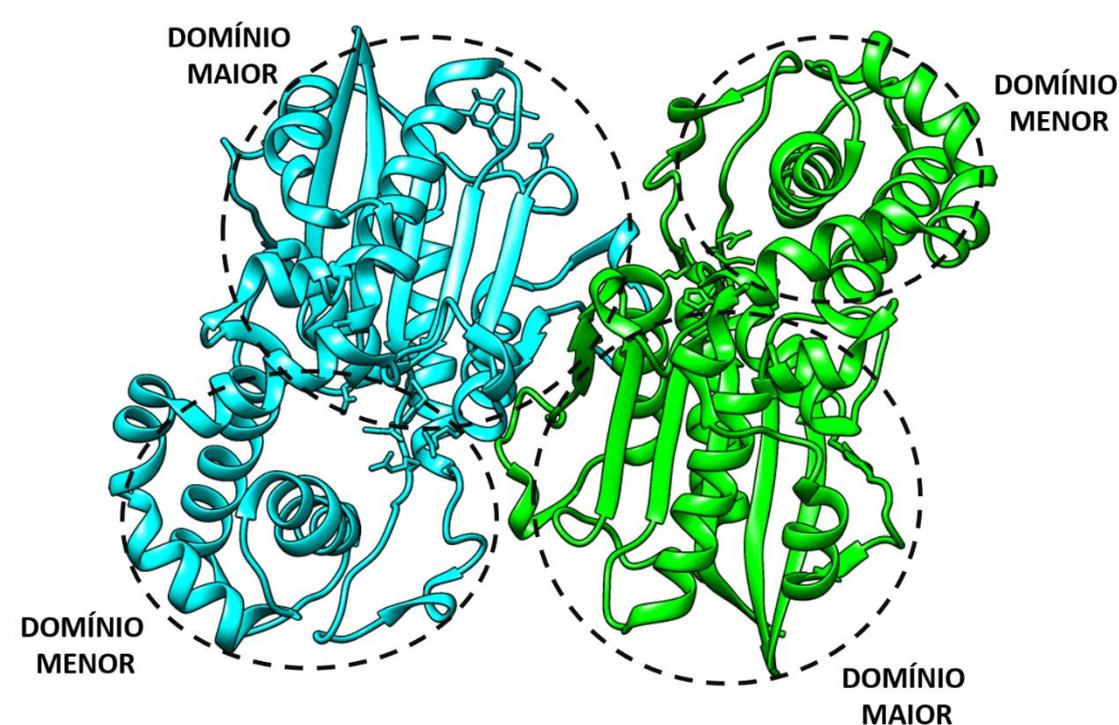
Entre as principais componentes do sêmen, estão a frutose, responsável por ser a fonte primária de energia do espermatozoide, e a fosfatase ácida prostática (PAP), que é uma glicoproteína secretada pelas células epiteliais da próstata e responsável por hidrolisar uma variedade de pequenos fosfoésteres

em condições ácidas (GAMBLIN; MORGAN-SMITH, 2020; KONG; BYUN, 2013; MUNIYAN *et al.*, 2013). A fosfatase ácida destaca-se no ambiente forense pela sua fácil detecção e por estar em grande quantidade no fluido seminal, sendo cerca de 400 vezes maior no sêmen que em qualquer outro fluido biológico (MUNIYAN *et al.*, 2013; STEFANIDOU; ALEVISOPOULOS; SPILIOPOULOU, 2010).

### 2.3 Fosfatase ácida prostática

A fosfatase ácida prostática (PAP) é uma proteína homodimérica em que cada subunidade possui dois domínios: um menor, composto por seis alfa hélices de cadeias longas, e o domínio maior, de composição mista de sete folhas beta com alfa hélices ao redor (Figura 2) (JAKOB *et al.*, 2000).

Figura 2. Enzima fosfatase ácida prostática (PDB: 1CVI).



Fonte: Autor (2023).

O sítio ativo da enzima está localizado em uma fenda entre os dois domínios, ele é constituído pelos resíduos de aminoácido asparagina 258 (ASP258), arginina 79 (ARG79) e histidina 12 (HIS12), os quais formam interações de hidrogênio com um resíduo glicina. Finalmente, após as reações

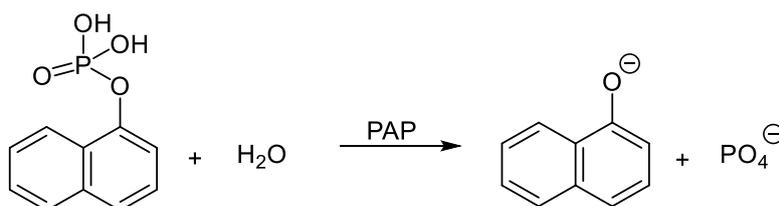


## 2.4 Principais kits utilizados atualmente

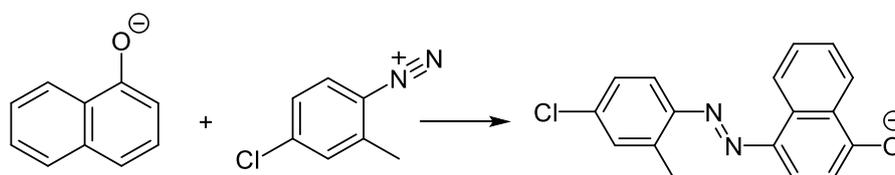
Hoje, as sondas atuais para detecção de sêmen levam no mínimo dois a quinze minutos para apresentar resultado positivo em amostras diluídas em até 400 vezes (REDHEAD; BROWN, 2013). Diversos métodos baseiam-se na detecção da fosfatase ácida pela inserção de grupos fosfato em moléculas orgânicas. Atualmente já existem kits no mercado algumas moléculas orgânicas capazes de detectar a PAP, sendo a mais conhecida delas o método do alfa-naftil fosfato. Este método é baseado na reação de hidrólise da molécula de alfa-naftil fosfato pela PAP, resultando na liberação do grupo fosfato e o alfa-naftol. Este segundo, segue reagindo com o composto 4-cloro-2-metilbenzeno para a formação de um corante diazônio, gerando uma alteração colorimétrica e emissão de fluorescência (Figura 5) (COOPER; TURNELL; PRICE, 1982).

Figura 5. Esquema de reação de característica do método alfa-naftil fosfato.

a) Reação com a fosfatase ácida prostática



b) Adição do sal diazônio



Fonte: Adaptado de COOPER; TURNELL; PRICE, 1982.

Outro kit disponível no mercado é desenvolvido por Herman; Feine; Gafny, 2018 é o Phadebas<sup>®</sup>, que consiste na identificação de sêmen através do método do alfa-naftil fosfato em dispositivos analíticos baseados em papel, que foram capazes de identificar o sêmen em amostras diluídas em proporções de até 1:10.

Outros estudos ainda em desenvolvimento visam a identificação da fosfatase ácida prostática através de mecanismos alternativos. Xie *et al.*, 2012 desenvolveu um método de detecção *turn on* baseado na liberação de um

conjugado formado por um polieletrólito catiônico (PPE<sup>4+</sup>) e um substrato de fosfatase *p*-nitrofenil fosfato (pNPP), que emite fluorescência quando em contato com a fosfatase. Já Dwivedi; Iyer, 2013 desenvolveram um método que consta numa sonda orgânica que emite fluorescência na presença da fosfatase, mas somente quando complexada com um íon férrico e com o substrato pNPP.

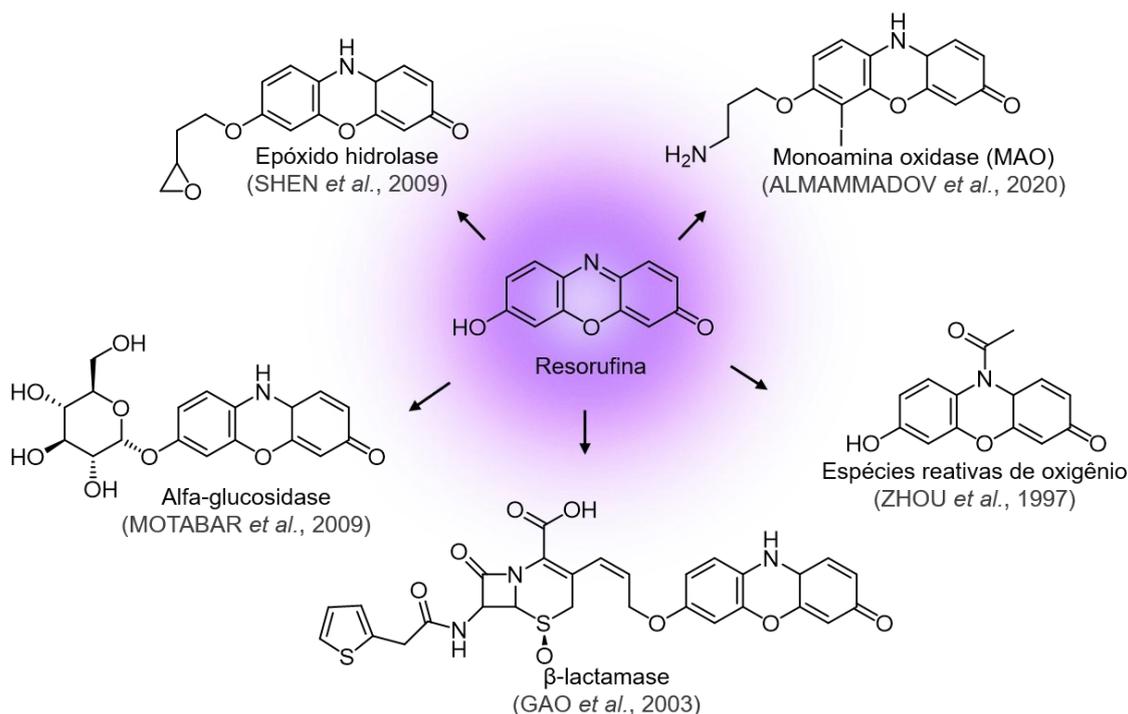
Métodos inorgânicos também desmonstraram ser eficazes para a identificação da PAP. Guo *et al.*, 2019 apresentaram uma sonda baseada na liberação de Cu<sup>2+</sup> em contato com a fosfatase, os íons de cobre interajem com um nanomaterial de C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e que quando expostas a irradiação por luz de led ( $\lambda = 410\text{--}420$  nm) por quinze minutos e reacionado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentam uma alteração colorimétrica.

Em sua maioria, os métodos atuais embora seletivos, apresentam limitações para uma utilização ágil, prática e dinâmica, pois exigem a realização de mais de uma etapa de reação e com diversos materiais para a obtenção do resultado da análise. Isto faz com que haja um aumento de custo na confecção e realização destes métodos, dificultando assim o acesso a estes kits. Em vista disto, torna-se necessária a busca por um meio alternativo para a detecção de sêmen, que ocorra de forma mais simples, rápida e versátil, o que trará agilidade para o dia a dia forense.

## **2.5 Corantes com capacidade de atuação como sonda**

Entre as moléculas orgânicas corantes conhecidas, a Resorufina se destaca por apresentar vantagens como emissão no comprimento de onda na faixa do vermelho (580 nm), boa estabilidade e alta fluorescência (WANG *et al.*, 2021). Além disso, seus derivados já demonstraram capacidade de atuação como sonda para diversas aplicações (Figura 6), como para a identificação da enzima  $\beta$ -lactamase (GAO *et al.*, 2003), monoamina oxidase (MAO) (ALMAMMADOV *et al.*, 2020),  $\alpha$ -glucosidase (MOTABAR *et al.*, 2009), epóxido hidrolase (SHEN *et al.*, 2009), espécies reativas de oxigênio (ZHOU *et al.*, 1997), entre outros (WANG *et al.*, 2021).

Figura 6. Sondas derivadas do corante Resorufina.



Fonte: Autor (2023).

A Resorufina possui dois lugares disponíveis para inserção de ramificações que dão sua característica de atuação como sonda, sendo no nitrogênio do anel morfolínico ou em sua hidroxila livre (Figura 7). Ambos são frequentes alvos de modificações estruturais que permitem que a Resorufina seja utilizada como sonda para diversas enzimas (TIAN *et al.*, 2021).

Figura 7. Posições de modificações estruturais da Resorufina

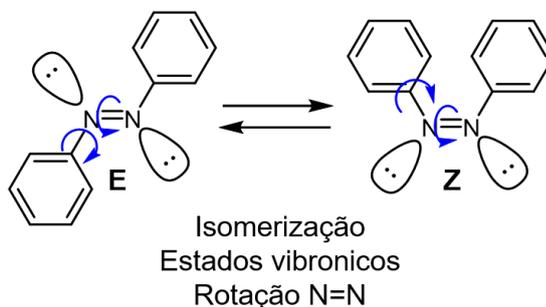


Fonte: Autor (2023).

Outro tipo de corante amplamente utilizado pela sua capacidade colorimétrica na síntese de sondas é o corante azo. Caracterizado pela sua ligação  $-N=N-$ , esta classe de compostos possuem uma ampla gama de cores e alto coeficientes de absorção molar por causa do número significativo de estados vibrônicos em cada níveis  $S_n$ . Porém, estes compostos são fracamente fluorescentes por causa de um decaimento não radiativo dos seus estados

excitados  $S_1$  e  $S_2$  devido à isomerização da ligação azo (Figura 8) (CHEVALIER; RENARD; ROMIEU, 2017).

Figura 8. Fotoisomerização (E-Z) de compostos azos.

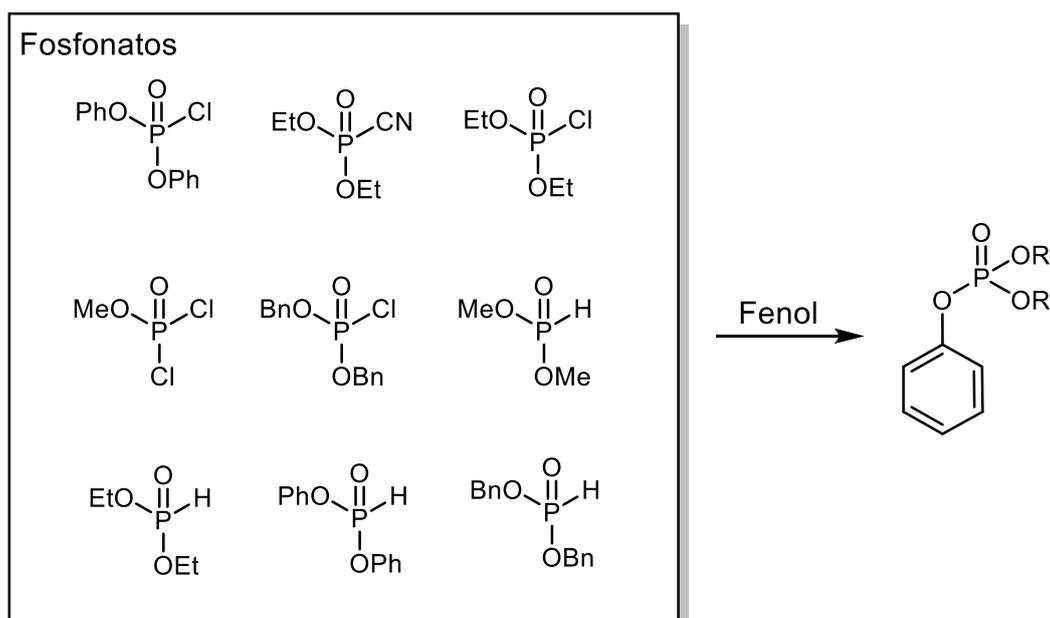


Fonte: Adaptado de CHEVALIER; RENARD; ROMIEU, 2017.

## 2.6 Reações de fosforilação

Na literatura existem diferentes métodos sintéticos para a inserção do grupo fosfato em hidroxilas aromáticas, em sua maioria compostos dialquil-fosfonatos (KOZAK *et al.*, 2018). Esta classe de compostos possui uma grande variedade de grupos alquilas ligados ao átomo de oxigênio (Figura 9), o que faz necessária uma reação de hidrólise ou desalquilação para a formação do grupo fosfato (HARSÁGI; KEGLEVICH, 2021).

Figura 9. Fosfonatos mais utilizados em reações de fosforilação



Fonte: Autor (2023).

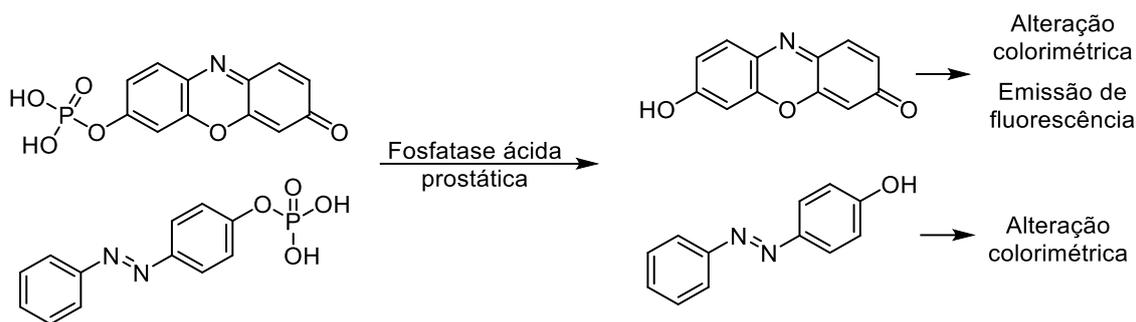
Métodos de hidrólise clássicos não seriam efetivos para a retirada dos grupos alquila do grupo fosfonato, pois implicaria na retirada inteira deste grupo devido a ligação P-O-C presente na estrutura. As metodologias mais comumente utilizadas neste tipo de reação é através da reação de McKenna, que consiste na utilização de brometo de trimetilsilano (Br-TMSi) para a captura dos grupos alquila (MCKENNA *et al.*, 1977). Outros agentes desalquilantes utilizados são o iodeto de trimetilsilano (I-TMSi), o cloreto de trimetilsilano (Cl-TMSi) e o trimetilsilano-imidazol (TMSI), que possuem mecanismo semelhante a reação de McKenna, porém o TMSI e TMSi não são tão efetivos para a retirada de grupos alquila e levam mais tempo para concluir a reação (HARSÁGI; KEGLEVICH, 2021).

## **2.7 Mecanismo das sondas propostas**

A inserção de um grupo fosfato na hidroxila livre permitirá que quando em contato com a PAP, haja a liberação da Resorufina livre ou do corante azo e assim a emissão de fluorescência, além de uma alteração colorimétrica também resultado da reação. A partir da reação de fosforilação seguida pela hidrólise do grupo etila pela reação de McKenna, e pelo potencial colorimétrico e fluorescente do corante Resorufina e colorimétrico do corante azo, pretende-se à síntese de sondas derivadas destes corantes que quando em contato com a enzima fosfatase ácida, gere uma alteração colorimétrica e emissão de fluorescência (Figura 10).

Estas sondas possuem vantagem em comparação com os kits disponível atualmente no mercado por seu mecanismo ser baseado apenas em uma reação enzimática, não necessitando de uma segunda ou terceira etapa de ativação da alteração colorimétrica/emissão de fluorescência, acontecendo de forma mais rápida e diminuindo os custos de reagentes necessários para a confecção deste novo kit. Dessa maneira permitindo a detecção da enzima com mais rapidez e viabilidade.

Figura 10. Mecanismo de detecção das sondas propostas.



Fonte: Autor (2023).

Portanto o presente trabalho tem como objetivo principal a criação de um kit colorimétrico e fluorescente, utilizando o corante azo e Resorufina junto com o grupo fosfato para a detecção da enzima fosfatase ácida prostática presente no sêmen. Dessa forma, após testado e validado, poderá contribuir como evidência forense em casos de violência contra a mulher, trazendo agilidade e rapidez para a elucidação destes casos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolvimento, otimização e validação de um *kit* colorimétrico/fluorescente, para análises qualitativas e semiquantitativas, aplicado à identificação de sêmen em crimes sexuais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- (i) Síntese das sondas colorimétricas/fluorescentes a partir do corante Resorufina e azo;
- (ii) Desenvolvimento, otimização, validação e aplicação dos *kits* baseados nas sondas sintetizadas em amostras reais;
- (iii) Distribuição dos kits para aplicação em situações reais por peritos da polícia científica e federal.

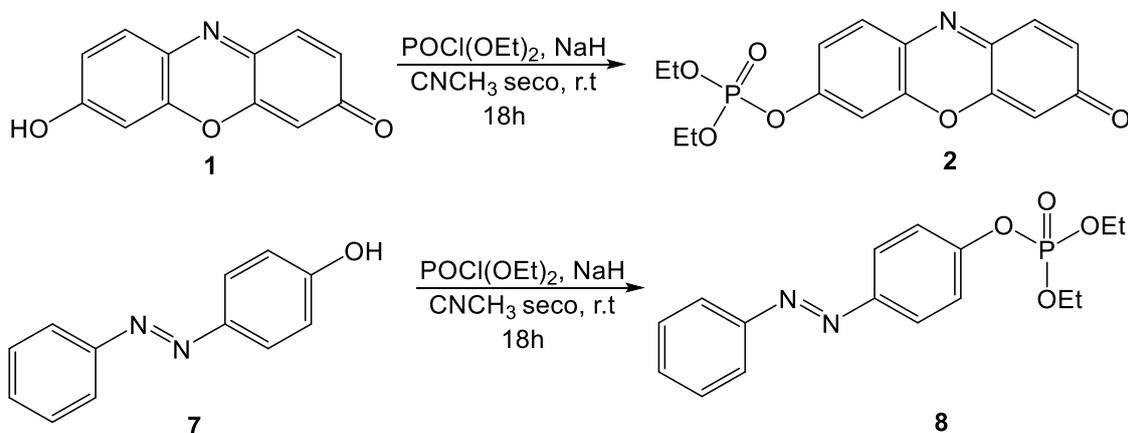
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Planejamento para a síntese

#### 4.1.1 Reação de fosforilação do corante Resorufina (1) e do corante azo (7)

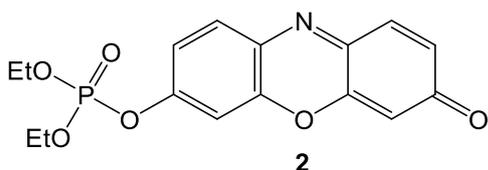
Para a reação de fosforilação (Figura 11), inicialmente em um balão volumétrico de 25 mL, foi adicionado o corante resorufina (1) ou o corante azo (7) (1 eq.) e hidreto de sódio 60% (2 eq.) diluídos em 5 mL de acetonitrila seca previamente tratada com pentóxido de fósforo. A mistura foi mantida em agitação durante 15 minutos sob uma atmosfera inerte. Em seguida é adicionado por gotejamento o clorofosfato de dietila (2 eq.) e deixada sob agitação por mais 18 horas. Após o término da reação, foi feita uma extração líquido/líquido 3x30 mL (AcOEt:H<sub>2</sub>O), a qual a fase orgânica foi coletada e levada a uma coluna cromatográfica clássica para isolamento do referido produto (2, 8) utilizando como fase móvel um gradiente de hexano e acetato de etila.

Figura 11. Esquema da reação de fosforilação do corante Resorufina (1) e do corante azo (7).



Fonte: Autor (2023).

#### 4.1.1.1 Dados e caracterização de Dietil(3-oxo-10,10a-di-hidro-3H-fenoxazin-7-il) fosfato (2)

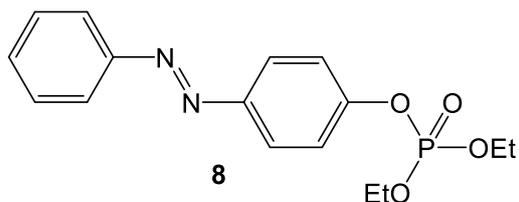


Sólido laranja cristalino; Rendimento 43%;

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,81 – 7,75 (*mdd*, 1H,  $J = 9,5; 0,8$  Hz, H-Ar); 7,43 (*d*, 1H,  $J = 9,9$  Hz, H-Ar); 7,26 – 7,23 (*m*, 2H, H-Ar); 6,87 (*dd*, 1H,  $J = 9,8; 2,0$  Hz, H-Ar); 6,34 (*d*, 1H,  $J = 2,0$  Hz, H-Ar); 4,34 – 4,22 (*m*, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ); 1,40 (*td*, 6H,  $J = 7,1; 1,0$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2$ ). (Apêndice 1)

RMN de  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  186,24; 153,66; 153,62; 149,31; 148,00; 144,67; 135,08; 134,78; 131,56; 130,68; 117,71; 117,67; 107,80; 107,27; 65,17; 16,08. (Apêndice 4)

#### 4.1.1.2 Dados e caracterização de (*E*)-dietil(4-(fenildiazenil)fenil)fosfato (**8**)



Óleo laranja; Rendimento 55%;

RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,94 (*dd*, 4H,  $J = 16,9, 8,2$  Hz, H-Ar); 7,56 – 7,49 (*m*, 3H, H-Ar); 7,39 (*d*, 2H,  $J = 8,6$  Hz, H-Ar); 4,32 – 4,24 (*m*, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ); 1,43 – 1,37 (*m*, 6H, 3 $\text{CH}_3$ ). (Apêndice 9)

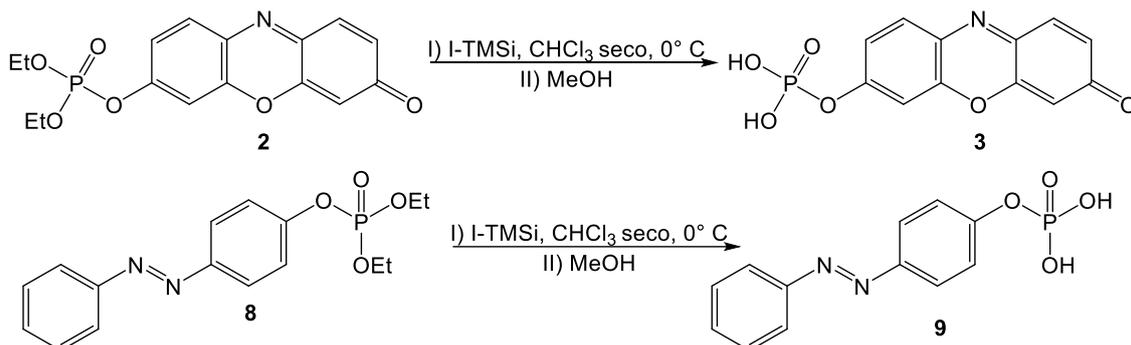
RMN de  $^{13}\text{C}$  (151 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152,79; 152,75; 152,58; 149,68; 131,02; 129,13; 129,09; 124,42; 122,83; 120,54; 120,50; 120,23; 64,83; 64,79; 16,11; 16,07. (Apêndice 10)

#### 4.1.2 Reação de desalquilação do grupo fosfato

Para a reação de desalquilação do grupo fosfato (Figura 12), inicialmente em um balão volumétrico de 25 mL, são adicionados o composto (**2**) ou o composto (**8**) (1 eq.) e o agente desalquilante iodeto de trimetilsilano (2,5 eq.) diluídos em 2 mL de clorofórmio seco previamente tratado com pentóxido de fósforo, e postos sob agitação em banho de gelo por duas horas. Em seguida, o

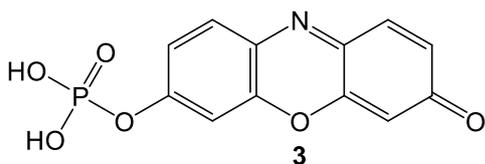
solvente é evaporado sob pressão reduzida e é adicionado 1 mL de metanol e postos sob agitação por uma hora. Após o término da reação ser constatado por CCD, é realizada uma coluna cromatográfica clássica utilizando carvão ativado e celite como fase estacionária e metanol como fase móvel. O produto resultante é triturado e lavado em éter etílico, rendendo o produto **3** e **9**.

Figura 12. Esquema da reação de desalquilação dos compostos intermediários **2** e **8**.



Fonte: Autor (2023).

#### 4.1.2.1 Dados e caracterização de 3-oxo-10,10a-di-hidro-3H-fenoxazin-7-il di-hidrogenofosfato (**3**)

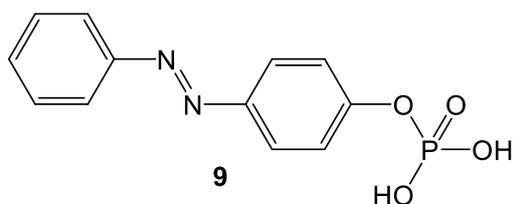


Sólido preto; Rendimento 65%;

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,86 (*d*, 1H,  $J = 8,3$  Hz, H-Ar); 7,56 (*d*, 1H,  $J = 9,5$  Hz, H-Ar); 7,36 – 7,23 (*m*, 2H, H-Ar); 6,83 (*d*, 1H,  $J = 9,2$  Hz, H-Ar); 6,32 (*s*, 1H, H-Ar). (Apêndice 5)

RMN de  $^{13}\text{C}$  (151 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  154,60; 152,39; 148,68; 131,79; 130,15; 129,92; 126,41; 124,56; 122,90; 121,88; 121,26; 121,23. (Apêndice 7)

#### 4.1.2.2 Dados e caracterização de (*E*)-4-(fenildiazenil)fenil dihidrogenofosfato (**9**)



Sólido preto; Rendimento 60%;

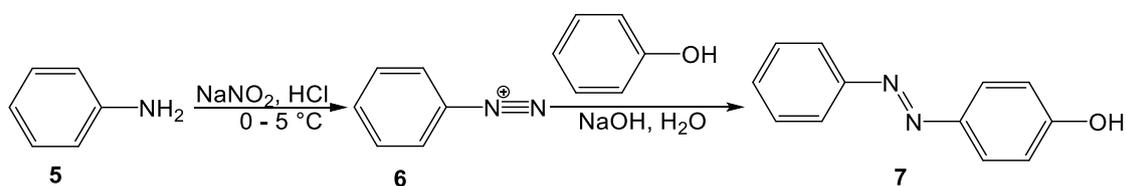
RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,91 (*dd*, 2H,  $J = 26,2; 7,4$  Hz; H-Ar); 7,63 – 7,56 (*m*, 2H, H-Ar); 7,37 (*d*,  $J = 6,7$  Hz; 1H). (Apêndice 11)

RMN de  $^{13}\text{C}$  (151 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  154,63; 154,59; 152,40; 148,69; 131,80; 130,01; 129,93; 124,57; 122,91; 121,27; 121,23; 120,75. (Apêndice 12)

#### 4.1.3 Reação de síntese do corante azo

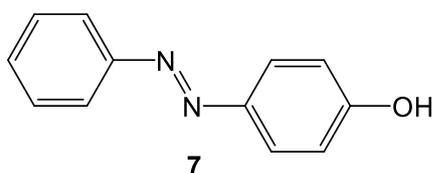
Para a síntese do corante azo (**7**) foi utilizada a rota descrita por Esezobor *et al.*, 2016 (Figura 13). Em um Erlenmeyer, anilina (1,23 mL, 10 mmol) foi diluída em uma solução de água destilada (8 mL) e HCl concentrado (8 mL) e mantida sob banho de gelo a 0 °C. Em seguida, esta mistura foi adicionada vagorosamente a uma solução aquosa (5 mL) de nitrito de sódio (1g, 15 mmol) para a formação do íon diazônio (**6**). Por fim, esta solução foi vagorosamente adicionada sob outro recipiente contendo fenol (15 mmol) dissolvido em uma solução (12 mL) de NaOH 10%, e mantida sob agitação por 30 minutos. O precipitado formado foi lavado com água destilada gelada e seco sob vácuo.

Figura 13. Esquema da rota de síntese do corante azo (**7**)



Fonte: Autor (2023).

##### 4.1.3.1 Dados e caracterização de (*E*)-4-(fenildiazenil)fenol (**7**)



Sólido marrom; Rendimento 90%;

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,92 – 7,84 (*m*, 4H, H-Ar); 7,54 – 7,40 (*m*, 3H, H-Ar); 6,95 (*d*, 2H,  $J = 8,8$  Hz, H-Ar); 5,41 (*s*, 1H, OH). (Apêndice 8)

#### 4.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para o acompanhamento das reações foram utilizadas placas de cromatografia em camada delgada (CCD) constituídas por sílica Gel 60 com 0,25 mm de espessura, e reveladas por luz emissora de radiação ultravioleta (UV) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 254 e 365 nm ou por vapor de iodo.

#### 4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ )

Os espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) foram adquiridos em equipamentos Brüker<sup>®</sup>, em modelos avance DRX 400 e 600 MHz – UltraShield<sup>®</sup>, utilizando como solvente deuterados  $\text{CDCl}_3$  para o composto **2** e  $\text{DMSO-d}_6$  para o composto **3**. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram computados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram computadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram instituídas da seguinte maneira: simpleto (*s*), simpleto largo (*sl*), duplete (*d*), tripleto (*t*), quarteto (*qua*), quinteto (*qui*) e multiplete (*m*).

#### 4.4 Procedimento experimental para os ensaios de bioanalíticos

##### 4.4.1 Reagentes e preparo das soluções

O preparo da solução tampão fosfato de sódio foi realizado a partir do reagente  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Vetec<sup>®</sup>), na concentração de 100 mM e em pH 8. Para o tampão acetato de sódio foi utilizado o reagente  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$  (Vetec<sup>®</sup>), na concentração de 200 mM em pH 5. Para o citrato de sódio, o reagente  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  (Synth<sup>®</sup>) na concentração de 400 mM em pH 5,5. O pH dos tampões foi ajustado utilizando soluções de  $\text{HCl}$  0,1 M (Merck<sup>®</sup>) ou  $\text{NaOH}$  0,1 M (Vetec<sup>®</sup>). A solução tampão Britton-Robinson (pH 6 - 10) foi preparada a partir da mistura de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Merck<sup>®</sup>),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Dinâmica<sup>®</sup>) e  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) na concentração de 10 mM.

Os espectros de absorção foram realizados em um espectrofotômetro Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) de duplo feixe equipado com cubetas de

quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 4 mL. Os estudos de fluorescência molecular foram realizados em um espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC, Japão) equipado com uma lâmpada de xenônio de 150 W. Utilizou-se ainda uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 4 mL.

Os ajustes de pH foram realizados em um medidor de pH Gehaka (modelo PG 1800, Brasil). As massas dos reagentes foram medidas em uma balança Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg para medidas  $\geq 10$  mg e em uma balança analítica Mettler Toledo (AG245, EUA) com precisão de 0,01 mg (massa  $< 10$  mg).

#### **4.4.2 Estudo da otimização do intervalo de pH para melhor resposta fluorimétrica**

Para definir qual intervalo de pH seria ideal para a identificação da Resorufina, visto que esta é o produto final da reação da sonda com a enzima, foram feitas soluções sob a concentração de 10  $\mu\text{M}$  da sonda **3** e em intervalos de pH 5-9. Por fim, determinando em qual intervalo de pH seria melhor para a detecção da sonda. Para identificar o pH ideal para a enzima, foi realizado um estudo similar com soluções com o intervalo de pH entre 4,5 e 6 com 10  $\mu\text{M}$  da sonda **3**. Determinando ao final o pH ideal para a ação da enzima.

#### **4.4.3 Estudo da interação da enzima fosfatase com a sonda 3**

Para análise desta interação, foi realizada uma curva com soluções a 10  $\mu\text{M}$  da sonda **3** e concentrações de 0,5-4,5  $\text{U L}^{-1}$  da enzima fosfatase ácida isolada da batata (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), em 100  $\mu\text{L}$  da solução tampão citrato em pH 5,5 com tempo de incubação de trinta minutos, seguido diluição com tampão fosfato a 100 mM em pH 8 para o volume final de 2 mL.

#### **4.4.4 Estudo da sonda 3 em amostras reais de sêmen**

Este estudo foi realizado com permissão do Comitê de Ética da UFAL (57998116.8.0000.5013) para amostras biológicas e futuramente pretende-se que realizar ensaios em conjunto com a Perícia Oficial de Alagoas. Foram feitas soluções de 4 mL a partir de amostras de sêmen diluídas em tampão citrato a 400 mM em pH 5,5 nas proporções de 0,2; 0,4; 1; 2 e 10% (v/v), onde em cada uma foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de uma solução a 200  $\mu\text{M}$  da sonda **3**.

#### 4.4.5 Estudo com inibidores de fosfatase

Os ensaios com inibidores da fosfatase ácida foi realizado a partir de três inibidores clássicos da enzima, o molibdato de sódio, tungstato de sódio e fluoreto de sódio. Para isso, foram utilizadas 5 U L<sup>-1</sup> da fosfatase (em tampão citrato de sódio 40 mM, pH 5,5) seguido da incubação com cada inibidor por uma hora e pôr fim a adição de 10 µM da sonda 3 seguido por mais 30 minutos de incubação. Este experimento foi realizado em duplicata ( $n = 2$ ) e o IC<sub>50</sub> calculado através do gráfico de intersecção pelo eixo da ordenada (% inibição) e abscissa (concentração do inibidor).

#### 4.4.6 Determinação das figuras de mérito e limite de detecção (LOD)

As curvas analíticas foram construídas com o mínimo de cinco pontos de acordo com a equação:  $IF = a \times C_{FA} + b$  onde IF é o valor de intensidade de fluorescência,  $C_{FA}$  a concentração de fosfatase ácida,  $a$  é o coeficiente angular da curva analítica e  $b$  o coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) para a curva analítica também foi calculado visando avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear.

O limite de detecção (LOD), que é a quantidade de analito que poderá ser diferenciada do ruído instrumental em cada método, sendo calculado por meio da fórmula:  $LOD = (m_B + 3 \times s_B) / a$ , sendo  $n = 10$ , sendo  $s_B$  o desvio padrão do branco analítico e  $m_B$  a média do branco analítico,  $a$  é o coeficiente angular da curva analítica. Já o desvio padrão relativo (RSD) foi calculado por meio da relação,  $RSD = (s_P / x_P) \times 100\%$ , onde  $s_P$  é o desvio padrão a um determinado nível de concentração de um padrão, no caso 1, 2,5 e 4 U L<sup>-1</sup> da enzima, e  $x_P$  é valor médio encontrado para o ponto da curva.

#### 4.4.7 Tratamento dos dados

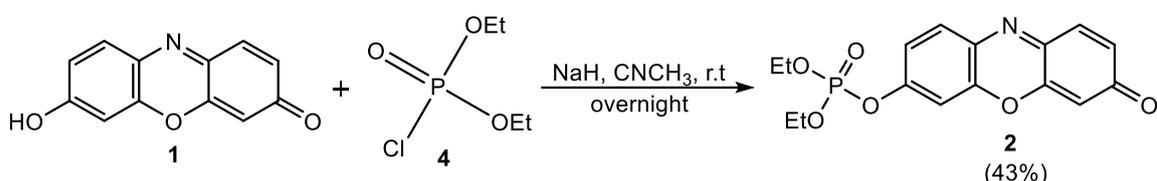
O tratamento estatístico dos resultados foi realizado utilizando o programa OriginLab versão 9.0 (Northampton, USA). Nas etapas de otimização dos diferentes parâmetros analíticos, o sinal defluorescência do branco analítico foi empregado como referência para seleção da melhor condição.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Síntese das sondas 3 e 9

Para a reação de fosforilação, inicialmente foi necessária a adaptação das condições reacionais relatadas por Biswas *et al.*, 2017. Portanto, foi utilizada acetonitrila seca como solvente e hidreto de sódio para a primeira etapa da reação, dada pela abstração do hidrogênio da hidroxila fenólica, seguida da adição do clorofosfato de dietila (**4**) para a fosforilação e formação do composto **2**. Esta metodologia foi efetiva para a síntese do composto sendo obtido rendimento moderado 43% (Figura 14).

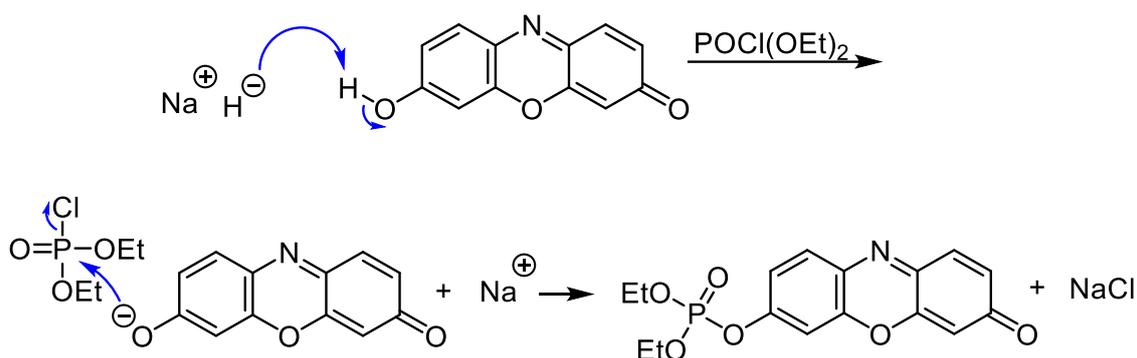
Figura 14. Esquema de síntese do composto **2** via reação de fosforilação.



Fonte: Autor (2023).

Outra alternativa para esta reação, é a utilização da base *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) para a etapa inicial de abstração do hidrogênio da hidroxila fenólica, também sendo efetiva para esta função, visto que tanto o NaH quando a DIPEA atuam como bases de Brønsted-Lowry capturando prótons. Porém, como o hidreto de sódio possui uma basicidade mais forte, a sua captura se torna mais efetiva, o que gerou reações com rendimento maior quanto. O mecanismo de reação está relatado na Figura 15, e consiste inicialmente pela abstração do hidrogênio da hidroxila fenólica, seguido pelo ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio no átomo de fósforo do grupo fosfato, liberando o átomo de cloro como um bom grupo de saída e assim formando a ligação fósforo-oxigênio.

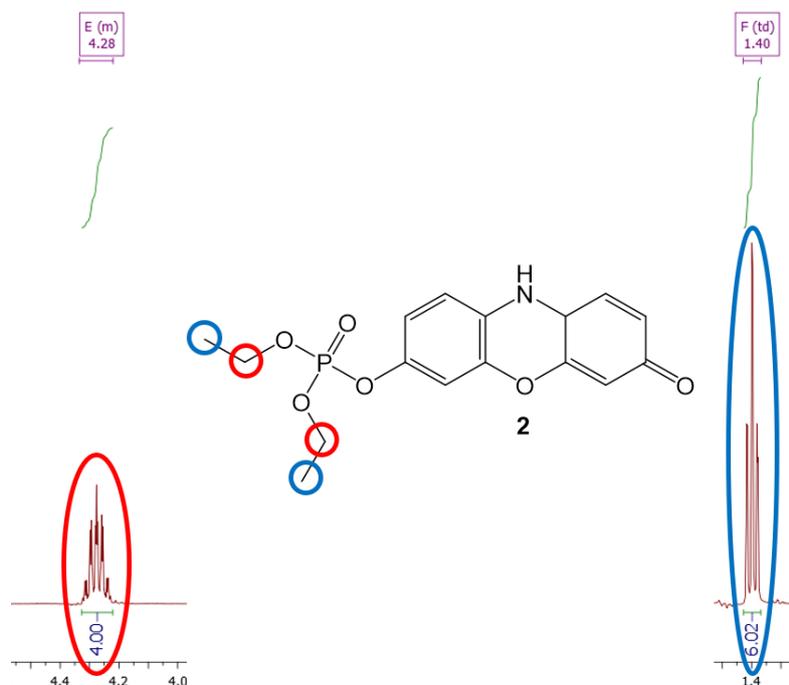
Figura 15. Mecanismo proposto da reação de fosforilação.



Fonte: Adaptado de OSONGA *et al.*, 2017.

Através da caracterização estrutural feita por ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi possível notar que para o composto **2** apresentou os sinais característicos do grupo etila proveniente do reagente de fosforilação (clorofosfato de dietila), sendo um multipletto em torno de 4,28 ppm referente aos dois metilenos ( $\text{CH}_2$ ), e um triplete em torno de 1,40 ppm referente as metilas ( $\text{CH}_3$ ) (Figura 16, Apêndice 2).

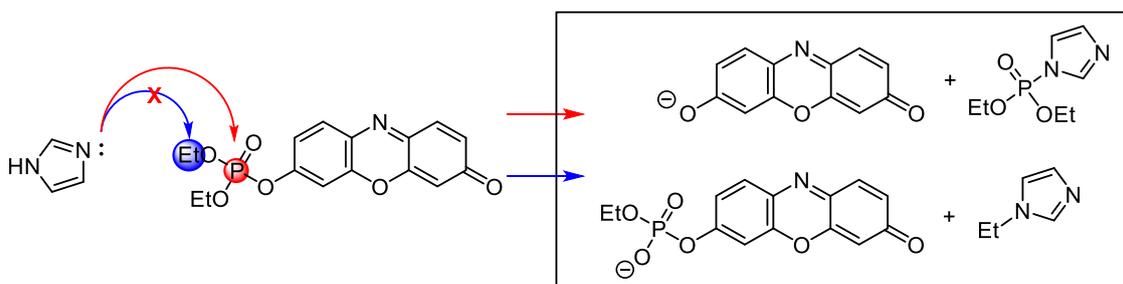
Figura 16. Sinais referente aos grupos etila no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Fonte: Autor (2023).

A segunda reação consiste na hidrólise ou desalquilação. Inicialmente foi utilizado o agente trimetilsilil-imidazol para a retirada das cadeias alifáticas do grupo fosfato, entretanto a reação não foi efetiva para a formação do produto, visto que o nitrogênio do heterociclo imidazol pode realizar o ataque em dois possíveis lugares em ésteres de fosfato. O primeiro lugar é no carbono alifático, sendo este o caminho almejado para a formação do produto desejado. A segunda possibilidade de ataque seria o átomo de fósforo, que através do mecanismo irá remover o grupo fosfato inteiro da molécula (Figura 17) (SILVA, V.; ORTH, 2019). Embora as condições reacionais favorecessem o primeiro ataque, foi observada a preferência pela remoção do grupo fosfato, reestabelecendo a resorufina. O produto secundário foi constatado através de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Figura 17. Possibilidades de ataque do agente Imidazol-TMSi.



Fonte: Adaptado de SILVA; ORTH, 2019.

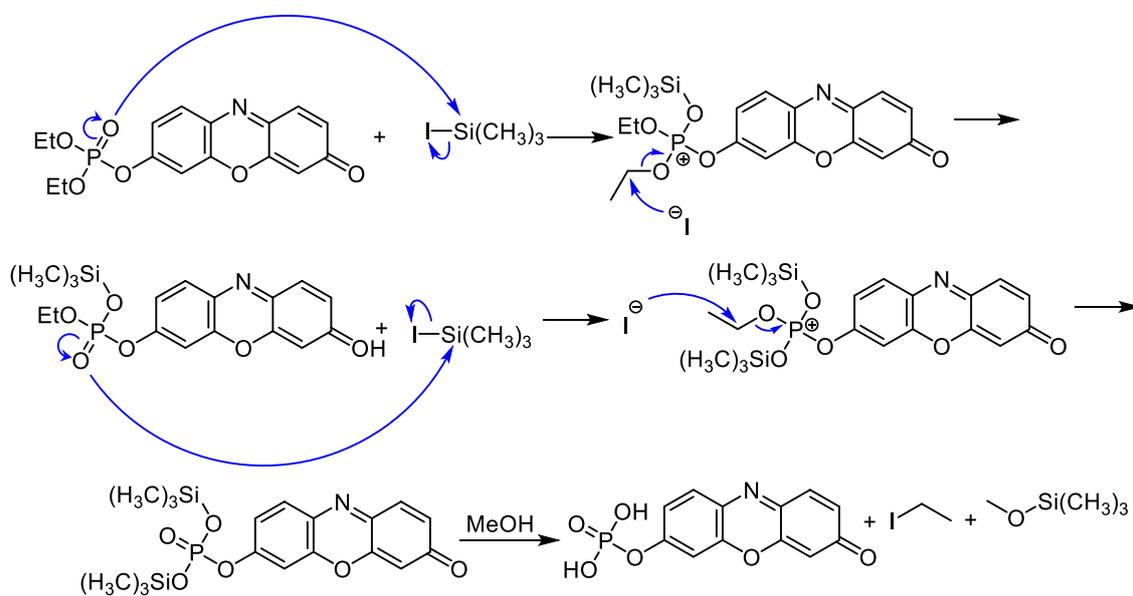
Ao contrário do anterior, o agente iodeto de trimetilsilano, demonstrou melhores resultados na formação do composto **3**. Acompanhando a reação por CCD, foi constatado o consumo do produto **2** em duas horas de reação, sendo necessária mais uma hora sob agitação com o solvente metanol para a inserção das hidroxilas.

Para a purificação do composto **3** inicialmente foi feita uma coluna cromatográfica clássica utilizando sílica como fase estacionária, porém, este método não foi efetivo para o isolamento devido uma aparente degradação do produto quando observada por cromatografia em camada delgada (CCD). Desse modo, outras alternativas foram testadas, como a neutralização prévia da sílica e a utilização de uma sílica básica (pH 8,4), no entanto, sem sucesso.

A melhor alternativa para o isolamento de **3** foi realizar uma coluna cromatográfica clássica de cerca de 5 centímetros utilizando como fase estacionária uma mistura de celite e carvão ativado e MeOH como fase móvel. Em seguida foi necessária uma lavagem recorrente com éter dietílico gelado para retirada dos resquícios de impurezas, obtendo por fim um pó amorfo preto com rendimento de 65%.

O mecanismo desta etapa de desalquilação foi proposto por Blackburn e Ingleson (1978), semelhante à Reação de McKenna (MCKENNA *et al.*, 1977), utiliza o brometo de trimetilsilano para a remoção das cadeias alifáticas do grupo fosfato, conforme pode ser observado na Figura 18.

Figura 18. Mecanismo proposto de desalquilação do grupo fosfato.



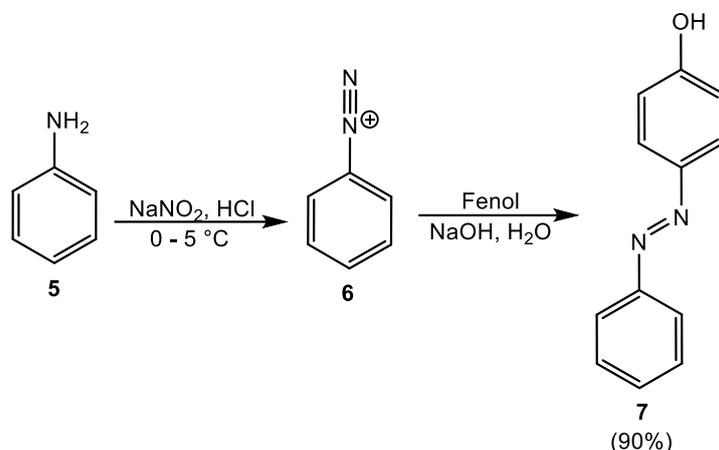
Fonte: Adaptado de BLACKBURN; INGLESON, 1978.

### 5.1.1 Síntese do corante azo (**7**)

A síntese de compostos azo já é bem relatada na literatura (ESEZOBOR *et al.*, 2016), desse modo, a síntese do composto **7** foi executada de maneira efetiva e com altos rendimentos (>90%) a partir da reação de formação do sal diazônio. Esta síntese é dada inicialmente pela reação da anilina (**5**) com nitrito de sódio em meio ácido para a formação do íon diazônio, seguida da reação de substituição eletrofílica aromática com fenol, produzindo assim **7** (Figura 19). A caracterização estrutural foi feita por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio, onde apresentou todos os sinais característicos da região dos

aromáticos do referido composto, conciliando com o que se encontra na literatura.

Figura 19. Esquema de síntese do composto **7**.



Fonte: Autor (2023).

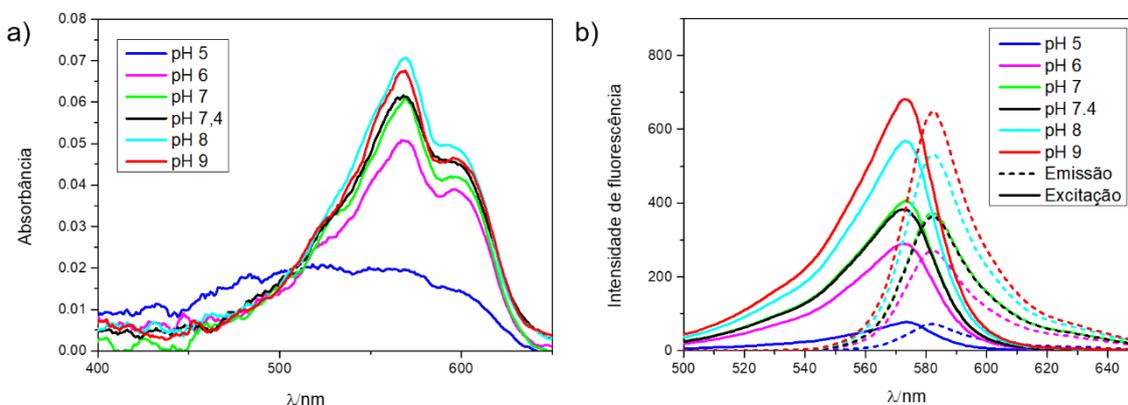
## 5.2 Otimização das condições para a sonda **3**

Para definir o melhor intervalo de pH para detecção da resposta enzimática da sonda **3**, foi utilizando o corante Resorufina, visto que este é o produto final da reação entre a sonda e a PAP; sendo, portanto, utilizado na otimização dos ensaios bioanalíticos.

No espectro de absorvância (Figura 20a) foi observado que a Resorufina possui maior capacidade de absorção no intervalo de 571 a 585 nm, resultado já observado por Silva et al. (2016). A concentração inicial do corante foi de 10 µM, analisada em diferentes intervalos de pH por técnica de fluorescência molecular. Nos espectros de emissão e excitação na Figura 20b, foi observado maior intensidade de fluorescência em pH superior a 7, sendo considerado o pH 8 como ideal para a detecção da Resorufina nos dois ensaios.

Como relatado por Bueno et al. (2002), esta preferência pelo meio alcalino está relacionada à Resorufina estar em sua forma iônica em pH >7, havendo um alto rendimento quântico em meios neutros e básicos. Outros autores como Zhang et al. (2012) e Yoshiya et al. (2015) também desenvolveram sondas fluorescentes a partir da Resorufina em seus trabalhos, também constatando o pH 8 como o ideal para a detecção do corante.

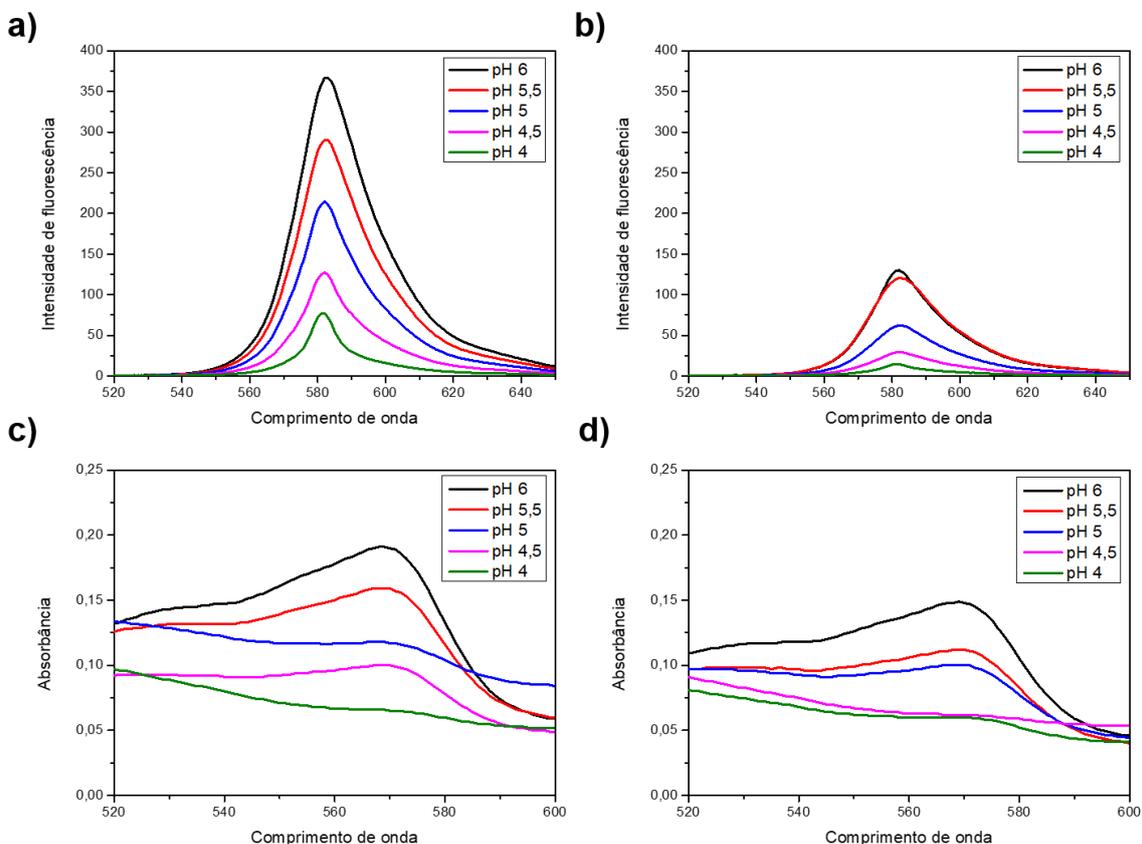
Figura 20. a) Espectro de absorção em diferentes pH 5 - 9; b) Espectro de excitação e emissão do corante Resorufina em diferentes valores de pH;  $\lambda_{ex/em} = 572/580$  nm.



Fonte: Autor (2023).

Embora ainda exista uma discussão sobre o valor exato de pH ideal para a PAP exercer a clivagem de substratos, sabe-se que a faixa entre 4,5 e 6 apresenta os melhores resultados (HAUSMANN; ALLEN, 2010). Tagad e Sabharwal (2018) definem que o pH 5 é ideal para a ação da enzima, o que combina com o ponto isoelétrico da enzima (pH em que a carga líquida é igual a zero), que apresenta-se em torno de 5.6 (BASHA, 1984). Adicionalmente, a alteração do pH pode afetar na resposta fluorimétrica pela mudança no rendimento quântico dado pela protonação ou desprotonação de grupos ionizáveis da Resorufina (ÇAKIR; ARSLAN, 2010). Nesse sentido, foi avaliado o efeito do pH na intensidade de fluorescência e na absorbância (Figura 21) utilizando uma quantidade fixa da PAP de  $2 \text{ U L}^{-1}$  ou sêmen diluído em 250 vezes (v/v) junto com  $10 \mu\text{M}$  da sonda **3**.

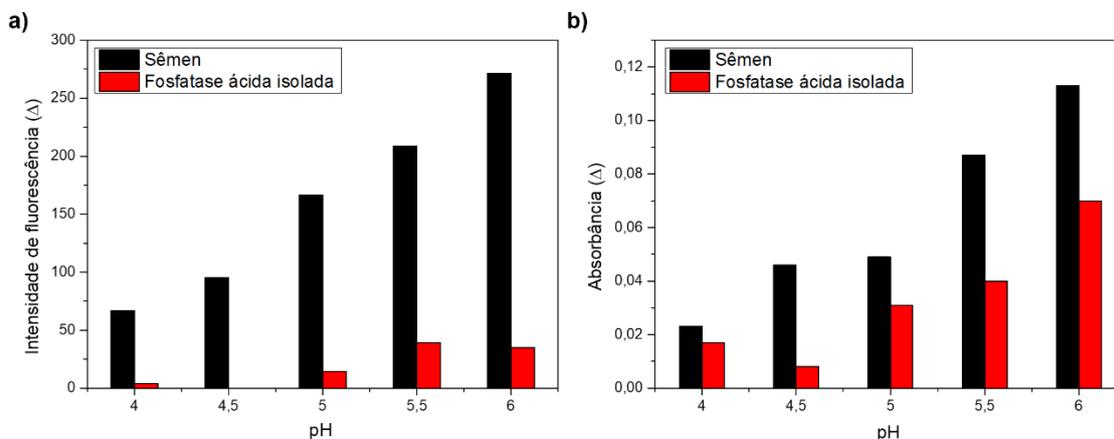
Figura 21. Espectro de emissão de fluorescência em diferentes valores de pH empregando amostra de sêmen (a) e fosfatase ácida isolada (b); Espectro de absorção em meio ácido com sêmen (c) e fosfatase ácida isolada (d). Condições: [3] = 10  $\mu$ M; amostra de sêmen a 0,125% (v/v); fosfatase ácida = 2 U L<sup>-1</sup>; [tampão acetato] = 40 mM;  $\lambda_{em}$  = 580 nm.



Fonte: Autor (2023).

A análise utilizando sêmen obteve maiores valores que a enzima isolada, isso se deve pela quantidade significativamente superior da fosfatase ácida presente no sêmen, o que torna mais rápida a conversão de toda sonda presente na solução em Resorufina, ao contrário da solução preparada com apenas 2 U L<sup>-1</sup> da enzima isolada. Nota-se que em pH 6, apresentou maior intensidade de fluorescência e de absorbância, porém, quando avaliada a fluorescência a partir da enzima isolada não houve uma diferença significativa entre o pH 5,5 e 6 (Figura 22). Desta forma, procurando não fugir dos dados já reportados por outros autores, foi escolhido o pH 5,5 para os testes seguintes como condição ideal para a ação da enzima.

Figura 22. Variação na intensidade de fluorescência (a) e absorbância (b) para cada intervalo de pH.

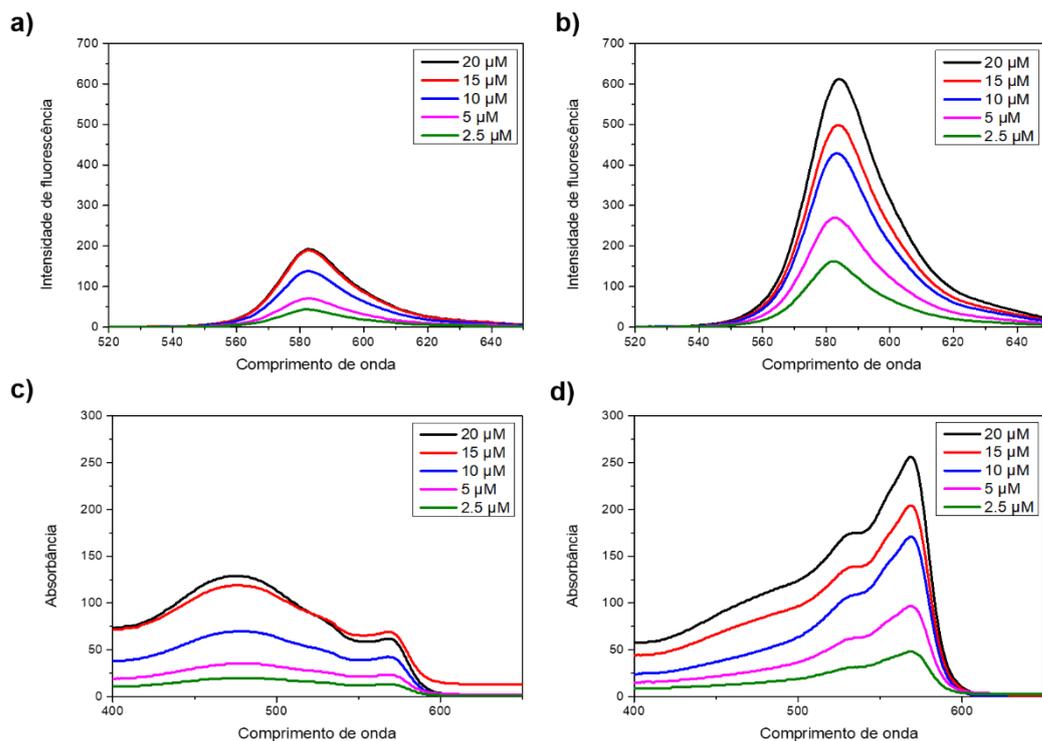


Fonte: Autor (2023).

Para definir a concentração a ser utilizada nos testes seguintes, foi feito um teste avaliando a concentração da sonda **3** na intensidade de fluorescência e na absorbância utilizando  $6 \text{ U L}^{-1}$  de fosfatase ácida. A concentração de  $20 \text{ } \mu\text{M}$  de sonda apresentou maior intensidade de fluorescência e absorbância em pH 8, o que indica que em trinta minutos de incubação pelo menos mais do que  $15 \text{ } \mu\text{M}$  da sonda foi convertida. Esta diferença não ocorreu em pH 5,5, onde as concentrações de  $20$  e  $15 \text{ } \mu\text{M}$  obtiveram valores semelhantes. Portanto, a concentração de  $10 \text{ } \mu\text{M}$  foi escolhida para os testes futuros, pois apresentou melhor relação concentração/fluorescência entre as concentrações avaliadas, não variando mais que 50% que a maior concentração.

Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência demonstrando o efeito do da concentração da sonda em pH 5,5 (a) e 8 (b). Espectros de UV-vis demonstrando

o efeito da concentração da sonda em pH 5,5 (c) e 8 (d). Condições: pH = 5,5; [Tampão acetato] = 40 mM; [Tampão citrato] = 40 mM;  $\lambda_{em}$  = 580 nm.

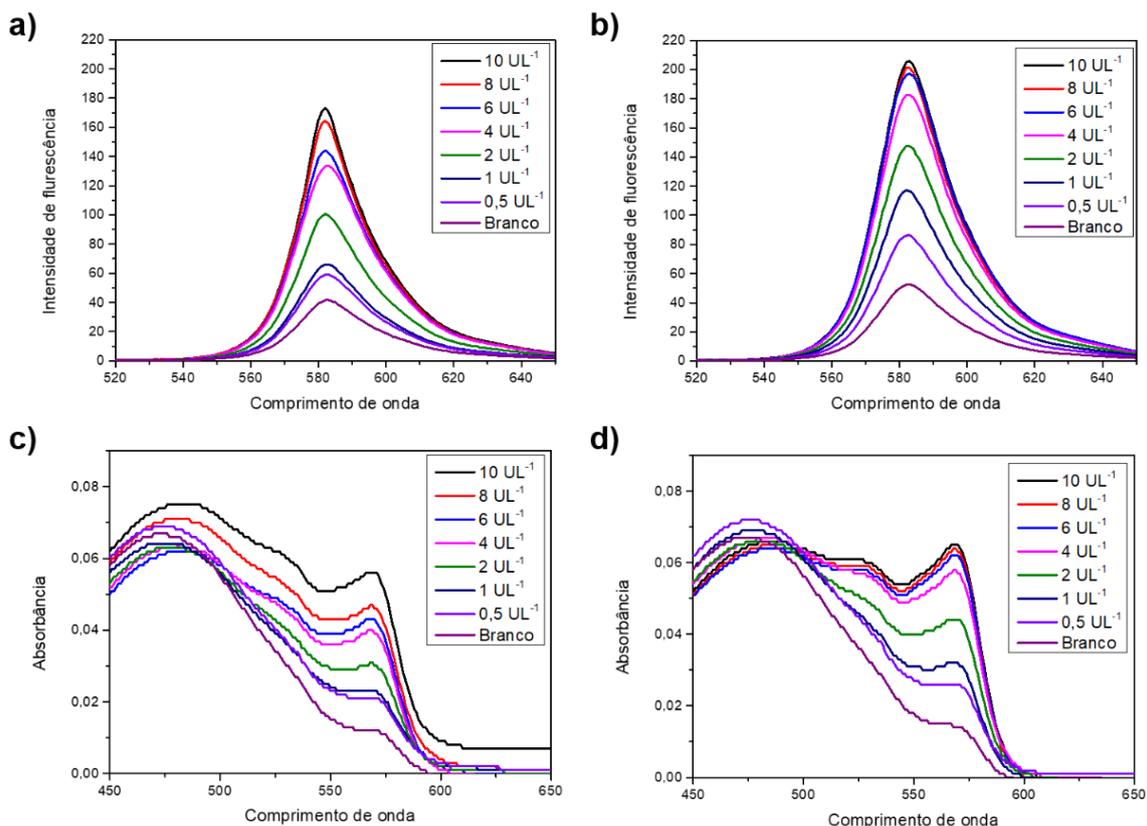


Fonte: Autor (2023).

Para o estudo do tipo do tampão, foram selecionados os tampões acetato de sódio ( $pK_a = 4,7$ ) e citrato de sódio e citrato de sódio ( $pK_{a3} = 6,4$ ), que apresentam capacidade máxima tamponante  $\pm 1$  do pH definido. Dessa forma, foi observado qual apresentaria melhor resposta analítica. O resultado desta avaliação encontra-se na Figura 24.

Figura 24. Espectros de emissão de fluorescência demonstrando o efeito do tampão acetato (a) e citrato (b). Espectros de UV-vis demonstrando o efeito do

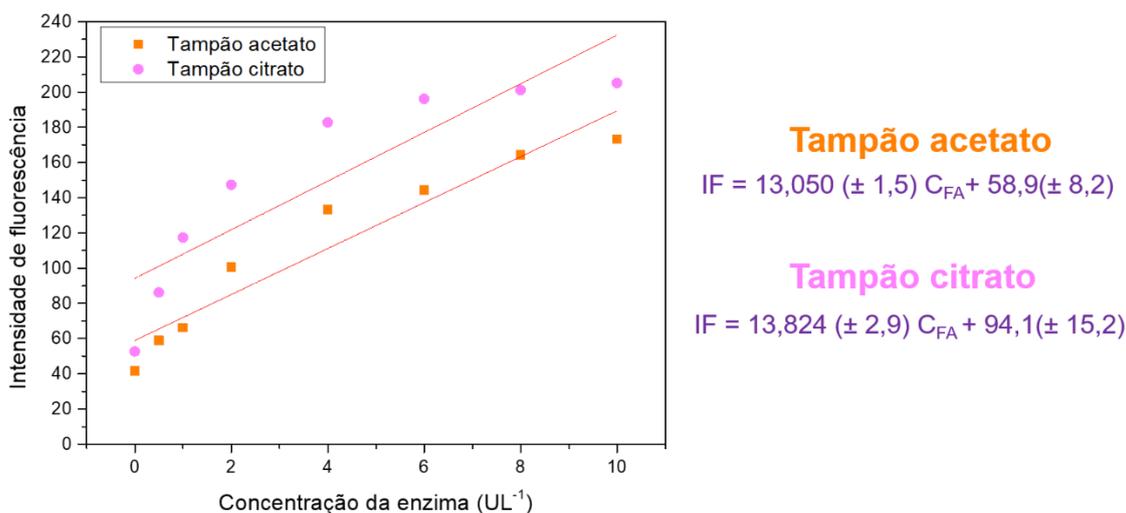
tampão acetato (c) e citrato (d). Condições: pH = 5,5; [3] = 10  $\mu$ M; [Tampão acetato] = 40 mM; [Tampão citrato] = 40 mM;  $\lambda_{em}$  = 580 nm.



Fonte: Autor (2023).

A escolha do tampão adequado é importante para o garantir o funcionamento da enzima, mantendo em condições ideais para a clivagem e evitando alterações estruturais que influenciem na sua resposta enzimática (SU *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2012). O efeito do tampão citrato de sódio foi mais evidente que o tampão acetato de sódio (Figura 25), onde em todas as concentrações de enzima utilizadas na curva houve uma variação de 15 a 43% entre os tampões, corroborando com os dados encontrados por López *et al.* (2007) que também definiu o tampão citrato como ideal.

Figura 25. Curva analítica demonstrando o efeito do tampão em pH 5,5 a 40 mM na intensidade de fluorescência.



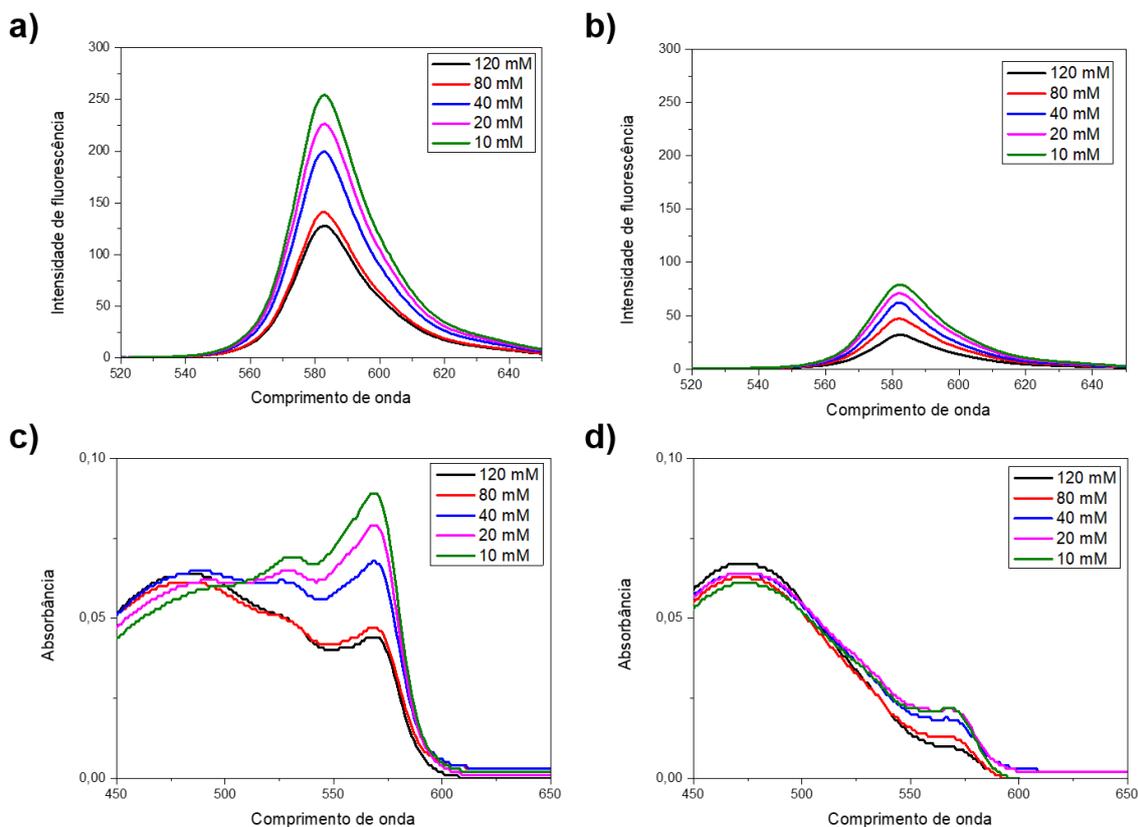
Fonte: Autor (2023).

Pela análise das equações da reta geradas pela curva analítica, ambas as curvas apresentam inclinação da reta semelhantes, e, portanto, a apresentam coeficientes angulares próximos. Porém, o tampão citrato apresentou um coeficiente linear maior que o tampão acetato, indicando uma maior sensibilidade à intensidade de fluorescência dado pelo eixo das ordenadas do gráfico.

A concentração da solução tampão também influencia o desempenho do método, podendo alterar o pH de modo que afete na fluorescência da sonda (REACH DEVICES., 2021). Dessa forma, buscando manter a capacidade tamponante e a melhor resposta do tampão, foi feita a análise utilizando concentrações de 10, 20, 40, 80, 120 mM do tampão citrato em pH 5,5, utilizando uma concentração fixa da PAP de 5 U L<sup>-1</sup> (Figura 26) e também comparando os resultados com o tampão acetato em pH 5,5 e fosfato em pH 8 (Figura 27).

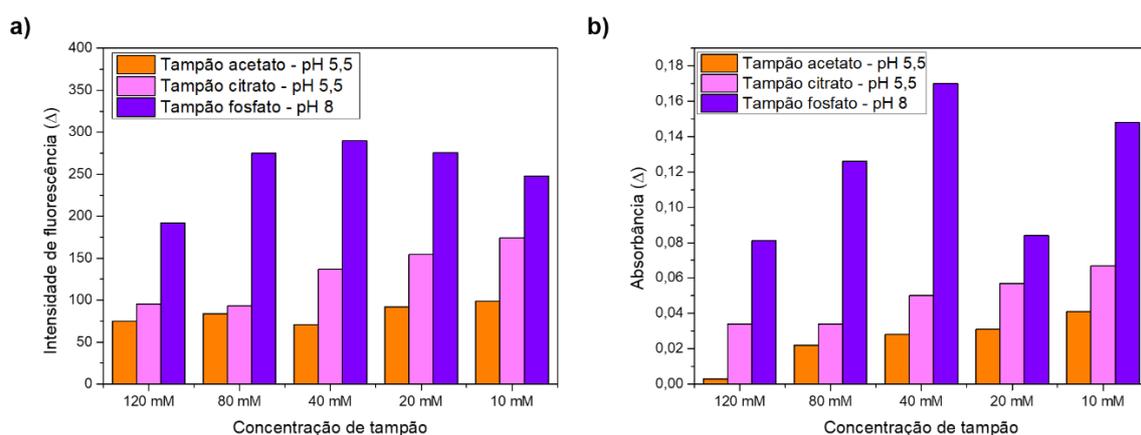
Figura 26. Efeito da concentração do tampão citrato na emissão de fluorescência da sonda **3** (a) e branco (b); Efeito da concentração do tampão citrato na

absorbância da sonda **3** (c) e branco (d). Condições: pH= 5,5; [sonda]= 10  $\mu\text{M}$ ; fosfatase ácida = 5  $\text{U L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{em}}$ = 580 nm.



Fonte: Autor (2023).

Figura 27. Comparação da variação de fluorescência (a) e absorbância (b) em os tampões acetato, citrato e fosfato.



Fonte: Autor (2023).

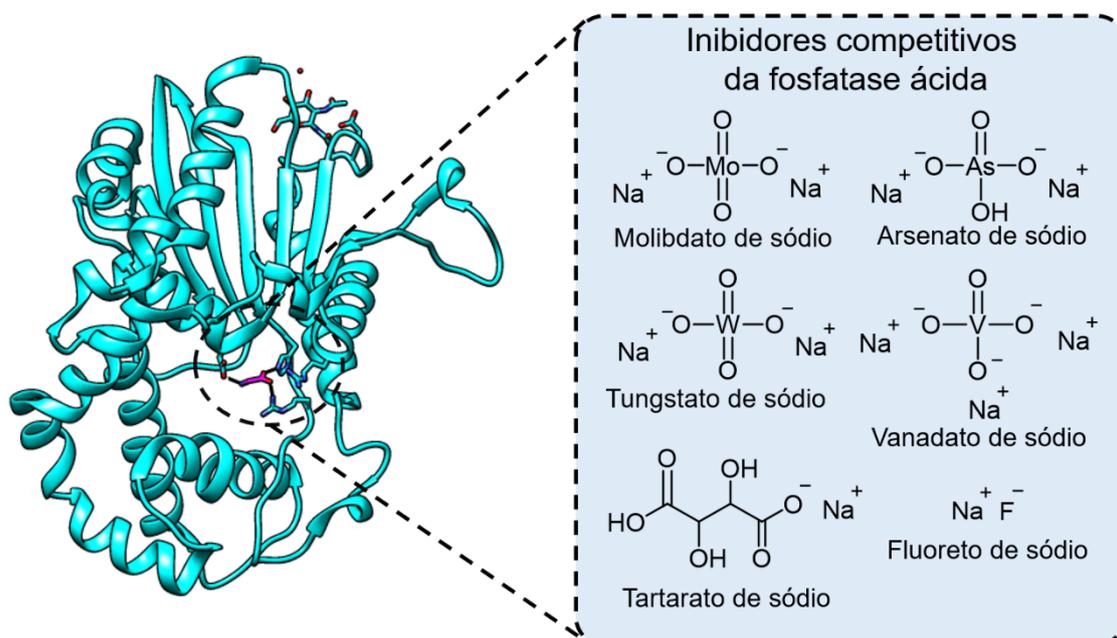
Para o tampão acetato, a variação da concentração não gerou diferenças significativas quanto a intensidade de fluorescência, enquanto que para o

tampão citrato, houve um pequeno aumento a partir da concentração de 40 mM, tanto para fluorescência quanto para absorvância (Figura 27). Para o tampão fosfato, a concentração de 40 mM apresentou maior sensibilidade de fluorescência e absorvância. Dessa forma, a concentração de 40 mM foi definida para os próximos testes.

### 5.3 Testes com inibidores de fosfatase ácida

A fosfatase ácida possui inibidores relatados na literatura que agem de forma competitiva se ligando ao sítio ativo da enzima e impedindo a ligação com o substrato. Entre estes inibidores, destacam-se os ânions molibdato, tartarato, arsenato, vanadato, tungstato e fluoreto (Figura 28). Estes inibem de forma competitiva pois são análogos estruturais do grupo fosfato (exceto tartarato e fluoreto) e se ligam de forma efetiva no sítio de ação da fosfatase, impedindo a clivagem de substratos (BERNARD *et al.*, 2002; SZALEWICZ *et al.*, 2003).

Figura 28. Inibidores competitivos da fosfatase ácida (PDB: 1CVI).

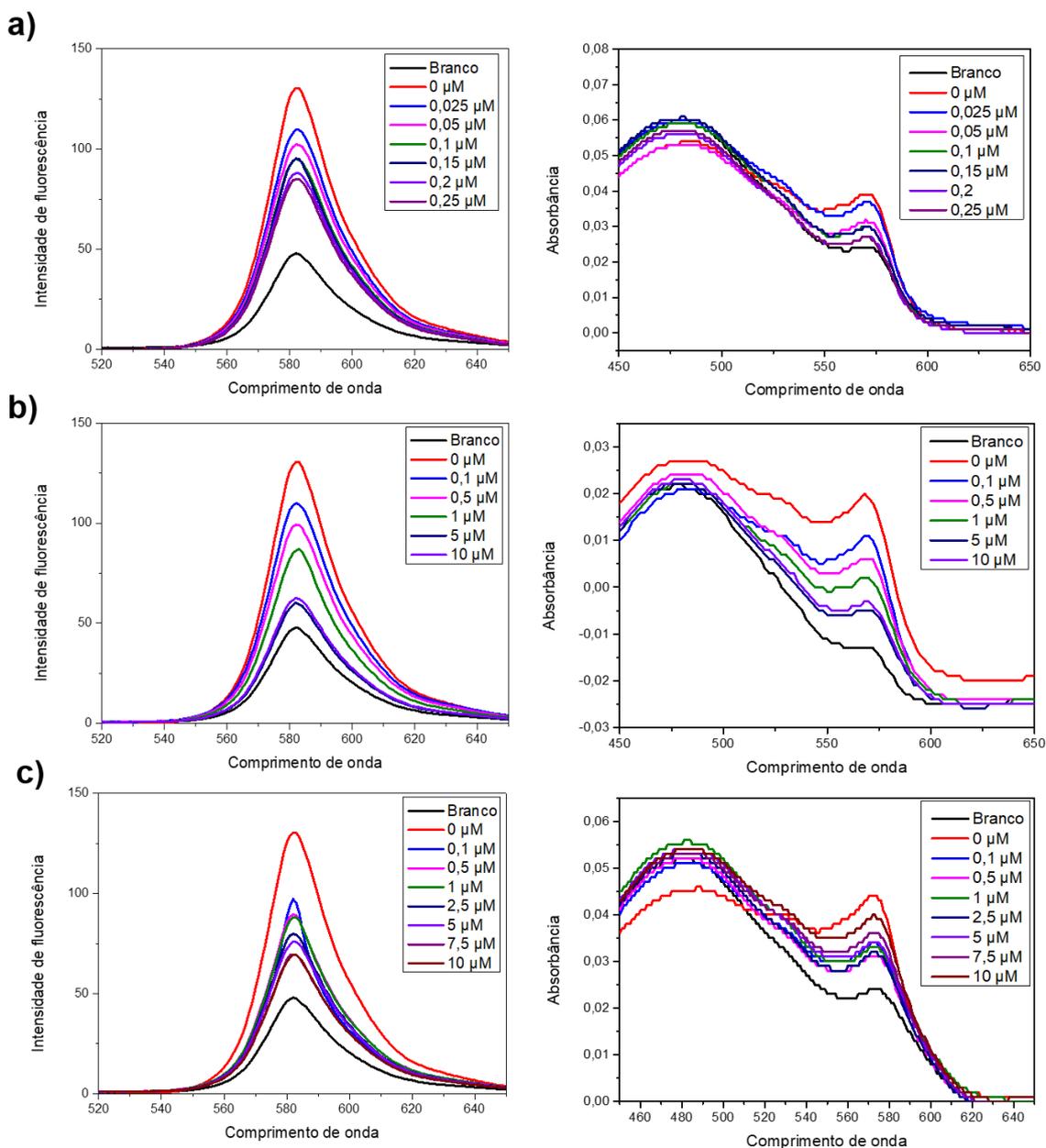


Fonte: Autor (2023).

A avaliação da fluorescência e da absorvância com concentrações dos inibidores molibdato de sódio, fluoreto de sódio e tungstato de sódio foi realizada, onde uma redução da intensidade de fluorescência indicaria que a conversão da sonda **3** em Resorufina é causada pela PAP. Para o molibdato de sódio foi utilizado um intervalo de concentração entre 0,025 - 0,25  $\mu\text{M}$ , enquanto

que foi escolhida a faixa de 0,1 - 10  $\mu\text{M}$  para o fluoreto de sódio e tungstato de sódio. Para esta análise foi usada a concentração de 5  $\text{U L}^{-1}$  da PAP e 10  $\mu\text{M}$  da sonda **3** (Figura 29).

Figura 29. Efeito da concentração dos inibidores molibdato de sódio (a), fluoreto de sódio (b) e tungstato de sódio (c) na intensidade de fluorescência e absorvância. Condições:  $\text{pH} = 5,5$ ; [sonda] = 10  $\mu\text{M}$ ; fosfatase ácida = 5  $\text{U L}^{-1}$ ; [Tampão citrato] = 40  $\text{mM}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ .



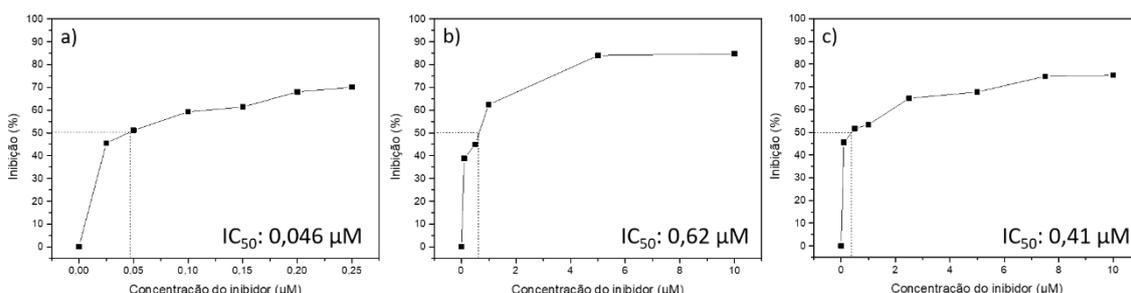
Fonte: Autor (2023).

Foi observado que há uma relação inversamente proporcional entre a concentração dos inibidores e a intensidade de fluorescência ou absorvância.

Esses dados possibilitam cálculo de  $IC_{50}$  para cada inibidor usando o gráfico de intersecção entre a porcentagem de inibição (considerando 100% inibido como o valor da intensidade de fluorescência do branco) e a concentração utilizada.

Como demonstrado por Olczak; Morawiecka; Watorek (2003) e Lindqvist; Schneider; Vihko (1994), estes compostos são considerados inibidores potentes da fosfatase ácida, com valores de  $K_i$  da ordem de 10 nM o que relaciona com os baixos valores de  $IC_{50}$  relatados na literatura. Portanto, para os três inibidores foi calculado  $IC_{50}$  menor que 1  $\mu M$ , sendo de 0,046  $\mu M$  para o molibdato de sódio, 0,62  $\mu M$  para o fluoreto de sódio e 0,41  $\mu M$  para o tungstato de sódio (Figura 30). A realização deste ensaio demonstra o efeito destes inibidores no teste, o que comprova a ação da enzima na clivagem do grupo fosfato na sonda **3**.

Figura 30. Gráficos de intersecção dos inibidores molibdato de sódio (a), fluoreto de sódio (b) e tungstato de sódio (c).

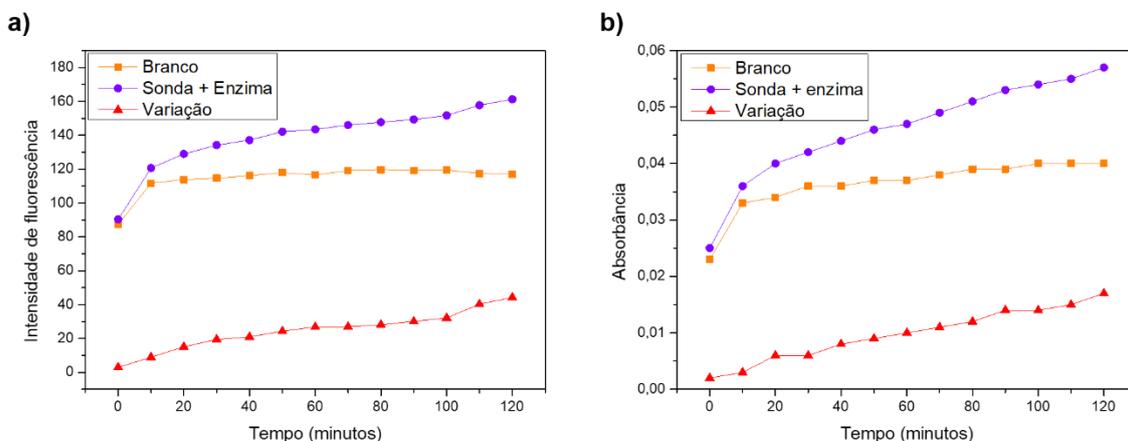


Fonte: Autor (2023).

#### 5.4 Avaliação da cinética e estabilidade da sonda **3**

A avaliação da cinética e estabilidade da sonda **3** foi realizado através de medidas contínuas da intensidade de fluorescência e da absorbância em função do tempo a partir de um intervalo de medição pré-estabelecido de 10 minutos em um tempo total de duas horas. Foram analisadas somente 10  $\mu M$  da sonda **3** (branco, em laranja) e a sonda **3** com 5  $U L^{-1}$  da enzima (em roxo) Figura 31.

Figura 31. Avaliação da cinética e estabilidade da sonda **3** na ausência (branco) e presença da enzima. Condições: pH = 5,5; [sonda]= 10  $\mu\text{M}$ ; fosfatase ácida = 5  $\text{U L}^{-1}$ ; [Tampão citrato] = 40 mM;  $\lambda_{em}$  = 580 nm.



Fonte: Autor (2023)

Observa-se que a partir dos 10 minutos iniciais há um aumento na intensidade de fluorescência e na absorbância para a sonda com a enzima e para o branco, porém a partir dos 20 minutos há um aumento na variação de fluorescência e absorbância entre as duas condições, com o branco mantendo a fluorescência constante e com um leve aumento na absorbância. Isto indica também que a concentração de 5  $\text{U L}^{-1}$  da enzima continua a converter os 10  $\mu\text{M}$  da sonda **3** após duas horas de reação. Também é perceptível que o comportamento da curva de variação mantém o mesmo comportamento da curva da sonda + enzima, indicando a estabilidade o branco.

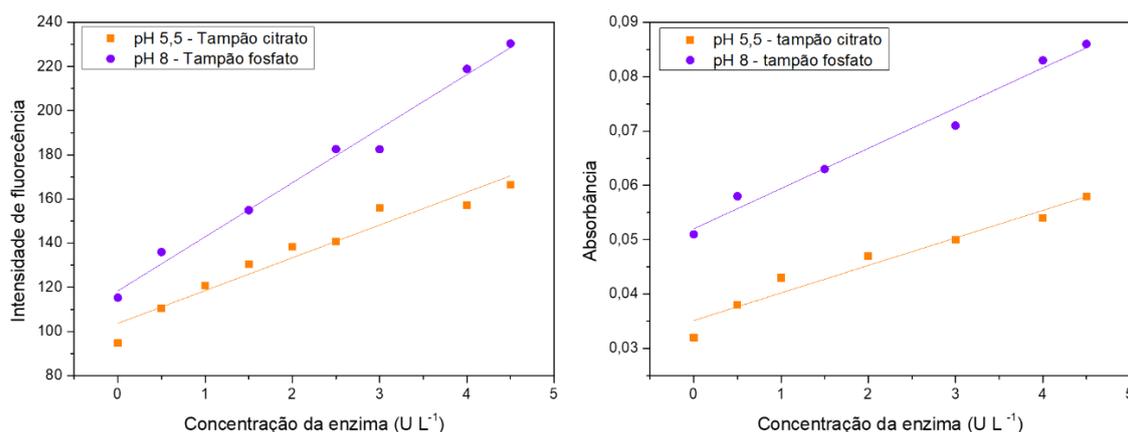
### 5.5 Determinação das figuras de mérito

Após determinar todas as condições ideais para a sonda **3** e para a enzima, foram feitas curvas analíticas com as condições para o pH de 5,5 com o tampão citrato e para o pH 8 com o tampão fosfato, analisadas por emissão de fluorescência e por absorção molecular (Tabela 1).

Para a curva de titulação fluorimétrica, a intensidade de fluorescência e a absorbância demonstraram correlação linear até a concentração de 4,5  $\text{U L}^{-1}$  (Figura 32) o que indica um aumento da intensidade de fluorescência em função do aumento da concentração da enzima, correlação importante para possíveis ensaios fluorimétricos e colorimétricos em amostras reais. A sonda desenvolvida por Qian et al. (2015), dada por um *quantum dot* baseado em carbono,

demonstrou correlação linear até  $5 \text{ U L}^{-1}$  em reação com fosfatase ácida. Em outro estudo, Hu et al. (2016) desenvolveu um método de detecção de fosfatase através de complexos de metal de transição de comportamento colorimétrico, observando uma faixa linear de até  $3,16 \text{ U L}^{-1}$ .

Figura 32. Curva analítica nas condições ideais para a sonda **3** e para fosfatase ácida.



Fonte: Autor (2023)

Tabela 1. Equações da reta e figuras de mérito em pH 5,5 e 8

	Equação da reta	LOD ( $\text{U L}^{-1}$ )	Intervalo linear ( $\text{U L}^{-1}$ )	$r$	RSD (%)*
<b>Em (pH 5,5)</b>	$IF = 14,85 (\pm 1,35) C_{FA} + 103,7 (\pm 3,5)$	0,26	0,5 – 4,5	0,9719 ( $n = 9$ )	6,22; 6,42 e 2,40
<b>Abs (pH 5,5)</b>	$Abs = 0,0051 (\pm 0,0005) C_{FA} + 0,035 (\pm 0,001)$	0,29	0,5 – 4,5	0,9766 ( $n = 7$ )	5,30; 9,31 e 6,10
<b>Em (pH 8)</b>	$IF = 24,49 (\pm 1,28) C_{FA} + 118,4 (\pm 3,6)$	0,26	0,5 – 4,5	0,993 ( $n = 7$ )	5,58; 4,25 e 2,37
<b>Abs (pH 8)</b>	$Abs = 0,0074 (\pm 0,0005) C_{FA} + 0,052 (\pm 0,001)$	0,20	0,5 – 4,5	0,990 ( $n = 6$ )	8,84; 6,99 e 3,59

Legenda: Em = Emissão de fluorescência; Abs = Absorbância; IF = Intensidade de fluorescência  $C_{FA}$  = Concentração de fosfatase ácida;

\*Concentrações de 1; 2,5 e  $4 \text{ U L}^{-1}$ .

Fonte: Autor (2023)

A depender das condições e da técnica de espectroscopia utilizadas, os métodos empregados com  $10 \mu\text{M}$  da sonda **3** geram limites de detecção (LOD) que variam entre  $0,2$  a  $0,29 \text{ U L}^{-1}$ . Estes resultados são comparáveis a outros métodos disponíveis na literatura e no mercado (Tabela 2), como o *kit* Fast Red TR que utiliza o método do alfa-naftil fosfato (Figura 5) para a detecção da

fosfatase e possui o LOD de 0,8 a 3,1 U L<sup>-1</sup> (COOPER; TURNELL; PRICE, 1982), sendo portanto, a sonda **3** mais sensível à detecção da fosfatase ácida.

Tabela 2. Comparação entre método com a sonda **3** e outras disponíveis na literatura.

Método	LOD (U L <sup>-1</sup> )	Intervalo linear (U L <sup>-1</sup> )	<i>r</i>	$\lambda_{em}$ (nm)	Referencia
<b>Sonda 3</b>	0,20 - 0,29	0,5 - 4,5	0,971 - 0,993	580	Autor, 2023
<b>Alfa-naftil- fosfato</b>	0,8 - 3,9	-	-	585	COOPER; TURNELL; PRICE, 1982
<b>Carbon dots N-dopados</b>	0,43	1 - 50	0,995	415 509	ZHU <i>et al.</i> , 2019
<b>Polímero de európio (sinal duplo)</b>	0,04 0,38	0,13 - 5,00 1,25 - 20	-	372 440 614	LI <i>et al.</i> , 2021
<b>CuInS<sub>2</sub> quantum dot</b>	3.1 nU mL <sup>-1</sup>	6.4 - 192 nU mL <sup>-1</sup>	0,998	655	LIN <i>et al.</i> , 2015
<b>Cu<sup>2+</sup> e carbon dots</b>	0.056	0.5 - 6	-	580	MA <i>et al.</i> , 2019

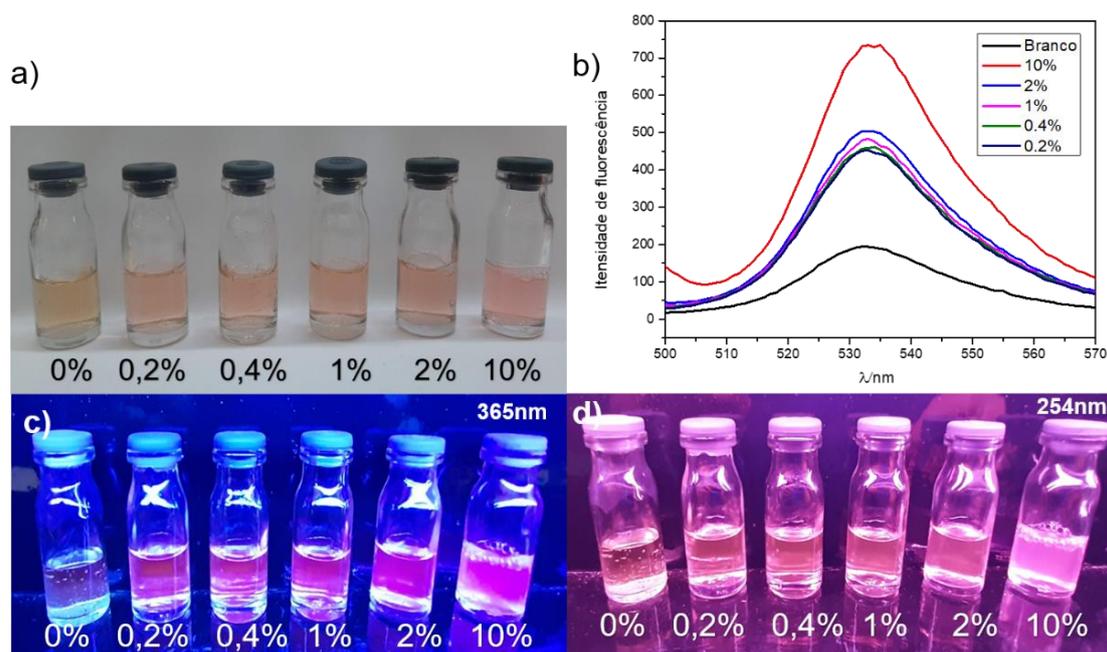
Em sua maioria, os métodos relatados na literatura para detecção da fosfatase ácida, consistem em mais de uma etapa para a indicação do resultado do teste, o que se difere do método aqui proposto, que em apenas uma etapa de reação, demonstra possuir maior sensibilidade que métodos baseados em *carbon dots* e *quantum dots*.

## 5.6 Testes com amostras de sêmen

Neste teste foi possível comprovar a eficiência da sonda **3** na detecção do sêmen. Em contato com o sêmen, há uma alteração colorimétrica instantânea em todas as amostras testadas, com alteração da cor da solução mudando do laranja para o rosa (Figura 33a). Quando expostas a luz ultravioleta de 365 nm (Figura 33c), todas as amostras emitiram fluorescência; entretanto, quando analisada em 254 nm (Figura 33d) apenas a amostra com 10% de sêmen apresentou esta capacidade.

Quando analisadas no teste de fluorescência, as amostras diluídas de 0,2% a 2% emitiram cerca de 2 vezes mais que a amostra negativa, enquanto que a emissão da amostra a 10% foi 8 vezes maior (Figura 33b). Isto indica que a sonda **3** possui capacidade de detectar amostras de sêmen diluídas em até 500 vezes.

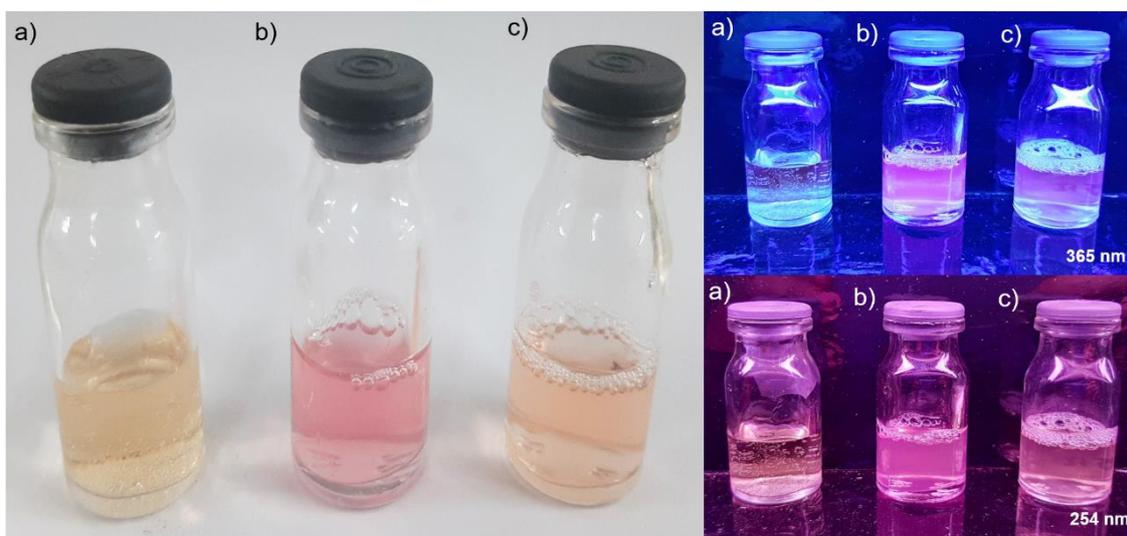
Figura 33. Alteração colorimétrica de amostras de sêmen diluídas; b). Espectro de emissão das amostras. Condições: [**3**]= 200  $\mu$ M; [Tampão acetato] = 100 mM; pH= 5,0;  $\lambda_{em}$ = 530 nm; c) Amostras sob exposição a luz ultravioleta de 365 nm; d) Amostras sob exposição a luz ultravioleta de 254 nm.



Fonte: Autor (2023); Imagem sem filtros.

De forma a comprovar que a conversão da sonda **3** em Resorufina, foi realizado um teste com um inibidor da enzima. O molibdato de sódio já foi relatado na literatura como inibidor da fosfatase ácida, diminuindo sua atividade quando em solução (TALPASAYI, 1962). Através deste estudo foi possível observar que não houve alteração colorimétrica na solução com o molibdato de sódio, mantendo a cor laranja da sonda **3** íntegra em solução, comprovando assim, a ação da PAP em presença da sonda (Figura 34).

Figura 34. a) Controle negativo; b) Controle positivo; c) Solução com inibidor



Fonte: Autor (2023); Imagem sem filtros.

### 5.7 Simulação da aplicação da sonda no *kit*

Afim de reproduzir o encontro de vestígios em uma cena de crime, foi feita uma simulação da interação da sonda **3** com fluidos biológicos e interferentes que podem ser encontrados no local. Entre os fluidos testados estão o sêmen, sangue, urina e saliva. Como prováveis interferentes foram selecionados aqueles que possuem aspectos como viscosidade e aparência semelhantes ao sêmen ou sangue, sendo ele o leite, a clara de ovo e o molho de tomate.

Entre tais interferentes, já foi relatado que o tomate e o leite apresentam a fosfatase ácida na sua composição. Para o tomate, assim como algumas plantas, a fosfatase é excretada no meio para liberar, remobilizar e reciclar o fosfato inorgânico livre (BOZZO; DUNN; PLAXTON, 2006). A fosfatase ácida no leite foi primeiramente reportada por HUGGINS; TALALAY, 1945, mas em 1992 foi descoberto que a fosfatase ácida compreende aproximadamente 2% de toda atividade de fosfatases no leite, sendo em sua maioria dada pela fosfatase alcalina (FOX, 2003). Em geral, a quantidade de fosfatase ácida no leite é muito baixa e não a torna de interesse para quantificação e para demais usos (FOX; KELLY, 2006).

A solução com a sonda **3** poderá ser utilizada de diversas formas no *kit* a depender da localização em que o vestígio será encontrado. Primeiramente, caso o vestígio seja encontrado em alguma superfície, poderá ser utilizado um

*swab* impregnado com a sonda **3** para que em seguida seja feito o contato com o vestígio na superfície. Caso positivo para sêmen, deverá haver uma alteração colorimétrica do *swab*, alterando da cor laranja para a cor rosa, caso negativo, se manterá a cor alaranjada.

Para testar essa habilidade, foram adicionadas quantidades pequenas de cada fluido e interferente. Em seguida, com um *swab* seco que foi impregnado com 50 µL de uma solução a 200 µM da sonda **3**, foi feito o contato com cada área, gerando ou não a alteração colorimétrica. Sendo o *swab* com sêmen o único a apresentar alteração colorimétrica após alguns segundos (Figura 35).

Figura 35. Simulação utilizando *swab* com a sonda **3** em piso contaminado.



Fonte: Autor (2023); Imagem sem filtros.

A segunda forma de aplicação da sonda **3** seria caso o vestígio seja encontrado no corpo da vítima. Nesse caso, a análise seria feita após a coleta do vestígio pelo *swab* e logo em seguida adicionado 50 µL da solução a 200 µM da sonda **3**. Nessa situação, também haverá alteração colorimétrica em um resultado positivo, alterando do rosa para o laranja.

Para simular essa situação, foi feita uma análise onde inicialmente os *swabs* foram impregnados com soluções a 10% (v/v) de cada fluido e interferente, e em seguida adicionados 50 µL da solução a 200 µM da sonda **3**, onde observou-se uma alteração colorimétrica perceptível a olho nu somente para o *swab* contaminado com sêmen (Figura 36).

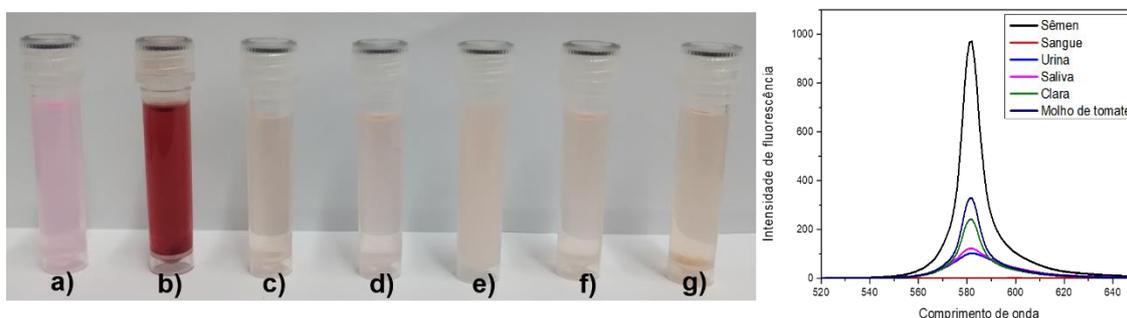
Figura 36. Simulação utilizando swab contaminado após adição da sonda **3**.



Fonte: Autor (2023); Imagem sem filtros.

Ainda foi feita a avaliação utilizando 10  $\mu\text{M}$  da sonda **3** com diluições em 10% (v/v) de cada interferente, onde a intensidade de fluorescência da solução com sêmen foi cerca de 5 vezes maior que as demais e foi a única em que houve alteração colorimétrica da solução Figura 37.

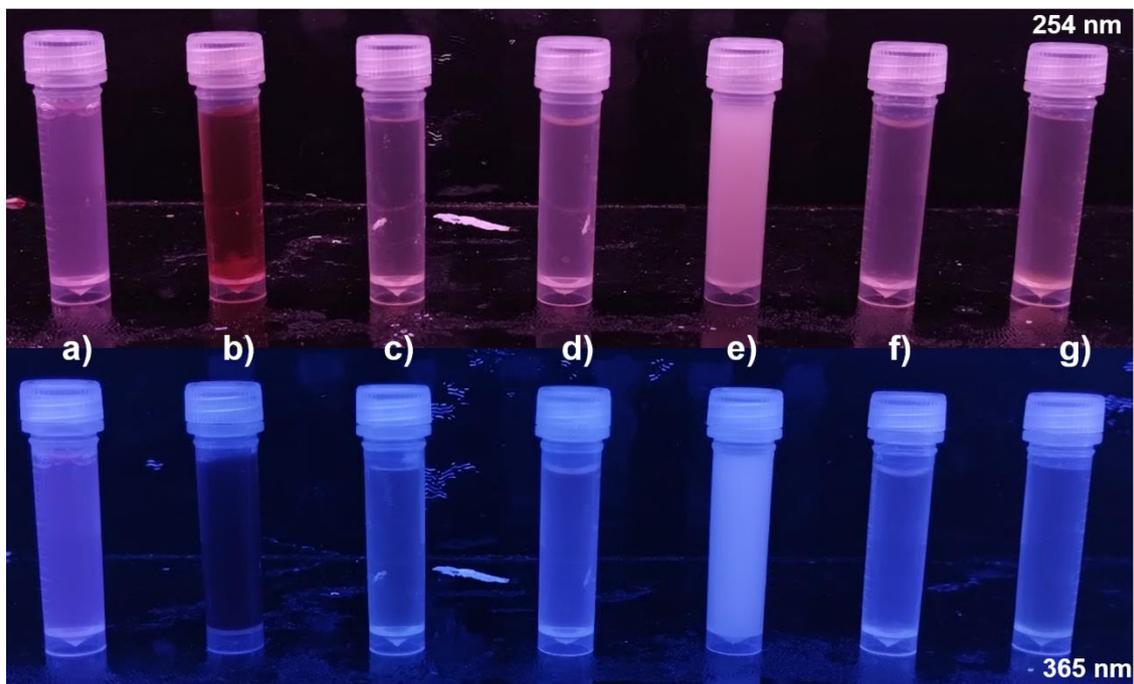
Figura 37. Soluções a 10% (v/v) com os contaminantes: sêmen (a), sangue (b), urina (c), saliva (d), leite (e), clara de ovo (f) e molho de tomate (g) e espectro de fluorescência destas soluções. Espectro de emissão de fluorescência com interferentes. Condições: [**3**] = 10  $\mu\text{M}$ ; [Tampão citrato] = 40 mM; pH = 5,5;  $\lambda_{\text{em}}$  = 580 nm



Fonte: Autor (2023); Imagem sem filtros.

Adicionalmente, quando expostas a comprimentos de onda de 254 e 365 nm, a solução com sêmen (a) apresentou leve fluorescência em ambos comprimentos de onda em comparação as demais amostras (Figura 38).

Figura 38. Exposição a luz UV de 254 e 365 nm das soluções a 10% (v/v) com os contaminantes: sêmen (a), sangue (b), urina (c), saliva (d), leite (e), clara de ovo (f) e molho de tomate (g).



Fonte: Autor (2023); Imagem sem filtros.

## 6 CONCLUSÃO

A rota de síntese utilizada para fosforilação foi efetiva para a formação do composto intermediário **2** e **8**, com rendimentos entre 43% e 55%. Para a reação de hidrólise, a metodologia empregada com o agente iodeto de trimetilsilano foi eficaz para a retirada das etilas, com rendimento variando entre 60% a 65% e rendimento global de 28% e 33%. A sonda proposta **3** demonstrou ser efetiva para a detecção da enzima fosfatase, tanto para o mecanismo colorimétrico, quanto para fluorimétrico, apresentando uma curva linear e limite de detecção de até 0,2 U L<sup>-1</sup> para a identificação da PAP e também sendo sensível para amostras reais de sêmen diluídas em até 500 vezes. Desse modo, podendo atuar como uma sonda *off-on*, tornando-se uma alternativa promissora para a implementação no campo forense.

## 6. PERSPECTIVAS

Como perspectiva, há o início dos testes analíticos da sonda azo (9), visando sua capacidade de atuação como sonda colorimétrica para detecção da enzima PAP. Para a sonda 3 resta realizar ensaios de recuperação utilizando sêmen sintético e real afim de avaliar e quantificar a capacidade de recuperação da sonda. Ademais, devido sua sensibilidade, pouco volume das soluções da sonda será utilizado para a aplicação, o que torna sua utilização de baixo custo e com uma elevada frequência analítica.

Espera-se com a conclusão deste projeto que pelo menos uma das sondas desenvolvidas componham um kit que permitirá o monitoramento qualitativo e semiquantitativo com elevada frequência analítica. Além disso, este trabalho renderá patentes e publicações na área forense e analítica, além da geração de um produto que agilize os resultados iniciais em testes forenses, de forma a adiantar a buscar pelo agressor, auxiliando a sociedade em casos de crime contra a mulher.

## REFERÊNCIAS

ALMAMMADOV, Toghrul *et al.* Resorufin Enters the Photodynamic Therapy Arena: A Monoamine Oxidase Activatable Agent for Selective Cytotoxicity. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 2491–2496, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00484>

ANAMTHATHMAKULA, Prashanth; WINUTHAYANON, Wipawee. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception†. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 411–426, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa075>

BASHA, Sheikh Mehboob. Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut ( *Arachis hypogaea* ) seed. **Canadian Journal of Botany**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 385–391, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/b84-058>

BERNARD, Muriel *et al.* Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus* The GenBank accession number for the *A. fumigatus* PHOA sequence reported in this paper is AF462065. **Microbiology**, [s. l.], v. 148, n. 9, p. 2819–2829, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2819>

BISWAS, Suwendu *et al.* Dual colorimetric and fluorogenic probes for visualizing tyrosine phosphatase activity. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 53, n. 14, p. 2233–2236, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C6CC09204G>

BLACKBURN, G. Michael; INGLESON, David. Specific dealkylation of phosphonate esters using iodotrimethylsilane. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, [s. l.], n. 20, p. 870, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c39780000870>

BOZZO, GALE G.; DUNN, EVELYN L.; PLAXTON, WILLIAM C. Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. **Plant, Cell and Environment**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 303–313, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01422.x>

BUENO, C. *et al.* The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. **Photophysics and Photochemical Reaction¶. Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 385–390, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760385TESIOR2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760385TESIOR2.0.CO2)

ÇAKIR, Semiha; ARSLAN, Emine. Voltammetry of resazurin at a mercury electrode. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 64, n. 3, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/s11696-010-0007-9>

CASEY, Taylor *et al.* Raman spectroscopy for forensic semen identification: Method validation vs. environmental interferences. **Vibrational Spectroscopy**, [s. l.], v. 109, p. 103065, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103065>

CHEVALIER, Arnaud; RENARD, Pierre-Yves; ROMIEU, Anthony. Azo-Based

- Fluorogenic Probes for Biosensing and Bioimaging: Recent Advances and Upcoming Challenges. **Chemistry - An Asian Journal**, [s. l.], v. 12, n. 16, p. 2008–2028, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/asia.201700682>
- COOPER, J.D.H.; TURNELL, D.C.; PRICE, C.P. The estimation of serum acid phosphatase using  $\alpha$ -naphthyl phosphate as substrate: observations on the use of Fast Red TR salt in the assay. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 126, n. 3, p. 297–306, 1982. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(82\)90304-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(82)90304-7)
- DWIVEDI, Atul K.; IYER, Parameswar K. Sensitive detection of acid phosphatase enzyme and screening of inhibitors using an anionic polyfluorene derivative. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 2374, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3ay40233a>
- ESEZOBOR, Oaikhena *et al.* Synthesis of 4-Phenylazo Phenol from Anthocyanins of *Delonix regia* and *Hibiscus sabdariffa* Flowers. **American Chemical Science Journal**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.9734/ACSJ/2016/22393>
- FOX, P. F. Indigenous Enzymes in Milk. *In*: **ADVANCED DAIRY CHEMISTRY—1 PROTEINS**. Boston, MA: Springer US, 2003. p. 467–471. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_11)
- FOX, P.F.; KELLY, A.L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 517–532, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.017>
- GAMBLIN, Amelia P.; MORGAN-SMITH, Rian K. The characteristics of seminal fluid and the forensic tests available to identify it. **WIREs Forensic Science**, [s. l.], v. 2, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wfs2.1363>
- GAO, Wenzhong *et al.* Novel Fluorogenic Substrates for Imaging  $\beta$ -Lactamase Gene Expression. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 125, n. 37, p. 11146–11147, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja036126o>
- GUO, Yuyang *et al.* Acid Phosphatase Invoked Exquisite Enzyme Cascade for Amplified Colorimetric Bioassay. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 7572–7579, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05719>
- HARSÁGI, Nikoletta; KEGLEVICH, György. The hydrolysis of phosphinates and phosphonates: A review. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26102840>
- HAUSMANN, Klaus; ALLEN, Richard D. Electron Microscopy of Paramecium (Ciliata). *In*: [S. l.: s. n.], 2010. p. 143–173. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96007-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96007-X)
- HERMAN, Yael; FEINE, Ilan; GAFNY, Ron. Acid phosphatase test on Phadebas® sheets — An optimized method for presumptive saliva and semen detection. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 288, p. 218–222, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.04.047>
- HU, Qiong *et al.* Turn-On Colorimetric Platform for Dual Activity Detection of Acid and Alkaline Phosphatase in Human Whole Blood. **Chemistry - An Asian**

**Journal**, [s. l.], v. 11, n. 21, p. 3040–3045, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/asia.201601006>

HUGGINS, Charles; TALALAY, Paul. Sodium Phenolphthalein Phosphate As a Substrate for Phosphatase Tests. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 159, n. 2, p. 399–410, 1945. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52801-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52801-0)

JAKOB, Clarissa G. *et al.* Crystal structure of human prostatic acid phosphatase. **The Prostate**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 211–218, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(20000215\)42:3<211::AID-PROS7>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(20000215)42:3<211::AID-PROS7>3.0.CO;2-U)

JORIO, Israel Domingos. **CRIMES SEXUAIS**. [S. l.: s. n.], 2021.

KONG, Hoon Young; BYUN, Jonghoe. Emerging Roles of Human Prostatic Acid Phosphatase. **Biomolecules and Therapeutics**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 10–20, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.095>

KOZAK, Witold *et al.* Selected Methods for the Chemical Phosphorylation and Thiophosphorylation of Phenols. **Asian Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 314–323, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajoc.201700638>

LI, Shuangqin *et al.* A dual-signal fluorescent probe for detection of acid phosphatase. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 413, n. 15, p. 3925–3932, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03343-2>

LIN, Zihan *et al.* Near-infrared fluorescence probe for the determination of acid phosphatase and imaging of prostate cancer cells. **The Analyst**, [s. l.], v. 140, n. 5, p. 1629–1636, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C4AN01868K>

LINDQVIST, Ylva; SCHNEIDER, Gunter; VIHKO, Pirkko. Crystal structures of rat acid phosphatase complexed with the transition-state analogs vanadate and molybdate. Implications for the reaction mechanism. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 221, n. 1, p. 139–142, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18722.x>

LÓPEZ, Roxana S. *et al.* Manganese and molybdenum affect acid phosphatases from potatoes. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 65–73, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09064710600641862>

MA, Xin *et al.* Carbon dots as an “on-off-on” fluorescent probe for detection of Cu(II) ion, ascorbic acid, and acid phosphatase. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 411, n. 25, p. 6645–6653, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02038-z>

MAGALHÃES, Teresa *et al.* Biological Evidence Management for DNA Analysis in Cases of Sexual Assault. **Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2015, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/365674>

MARCAO, Renato; GENTIL, Plinio. **Crimes Contra a Dignidade Sexual**. 3ed. ed. [S. l.]: Saraiva Jur, 2019.

MCKENNA, Charles E. *et al.* The facile dealkylation of phosphonic acid dialkyl

esters by bromotrimethylsilane. **Tetrahedron Letters**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 155–158, 1977. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)92575-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)92575-4)

MOTABAR, Omid *et al.* A new resorufin-based  $\alpha$ -glucosidase assay for high-throughput screening. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 390, n. 1, p. 79–84, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.04.010>

MUNIYAN, Sakthivel *et al.* Human Prostatic Acid Phosphatase: Structure, Function and Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 10438–10464, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms140510438>

OLCZAK, Mariusz; MORAWIECKA, Bronisława; WATOREK, Wiesław. Plant purple acid phosphatases - genes, structures and biological function. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 1245–1256, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.18388/abp.2003\\_3648](https://doi.org/10.18388/abp.2003_3648)

ORTLUND, Eric; LACOUNT, Michael W.; LEBIODA, Lukasz. Crystal Structures of Human Prostatic Acid Phosphatase in Complex with a Phosphate Ion and  $\alpha$ -Benzylaminobenzylphosphonic Acid Update the Mechanistic Picture and Offer New Insights into Inhibitor Design ., **Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 383–389, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi0265067>

OSONGA, Francis J. *et al.* Synthesis and characterization of novel flavonoid derivatives via sequential phosphorylation of quercetin. **Tetrahedron Letters**, [s. l.], v. 58, n. 15, p. 1474–1479, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.02.085>

QIAN, Zhaosheng *et al.* Reversible Fluorescent Nanoswitch Based on Carbon Quantum Dots Nanoassembly for Real-Time Acid Phosphatase Activity Monitoring. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 87, n. 14, p. 7332–7339, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01488>

REACH DEVICES. **Biological Buffers**. [S. l.], 2021.

REDHEAD, Paul; BROWN, Melanie K. The acid phosphatase test two minute cut-off: An insufficient time to detect some semen stains. **Science & Justice**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 187–191, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2012.09.004>

RODRIGUEZ, Jae Joseph Russell B. *et al.* Integrating presumptive and confirmatory semen tests into DNA profiling of sexual assault evidence: a Philippine example. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 45, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0149-z>

SHEN, Wei *et al.* A Long-Wavelength, Fluorogenic Probe for Epoxide Hydrolase: 7-(2-(Oxiran-2-yl)ethoxy) Resorufin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 1496–1499, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1496>

SILVA, Filomena S.G. *et al.* Determination of Metabolic Viability and Cell Mass Using a Tandem Resazurin/Sulforhodamine B Assay. **Current Protocols in Toxicology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 2.24.1-2.24.15, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cptx.1>

- SILVA, Valmir; ORTH, Elisa. Are Imidazoles Versatile or Promiscuous in Reactions With Organophosphates? Insights From the Case of Parathion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190084>
- STEFANIDOU, M; ALEVISOPOULOS, G; SPILIOPOULOU, C. Fundamental issues in forensic semen detection. **The West Indian medical journal**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 280–283, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21291106>
- SU, Guowan *et al.* Effect of different buffer systems on the xanthine oxidase inhibitory activity of tuna ( *Katsuwonus pelamis* ) protein hydrolysate. **Food Research International**, [s. l.], v. 105, p. 556–562, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.037>
- SZALEWICZ, Agata *et al.* The 35 kDa acid metallophosphatase of the frog *Rana esculenta* liver: studies on its cellular localization and protein phosphatase activity. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 555–566, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.18388/abp.2003\\_3709](https://doi.org/10.18388/abp.2003_3709)
- TAGAD, Chandrakant K.; SABHARWAL, Sushma G. Purification and characterization of acid phosphatase from *Macrotyloma uiflorum* seeds. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 313–320, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2941-9>
- TALPASAYI, E.R.S. Acid phosphatase activity of some algae and its inhibition by molybdenum. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 710–712, 1962. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90654-6](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90654-6)
- TIAN, Lu *et al.* Resorufin-based responsive probes for fluorescence and colorimetric analysis. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 53–79, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0TB01628D>
- VIRKLER, Kelly; LEDNEV, Igor K. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 188, n. 1–3, p. 1–17, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>
- WANG, Han *et al.* Recent development of reactional small-molecule fluorescent probes based on resorufin. **Dyes and Pigments**, [s. l.], v. 191, p. 109351, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109351>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Violence against women prevalence estimates, 2018**. [S. l.: s. n.], 2021.
- XIE, Yonghua *et al.* Continuous and Sensitive Acid Phosphatase Assay Based on a Conjugated Polyelectrolyte. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 3784–3787, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/am3011498>
- YOSHIYA, Taku *et al.* A GGCT fluorogenic probe: design, synthesis and application to cancer-related cells. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 3182–3185, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C5OB00086F>
- YU, Zhipeng *et al.* Primary and secondary structure of novel ACE-inhibitory

peptides from egg white protein. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 133, n. 2, p. 315–322, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.032>

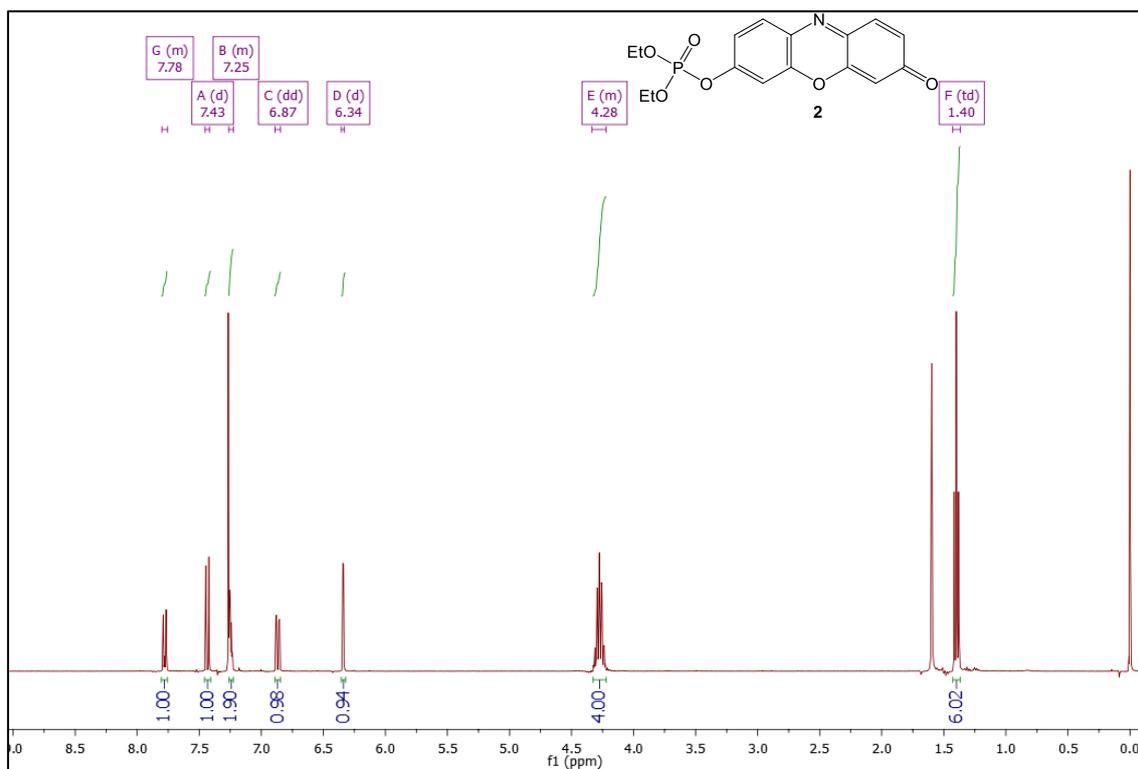
ZHANG, Yangyang *et al.* A spectroscopic off-on probe for simple and sensitive detection of carboxylesterase activity and its application to cell imaging. **The Analyst**, [s. l.], v. 137, n. 3, p. 716–721, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C2AN15952J>

ZHOU, Mingjie *et al.* A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 253, n. 2, p. 162–168, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2391>

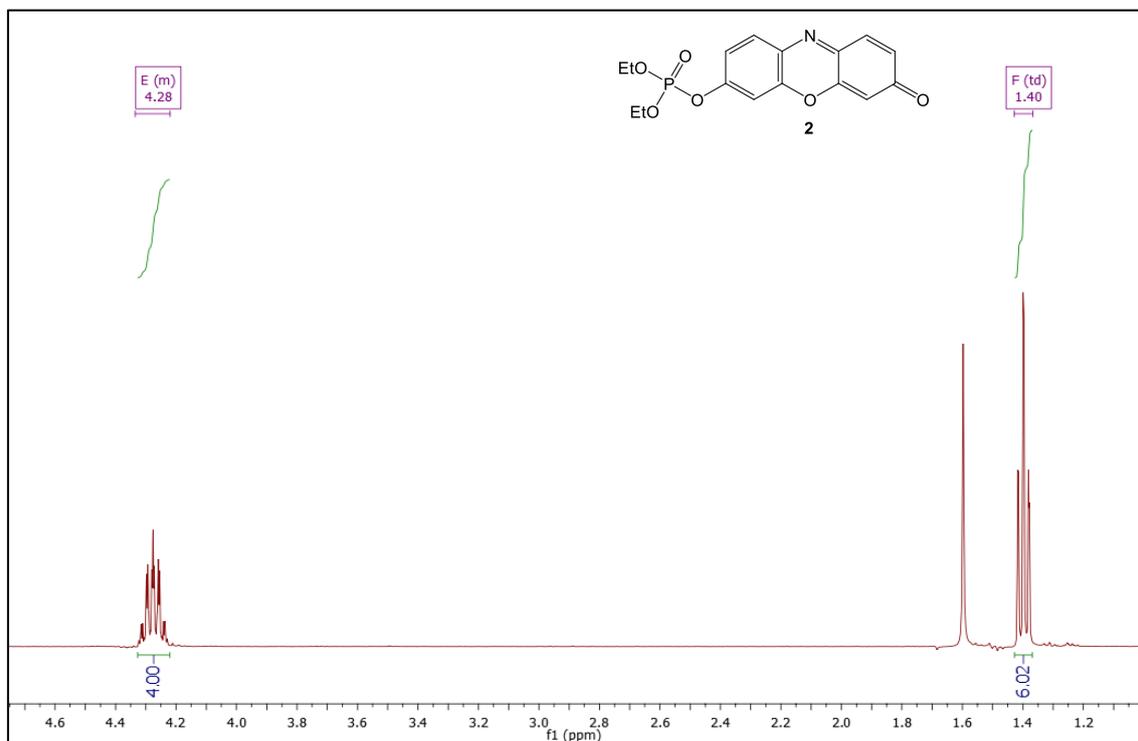
ZHU, Zhenmao *et al.* Nitrogen-doped carbon dots as a ratiometric fluorescent probe for determination of the activity of acid phosphatase, for inhibitor screening, and for intracellular imaging. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 186, n. 8, p. 558, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3600-9>

## APÊNDICE

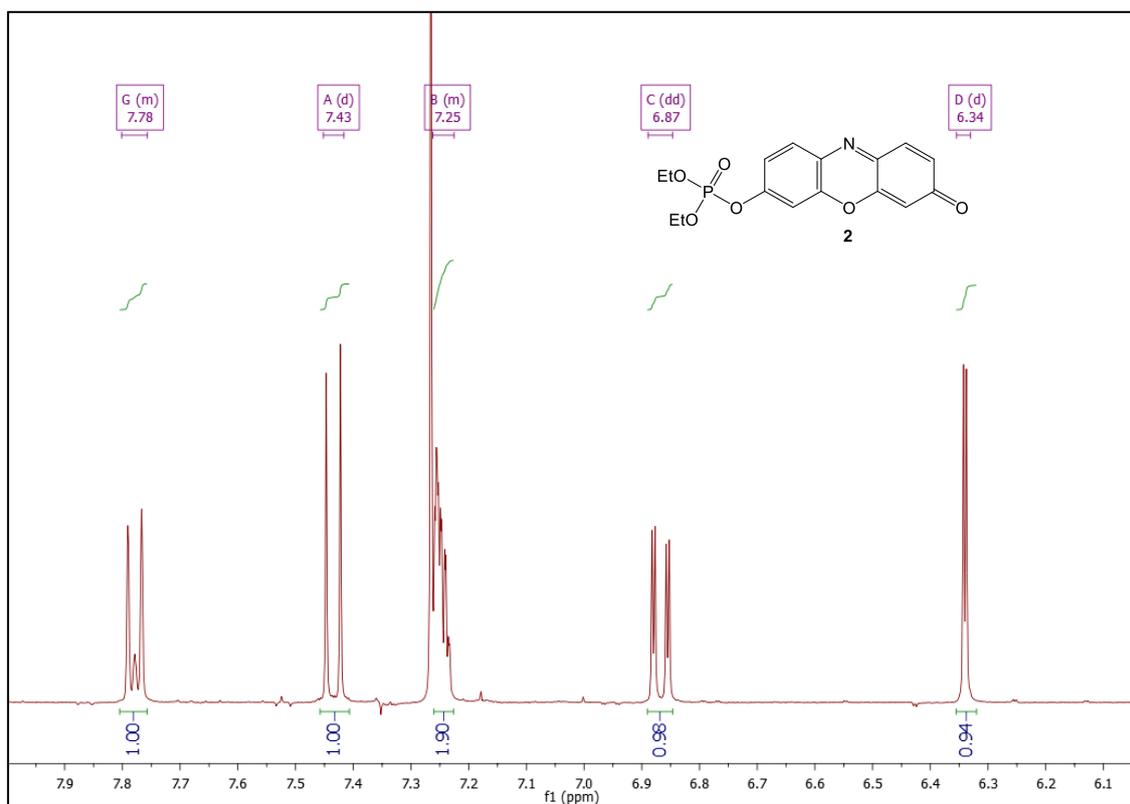
### Apêndice 1. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto **2** (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



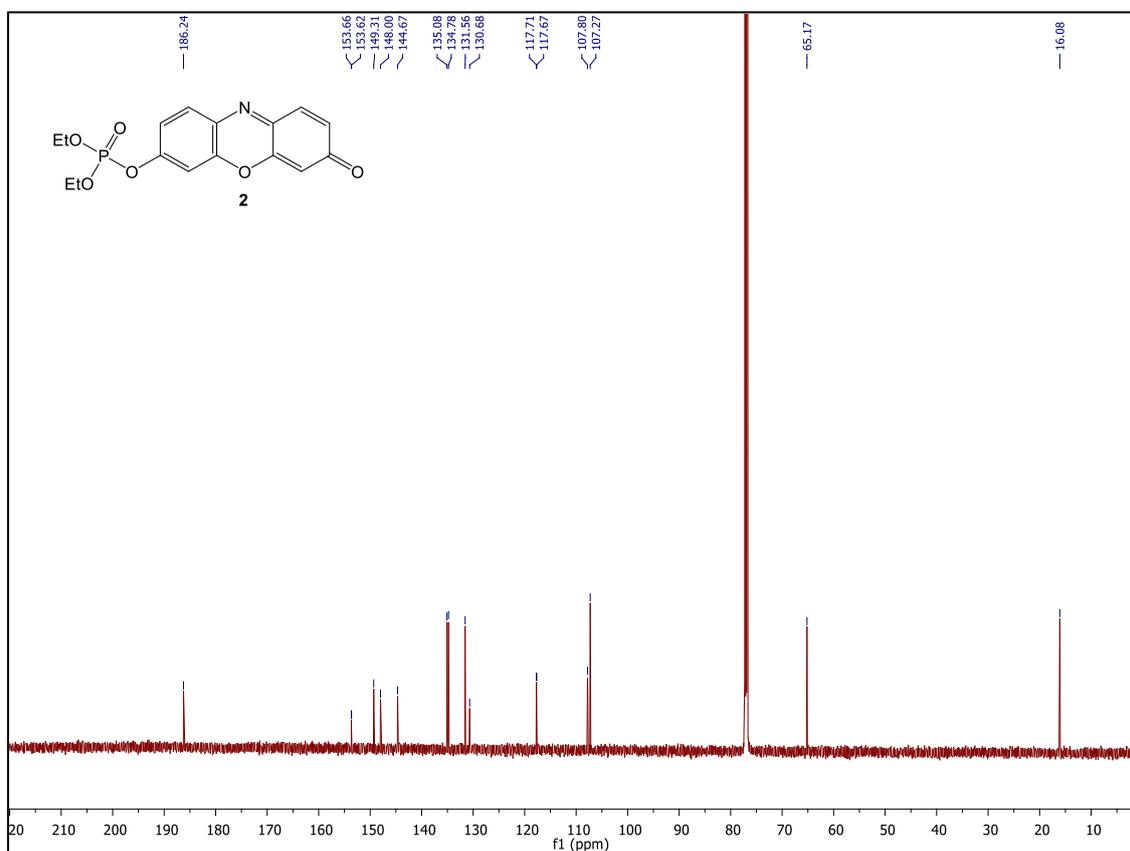
### Apêndice 2. Ampliação de 1,10-4,70 ppm RMN $^1\text{H}$ do composto **2** (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



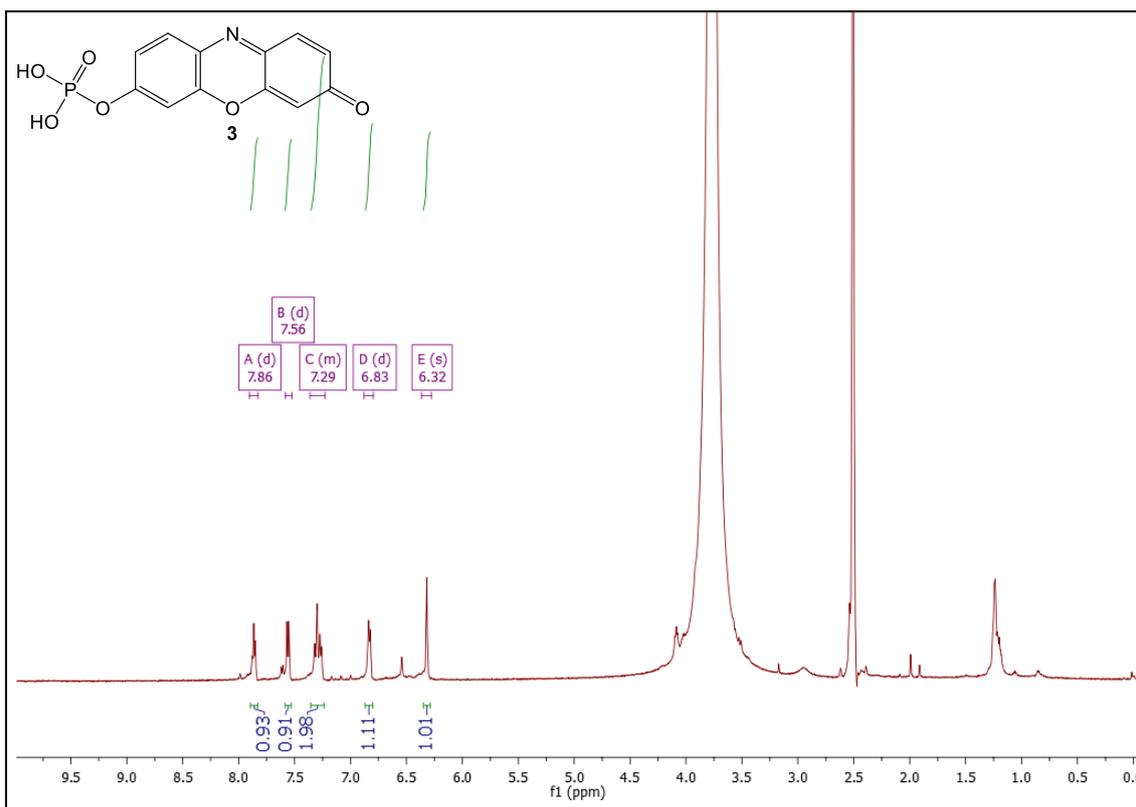
Apêndice 3. Ampliação de 6,00-8,00 ppm RMN <sup>1</sup>H do composto **2** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



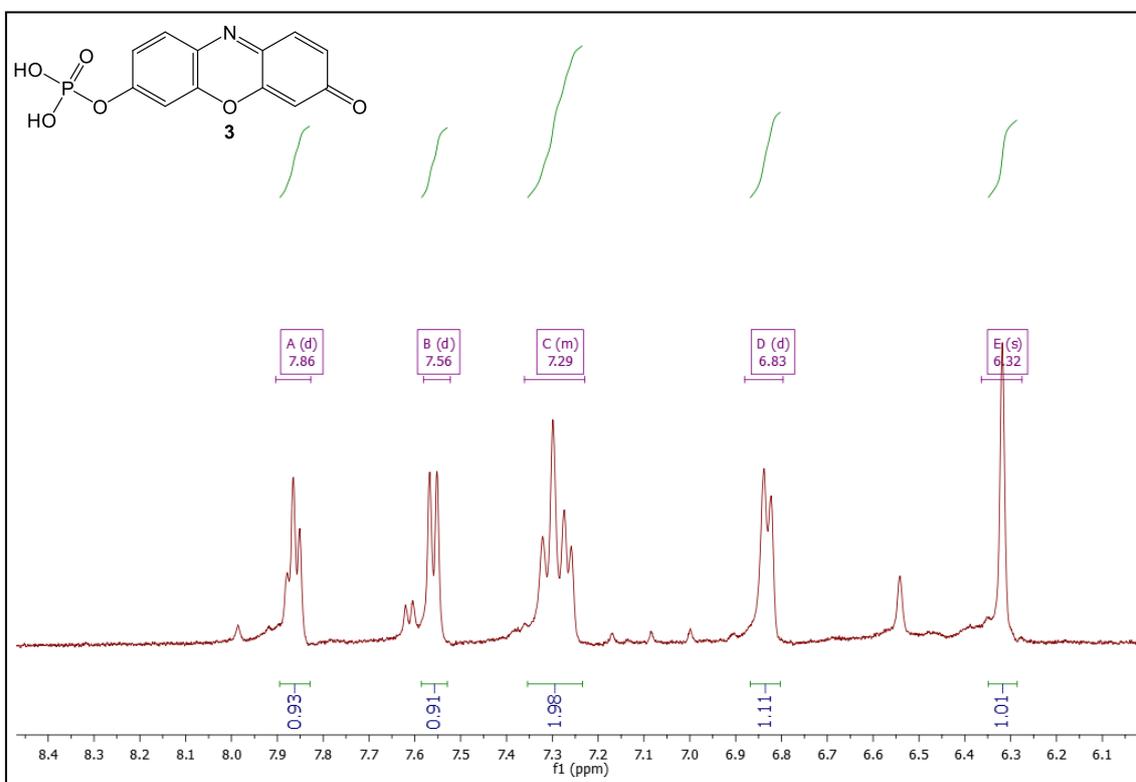
Apêndice 4. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto **2** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



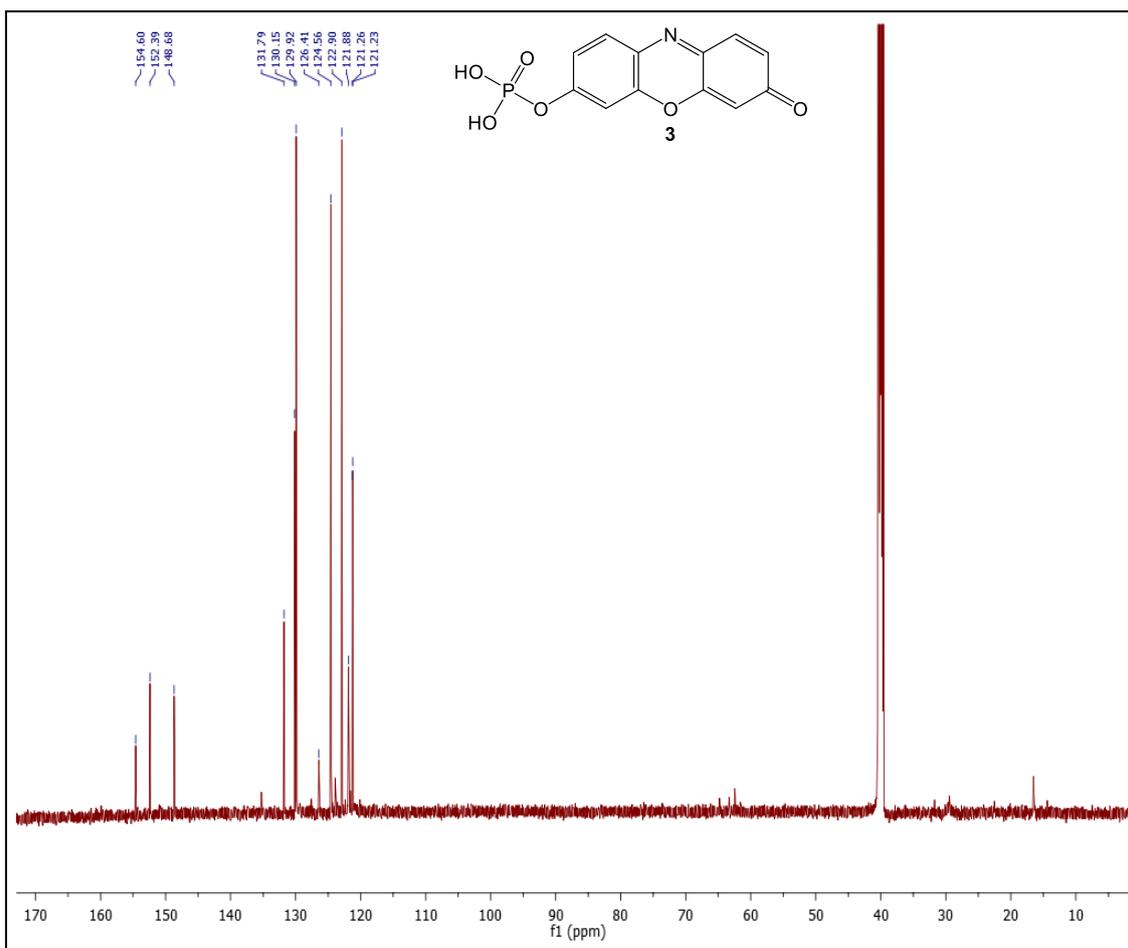
Apêndice 5. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **3** (600 MHz, DMSO- $d_6$ )



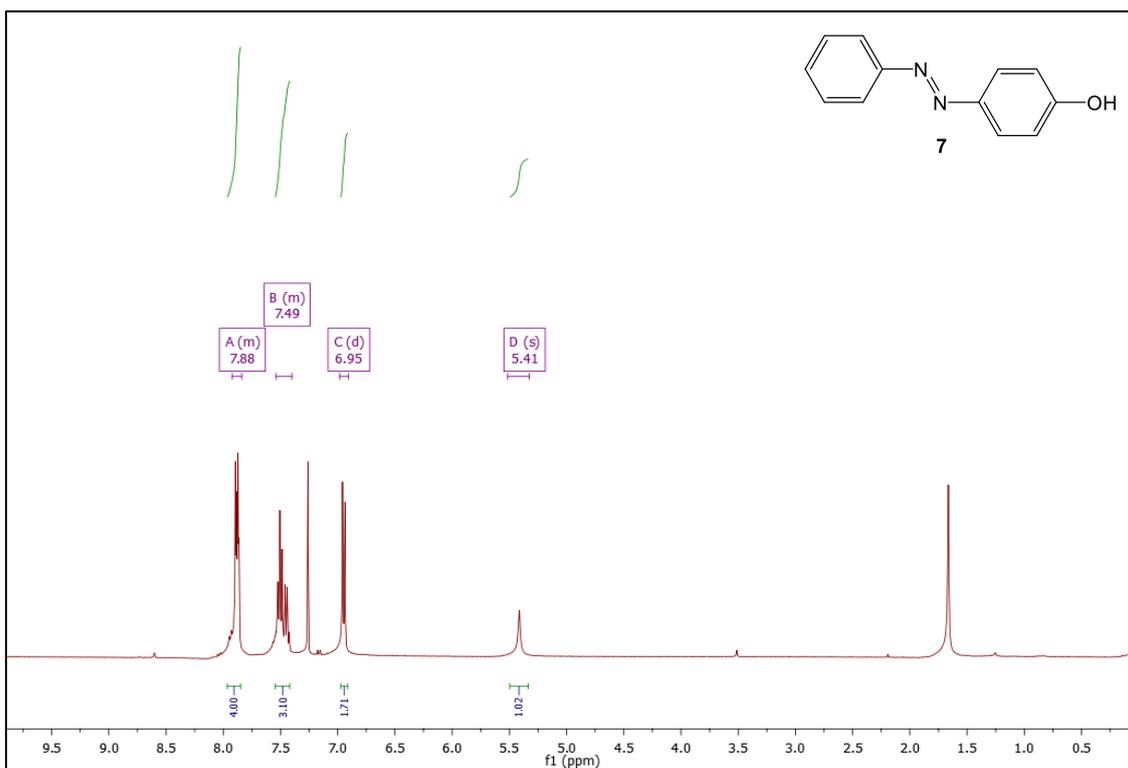
Apêndice 6. Ampliação de 6.00-8.50 ppm RMN  $^1\text{H}$  do composto **3** (600 MHz, DMSO- $d_6$ )



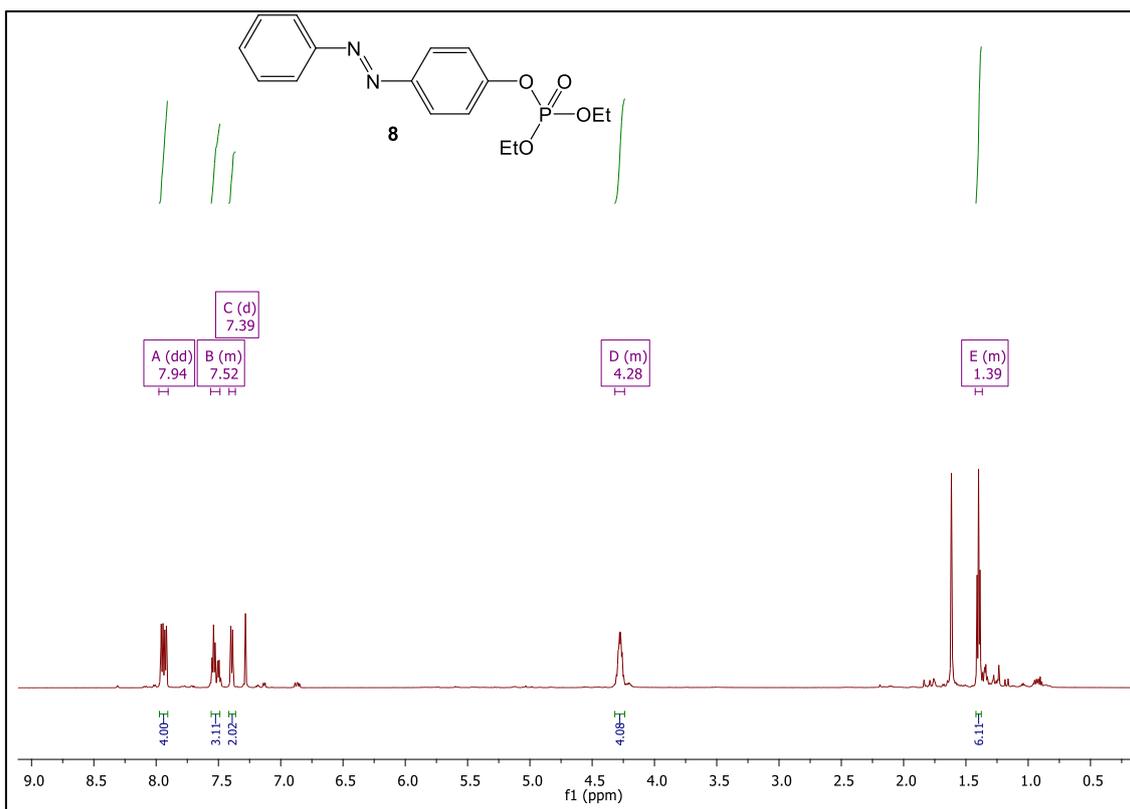
Apêndice 7. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **3** (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )



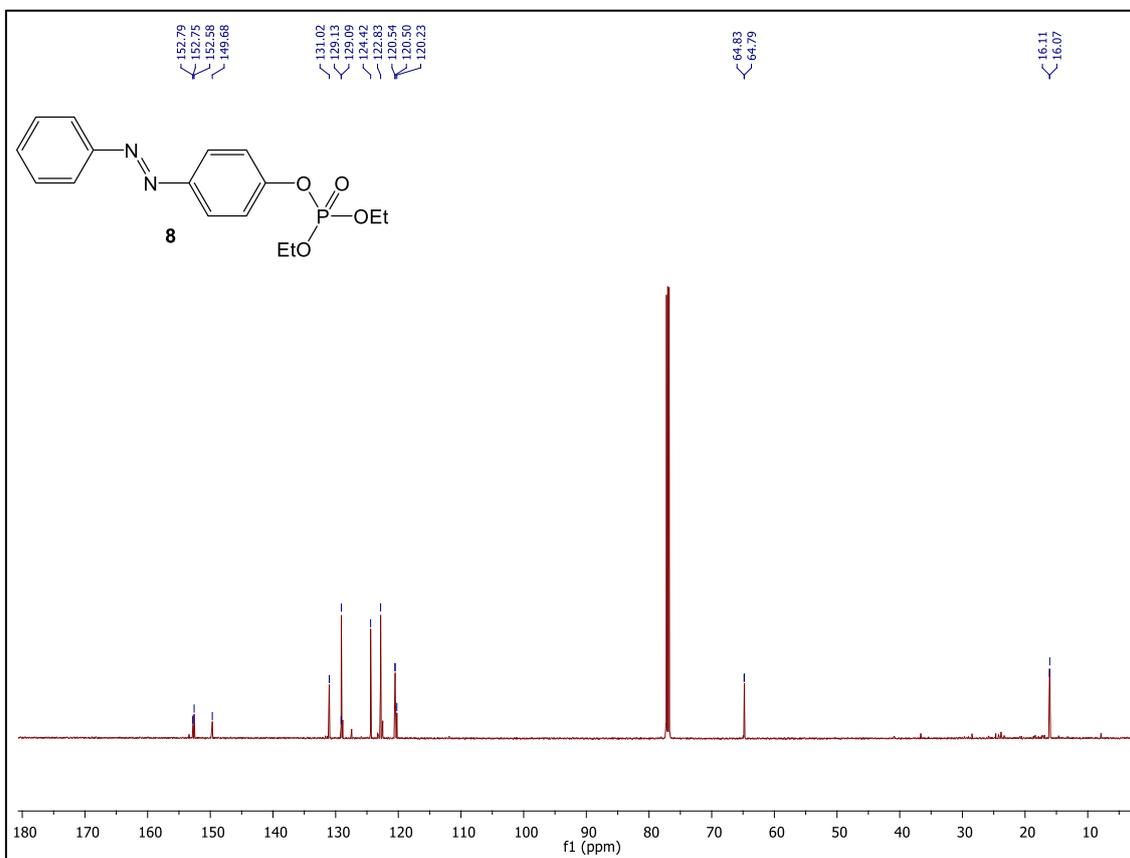
Apêndice 8. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **7** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



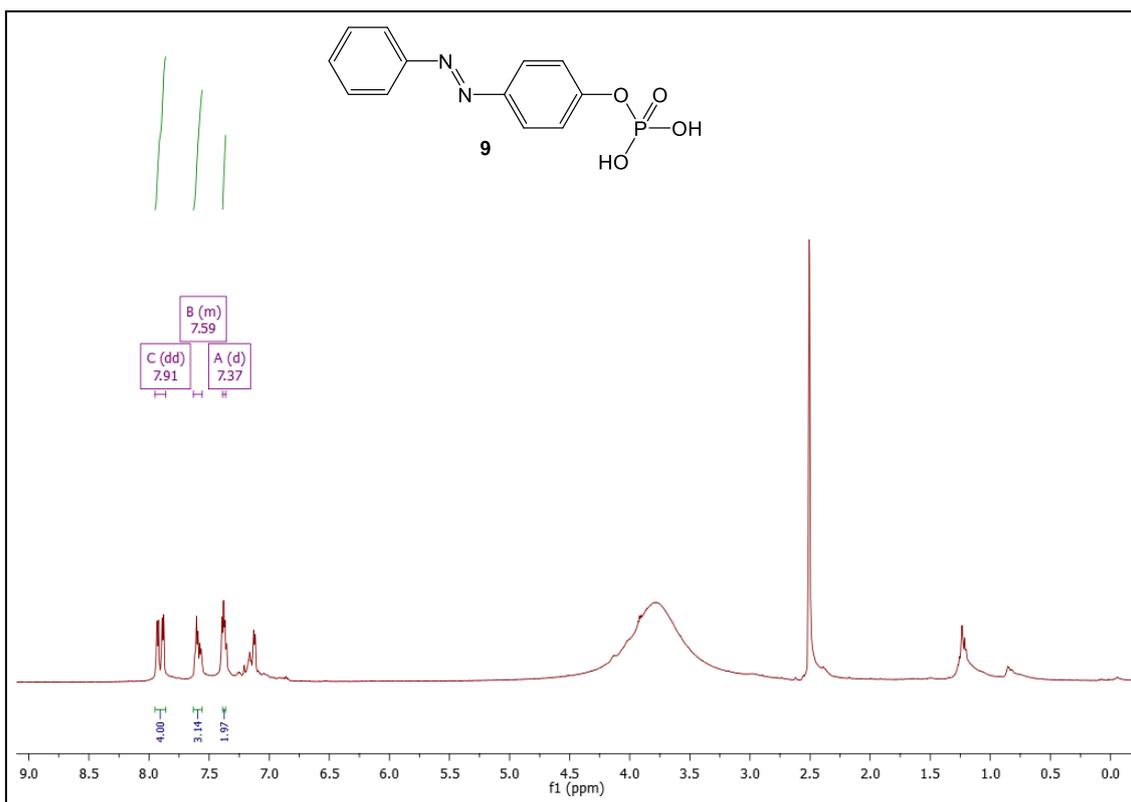
Apêndice 9. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **8** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



Apêndice 10. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **8** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



Apêndice 11. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **9** (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )



Apêndice 12. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **9** (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

