



# UFAL

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

**Desenvolvimento de metodologias analíticas para  
detecção de marcadores forenses em fluidos biológicos  
associados a crimes sexuais**

AMANDA LUISE ALVES NASCIMENTO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

AMANDA LUISE ALVES NASCIMENTO

**Desenvolvimento de metodologias analíticas para  
detecção de marcadores forenses em fluidos biológicos  
associados a crimes sexuais**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), para defesa de doutorado.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Daniela Santos Anunciação

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. M<sup>a</sup> Lúcia Marques Ferreira de Sousa Saraiva

Maceió – AL  
Abril – 2025

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

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

N244d Nascimento, Amanda Luise Alves.  
Desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção de marcadores forenses em fluidos biológicos associados a crimes sexuais / Amanda Luise Alves Nascimento. – 2025.  
155 f. : il., graf., tabs. color.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.

Co-orientadora: Daniela Santos Anunciação.

Co-orientadora: Lúcia Marques Ferreira de Sousa Saraiva

Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2025.

Bibliografia: f. 139-152.

Anexos: f. 154-155.

1. Delitos sexuais. 2. Aplicação forense. 3. Detecção colorimétrica. 4. Biomarcadores. 5. Produtos biológicas. I. Título.

CDU: 66.0:343.98



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda Amanda Luise Alves Nascimento, intitulada “*Desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção de marcadores forenses em fluidos biológicos associados a crimes sexuais*”, apresentada em sessão aberta, ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) no dia 24 de abril de 2025, às 9 h, por meio de videoconferência.



Documento assinado digitalmente  
**JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS**  
Data: 24/04/2025 13:45:36-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSUÉ CARINHANHA CALDAS SANTOS  
Orientador – PPGQB – IQB – UFAL

Assinado por: **Maria Lúcia Marques  
Ferreira de Sousa Saraiva**  
Num. de Identificação: 06454760  
Data: 2025.04.24 18:06:19+01'00'

Profa. Dra. MARIA LÚCIA M. F. DE SOUSA SARAIVA  
Coorientadora – FF / UP



Documento assinado digitalmente  
**MARIA DO CARMO HESPANHOL**  
Data: 24/04/2025 16:28:50-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARIA DO CARMO HESPANHOL  
UFV



Documento assinado digitalmente  
**ANA CATARINA REZENDE LEITE**  
Data: 24/04/2025 21:17:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ANA CATARINA REZENDE LEITE  
UFAL



Documento assinado digitalmente  
**DANIELA SANTOS ANUNCIACAO**  
Data: 25/04/2025 09:57:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. DANIELA SANTOS ANUNCIACÃO  
Coorientadora – PPGQB – IQB – UFAL



Documento assinado digitalmente  
**CLESIA CRISTINA NASCENTES**  
Data: 24/04/2025 16:51:32-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. CLÉSIA CRISTINA NASCENTES  
UFMG



Documento assinado digitalmente  
**JANAINA HEBERLE BORTOLUZZI**  
Data: 24/04/2025 18:47:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. JANAINA HEBERLE BORTOLUZZI  
UFAL



Ata da sessão referente à defesa intitulada "*Desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção de marcadores forenses em fluidos biológicos associados a crimes sexuais*", área de concentração: Química Analítica e linha de pesquisa: Química Analítica e Ambiental, pela discente Amanda Luise Alves Nascimento sob orientação do Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos.

No vigésimo quarto dia do mês de abril do ano de 2025, às 9 h, por meio de videoconferência, através do link <https://meet.google.com/isy-fvkc-agv> reuniu-se, em sessão aberta, a banca examinadora em epígrafe, aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação. Tendo o orientador declarado o início da sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, a discente procedeu a apresentação de seu Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-graduação *stricto sensu* por 46 min, e em seguida foi submetida à arguição online pela Banca Examinadora por 03:04 h, que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado: APROVADA.

Nada mais havendo a tratar, o orientador declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos senhores membros da Banca Examinadora e pela discente, atestando ciência do que nela consta.

Dra. CLÉSIA CRISTINA NASCENTES, UFMG  
Examinadora Externa à Instituição



Documento assinado digitalmente  
**CLESIA CRISTINA NASCENTES**  
Data: 24/04/2025 16:51:32-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. MARIA DO CARMO HESPANHOL, UFV  
Examinadora Externa à Instituição



Documento assinado digitalmente  
**MARIA DO CARMO HESPANHOL**  
Data: 24/04/2025 16:28:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. JANAINA HEBERLE BORTOLUZZI, UFAL  
Examinadora Interna



Documento assinado digitalmente  
**JANAINA HEBERLE BORTOLUZZI**  
Data: 24/04/2025 18:48:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. ANA CATARINA REZENDE LEITE, UFAL  
Examinadora Interna



Documento assinado digitalmente  
**ANA CATARINA REZENDE LEITE**  
Data: 24/04/2025 21:16:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. MARIA LÚCIA MARQUES FERREIRA DE SOUSA SARAIVA, UNIVERSIDADE do PORTO  
Coordenadora

Assinado por: **Maria Lúcia Marques  
Ferreira de Sousa Saraiva**  
Num. de Identificação: 06454760  
Data: 2025.04.24 18:03:13+01'00'

Dra. DANIELA SANTOS ANUNCIACÃO, UFAL  
Coordenadora



Documento assinado digitalmente  
**DANIELA SANTOS ANUNCIACAO**  
Data: 25/04/2025 09:57:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS, UFAL  
Presidente



Documento assinado digitalmente  
**JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS**  
Data: 24/04/2025 13:45:36-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AMANDA LUISE ALVES NASCIMENTO  
Doutorando



Documento assinado digitalmente  
**AMANDA LUISE ALVES NASCIMENTO**  
Data: 25/04/2025 22:19:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado coragem e força para concluir todas as etapas. À minha família, representada por minha mãe Solange Alves e minha irmã Fernanda Alves, por acreditarem em mim, por serem meu combustível diário, suporte emocional e por estarem comigo em todos os momentos mesmo à distância, vocês são os amores da minha vida. Agradeço à CAPES, em especial os projetos PROCAD - Segurança Pública e Ciências Forenses e Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE). Ao CNPq, UFAL, IQB e PPGQB por todo investimento e condições ofertadas para realização desse trabalho.

Ao meu Orientador Josué Carinhanha, agradeço por todo apoio, ensinamentos valiosos e por cada oportunidade, que foram essenciais no meu desenvolvimento pessoal e profissional ao longo desses 10 anos. As coorientadoras Daniela Anunciação e M<sup>a</sup> Lúcia Saraiva, por todo suporte durante o trabalho desenvolvido. Ao LINQA, composto por pessoas que foram fundamentais em diferentes etapas da minha jornada acadêmica, representados especialmente pelos meus amigos, Wood, Janaina, Karol, Jaelson, Reginaldo, Mayara, Aryanna, Francisco, Eduarda, Isabella, Fátima e Ellen. A Jéssica, Victorya, Emilly, Emyle, Marieta e Fábio, que auxiliaram em diferentes momentos no desenvolvimento desse trabalho. À Marina, minha irmã científica e grande amiga, que esteve ao meu lado desde os primeiros passos na ciência, me ensinou e auxiliou em grande parte do que sei, obrigada pela cumplicidade e apoio. Ao Ari, sou grata pela amizade, parceria constante em diferentes momentos, pelas conversas sinceras, suporte e desabafos compartilhados ao longo desses anos.

A todos os meus amigos, desde os amigos da infância e ensino médio, os adquiridos durante a jornada acadêmica, aqueles com quem dividi o lar, os que fiz durante minha estadia no Porto e os conquistados ao longo da vida, minha mais sincera gratidão. Espalhados por todas as regiões do Brasil e em alguns cantos do mundo, sou grata pelos caminhos que a vida seguiu e nos uniu. Aos que sempre estão comigo, minha rede de apoio, minha bolha afetiva, agradeço imensamente por cada gesto, palavra e todo apoio ofertado. Em especial, ao Moisés, um irmão com o qual a vida me presenteou, minha gratidão por toda a parceria, amizade e suporte ao longo desses anos, crescemos juntos e é bom dividir as conquistas e lutas da vida com você. Ao Felipe, meu namorado, agradeço por cada gesto de apoio, compreensão, cumplicidade e paciência, e por trazer leveza e tranquilidade para meus dias.

## RESUMO

A identificação de fluidos corporais é uma etapa crucial nas investigações criminais, especialmente em crimes sexuais, que apresentam alta incidência. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que uma em cada três mulheres no mundo já tenha sofrido violência física e/ou sexual. Para confirmar o estupro e identificar o agressor, amostras biológicas, como sêmen, são coletadas na cena do crime ou da vítima. Nesse contexto, diferentes metodologias têm sido avaliadas para superar as limitações dos ensaios convencionais, como resultados falso-positivos. Assim, metodologias de identificação de marcadores presentes no sêmen, têm sido avaliadas. O presente trabalho visou o emprego de diferentes metodologias como, considerando sistemas em solução, dispositivo analítico microfluídicos em papel ( $\mu$ PAD) e um explorando sistema por Análise por Injeção Sequencial (SIA), empregando a variação da resposta colorimétrica dos sistemas reativos devido à presença de frutose, íons zinco e fosfatase ácida, por meio da geração de cromóforos característicos. Diversos parâmetros foram otimizados no desenvolvimento dessas metodologias para aprimorar a seletividade e a sensibilidade das análises. Para a frutose, obteve-se um limite de detecção (LOD) de  $0,64 \text{ mg L}^{-1}$  e  $6,25 \text{ mg L}^{-1}$  em solução e no  $\mu$ PAD, respectivamente. Na detecção de íons zinco, diferentes azocorantes [2-carboxi-2'-hidroxi-5'-sulfoformazilbenzeno (zincon), 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)fenol (Br-PADAP) e 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR)] foram avaliados tanto em solução quanto no  $\mu$ PAD, apresentando variação quanto a sensibilidade, mas, todos passíveis de serem aplicados em amostras reais. O PAN apresentou melhor desempenho analítico em ambas as metodologias empregadas com LOD  $0,05 \mu\text{M}$  (solução) e  $3,44 \mu\text{M}$  ( $\mu$ PAD). Apresentando uma sensibilidade 100% no que se refere a validação qualitativa. Decorrente da maior sensibilidade em solução, o PAN foi selecionado para ser utilizado no SIA. Que, por sua vez, visa a dupla detecção de fosfatase ácida (AP) e íons de zinco, empregando os reagentes 4-aminoantipirina (4-AAP) e PAN, respectivamente. O sistema SIA demonstrou alta sensibilidade e precisão, com um LOD de  $9,4 \text{ U L}^{-1}$  para AP e  $3,1 \mu\text{M}$  para Zn(II). Todas as metodologias aplicadas apresentaram desvios inferiores a 3,8% e recuperações entre 88 e 120%, comprovando que o método é adequado para a finalidade proposta. A avaliação frente amostras reais (sêmen, sangue, sangue menstrual, fluido vaginal, saliva e urina) foi realizada para os diferentes marcadores apresentando boa sensibilidade e confiabilidade, permitindo análises qualitativas e quantitativas com traços mínimos de amostras diretamente na cena criminosa. Assim, essas metodologias visam suprir as limitações dos kits disponíveis no mercado, principalmente no que se refere ao tempo de resposta e falsos positivos, surgindo assim como inovação científica que contribuirá na elucidação de crimes sexuais.

**Palavras-chave:** crimes sexuais; aplicação forense; detecção colorimétrica; marcadores; amostras biológicas.

## ABSTRACT

The identification of bodily fluids is a crucial step in criminal investigations, especially in sexual assault cases, which have a high incidence rate. According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that one in three women worldwide has experienced physical and/or sexual violence. To confirm rape and identify the perpetrator, biological samples such as semen are collected from the crime scene or the victim. In this context, various methodologies have been evaluated to overcome the limitations of conventional assays, such as false-positive results. Therefore, techniques for identifying markers present in semen have been investigated. This study aimed to employ different methodologies, including solution-based systems, microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs), and a Sequential Injection Analysis (SIA) system, by exploring the colorimetric response variation of reactive systems in the presence of fructose, zinc ions, and acid phosphatase through the generation of characteristic chromophores. Several parameters were optimized during the development of these methods to enhance selectivity and sensitivity. For fructose detection, limits of detection (LOD) of  $0.64 \text{ mg L}^{-1}$  and  $6.25 \text{ mg L}^{-1}$  were obtained in solution and on the  $\mu$ PAD, respectively. For zinc ion detection, different azo dyes [2-carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzene (zincon), 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN), 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethylamino)phenol (Br-PADAP) and 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR)] were evaluated both in solution and on the  $\mu$ PAD, showing variations in sensitivity, but all were suitable for application in real samples. Among them, PAN exhibited the best analytical performance in both methodologies, with LODs of  $0.05 \text{ }\mu\text{M}$  (solution) and  $3.44 \text{ }\mu\text{M}$  ( $\mu$ PAD), and demonstrated 100% sensitivity in qualitative validation. Due to its higher sensitivity in solution, PAN was selected for use in the SIA system. The SIA approach aimed at the dual detection of acid phosphatase (AP) and zinc ions using 4-aminoantipyrine (4-AAP) and PAN, respectively. The SIA system showed high sensitivity and precision, with an LOD of  $9.4 \text{ U L}^{-1}$  for AP and  $3.1 \text{ }\mu\text{M}$  for Zn(II). All applied methodologies presented relative standard deviations (RSD) below 3.8% and recoveries ranging from 88% to 120%, confirming their adequacy for the proposed application. Evaluation with real samples (semen, blood, menstrual blood, vaginal fluid, saliva, and urine) was conducted for the different markers, showing good sensitivity and reliability, allowing both qualitative and quantitative analyses with minimal sample volumes directly at the crime scene. These methodologies aim to overcome the limitations of commercially available kits, particularly regarding response time and false positives, thus representing a scientific innovation that can contribute to the resolution of sexual assault cases.

**Keywords:** sexual crimes; forensic application; colorimetric detection; markers; biological samples.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** NÚMERO DE CASOS DE ESTUPRO E ESTUPRO DE VULNERÁVEL DOS ÚLTIMOS TREZE ANOS.....18
- FIGURA 2.** ESTRUTURA DA FOSFATASE ÁCIDA PROSTÁTICA (PDB: 1CVI). .....25
- FIGURA 3.** ESQUEMA REPRESENTATIVO DA CONFECÇÃO DOS DISPOSITIVOS UTILIZANDO IMPRESSÃO EM CERA. ....37
- FIGURA 4.** ESQUEMA ILUSTRATIVO DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO CROMÓFORO AZUL. ETAPA 1. GERAÇÃO DO COMPOSTO CARBONÍLICO EM SOLUÇÃO, ETAPA 2. ADIÇÃO DOS REAGENTES E AMOSTRA NA ZONA REACIONAL DO MPAD. ....39
- FIGURA 5.** REPRESENTAÇÃO DE FORMAÇÃO DO CROMÓFORO AZUL FORMADO APÓS O ACOPLAMENTO OXIDATIVO DOS COMPOSTOS CARBONÍLICOS GERADOS COM MBTH/FE(III). A. REAÇÃO DA FRUTOSE COM O  $KIO_4$  FORMANDO COMPOSTOS CARBONÍLICOS. B. REAÇÃO DOS COMPOSTOS CARBONÍLICOS COM O MBTH GERANDO UM CROMÓFORO DE COLORAÇÃO AZUL.....42
- FIGURA 6.** AVALIAÇÃO INICIAL DA FORMAÇÃO DO CROMÓFORO EM SOLUÇÃO A PARTIR DA OXIDAÇÃO DA FRUTOSE E REAÇÃO COM MBTH/FE(III) EM MEIO ÁCIDO. A. ESPECTROS DE ABSORÇÃO MOLECULAR EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE FRUTOSE ( $0 - 12,5 \text{ MG L}^{-1}$ ) E B. LINEARIZAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE REGRESSÃO LINEAR COM A RESPECTIVA INCERTEZA PARA O MODELO. CONDIÇÕES REACIONAIS:  $[KIO_4] = 0,2 \text{ MM}$ ,  $[MBTH] = 2,25 \text{ MM}$  E  $[FECL_3] = 2,0 \text{ MM}$  A  $25^\circ\text{C}$ . ....43
- FIGURA 7.** CURVA ANALÍTICA RELATIVA À INTENSIDADE DE COR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE ( $0 - 250 \text{ MG L}^{-1}$ ) EMPREGANDO  $\mu\text{PAD}$  ( $N = 3$ ). CONDIÇÕES:  $[KIO_4] = 5 \text{ MM}$ ,  $[MBTH] = 18 \text{ MM}$ ,  $[FECL_3] = 20 \text{ MM}$  A  $25^\circ\text{C}$ . CANAL DE COR UTILIZADO = CMYK. A FIGURA DENTRO DO GRÁFICO REPRESENTA AS ZONAS DO  $\mu\text{PAD}$  ONDE OCORREU A REAÇÃO COLORIMÉTRICA. ....44
- FIGURA 8.** AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE MOLIBDATO DE SÓDIO [3:1 (15 MM), 6:1 (30 MM), 12:1(60 MM) E 24:1 (120 MM)]. A. CURVA ANALÍTICA EM FUNÇÃO DA INTENSIDADE DE COR EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MOLIBDATO DE SÓDIO. B. ZONAS DE REAÇÃO COLORIMÉTRICA DO  $\mu\text{PAD}$ . C. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ADIÇÃO DO MOLIBDATO DE SÓDIO EM SOLUÇÃO. CONDIÇÕES: CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE ( $0 - 250 \text{ MG L}^{-1}$ ) EMPREGANDO  $\mu\text{PAD}$  ( $N = 3$ ),  $[KIO_4] = 5 \text{ MM}$ ,  $[MBTH] = 18 \text{ MM}$ ,  $[FECL_3] = 20 \text{ MM}$  A  $25^\circ\text{C}$ . CANAL DE COR UTILIZADO = CIANO.....45
- FIGURA 9.** AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE FE(II) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EMPREGANDO  $\mu\text{PAD}$  ( $N = 5$ ). CONDIÇÕES: CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE ( $0 - 200 \text{ MG L}^{-1}$ ),  $[Na_2MOO_4] = 60 \text{ MM}$ ,  $[KIO_4] = 5 \text{ MM}$ ,  $[MBTH] = 18 \text{ MM}$ ,  $[FECL_3] = 20 \text{ MM}$  A  $25^\circ\text{C}$ . CANAL DE COR UTILIZADO = CIANO. A FIGURA DENTRO DO GRÁFICO REPRESENTA AS ZONAS DO  $\mu\text{PAD}$  ONDE OCORREU A REAÇÃO COLORIMÉTRICA. ....46
- FIGURA 10.** INFLUÊNCIA DO MOLIBDATO E FERRO NA FORMAÇÃO DO CROMÓFORO. A. CURVA EM SOLUÇÃO, CONDIÇÕES: CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE ( $0 - 12 \text{ MG L}^{-1}$ ),  $[KIO_4] = 0,2 \text{ MM}$ ,  $[MBTH] = 2,25 \text{ MM}$  E  $[FECL_3] = 2,0 \text{ MM}$ . B. CURVA NO  $\mu\text{PAD}$  ( $N = 5$ ).

- CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE (0 – 200 MG L<sup>-1</sup>) EMPREGANDO, COM ADIÇÃO DE FE(II) AO SISTEMA, [NA<sub>2</sub>MOO<sub>4</sub>] = 60 MM, [KIO<sub>4</sub>] = 5MM, [MBTH] = 18 MM, [FECL<sub>3</sub>] = 20 MM A 25 °C. CANAL DE COR UTILIZADO = CIANO. A FIGURA AO LADO DO GRÁFICO B REPRESENTA AS ZONAS DO μPAD ONDE OCORREU A REAÇÃO COLORIMÉTRICA. ....47
- FIGURA 11.** INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO GLICINA (PH = 3,0) NA REAÇÃO COLORIMÉTRICA. CONDIÇÕES: CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE (0 – 5 MG L<sup>-1</sup>), [KIO<sub>4</sub>] = 0,2 MM, [MBTH] = 2,25 MM E [FECL<sub>3</sub>] = 2,0 MM. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. ....49
- FIGURA 12.** EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO. A. SENSIBILIDADE E B. SINAL DO BRANCO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HCL. CONDIÇÕES: CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE (0 – 200 MG L<sup>-1</sup>) EMPREGANDO μPAD (N = 3) A 25 °C. CANAL DE COR UTILIZADO = CIANO. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. ....49
- FIGURA 13.** INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO REAGENTE COLORIMÉTRICO (MBTH) E DO FE(III) NA SENSIBILIDADE E NO SINAL DO BRANCO EM SOLUÇÃO. A. SENSIBILIDADE E B. BRANCO EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MBTH; C. SENSIBILIDADE E D. BRANCO EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FE(III). CONDIÇÕES: CONCENTRAÇÃO FRUTOSE: (0 – 5 MG L<sup>-1</sup>), [NA<sub>2</sub>MOO<sub>4</sub>] = 0,2 MM, [KIO<sub>4</sub>] = 0,2 MM, [MBTH] = 2,25 MM, [FECL<sub>3</sub>] = 2,0 MM A 25 °C. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. ....50
- FIGURA 14.** INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO REAGENTE COLORIMÉTRICO (MBTH) E DO FE(III) NA SENSIBILIDADE E NO SINAL DO BRANCO NO MPAD. A. SENSIBILIDADE E B. BRANCO EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MBTH; C. SENSIBILIDADE E D. BRANCO EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FE(III). CONDIÇÕES: CONCENTRAÇÃO FRUTOSE: (0 – 200 MG L<sup>-1</sup>) EMPREGANDO μPAD (N = 5), [NA<sub>2</sub>MOO<sub>4</sub>] = 60 MM, [KIO<sub>4</sub>] = 5 MM, [FE(II)] = 2,5 MM A 25 °C. CANAL DE COR UTILIZADO = CIANO. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. ....50
- FIGURA 15.** SENSIBILIDADE DAS CURVAS EM FUNÇÃO DAS CORES DO SISTEMA SUBTRATIVO CMYK, CONTRIBUIÇÃO DOS CANAIS CIANO, MAGENTA E AMARELO. CONDIÇÕES: CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE (0 – 200 MG L<sup>-1</sup>) EMPREGANDO μPAD (N = 3), [NA<sub>2</sub>MOO<sub>4</sub>] = 60 MM, [KIO<sub>4</sub>] = 5 MM, [MBTH] = 18 MM, [FECL<sub>3</sub>] = 20 MM A 25 °C. ....51
- FIGURA 16.** AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES PRESENTES NO SÊMEN. A. EM SOLUÇÃO; B. NO MPAD. SISTEMAS: 1. FRUTOSE; 2. FRUTOSE + GLICOSE (PROPORÇÃO 2,5:1); 3. FRUTOSE E INOSITOL (PROPORÇÃO 2:1); 4. SÊMEN SINTÉTICO. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. ....52
- FIGURA 17.** DETERMINAÇÃO DA FAIXA LINEAR RELATIVA À REAÇÃO COLORIMÉTRICA, MEDIDAS DE ABSORBÂNCIA (ABS.) E INTENSIDADE DE COR (IC) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE. A. CURVA ANALÍTICA EM SOLUÇÃO, AS FIGURAS DENTRO DO GRÁFICO REPRESENTAM A CURVA DE ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DA FRUTOSE ATÉ A SATURAÇÃO E OS PONTOS DA

REAÇÃO COLORIMÉTRICA EM SOLUÇÃO B. CURVA ANALÍTICA NO $\mu$ PAD. A FIGURA DENTRO DO GRÁFICO REPRESENTA A CURVA DA INTENSIDADE DE COR EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DA FRUTOSE ATÉ A SATURAÇÃO E AS ZONAS DO $\mu$ PAD RELACIONADAS AS CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE NA FAIXA LINEAR. ....	53
<b>FIGURA 18.</b> AVALIAÇÃO AGREE DAS METODOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE FRUTOSE. A. EM SOLUÇÃO E B. NO MPAD. ....	55
<b>FIGURA 19.</b> ESTUDO DE DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ALIMENTÍCIAS EM SOLUÇÃO (AMOSTRA:SOLUÇÃO = 1:300). AMOSTRAS: (B) BRANCO ANALÍTICO; (1) SÊMEN; (2) FLUIDO VAGINAL; (3) SANGUE MENSTRUAL; (4) SANGUE ♂; (5) SANGUE ♀; (6) URINA ♂; (7) URINA ♀; (8) SALIVA ♂; (9) SALIVA ♀; (10) LEITE; (11) SUCO DE ABACAXI; (12) CLARA DE OVO; (13) SUCO DE LARANJA; (14) MOLHO DE TOMATE. CONDIÇÕES: [KIO <sub>4</sub> ] = 0,2 MM, [MBTH] = 2,25 MM E [FECL <sub>3</sub> ] = 2,0 MM A 25 °C. ....	56
<b>FIGURA 20.</b> AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ALIMENTÍCIAS NO $\mu$ PAD. A. AVALIAÇÃO QUALITATIVA E B. DADOS QUANTITATIVOS DAS AMOSTRAS. CONDIÇÕES: [NA <sub>2</sub> MOO <sub>4</sub> ] = 60 MM, [KIO <sub>4</sub> ] = 5 MM, [FE(II)] = 2,5 MM [MBTH] = 18 MM, [FECL <sub>3</sub> ] = 20 MM A 25 °C. CANAL DE COR UTILIZADO = CIANO. ....	57
<b>FIGURA 21.</b> AVALIAÇÃO TEMPORAL DA AMOSTRA EM DIFERENTES TECIDOS E SUPERFÍCIES. A. AMOSTRA DEPOSITADA NOS TECIDOS E ANALISADA NO $\mu$ PAD APÓS 24 E 48 HORAS SOB CONDIÇÕES AMBIENTAIS. B. AMOSTRA DEPOSITADA NO TECIDO SEDA AVALIADA APÓS 3 MESES MANTIDA EM CONDIÇÕES AMBIENTE. C. AMOSTRA DEPOSITADA EM DIFERENTES SUPERFÍCIES E AVALIADA NO $\mu$ PAD APÓS 24 H. CONDIÇÕES: [NA <sub>2</sub> MOO <sub>4</sub> ] = 60 MM, [KIO <sub>4</sub> ] = 5 MM, [FE(II)] = 2,5 MM [MBTH] = 18 MM, [FECL <sub>3</sub> ] = 20 MM A 22 A 27 °C. CANAL DE COR UTILIZADO = CIANO. ....	59
<b>FIGURA 22.</b> AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA DIFERENÇA ENTRE O BRANCO ANALÍTICO E O LOD. AS ZONAS 2, 3 E 9 REPRESENTAM O BRANCO, ENQUANTO AS ZONAS 1,4,5,6,7,8 E 10 CORRESPONDEM AO LOD. ....	60
<b>FIGURA 23.</b> FOTOS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO PRESUNTIVA COM DIFERENTES AMOSTRAS REAIS. REFERÊNCIA NEGATIVA (BRANCO), REFERÊNCIA POSITIVA (FRUTOSE). A. PLACA DE TOQUE. (1) URINA ♀; (2) SANGUE ♀; (3) FLUIDO VAGINAL; (4) SALIVA ♂; (5) SANGUE ♂; (6) URINA ♂; (7) SÊMEN; (8) SANGUE MENSTRUAL; (9) SALIVA ♂; (10) SALIVA ♀; (11) URINA ♂; (12) URINA ♀; (13) SALIVA ♀; (14) FLUIDO VAGINAL; (15) SÊMEN; (16) SANGUE ♀; (17) SANGUE MENSTRUAL; (18) URINA ♂; (19) SÊMEN; (20) SANGUE ♂. B. MPAD. (1) FLUIDO VAGINAL; (2) SANGUE MENSTRUAL; (3) SÊMEN; (4) URINA ♀; (5) SANGUE ♂; (6) SALIVA ♂; (7) SÊMEN; (8) URINA ♂; (9) SANGUE ♂; (10) SÊMEN; (11) SALIVA ♀; (12) FLUÍDO VAGINAL; (13) SÊMEN; (14) URINA ♂; (15) URINA ♀; (16) SANGUE ♀; (17) SANGUE MENSTRUAL; (18) SALIVA ♂; (19) SÊMEN; (20) SALIVA ♀. ....	61
<b>FIGURA 24.</b> REPRESENTAÇÃO DA CONFECÇÃO DOS DISPOSITIVOS EMPREGANDO IMPRESSORA DE CORTE. ....	78
<b>FIGURA 25.</b> REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA ENTRE OS AZOCORANTES E ÍONS ZINCO NA ZONA REACIONAL DO MPAD. ....	79

<b>FIGURA 26.</b> REPRESENTAÇÃO DOS CROMÓFOROS FORMADOS A PARTIR DAS REAÇÕES DE COMPLEXAÇÃO COM OS AZOCORANTES. A. ZINCON, B. PAN, C. BR-PADAP E, D. PAR. ...	82
<b>FIGURA 27.</b> INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO AZOCORANTE NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO. A. ZINCON, B. PAN, C. BR-PADAP E D. PAR. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%.....	83
<b>FIGURA 28.</b> EFEITO DO PH DO MEIO NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO. A. ZINCON, B. PAN, C. BR-PADAP E D. PAR. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. 83	83
<b>FIGURA 29.</b> AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO NAS REAÇÕES COLORIMÉTRICAS. A. ZINCON, B. PAN, C. BR-PADAP E D. PAR. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. ....	84
<b>FIGURA 30.</b> AVALIAÇÃO CINÉTICA DOS AZOCORANTES. A. ZINCON, B. PAN, C. BR-PADAP E D. PAR. ....	84
<b>FIGURA 31.</b> LINEARIZAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE REGRESSÃO LINEAR. A FIGURA DENTRO DO GRÁFICO SÃO OS ESPECTROS DE ABSORÇÃO MOLECULAR EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS ZN(II) PARA CADA REAGENTE. A. ZINCON 60MM, B. PAN 40 MM, C. BR-PADAP 20 MM E, D. PAR 40 MM. ....	86
<b>FIGURA 32.</b> ENSAIO PRELIMINAR EM AMOSTRA REAL COM OS AZOCORANTES NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS. A. ZINCON, B. PAN, C. BR-PADAP E, D. PAR. OS NÚMEROS DENTRO DAS CAIXAS REFEREM-SE AOS FATORES DE DILUIÇÃO (AMOSTRA:SOLVENTE). ....	89
<b>FIGURA 33.</b> AVALIAÇÃO DA ORDEM DE ADIÇÃO DOS REAGENTES NO MPAD. A. PAN, B. BR-PADAP E, C. PAR. CONDIÇÕES: PH = 9,0 (A, B) E PH = 9,5 (B), [PAN] = 1,0 MM, [BR-PADAP] = 0,6 MM E [PAR] = 1,0 MM. ORDENS AVALIADAS: (1) AZOCORANTE → ZN(II), (2) ZN(II) → AZOCORANTE E (3) AZOCORANTE → TAMPÃO BORATO → ZN(II). TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. ....	93
<b>FIGURA 34.</b> SENSIBILIDADE DAS CURVAS EM FUNÇÃO DAS CORES DO SISTEMA SUBTRATIVO CMYK, CONTRIBUIÇÃO DOS CANAIS CIANO, MAGENTA E AMARELO. A. PAN, B. BR-PADAP E, C. PAR. CONDIÇÕES: PH = 9,0 (A, B) E PH = 9,5 (B), [PAN] = 1,0 MM, [BR-PADAP] = 0,6 MM E [PAR] = 1,0 MM. ....	93
<b>FIGURA 35.</b> VARIAÇÃO DOS VOLUMES DAS ALÍQUOTAS DOS REAGENTES ADICIONADAS AO MPAD. A. PAN, B. BR-PADAP E, C. PAR. CONDIÇÕES: PH = 9,0 (A, B) E PH = 9,5 (B), [PAN] = 1,0 MM, [BR-PADAP] = 0,6 MM E [PAR] = 1,0 MM. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. ....	94
<b>FIGURA 36.</b> INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO BORATO NA REAÇÃO COLORIMÉTRICA NO MPAD. A. PAN, B. BR-PADAP E, C. PAR. CONDIÇÕES: PH = 9,0 (A, B) E PH = 9,5 (B), [PAN] = 1,0 MM, [BR-PADAP] = 0,6 MM E [PAR] = 1,0 MM. TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%. ....	94
<b>FIGURA 37.</b> AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AZOCORANTE NA REAÇÃO COLORIMÉTRICA NO MPAD. A. PAN, B. BR-PADAP E, C. PAR. CONDIÇÕES: 25 MM, PH = 9,0	

(A, B) E 50 MM, PH = 9,5 (B). TESTE APLICADO: ANOVA ONE WAY, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%.	95
<b>FIGURA 38.</b> DETERMINAÇÃO DA FAIXA LINEAR NO $\mu$ PAD RELATIVA À INTENSIDADE DE COR (IC) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS ZN(II). A. PAN, B. BR-PADAP, E C. PAR. AS FIGURAS DENTRO DO GRÁFICO REPRESENTAM AS CURVAS DA INTENSIDADE DE COR EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ÍONS ZN(II) ATÉ A SATURAÇÃO E AS ZONAS DO $\mu$ PAD RELACIONADAS AS CONCENTRAÇÕES DE ÍONS ZN(II) NA FAIXA LINEAR.	97
<b>FIGURA 39.</b> AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE ZINCO EMPREGANDO A FERRAMENTA MÉTRICA AGREE. A. EM SOLUÇÃO E B. NO MPAD.	99
<b>FIGURA 40.</b> FOTOS COM DIFERENTES AMOSTRAS REAIS NA PLACA DE TOQUE EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO PRESUNTIVA E PERCENTUAIS DE ACERTO. A. PAN, B. BR-PADAP E, C. PAR.	101
<b>FIGURA 41.</b> FOTOS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO PRESUNTIVA COM AS DIFERENTES AMOSTRAS REAIS NO MPAD, COM OS PERCENTUAIS DE ACERTOS. A. PAN, B. BR-PADAP E, C. PAR. TRATAMENTO QUANTITATIVO EM FUNÇÃO DA INTENSIDADE DE COR (IC) PARA AS DIFERENTES AMOSTRAS . D. PAN, E. BR-PADAP E, F. PAR.	102
<b>FIGURA 42.</b> SISTEMA SIA PARA A DETECÇÃO DE ÍONS AP E $Zn^{2+}$ .SOLUÇÃO TRANSPORTADORA (TAMPÃO TRIS, 0,2 M, PH 8,0); SYRINGE PUMP (SP); HOLDING COIL (HC, 100 CM, DIÂMETRO INTERNO DE 0,8 MM); R <sub>1</sub> (PAN); R <sub>2</sub> (SUBSTRATO, PP); R <sub>3</sub> (TAMPÃO ACETATO, 0,05 M, PH 5); R <sub>4</sub> (4-AAP); R <sub>5</sub> (OXIDANTE, K <sub>3</sub> FE(CN) <sub>6</sub> ); REACTION COIL (RC, 15 CM); S (AMOSTRA); D (DETECTOR, 515 NM) E W (RESÍDUO).	113
<b>FIGURA 43.</b> REPRESENTAÇÃO DOS CROMÓFOROS FORMADOS APÓS AS REAÇÕES. A. GERAÇÃO DO CROMÓFORO DE COR VERMELHA APÓS A HIDRÓLISE DO FENIL FOSFATO (PP) NA PRESENÇA DE AP, RESULTANDO NA PRODUÇÃO DE FENOL, QUE REAGE POR CONDENSAÇÃO OXIDATIVA COM 4-AAP NA PRESENÇA DE K <sub>3</sub> FE(CN) <sub>6</sub> COMO OXIDANTE. B. FORMAÇÃO DO CROMÓFORO DE COR MAGENTA APÓS A REAÇÃO DOS ÍONS $Zn^{2+}$ COM PAN.	117
<b>FIGURA 44.</b> LINEARIZAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE REGRESSÃO LINEAR COM OS VALORES DE INCERTEZA PARA O MÉTODO. A. CURVA PARA DETECÇÃO DE AP; B. CURVA PARA DETECÇÃO DOS ÍONS $Zn^{2+}$ .	125
<b>FIGURA 45.</b> AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO MÉTODO FRENTE A DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS. A. AMOSTRAS SINTÉTICAS, B. AMOSTRAS REAIS. O SINAL ANALÍTICO FOI NORMALIZADO, USANDO O BRANCO ANALÍTICO E O SINAL DA AMOSTRA DE SÊMEN COMO REFERÊNCIA.	127
<b>FIGURA 46.</b> AVALIAÇÃO AGREE DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ÍONS AP E $Zn^{2+}$ : (A) SIA E (B) EM BATELADA. AVALIAÇÃO AGREEPREP (C) SIA E (D) EM BATELADA.	129
<b>FIGURA 47.</b> DESIGNER DO COLOR – A, DISPOSITIVO COM TRIPLA DETECÇÃO (FRUTOSE, FOSFATASE ÁCIDA E ZINCO).	138

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> ALGUNS KITS COMERCIAIS PARA DETECÇÃO DE SÊMEN COMPARADO AO TESTE EM DESENVOLVIMENTO. -----	20
<b>TABELA 2.</b> CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS EM DIFERENTES FLUIDOS BIOLÓGICOS. -----	22
<b>TABELA 3.</b> AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES REACIONAIS PARA OXIDAÇÃO DA FRUTOSE EM MEIO ÁCIDO (N = 3). CONDIÇÕES REACIONAIS: [NA <sub>2</sub> MOO <sub>4</sub> ] = 0,2 MM, [KIO <sub>4</sub> ] = 0,2 MM, [MBTH] = 2,25 MM, [FECL <sub>3</sub> ] = 2,0 MM A 25 °C.-----	48
<b>TABELA 4.</b> PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO PROPOSTO.-----	54
<b>TABELA 5.</b> VALORES DE RECUPERAÇÕES COM AMOSTRA DE SÊMEN EM SOLUÇÃO (DILUIÇÃO: 6700×) E NO MPAD (DILUIÇÃO: 100×).-----	55
<b>TABELA 6.</b> PARÂMETROS DE DESEMPENHO DA AVALIAÇÃO QUALITATIVA DOS MÉTODOS ANALÍTICOS (EM SOLUÇÃO E NO MPAD) POR VOLUNTÁRIOS. -----	62
<b>TABELA 7.</b> CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA OS REAGENTES E PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA OS REAGENTES EM SOLUÇÃO. -----	86
<b>TABELA 8.</b> COMPARAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS (EM SOLUÇÃO) EMPREGANDO OS AZOCORANTES (ZINCON, PAN, BR-PADAP E PAR) APLICADOS EM AMOSTRAS DISTINTAS. -----	88
<b>TABELA 9.</b> VALORES DE RECUPERAÇÕES COM AMOSTRA DE SÊMEN PARA O PAN, BR-PADAP E PAR.-----	90
<b>TABELA 10.</b> CONDIÇÕES OTIMIZADAS E PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA AZOCORANTES NO MPAD.-----	97
<b>TABELA 11.</b> PERCENTUAIS DE RECUPERAÇÕES COM AMOSTRA DE SÊMEN NO MPAD PARA OS AZOCORANTES PAN, BR-PADAP E PAR. -----	98
<b>TABELA 12.</b> PARÂMETROS DE DESEMPENHO DA AVALIAÇÃO QUALITATIVA DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA OS AZOCORANTES (EM SOLUÇÃO E NO MPAD) REALIZADA POR VOLUNTÁRIOS (N ≥ 68).-----	103
<b>TABELA 13.</b> CICLO ANALÍTICO SIA UTILIZADO PARA A DETECÇÃO DE AP E ÍONS ZN <sup>2+</sup> . A VAZÃO UTILIZADA FOI DE 1 ML MIN <sup>-1</sup> EM TODAS AS ETAPAS.-----	113
<b>TABELA 14.</b> PARÂMETROS DA OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA SIA PARA DETECÇÃO DE AP E ÍONS ZN <sup>2+</sup> .-----	116
<b>TABELA 15.</b> AVALIAÇÃO DA ORDEM DE REAÇÃO PARA A DETECÇÃO DE AP E ÍONS ZINCO. -----	117
<b>TABELA 16.</b> AVALIAÇÃO DO PH NA COMPLEXAÇÃO DE ÍONS ZN <sup>2+</sup> UTILIZANDO TAMPÃO BORATO.-----	119
<b>TABELA 17.</b> ANÁLISE DE TAMPÕES PARA REAÇÕES ENVOLVENDO AP E ÍONS ZN <sup>2+</sup> EM PH 8,0. -----	119
<b>TABELA 18.</b> AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PARADA DE FLUXO NA OTIMIZAÇÃO ANALÍTICA. -----	120
<b>TABELA 19.</b> VARIAÇÃO DOS VOLUMES DE REAGENTES UTILIZADOS NO SISTEMA SIA. ----	121

<b>TABELA 20.</b> AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE REAGENTES UTILIZADAS NA DETECÇÃO DOS MARCADORES AP E ÍONS $Zn^{2+}$ . -----	122
<b>TABELA 21.</b> INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO REATOR NA MISTURA DAS SOLUÇÕES. -----	123
<b>TABELA 22.</b> VARIAÇÃO NA VAZÃO DA SOLUÇÃO TRANSPORTADORA. -----	123
<b>TABELA 23.</b> INFLUÊNCIA DO COMPRIMENTO DE ONDA NA DETECÇÃO. -----	124
<b>TABELA 24.</b> FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO SIA. -----	125
<b>TABELA 25.</b> VALORES DE RECUPERAÇÕES EM AMOSTRA SINTÉTICA DE SÊMEN PARA AP E $Zn^{2+}$ . -----	126
<b>TABELA 26.</b> COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS SIA E BATELADA NA DETECÇÃO DO ANALITO. -----	128

## LISTA DE ABREVIATURA e SIGLAS

4-AAP – 4-aminoantipirina

A – Absorvância

Fontes de luz alternativas (ALS)

$\mu$ PAD – Dispositivos analíticos microfluídicos em papel

WHO – Organização Mundial de Saúde

AP – Fosfatase ácida

M – Molar

nm – Nanômetros

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

pH – Potencial hidrogeniônico

PSA – antígeno prostático específico

FIA – análise por injeção em fluxo

SIA – análise por injeção sequencial

UV – Ultravioleta

UV-vis – Ultravioleta-visível

RNA – ácido ribonucleico

NIR – infravermelho próximo

PCA – análise de componentes principais

MCR-ALS – resolução de curva multivariada com mínimos quadrados alternados

MEV – microscopia eletrônica de varredura

ATR-FTIR– espectroscopia infravermelha de refletância total atenuada - transformada de Fourier

MBTH – 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona

RGB – vermelho, verde, azul

CMYK – ciano, magenta, amarelo, preto

RSD – desvio padrão relativo

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	17
1.1 Sêmen: composição e identificação.....	18
1.2 Frutose como marcador químico para amostra de sêmen.....	23
1.3 Zinco como marcador químico para amostra de sêmen.....	24
1.4 Fosfatase ácida (FA) como marcador bioquímico para amostra de sêmen.....	25
1.5 Dispositivos analíticos microfluídicos em papel ( $\mu$ PADs).....	26
1.6 Análise de injeção sequencial (SIA).....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS</b> .....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos .....	31
<b>4. CAPÍTULO 1: Teste presuntivo para detecção de sêmen baseado no marcador químico frutose: avaliação de estratégias colorimétricas em solução e em dispositivo analítico microfluídicos em papel</b> .....	33
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>2 EXPERIMENTAL</b> .....	36
2.1 Reagentes e preparo das soluções .....	36
2.2 Preparação dos $\mu$ PAD.....	37
2.3 Procedimentos.....	37
2.3.1 <i>Ensaio colorimétrico em solução</i> .....	37
2.3.2 <i>Detecção de frutose utilizando <math>\mu</math>PADs</i> .....	38
2.3.3 <i>Avaliação de possíveis interferentes</i> .....	39
2.3.4 <i>Testes em amostras reais</i> .....	39
2.3.5 <i>Tratamento estatístico e figuras de mérito</i> .....	40
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
3.1 Otimização das condições experimentais para os ensaios em solução e no $\mu$ PADs.....	42
3.2 Detecção colorimétrica de frutose empregando $\mu$ PAD.....	51
3.2.1 <i>Avaliação dos canais de cor</i> .....	51
3.3 Avaliação de possíveis interferentes .....	52
3.4 Figuras de mérito e ensaios de recuperação .....	53
3.5 Ensaio qualitativo com amostras reais.....	56
3.6 Validação estatística dos métodos para aplicações qualitativas.....	59

<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>
<b>5. CAPÍTULO 2: Detecção colorimétrica de zinco em amostras seminais: avaliação sistemática de estratégias de análise</b> .....	<b>74</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>2. EXPERIMENTAL</b> .....	<b>77</b>
<b>2.1 Materiais e soluções</b> .....	<b>77</b>
<b>2.2 Confeção do dispositivo de papel</b> .....	<b>77</b>
<b>2.3 Procedimentos</b> .....	<b>78</b>
2.3.1 <i>Detecção colorimétrica em solução</i> .....	<b>78</b>
2.3.2 <i>Detecção colorimétrica empregando <math>\mu</math>PAD</i> .....	<b>78</b>
2.3.3 <i>Amostras reais e avaliação qualitativa de possíveis interferentes</i> .....	<b>79</b>
2.3.4 <i>Análise estatística e figuras de mérito</i> .....	<b>80</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>80</b>
<b>3.1 Reações em solução</b> .....	<b>80</b>
3.1.1 <i>Otimização dos parâmetros reacionais</i> .....	<b>80</b>
3.1.2 <i>Figuras de mérito e ensaios de recuperação</i> .....	<b>85</b>
<b>3.2 Reações colorimétricas no <math>\mu</math>PAD</b> .....	<b>91</b>
3.2.1 <i>Otimização das condições reacionais e canais de cor no <math>\mu</math>PAD</i> .....	<b>91</b>
3.2.2 <i>Figuras de mérito e ensaios de recuperação</i> .....	<b>96</b>
<b>3.3 Ensaios em amostras reais</b> .....	<b>99</b>
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>104</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>104</b>
<b>6. CAPÍTULO 3: Detecção simultânea de zinco e fosfatase ácida em amostras forenses empregando análise por injeção sequencial com detecção colorimétrica</b> .....	<b>109</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>110</b>
<b>2. EXPERIMENTAL</b> .....	<b>112</b>
<b>2.1. Reagentes e soluções</b> .....	<b>112</b>
<b>2.2 Sistema SIA</b> .....	<b>112</b>
<b>2.3 Procedimento de Análises por Injeção Sequencial</b> .....	<b>113</b>
<b>2.4 Amostras reais e sintéticas</b> .....	<b>114</b>
<b>2.5 Análise estatística</b> .....	<b>115</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>115</b>
<b>3.1 Otimização do sistema SIA</b> .....	<b>115</b>

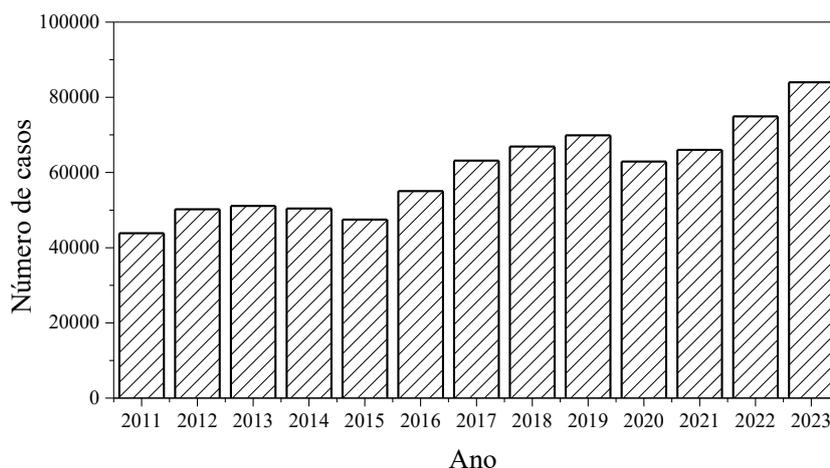
3.1.1 Ordem da reação e aspiração das alíquotas .....	116
3.1.2 Avaliação do pH e seleção do tampão .....	118
3.1.3 Stop flow time .....	119
3.1.4 Volume e concentração dos reagentes .....	120
3.1.5 Tamanho do reator e vazão das soluções .....	122
3.1.6 Avaliação do comprimento de onda .....	123
<b>3.2 Figuras de mérito .....</b>	<b>124</b>
<b>3.3 Aplicação do método em amostras .....</b>	<b>126</b>
<b>3.4 Comparação dos métodos SIA e batelada com base nos princípios da química verde .....</b>	<b>129</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>130</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>130</b>
<b>7. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>138</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>138</b>
<b>9. REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>	<b>139</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>153</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A violência está presente em todas as sociedades, classes sociais e raças, impactando diretamente na saúde da população mundial, trata-se de uma forma de ação contra pessoas que pode causar diversos tipos de danos à vítima (García-Moreno et al., 2013; Smith; Sinkford, 2022). Existem diferentes tipos de violência: física, psicológica, sexual, patrimonial e moral, distribuídas entre diferentes grupos-alvo. No Brasil, busca-se implementar medidas visando reduzir os indicadores relacionados a violência, desde a década de 80, onde o homicídio e crimes sexuais são os mais frequentes (Dahlberg; Krug, 2006; Katagiri et al., 2019; WHO, 2021). A agressão sexual é um crime de violência, que lamentavelmente aumenta o número de registros a cada ano, as vítimas geralmente são crianças e mulheres, e os agressores são na maioria das vezes do sexo masculino (Collins, 1998). Violência sexual é qualquer ato sexual ou tentativa do ato não esperado, com atitudes como a repressão, ameaças ou força física, praticado por qualquer pessoa independentemente de suas relações com a vítima, em qualquer ambiente (Basile et al., 2011). O estupro é uma das formas de violência sexual mais frequente, cometida principalmente pelos homens contra as mulheres e crianças, atingindo aproximadamente 1 a cada 3 mulheres (WHO, 2021).

No Brasil, a Secretaria da Saúde estima um total de mais de 500 mil tentativas ou casos consumados anualmente, destes, apenas cerca de 10% procuram a polícia (Brasil, 2024; Childhood Brasil, 2019; Katagiri et al., 2019; Moreira et al., 2022). Os dados apresentados no Anuário Brasileiro de Segurança Pública de 2024, registrou que 2023 houve o maior número de estupros da história, 84.988 casos, um crescimento de 6,5% em relação ao ano anterior. Os números de casos de estupros cresceram 91,5% entre 2011 e 2023 (Fig. 1), tendo como principais vítimas crianças, em 63.831 dos casos, perfazendo 76%.

**Figura 1.** Número de casos de estupro e estupro de vulnerável dos últimos treze anos.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Nesse contexto, a ciência forense busca desenvolver e validar métodos analíticos de investigação criminal, sendo a identificação de fluidos corporais, como sangue, sêmen, secreção vaginal, saliva e urina, uma etapa crucial na investigação (Bazyar, 2023; Das et al., 2021). Assim, amostras biológicas coletadas na cena do crime ou na própria vítima da ação criminosa são de extrema importância para identificar os suspeitos dos atos criminosos, devido às informações obtidas pela análise dessas (Mapes; Kloosterman; Poot, 2015). Em casos de violência sexual onde há o contato físico entre o agressor e a vítima e, conseqüentemente, troca de material biológico, a identificação do fluido vaginal em uma amostra mista contendo sêmen fornece importantes evidências probatórias de relação sexual, sendo a detecção e a identificação por meio de testes laboratoriais, etapas vitais nesse tipo de investigação (Peonim et al., 2013; Takamura et al., 2018).

Contudo, nem sempre é fácil identificar a natureza de um fluido corporal, pois muitos possuem aparência similar à de outras amostras biológicas ou não, e alguns não são visíveis na avaliação visual. Assim, sendo necessária uma confirmação adicional para garantir a veracidade das evidências obtidas (Virkler; Lednev, 2010; Vyas et al., 2020). Em casos que envolvem violência sexual, um dos fluidos corporais mais encontrado durante as investigações criminais é o sêmen.

### **1.1 Sêmen: composição e identificação**

O sêmen é o fluido corporal mais examinado em crimes sexuais, considerado um marcador confiável em casos de estupro, coito anal e outras ocorrências forenses, podendo

ser empregado para confirmar o crime e identificar possíveis suspeitos (Sakurada et al., 2020; Wasserstrom et al., 2013). Trata-se de um líquido produzido no aparelho sexual masculino, fundamental para a fertilidade do homem. Esse fluido é formado por uma mistura de componentes produzidos por glândulas diferentes, misturados durante a ejaculação. Cerca de 5% do ejaculado, é composto por secreções das glândulas bulbouretrais e uretrais, 15 a 30% da próstata, pequenas contribuições da ampola e do epidídimo e, a maior parte do ejaculado deriva das vesículas seminais (Owen; Katz, 2005).

Todos os componentes do sêmen são associados ou produzidos em diferentes glândulas do sistema reprodutor. Dentre elas, a próstata é fonte de fosfatase ácida, antígeno prostático específico (PSA), ácido cítrico, zinco, entre outros. A vesícula seminal fornece frutose, ácido ascórbico e prostaglandinas, enquanto o epidídimo é responsável por produzir alguns aminoácidos, uma pequena quantidade da frutose presente é oriunda da ampola do ducto deferente (Mann, 1948; Das et al., 2021). Assim, os componentes bioquímicos presentes em altas concentrações no sêmen como, frutose, colina, espermina, ácido cítrico, fosfatase ácida e albumina, podem a priori, ser empregados como possíveis marcadores em testes de identificação. A glicose, inositol, ácido láctico e ureia também estão presentes nesse fluido, porém em quantidades menores (Virkler; Lednev, 2009).

Os testes utilizados na identificação dos fluidos corporais em cenas de crime podem ser classificados de duas formas, presuntivos e confirmatórios, de acordo com sua seletividade (Zapata et al., 2015). De forma geral, a presença/ausência de uma amostra biológica é primeiramente avaliada por meio de testes presuntivos, enquanto, os testes confirmatórios são ou não empregados como segunda etapa, dependendo do resultado prévio do teste presuntivo (Kanu; Kaplan, 2016). Atualmente existe uma ampla variedade de testes presuntivos disponíveis que podem ser empregados para rastrear esfregaços ou manchas que possam conter sêmen nas cenas do crime, como diferentes fontes de luz alternativas (ALS), a exemplo, da luz azul (450 nm), luz UV (315 - 400 nm), e testes enzimáticos, com destaque para aqueles utilizados na detecção da fosfatase ácida seminal (Tabela 1) (Gamblin; Morgan-Smith, 2020; Rodriguez et al., 2019; Tay, et al., 2021; Wasserstrom et al., 2013).

**Tabela 1.** Alguns kits comerciais para detecção de sêmen comparado ao teste em desenvolvimento.

Teste	Valor por análise (R\$)	Método	Volume da amostra	Marcadores	Faixa linear	Limitações	Empresa
Acid Phosphatase Assay Kit (pNPP)	4,58	Colorimétrico	25 µL	AP	-		Sigma
Acid Phosphatase Fluorometric Assay Kit	22,03	Fluorimétrico	20 µL	AP	0,008 - 10 U L <sup>-1</sup>		Sigma
CheckMate Semen Detection Kit	46,00	Colorimétrico	50 µL	AP	42 – 12 000 U L <sup>-1</sup>	As soluções possuem estabilidade de apenas 24h	SpyCentre Security
Semen Detection Test - P30 Antigen	45,00	Colorimétrico	-	PSA	-	A urina é falso-positivo e apresenta falso-negativo para algumas amostras de sêmen	Crime Scene
BLUESTAR® Identi-PSA	37,80	Colorimétrico	≥ 1 µL	PSA	4 – 10 ng mL <sup>-1</sup>	Falsos positivos	Arrowhead forensics
Semen Detection Professional Test	27,88	Colorimétrico	-	PSA	-	Falsos negativos	Puritan
Semen Detection Professional Test	27,88	Colorimétrico	-	AP	-	Falsos negativos	Puritan
Semen test strips	69,20	Colorimétrico	≥ 1 µL	AP	-		Electronicbuds
Semen Detection Test – AP kit	70,00	Colorimétrico	≥ 1 µL	AP	-		Crime Scene
MACFOR - Color S	~1,00	Colorimétrico	2 µL	Frutose, Zinco e AP	-		Este trabalho

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Para confirmação da presença de sêmen, a técnica amplamente aceita é a identificação microscópica de espermatozoides, considerada como referência, é frequentemente utilizada após resultado positivo em um teste presuntivo (Peonim et al., 2013; Unuma et al., 2023). Existem também ensaios imunológicos de confirmação para detecção de sêmen, baseados na presença de proteínas específicas encontradas no sêmen ou esperma, o comumente empregado é o teste do antígeno específico da próstata (PSA), o qual, detecta a presença da PSA oriunda da próstata, presente no sêmen, inclusive em homens oligospermáticos e azoospermicos (Alaloosh; Aljubori, 2019; Boward; Wilson, 2013; Dejous; Krishnan, 2021). Além disto, emprega-se a biologia molecular para identificação do agressor a partir do DNA e pode-se utilizar também outras metodologias com marcadores específicos, exemplo, DNA e RNA (Chhabra et al., 2022; Fleming; Harbison, 2010; Haas et al., 2009).

Todavia, essas estratégias de análise para identificação ou detecção de sêmen apresentam como principais limitações a quantidade de amostra e reagentes, portabilidade, custo, tempo de resposta e possibilidade de resultados falsos-positivos ou negativos. Tornando a identificação um processo trabalhoso, visto que substâncias encontradas nas cenas de crimes, muitas vezes se assemelham à aparência de determinado fluido corporal (Casey et al., 2020; Takamura, et al., 2018). Desta forma, em virtude do número excessivo de casos e das limitações apresentadas pelas metodologias disponíveis no mercado, faz-se necessário o desenvolvimento de novos testes ou dispositivos mais rápidos, sensíveis, seletivos e que permitam além da identificação a quantificação, quando necessária, dos marcadores forenses na cena do crime (Agarwal; Csóka, 2019; Yao et al., 2020).

Sendo assim, têm-se averiguado diferentes metodologias de identificação, incluindo novos testes presuntivos e confirmatórios (Zha, et al., 2020). Como a metodologia não destrutiva proposta por Silva et al. (2017) utilizando imagem hiperespectral no infravermelho próximo (NIR) para detecção de manchas de sêmen em tecidos, empregando análise de componentes principais (PCA) e resolução de curva multivariada com mínimos quadrados alternados (MCR-ALS). Além de um novo método que também pode ser utilizado para identificar manchas de sêmen, aplicando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise de energia dispersiva de raios X para a detecção oligoelementos metálicos, uma vez que estão presentes em quantidades variadas nos fluidos corporais (Dube et al., 2020).

Como supracitado, a maioria desses testes utilizam marcadores forenses, como por exemplo, a fosfatase ácida e a colina, outros marcadores presentes no sêmen em altas concentrações quando comparado a outros fluidos corporais também podem ser empregados, como a frutose e zinco (Tabela 2) (Gamblin; Morgan-Smith, 2020).

**Tabela 2.** Concentração dos marcadores bioquímicos em diferentes fluidos biológicos.

Marcadores	Fluidos				
	Sêmen	Fluído vaginal	Sangue	Urina	Saliva
Frutose (mg L <sup>-1</sup> )	1000 – 6300 Jakobsen et al., 1989 Owen; Katz, 2005 Thang et al., 2018	93,1 – 176,9 Zaviačić et al., 1988	1,1 – 1,7 Kawasaki et al., 2002	39,4 – 99,6 Zaviačić et al., 1988	770 – 810 Kelsay et al., 1974
Fosfatase ácida (U L <sup>-1</sup> )	500 – 6000 Miteva et al., 2010 Rümke, 1974	3,0 – 12,5 Tamaki et al., 1989	3,0 – 4,7 Seiler et al., 1983	0,6 – 2,2 Goodwin, J. F. (1970)	4,5 – 14,6 Neto et al., 2011
DNA (ng µL <sup>-1</sup> )	43,2 – 125 Martinez et al., 2018 Ponti et al., 2018	10 – 100 Giampaoli et al., 2012	1,8 – 400 Cardozo et al., 2009 Ponti et al., 2018	(0,02 – 96,9)×10 <sup>-3</sup> Bryzgunova et al., 2006 Johnson et al., 2007	1 – 167 Garbieri et al., 2017 Philibert et al., 2008
Zinco total (µM)	1200– 4200 Yamaguchi et al., 2009 Stanković; Mikac-Dević, 1976 Chia et al., 2000 Canale et al., 1986	18,4 – 229,5 Rogers et al., 1988	9,48 – 21,1 Giroux et al., 1976 Vivoli et al., 1987	27,1 – 119,6* Schuhmacher et al., 1994	(2,4 – 48,7)×10 <sup>-4</sup> Bales et al., 1990
Espermina (µM)	250 – 3000 Engel et al., 2019 Harms et al., 2022 Jänne et al., 1973 Shohat et al., 1990	ND <sup>#</sup> Suzuki et al., 1982 Wolrath et al., 2011	ND – 0,4 Kong et al., 2021 Suzuki et al., 1982	ND – 10 Suzuki et al., 1982 Nair et al., 2019	ND – 1,9 Suzuki et al., 1982 Senekowitsch et al., 2023
Espermidina (µM)	100 – 1400 Engel et al., 2019 Harms et al., 2022 Jänne et al., 1973	ND <sup>#</sup> Suzuki et al., 1982	0,3 – 2,7 Kong et al., 2021	40 – 50 Nair et al., 2019	0,4 – 2,9 Senekowitsch et al., 2023
Colina (mg L <sup>-1</sup> )	900 – 3073 Takatori et al., 1981 Takatori et al., 1984 Mandal; Bhattacharyya, 1986	~ 0,7 Hoffman et al., 2024	0,8 – 2,0 Kirsch et al., 2010	0,1 – 1,3 Kirsch et al., 2010	0,6 – 1,6 Wang et al., 2014

\* µg g<sup>-1</sup> creatinina.

# Podem ser encontradas em baixas concentrações no fluido vaginal em casos de infecções vaginais (Nelson et al., 2015; Wolrath et al., 2011).

Fonte: elaborado pela autora, 2025

## 1.2 Frutose como marcador químico para amostra de sêmen

O sêmen é o único dentre os fluídos corporais que possui altos teores de frutose (acima de 1000 mg L<sup>-1</sup>), um monossacarídeo crucial para assegurar a viabilidade, função e mortandade do esperma, sendo o principal carboidrato encontrado no plasma seminal, responsável por mais da metade do consumo de carboidratos dos espermatozoides, considerado uma importante fonte de energia (Ahmed et al., 2010; Johnson et al., 2020). Esse açúcar presente na dieta humana, é um composto sólido, cristalino e solúvel em água, presente naturalmente em diversas frutas e vegetais, sintetizado também no organismo a partir da glicose, molécula a qual muitas vezes encontra-se ligada formando o dissacarídeo sacarose (Krause; Wegner, 2020).

A frutose é secretada pelas vesículas seminais e pelas glândulas sexuais acessórias. Seus níveis de concentração no sêmen podem variar com o tempo devido à frutólise (degradação da frutose) no sêmen, processo realizado principalmente pelos espermatozoides (Sengupta et al., 2020; Toragall et al., 2019). A determinação desse marcador é particularmente valiosa, devido a relação direta que pode ser estabelecida entre o nível de frutose no plasma seminal e a função da testosterona nas células intersticiais, sendo medida rotineiramente para quantificar a função da vesícula seminal e da possibilidade de infertilidade masculino (Ahmed et al., 2010; Shemshaki et al., 2021).

Diversos estudos clínicos sobre o papel da frutose nos parâmetros do sêmen foram realizados, relatando níveis menores de frutose seminal em homens oligozoospermicos e azoospermicos, quando comparados com homens normozoospermicos (Ahmad et al., 2008; Amidu et al., 2012; Nsonwu-Anyanwu et al., 2019). Sarazin et al. (2012) utilizou um método eletroforético capilar para determinação de carboidratos, dentre ele a frutose, em diferentes amostras. No âmbito forense, este marcador tem sido utilizado para detecção de sêmen via técnicas espectroscópicas como, espectroscopia infravermelha de refletância total atenuada - transformada de Fourier (ATR-FTIR) (Wei et al., 2021; Zha et al., 2020) e espectroscopia Raman (Das et al., 2021). Casey et al. (2020), identificou a frutose e outros componentes presentes no sêmen, devido à de picos característicos monitorados por espectroscopia Raman combinada análise estatística avançada. Esses estudos evidenciam a relevância da identificação desse marcador presente em altas concentrações no sêmen, o que possibilita sua

utilização em testes presuntivos. Todavia, não há disponível no mercado um kit ou dispositivo baseado em reações com esse açúcar.

### **1.3 Zinco como marcador químico para amostra de sêmen**

O zinco (Zn) é um oligoelemento fundamental, envolvido em uma variedade de processos biológicos. Atua na mediação da função e estrutura das proteínas, na manutenção do equilíbrio fisiológico, bem como na proliferação e diferenciação celular (Stefanidou et al., 2006; Fallah et al., 2018; Wong et al., 2001). A concentração desse elemento pode variar consideravelmente entre os diferentes tecidos humanos e fluidos biológicos, sendo particularmente elevada no sêmen, devido à contribuição da próstata, que é a principal responsável pelos elevados níveis desse elemento nesse fluido (Dissanayake et al., 2010; Yamaguchi et al., 2009). Além de suas múltiplas funções biológicas, o zinco contribui para a formação da motilidade espermática e influencia diretamente a morfologia dos espermatozoides. Sua ação está fortemente associada à fertilidade, sobretudo por seus efeitos positivos na espermatogênese (Henkel et al., 1999; Marzec-Wróblewska et al., 2011).

Nesse contexto, muitos suplementos voltados à fertilidade masculina contêm zinco em sua composição, e estudos clínicos utilizam sua concentração no sêmen como parâmetro para avaliar a qualidade seminal. Homens férteis tendem a apresentar níveis mais elevados de zinco seminal em comparação aos inférteis, sugerindo que a deficiência desse elemento pode ser um biomarcador indireto da infertilidade masculina (Allouche-Fitoussi; Breitbart, 2020; Schisterman et al., 2020). Nessa perspectiva, Huang et al. (2013) investigaram pacientes com oligoastenozoospermia, verificando que o tratamento com gluconato de zinco aumentava significativamente os níveis de zinco no sêmen, a contagem e a motilidade dos espermatozoides. Osadchuk et al., (2021) avaliaram a influência do zinco na qualidade do sêmen e, observaram que a deficiência desse elemento pode representar um fator de risco significativo para a redução da qualidade do sêmen.

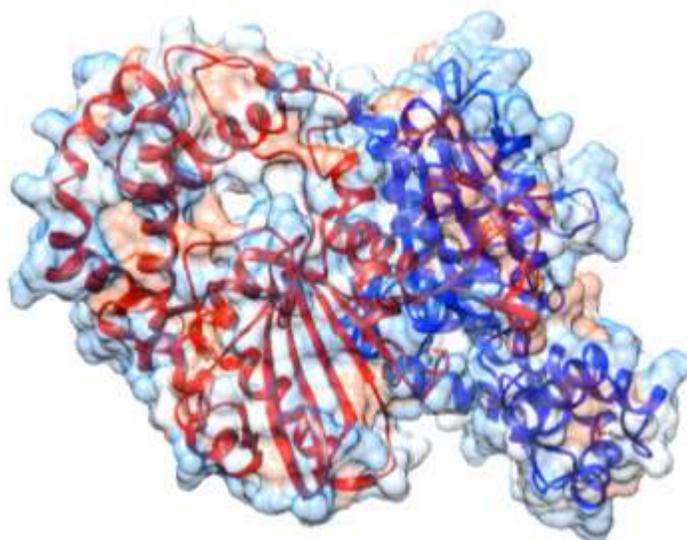
Além disso, decorrente da sua presença constante no sêmen, o zinco também pode ser utilizado como marcador valioso na identificação desse fluido em investigações forenses e uma boa alternativa para outros marcadores mais degradáveis, como a fosfatase ácida (Gamblin; Morgan-Smith, 2020; Hooft; Van De Voorde, 1990; Suttipapit, 2015). Nesse

sentido, Oliveira et al. (2025) desenvolveram um sensor colorimétrico baseado em fibras fiadas sopradas para detecção colorimétrica de pequenas quantidades de zinco no sêmen.

#### 1.4 Fosfatase ácida (FA) como marcador bioquímico para amostra de sêmen

A fosfatase ácida (Fig. 2) está presente no fluido seminal em altas concentrações (Lewis et al., 2013; Zhang et al., 2020). Trata-se de uma enzima hidrossolúvel, responsável por catalisar a hidrólise de diversos ésteres de fosfato em meio ácido (pH 4 - 6), associada a diversas funções fisiológicas e pode ser encontrada em vários tecidos e órgãos, com diferentes isoformas, propriedades físicas e seletividade de substrato (Le-Vinh et al., 2022; Li et al., 1970; Yan, 1974). Muitas isoenzimas dessa classe são conhecidas, mas a que possui maior relevância no diagnóstico provém da próstata, uma vez que, devido às altas concentrações de fosfatase ácida no plasma seminal, esta enzima é usada para monitorar a função da próstata, no entanto, o PSA é o marcador mais empregado para esta finalidade (Miteva et al., 2010; Mukherjee; Gopalakrishnan, 2023; Vishawanath et al., 2023).

**Figura 2.** Estrutura da fosfatase ácida prostática (PDB: 1CVI).



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Composta por um grupo de cinco isoenzimas nomeadamente, lisossômicas, prostáticas, eritrocíticas, macrófagas e osteoclasticas, a fosfatase ácida está localizada principalmente na próstata e suas secreções. Quando comparado a qualquer outro tecido, o

nível na próstata masculina é pelo menos 100 vezes maior. Pequenas quantidades dessa enzima são encontradas também em uma variedade de tecidos e órgãos, como, rins, fígado, medula óssea, baço e células sanguíneas, sendo importante para vários processos biológicos e desempenhando funções cruciais (Peonim et al., 2013; Vishawanath et al., 2023). A atividade enzimática da FA está relacionada a formação de um homodímero, que compreende duas subunidades associadas por ligações não covalentes e cataliticamente inativas. Cada subunidade contém dois domínios, o domínio maior do tipo  $\alpha/\beta$ , contendo uma folha  $\beta$  central mista de sete fitas com hélices  $\alpha$  e o domínio  $\alpha$  menor contendo seis hélices  $\alpha$  (Kong; Byun, 2013).

A identificação da FA permite localizar de forma rápida e direta possíveis manchas de sêmen, por métodos colorimétricos, visto que esta enzima é capaz de catalisar a hidrólise de fosfatos orgânicos formando um produto que ao reagir com um sal cromogênico de diazônio, muda de coloração. Os métodos alfa-naftil fosfato e Brentamina, usado rotineiramente e beta-naftol com Fast Garnet B, baseiam-se nesse princípio, que possibilita ampla aplicação dessa enzima em testes colorimétricos e fluorimétricos (Lewis et al., 2013; Virkler; Lednev, 2009; Peonim et al., 2013). À vista disso, Herman et al. (2018) empregaram o princípio da reação supracitada em papel filtro e folha Phadebas, para detecção de sêmen, obtendo uma resposta colorimétrica rápida da reação em papel, que pode ser empregado como plataforma analítica.

### **1.5 Dispositivos analíticos microfluídicos em papel ( $\mu$ PADs)**

As horas iniciais de uma investigação criminal são geralmente cruciais para que a investigadores forenses obtenham mais informações sobre a identidade de potenciais suspeitos, além de obter fatos relevantes. Desta forma, as investigações forenses no local do crime e em tempo real, podem melhorar a rapidez e eficácia do sistema judicial, evitando os atrasos que ocorrem inevitavelmente quando as provas precisam ser enviadas para um laboratório forense para análise, à vista disso, o uso de tecnologias empregando dispositivos microfluídicos pode atender a esses requisitos devido às suas diversas propriedades (Araújo et al., 2018; Bazzyar, 2023; Harshey et al., 2023).

A utilização de sensores portáteis, sistemas baseados em *chips* e dispositivos para análise *in loco* de amostras forenses, aumentaram nos últimos anos, levando ao

desenvolvimento de testes presuntivos para triagem de amostras alvo de investigação (Bazyar, 2023; Christodoulides et al., 2015). O desenvolvimento desses dispositivos microfluídicos foi impulsionado sobretudo pelo desejo de produzir sistemas com custo-benefício viável para diagnóstico no local de atendimento e monitoramento ambiental (Sia; Kricka, 2008). A introdução desses dispositivos na comunidade científica foi atribuída ao Grupo Whitesides da Universidade de Harvard (Akyazi et al., 2018). Visando esta finalidade, os dispositivos devem fornecer uma resposta completa sobre as amostras introduzidas, gerando dados que possam ser úteis na tomada de decisões (Dungchai et al., 2009; Mettakoonpitak et al., 2016).

Dentre os sistemas microfluídicos de menor custo, estão os dispositivos microfluídicos de papel, estes são excelentes alternativas aos sensores convencionais fabricados com outros materiais, como vidro, por exemplo (Ameku et al., 2019). O trabalho desenvolvido por Martinez et al. (2007) foi o pioneiro na utilização do papel cromatográfico para a fabricação dos dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel ( $\mu$ PADs), estes são relativamente fáceis de usar, de baixo custo, requerem pequenas quantidades de reagentes e amostras, permitem análises rápidas e são descartáveis, tornando-os uma alternativa atraente aos dispositivos tradicionais para testes no local de atendimento. Portanto se trata de uma boa alternativa, uma vez que, podem ser fabricados usando métodos simples e/ou materiais reciclados (Brito-Pereira et al., 2022), além de ser portátil, leve e miniaturizável (Boobphahom et al., 2020; Nadar et al., 2021; Zhao; Berg, 2008).

Além disso, o papel é a estrutura polimérica de celulose mais abundante, sendo biodegradável, flexível, porosidade e baixo custo. A organização do papel em regiões de canais hidrofílicos separados por barreiras hidrofóbicas fornece dispositivos microfluídicos analíticos com algumas funções básicas como (Carrilho et al., 2009; Das et al., 2022; Yetisen et al., 2013):

- (i) Distribuição de amostras em múltiplas regiões separadas, possibilitando vários testes ou réplicas;
- (ii) Movimento da amostra por ação capilar, devido a presença de redes microporosas no papel responsáveis pelo fluxo de solventes;
- (iii) Proporciona trabalhar com pequenos volumes de amostra, muito importante quando a quantidade da amostra é limitada;

(iv) Os dispositivos podem ser incinerados, facilitando o descarte de resíduos biológicos.

Estas propriedades do papel são de grande interesse para a produção de pequenas tecnologias *lab-on-chip* (Sia; Kricka, 2008). Tais dispositivos podem ser fabricados empregando abordagens diferentes como, impressão em cera (Carrilho et al., 2009; Noiphung et al., 2018), imersão em cera (Songjaroen et al., 2011), impressão a jato de tinta (Abe et al., 2008), fotolitografia (Martinez et al., 2007), tratamento plasmático (Li et al., 2008) e entre outros (Bruzewicz et al., 2008; Fenton et al., 2009; Nurak et al., 2013), sendo a impressão em cera o método mais simples para fabricação dos  $\mu$ PADs (Das et al., 2022; Lu et al., 2009). Embora a fabricação e utilização desses dispositivos seja simples, os altos valores de limite de detecção (LOD) ainda podem ser considerados a principal desvantagem, restringindo sua utilização a depender da necessidade (Ataide et al., 2023).

Cada método tem suas vantagens e desvantagens e são selecionados a depender da finalidade a qual serão destinados. Os  $\mu$ PADs podem ser são acoplados à diferentes técnicas e metodologias de detecção, incluindo ensaios colorimétricos (Alizadeh et al., 2019; Kaewarsa et al., 2017; Wei et al., 2015), detecção eletroquímica (Primpray et al., 2019), medidas de fluorescência (Assi et al., 2023; Liu; Crooks, 2011; Zhou et al., 2020) e quimiluminescência (Yang et al., 2019; Yu et al., 2011), essenciais na análise de fluidos biológicos, biomarcadores, metabolitos, medicamentos, entre outros (Ameku et al., 2019; Cate et al., 2015).

Decorrente da praticidade e possibilidade de detecção de vestígios *in loco*, os  $\mu$ PADs têm atraído o interesse de cientistas forenses nos últimos anos. Nesse sentido, Ameku et al. (2019) empregaram  $\mu$ PADs para detecção de amostras de cocaína, com detecção dupla, tanto por voltametria cíclica como por espalhamento Raman. Cromartie et al. (2019) utilizaram o  $\mu$ PAD na detecção colorimétrica de machas oriundas de diferentes fluidos biológicos. Yakoh et al. (2021), por sua vez, propuseram uma plataforma eletroquímica baseada em papel para o diagnóstico de COVID-19, por meio de uma triagem para detecção de imunoglobulinas SARS-CoV-2, monitorada por voltametria de onda quadrada. Mais recente, Pinheiro et al. (2022) utilizaram os  $\mu$ PADs para determinação colorimétrica do teor alcoólico em bebidas, para avaliar possíveis adulterações, baseando-se em reações redox. Andrade et al. (2023) empregou o dispositivo em papel para detecção instantânea de amido adulterante em leite comercial via reações colorimétricas. Destarte, fica evidente o papel importante que a

utilização desses dispositivos desempenha nas diferentes áreas, cuja aplicação vem crescendo na comunidade forense devido às diversas vantagens, visando sempre auxiliar na resolução de casos com brevidade.

### **1.6 Análise de injeção sequencial (SIA)**

Diante da crescente preocupação com a elevada incidência de crimes, surgiu a necessidade de desenvolver procedimentos analíticos mais eficientes. Uma vez que, as análises forenses requerem métodos modernos que aliem rapidez, baixo custo, alta sensibilidade e segurança tanto no manuseio das soluções quanto em relação ao meio ambiente (Idris, 2010). Nesse sentido, visando suprir essas demandas, os métodos de análise química baseados em fluxo estão bem consolidados, a exemplo, análise por injeção em fluxo (FIA), análise por injeção sequencial (SIA), análise de fluxo contínuo (FCA) e injeção de fluxo multisseringa (MSFI) (Dallmayr et al., 2025; Qiao, 2020; Trojanowicz; Kołacińska, 2016; Xue et al., 2024).

A SIA surgiu como uma alternativa à FIA, visando superar suas principais limitações na realização de reações em solução, no que se refere principalmente a versatilidade e baixo consumo de amostra e reagentes (Economou, 2005). Assim, a técnica SIA pode incluir uma variedade de procedimentos mais complexos, como manipulação e pré-tratamento de amostras em sistemas on-line (Theodoridis et al., 2007). Desta forma, apresenta vantagens como automação total, miniaturização e versatilidade, que atendem bem aos requisitos analíticos atuais. A automação garante rapidez, segurança no manuseio, maior exatidão e precisão. A miniaturização acelera a análise, reduz o consumo de reagentes e minimiza o impacto ambiental. Devido a versatilidade, é possível adaptar facilmente o sistema a diferentes tipos de análises, além da possibilidade de determinações multiparamétricas (Idris; Alnajjar, 2008; Mesquita; Rangel, 2009). No sistema SIA, as portas da válvula de seleção multiposição são conectadas a diferentes unidades, como reservatórios, detectores, bombas, reatores, separadores, células especializadas e coletores. Essa configuração proporciona maior versatilidade e possibilita uma integração eficiente entre as etapas do processo analítico (Qiao, 2020). As técnicas de análise em fluxo podem ser acopladas a diferentes técnicas de detecção como, espectrofotometria (Silva et al., 2008), fluorescência (Skok et al.,

2024), espectrometria de massas (Negrete et al., 2022), eletroquímica (Perez-Olmos et al., 2005), entre outras (Manousi et al., 2023; Oteef; Idris, 2023).

Nesse contexto, diversos estudos têm sido conduzidos na área forense. Idris e Alnajjar (2008), por exemplo, investigaram os níveis de morfina em amostras de urina humana utilizando a técnica SIA, com tratamento da amostra realizado de forma on-line e detecção espectrofotométrica. Em investigações forenses, a detecção de morfina é um indicador da presença de heroína, devido ao seu metabolismo no organismo. Silva et al. (2008) empregaram o sistema SIA com detecção espectrofotométrica visando a detecção de cocaína, usando tiocianato de cobalto como reagente complexante. Mais recente, Trinklein et al. (2021) aplicaram a técnica SIA acoplada à RMN de prótons de bancada on-line, para detecção de substâncias psicoativas. Esses estudos evidenciam o potencial do SIA como ferramenta analítica no suporte a investigações criminais.

## 2 JUSTIFICATIVA

Dada a relevância, praticidade e versatilidade para análise em campo nas diferentes áreas, incluindo a forense, os  $\mu$ PADs surgem como inovação científica e tecnológica que contribuirá fortemente na elucidação de casos com mais brevidade e confiabilidade buscando inibir a expansão de crimes contra a mulher, visto que estes fornecem análises forenses confiáveis diretamente na cena do crime.

O presente trabalho está inserido no projeto “*Crimes contra a mulher: desenvolvimento de kits para identificação de marcadores forenses em fluidos biológicos*” financiado pelo Programa de cooperação acadêmica em segurança pública e ciências forenses (PROCAD). Este visa o desenvolvimento de *kits* para identificação de sêmen em vestígios forenses oriundos de crimes sexuais contra a mulher. Serão desenvolvidos e validados cinco *kits* da linha MACFOR, dentre eles, o COLOR – A. Trata-se de um kit contendo o  $\mu$ PAD e as respectivas soluções para análises qualitativas e quantitativas, possibilitando uma detecção simultânea de frutose, fosfatase ácida e zinco, explorando detecção colorimétrica. Possibilita fácil visualização da mudança de cor, que podem ser observadas a olho nu para determinação qualitativa ou analisada através de imagens digitais para quantificação.

### **3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar metodologias baseadas em reações colorimétricas, com análises simples e rápida para identificação de marcadores (bio)químicos para detecção de sêmen em vestígios forenses oriundos de crimes sexuais contra a mulher.

#### **3.2 Objetivos específicos**

##### ***Capítulo 1:***

- (i)* Otimizar os principais parâmetros reacionais em solução e no  $\mu$ PAD, para a detecção de frutose, empregando sensibilidade analítica e sinal do intercepto como critério de avaliação;
- (ii)* Estabelecer as principais figuras de mérito e validar do método analítico frente a amostras reais;
- (iii)* Aplicar o método otimizado em amostras biológicas e comparar com outros sistemas que podem levar a resposta falso-positivo;
- (iv)* Validar as metodologias de detecção de frutose para análises qualitativas;

##### ***Capítulo 2:***

- (i)* Ajustar os principais parâmetros reacionais em solução e no  $\mu$ PAD para a detecção de zinco, utilizando a sensibilidade analítica e o sinal do intercepto como critérios de avaliação;
- (ii)* Estabelecer as principais figuras de mérito em solução e no  $\mu$ PAD para cada azocorante e validar o método analítico frente a amostras reais;
- (iii)* Aplicar o método otimizado em amostras biológicas e compará-lo com outros sistemas passíveis de gerar resultados falso-positivos;
- (iv)* Validar qualitativamente as metodologias para detecção de zinco e comparar o desempenho dos azocorantes empregados.

##### ***Capítulo 3:***

- (i)* Otimizar dos principais parâmetros físico-químicos no sistema de análise em fluxo sequencial, para a detecção simultânea de fosfatase ácida e zinco, empregando sensibilidade analítica e sinal do intercepto como critério de avaliação;

(ii) Ajustar os principais parâmetros intrínsecos ao sistema em fluxo (tamanho do reator, vazões, tempo de parada de fluxo)

(iii) Estabelecer as principais figuras de mérito no sistema em fluxo e validar do método analítico frente a amostras reais;

(iii) Aplicar o método otimizado em amostras sintéticas e biológicas, e comparar com outros sistemas que podem levar a resposta falso-positivo;

✚ Fabricação e validação do COLOR- A, um dispositivo de tripla detecção (frutose, zinco e fosfatase ácida) para utilização em casos reais pela Polícia científica.

## 4. CAPÍTULO 1: Teste presuntivo para detecção de sêmen baseado no marcador químico frutose: avaliação de estratégias colorimétricas em solução e em dispositivo analítico microfluídicos em papel

### Resumo

A identificação de fluidos biológicos é um passo fundamental nas investigações criminais, especialmente em crimes sexuais, que possuem alta ocorrência mundial. Para comprovar o crime e identificar o agressor, amostras biológicas, como sêmen, são coletadas na cena do crime ou na vítima que sofreu a ação criminosa. Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver uma metodologia analítica para detecção de frutose (marcador químico) em solução e em dispositivo analítico microfluídicos em papel ( $\mu$ PAD). A resposta colorimétrica ocorre devido à presença de frutose, resultando na formação de um cromóforo de coloração azul ( $\lambda = 625$  nm). Diferentes parâmetros foram otimizados buscando melhorar a detectabilidade e sensibilidade do método, permitindo obter resposta linear na faixa de 0,5 – 3 mg L<sup>-1</sup> (solução) e 12,5 - 150 mg L<sup>-1</sup> ( $\mu$ PAD). Os limites de detecção (LOD) foram 0,64 mg L<sup>-1</sup> e 6,25 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, demonstrando que o método atende perfeitamente à finalidade proposta. Além disso, as metodologias apresentaram recuperações entre 91 – 102% e RSD  $\leq$  3,8%, evidenciando a exatidão e precisão do método. As metodologias testadas em amostras reais demonstraram alta sensibilidade e confiabilidade, frente avaliação de possíveis interferentes. A avaliação qualitativa ( $n \geq 60$ ) confirmou a eficácia dos ensaios com sensibilidade mínima de 98%. Desta forma, as metodologias (em solução ou  $\mu$ PAD) permitem análises qualitativas e quantitativas diretamente nas cenas de crimes e visam suprir as limitações dos testes disponíveis no mercado, principalmente em relação ao tempo de resposta e à ocorrência de falsos positivos.

**Palavras-chaves:** crimes sexuais; amostras biológicas; *spot tests*; detecção colorimétrica; aplicações forenses.

## 1 INTRODUÇÃO

A violência sexual constitui uma grave violação dos direitos humanos, uma questão que impacta diretamente na saúde global, atingindo pessoas de todas as classes sociais e raças (García-Moreno et al., 2013; Grosser; Tyler, 2022; Katagiri et al., 2019). Os crimes relacionados a prática de violência sexual têm registrado aumentos alarmantes a cada ano, afetando principalmente crianças e mulheres. Estima-se que a nível mundial 1 em cada 3 mulheres (cerca de 736 milhões) sofrem violência física e/ou sexual ao longo da vida (WHO, 2021).

Diante dessa realidade, a investigação criminal desempenha um papel crucial na elucidação desses crimes, com a identificação de fluidos biológicos, como sangue, sêmen, secreção vaginal, saliva e urina, constituindo uma etapa essencial. Assim, essas amostras coletadas na cena do crime ou na própria vítima da ação criminoso, fornecem informações valiosas que auxiliam na identificação dos suspeitos dos atos criminosos (Mapes; Kloosterman; Poot, 2015; Pradeep et al., 2024). O sêmen é uma das amostras biológicas mais comuns em casos de agressão sexual, considerado um marcador confiável que pode ser empregado para confirmar o crime e identificar possíveis suspeitos (Owen; Katz, 2005; Sakurada et al., 2020; Wasserstrom et al., 2013). Esse fluido de composição complexa apresenta altas concentrações de alguns componentes bioquímicos como, frutose, colina, espermina, ácido cítrico, fosfatase ácida e albumina, que podem a priori, ser empregados como possíveis marcadores em testes de identificação do tipo de amostra (Das et al., 2021; Gamblin; Morgan-Smith, 2020; Mann, 1948; Virkler; Lednev, 2009).

Os testes utilizados na identificação dos fluidos biológicos podem ser classificados de duas formas, presuntivos e confirmatórios, de acordo com sua seletividade (Zapata et al., 2015). De forma geral, a presença/ausência de uma amostra biológica é primeiramente avaliada por meio de testes presuntivos, enquanto, os testes confirmatórios são ou não empregados como segunda etapa, dependendo do resultado do teste presuntivo (Kanu; Kaplan, 2016). Atualmente, há uma gama de testes presuntivos disponíveis para identificar esfregaços ou manchas contendo sêmen em cenas de crime (Gamblin; Morgan-Smith, 2020; Rana et al., 2023; Rodriguez et al., 2019; Tay et al., 2021). Para confirmação da presença de sêmen, a identificação microscópica de espermatozoides é considerada como um protocolo

de referência, contudo, a ausência de espermatozoides (azoospermia), a idade e condições de conservação da amostra, são fatores limitantes (Peonim et al., 2013; Unuma et al., 2023). Porém, o desenvolvimento de metodologias alternativas para detecção de marcadores (bio)químicos em amostras de sêmen é uma demanda constante (Zha et al., 2020). Todavia, alguns critérios precisam ser considerados como a quantidade reduzida de amostra, portabilidade, custo, tempo de resposta, toxicidade dos reagentes e seletividade (Casey et al., 2020; Takamura et al., 2018; Yao et al., 2020).

O sêmen é o único dentre os fluidos biológicos que possui níveis elevados de frutose (acima de 1000 mg L<sup>-1</sup>), um monossacarídeo crucial para assegurar a viabilidade, função e mortandade do esperma, sendo o principal carboidrato encontrado no plasma seminal (Johnson et al., 2020; Shemshaki et al., 2021; Toragall et al., 2019). No âmbito forense, este marcador tem sido utilizado para detecção de sêmen empregando técnicas espectroscópicas como, espectroscopia de refletância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) (Wei et al., 2021; Zha et al., 2020) e espectroscopia Raman (Das et al., 2021). Casey et al. (2020), identificou frutose e outros componentes no sêmen, devido à presença de picos característicos por espectroscopia Raman combinada à análise estatística, evidenciando a viabilidade da detecção do sêmen por esse marcador e possibilitando sua utilização em análises forenses.

As primeiras horas de uma investigação criminal são cruciais para que se obtenham informações sobre a identidade de possíveis suspeitos e fatos relevantes na cena do crime (Bazyar, 2023; Vyas et al., 2020). As investigações no local do crime e aplicações de testes preditivos/confirmatórios *in loco* podem melhorar a eficácia do processo, evitando atrasos associados ao envio de evidências para análise em laboratórios. À vista disso, o uso de tecnologias empregando volumes reduzidos de amostra e reagentes, explorando estratégias em solução e dispositivos microfluídicos podem atender a esses requisitos, permitindo a análise *in situ* viabilizando o desenvolvimento de testes presuntivos para a triagem de amostras forenses (Araujo et al., 2018; Christodoulides et al., 2015; Harshey et al., 2023). Assim, *spot tests* são amplamente utilizados pela polícia científica, pois oferecem resultados rápidos a um custo significativamente menor, com possibilidade de tomada de decisão, geralmente para detecção de substâncias ilícitas. Nesse sentido, Philp et al. (2016)

desenvolveram um teste presuntivo empregando reações colorimétricas em placa de toque, para detecção de substâncias psicoativas em materiais apreendidos.

Dentre os sistemas microfluídicos de menor custo, estão os microfluidic paper-based analytical device ( $\mu$ PAD), excelente alternativa aos sensores convencionais fabricados com outros materiais. Os  $\mu$ PAD oferecem vantagens como facilidade de uso, portabilidade, baixo custo, menor consumo de reagentes e amostras, análises rápidas e são descartáveis, tornando-os uma opção atraente para análise forense em campo (Agarwal; Csóka, 2019; Ameku et al., 2019; Boobphahom et al., 2020; Nadar et al., 2021; Zhao; Berg, 2008). Diferentes técnicas de detecção podem ser usadas para obter informações quali- e quantitativas dos  $\mu$ PAD, sendo a detecção colorimétrica amplamente utilizada (Alizadeh et al, 2019; Kaewarsa et al., 2017; Musile et al., 2023; Wei et al., 2015). Aksorn and Teepoo (2020) utilizaram  $\mu$ PAD para detecção enzimática colorimétrica de sacarose, frutose e glicose visando monitorar a qualidade de produtos na indústria açucareira. Contudo, o uso de reações enzimáticas é um fator limitante devido ao custo de obtenção e estabilidade das enzimas. Cromartie et al. (2019), por sua vez utilizaram  $\mu$ PAD para sorologia forense de fluidos biológicos (sangue, saliva, sêmen e urina). Desta forma, este trabalho visa o desenvolvimento e validação de um teste presuntivo para sêmen usando frutose como marcador químico em ensaios em solução e  $\mu$ PAD, assim, contribuindo para a elucidação de casos de crimes sexuais, com maior rapidez e confiabilidade, ao possibilitar análises diretas na cena do crime.

## **2 EXPERIMENTAL**

### **2.1 Reagentes e preparo das soluções**

Todos os reagentes utilizados possuem pureza analítica, dispensando etapas adicionais de purificação. A frutose, o 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH), ácido clorídrico (HCl) e o cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA). Enquanto periodato de potássio ( $\text{KIO}_4$ ), sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ), a polivinilpirrolidona (PVP), molibdato de sódio ( $\text{NaMoO}_4$ ), glicina, glicose e inositol foram obtidos na Dinâmica (Brasil) e Vetec (Brasil). A solução estoque de frutose ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi preparada dissolvendo o açúcar diretamente em água ultrapura (condutividade  $< 0,1 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ ), proveniente do purificador Master System MS2000 (Gehaka, Brasil). As soluções estoques do MBTH 18

mM e  $\text{FeCl}_3$  20 mM, foram preparadas em HCl 0,1 M, enquanto, a solução de  $\text{FeSO}_4$  em água ultrapura. A solução estoque de  $\text{KIO}_4$  e  $\text{NaMoO}_4$  foram preparadas em tampão glicina 10 mM (pH 3,0), cuja solução foi preparada dissolvendo 75 mg do sólido em 100 mL de água ultrapura. Por fim, todas as soluções foram posteriormente diluídas para a concentração final desejada em tampão.

## 2.2 Preparação dos $\mu\text{PAD}$

Os  $\mu\text{PAD}$ s foram fabricados em parceria com o Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro, da Universidade Federal de Goiás, pela técnica de impressão em cera em papel cromatográfico, utilizando a impressora ColorQube 8570 (Xerox Corporation, Rochester, NY, EUA) (Nogueira et al., 2019). Posteriormente, os  $\mu\text{PAD}$ s foram aquecidos na estufa a 150 °C por 60 s para garantir que a cera incorporasse na fibra de celulose, possibilitando a formação de barreiras hidrofóbicas para manipular o fluxo do fluido (Fig. 3) (Carrilho et al., 2009; Malekghasemi; Kahveci; Duman, 2016). Na etapa de otimização diversos parâmetros físico-químicos foram avaliados buscando obter melhor sensibilidade (tempo de reação, ordem, volume e concentração dos reagentes).

**Figura 3.** Esquema representativo da confecção dos dispositivos utilizando impressão em cera.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

## 2.3 Procedimentos

### 2.3.1 Ensaios colorimétricos em solução

Para obtenção dos espectros de absorção utilizou-se um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brazil) equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Nas análises em solução empregando detecção

espectrofotométrica, adicionou-se em um *ependorf* quantidades crescentes de frutose (2,5 – 12,5 mg L<sup>-1</sup>), 50 µL de KIO<sub>4</sub> a 4 mM e aguardou-se 15 min para oxidação do açúcar e geração dos compostos carbonílicos. Em seguida, se adicionou 125 µL de MBTH (18 mM) e 100 µL de FeCl<sub>3</sub> (20 mM), nesta ordem, completando o volume com o tampão glicina (para 1,0 mL) e aguardou-se 30 min para realizar as medidas (450 - 750 nm).

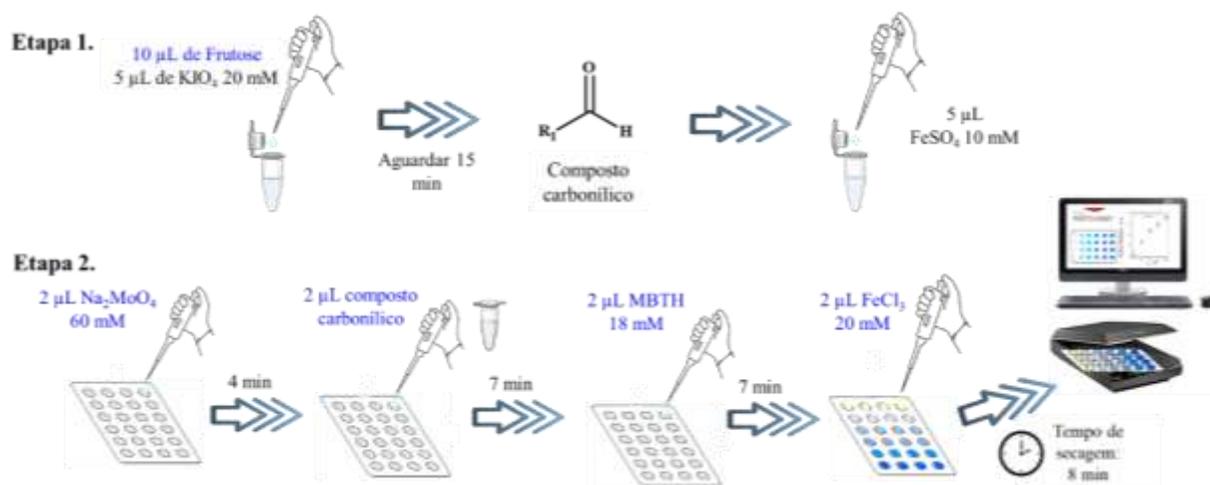
Adicionalmente, os testes em solução também foram realizados em uma placa de toque de porcelana com 12 cavidades, utilizando 2 µL das amostras reais (sem diluição), 5 µL de KIO<sub>4</sub> a 4 mM, 12,5 µL de MBTH 18 mM e 10 µL de FeCl<sub>3</sub> 20 mM, adição de tampão glicina (72,5 µL), perfazendo um volume final de 100 µL.

### **2.3.2 Detecção de frutose utilizando µPADs**

Para a geração dos compostos carbonílicos nos ensaios em papel, a oxidação da frutose foi realizada adicionando quantidades crescentes (1 – 10 µL) do açúcar (250 mg L<sup>-1</sup>) e 5 µL de KIO<sub>4</sub> (20 mM) em um *ependorf*, aguardando 15 min de reação. Em seguida, adicionou-se 5 µL de FeSO<sub>4</sub> 10 mM, para o Fe(II) reagir com o periodato em excesso, evitando a oxidação da celulose do papel. Na condição otimizada empregou-se a seguinte ordem de aplicação no µPAD: NaMoO<sub>4</sub> (60 mM), produto da oxidação da frutose, MBTH (18 mM) e FeCl<sub>3</sub> (20 mM), aplicando 2 µL de cada solução na superfície do papel, com intervalos de 7 min entre as adições (para secagem das soluções), totalizando cerca de 26 min (Fig. 4).

A mudança de coloração nas zonas de detecção foi observada visualmente e as imagens registradas por *scanner* Epson (perfection v19, 4800 dpi), as quais foram utilizadas para obter resposta analítica quantitativa do sistema. A intensidade de cor (IC) foi mensurada empregando o *software* Corel Photo-Paint® (CorelDRAW, *Graphics Suite*), a partir do sistema de cor subtrativo CMYK (Ciano, Magenta, Amarelo e Preto). Posteriormente, as curvas analíticas foram construídas com no mínimo cinco pontos para a análise, permitindo a obtenção de diferentes parâmetros estatísticos.

**Figura 4.** Esquema ilustrativo da reação de formação do cromóforo azul. Etapa 1. geração do composto carbonílico em solução, Etapa 2. adição dos reagentes e amostra na zona reacional do  $\mu$ PAD.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 2.3.3 Avaliação de possíveis interferentes

Inicialmente, se avaliou o efeito da glicose (açúcar) e do inositol (composto polihidroxilado), compostos presentes no sêmen, nas condições otimizadas, para avaliar se estes compostos poderiam apresentar padrão de reação similar ao da frutose. Além disto, amostras de sêmen sintético foram produzidas seguindo metodologia descrita por Owen e Katz (2005), na qual, para 10 mL de solução tampão fosfato (10 mM, pH = 8,2), foram adicionados: citrato de sódio (81,3 mg), cloreto de potássio (9,1 mg), hidróxido de potássio (8,8 mg), frutose (27,2 mg), glicose (10,2 mg), ácido láctico (6,2 mg), ureia (4,5 mg), albumina de soro bovino (504 mg), cloreto de cálcio (10,1 mg), cloreto de magnésio (9,2 mg), cloreto de zinco (3,4 mg) e 200  $\mu$ L de metilcelulose a 2% (m/v).

### 2.3.4 Testes em amostras reais

O método desenvolvido foi aplicado em amostras de sêmen e de outros fluidos biológicos obtidas a partir de voluntários, com idade a partir de 18 anos, em conformidade com as diretrizes do Comitê de Ética da UFAL (57998116.8.0000.5013). As amostras foram armazenadas em tubos falcon e condicionadas em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$ . A seletividade do método

(solução e  $\mu$ PAD) foi avaliada frente a diferentes fluidos biológicos e amostras que podem estar presentes em cenas de crimes sexuais, incluindo, fluido vaginal, sangue menstrual, sangue masculino e feminino, urina masculina e feminina, saliva masculina e feminina, e amostras de alimentos (leite, suco de laranja, clara de ovo, suco de abacaxi e molho de tomate). Para investigar a influência de fatores externos e o efeito do tempo, 30  $\mu$ L de sêmen foram aplicados em diferentes tecidos (algodão, seda, microfibra, poliéster e tricoline) e superfícies (estofado de cadeira, cerâmica, plástico e madeira), permanecendo expostos ao ambiente por períodos variando de 1 a 90 dias (3 meses), dependendo do material. Para os testes em tecido, uma pequena porção do tecido (0,5 cm  $\times$  0,5 cm) foi extraída diretamente em 50  $\mu$ L de tampão glicina 10 mM (pH 3,0), adicionando em seguida 25  $\mu$ L do oxidante [FeCl<sub>3</sub>], aguardando-se 15 minutos antes da adição de 25  $\mu$ L do Fe(II). Após esse período, uma alíquota de 2  $\mu$ L foi utilizada para a análise no  $\mu$ PAD. Para a avaliação em superfícies, um swab previamente imerso no tampão foi utilizado para coletar a amostra. Em seguida, foi adicionado o oxidante aguardou-se 15 minutos e, posteriormente, adicionou-se o Fe(II). Após esse processo, uma alíquota de 2  $\mu$ L foi retirada para análise.

### ***2.3.5 Tratamento estatístico e figuras de mérito***

Todas as análises foram realizadas em triplicata ( $n = 3$ ) e os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). A sensibilidade analítica, definida pela inclinação da curva analítica (*slope*) obtida por regressão linear, foi adotada como o principal critério de avaliação. As curvas analíticas foram construídas com um mínimo de cinco pontos ( $n \geq 5$ ) de acordo com a equação:  $Y = S \times C_{Fr} + b$ , onde  $Y$  representa a absorvância ou a intensidade de cor,  $C_{Fr}$  a concentração de frutose,  $S$  o *slope* e  $b$  o intercept. O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) para a curva analítica foi calculado para avaliar o alinhamento dos pontos com o perfil linear. Para comparações de diferentes sistemas empregou-se a análise de variância (ANOVA) para um nível de confiança de 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Os valores do limite de detecção (LOD,  $3\sigma$ ) e desvio padrão relativo (RSD) intradiário ( $n = 10$ ) e interdiário ( $n = 10$ ) e percentual de recuperação foram calculados mediante equações descritas na literatura (Patel et al., 2021). As curvas analíticas utilizadas nessa etapa foram analisadas com  $n \geq 8$ . O

tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o *software* OriginLab 2018 (Northampton, EUA).

Para avaliar o desempenho dos ensaios qualitativos, alguns parâmetros estatísticos (sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de falsos-positivos, razão de falsos negativos e F1-score) foram calculados baseando-se nas seguintes equações (Romijnders et al., 2021; Liang et al., 2024). Os dados para essa avaliação foram coletados por meio de formulários eletrônicos (Anexo 1):

$$\text{Sensibilidade (SE), \%} = \left( \frac{V_p}{V_p + F_n} \right) \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

$$\text{Especificidade, \%} = \left( \frac{V_n}{V_n + F_p} \right) \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

$$\text{Eficiência, \%} = \left( \frac{V_p + V_n}{V_p + V_n + F_p + F_n} \right) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

$$\text{Valor preditivo positivo (precisão, PR), \%} = \left( \frac{V_p}{V_p + F_p} \right) \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

$$\text{Valor preditivo negativo, \%} = \left( \frac{V_n}{V_n + F_n} \right) \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

$$\text{Razão de falso-positivo, \%} = \left( \frac{F_p}{V_n + F_p} \right) \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

$$\text{Razão de falso-negativo, \%} = \left( \frac{F_n}{V_p + F_n} \right) \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

$$\text{F1-score, \%} = \left( \frac{2 \times \text{SE} \times \text{PR}}{\text{SE} + \text{PR}} \right) \quad \text{Equação (8)}$$

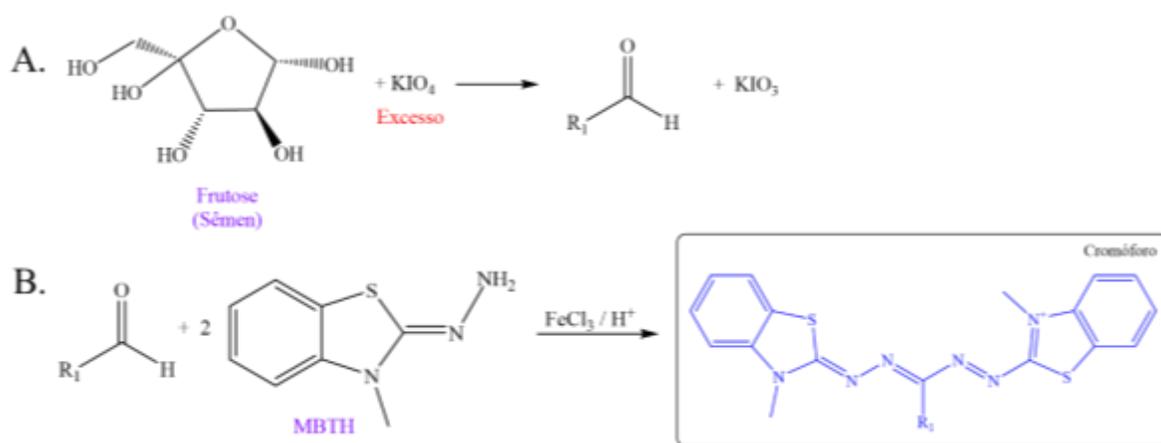
Onde,  $V_p$  é número de amostras verdadeiramente positivas;  $F_n$  é número de falsos-negativos;  $V_n$  é número de amostras verdadeiramente negativas; e  $F_p$  é o número de falsos-positivos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações colorimétricas para detecção direta de frutose, em geral, usam condições químicas mais extremas, envolvendo aquecimento e reagentes concentrados (Hu et al., 2016; Roe, 1934). A reação colorimétrica empregada para desenvolvimento da metodologia

proposta ocorre por meio da oxidação da frutose (açúcar redutor) pelo  $\text{KIO}_4$  e consequente geração dos compostos carbonílicos, os quais, reagem via acoplamento oxidativo com o MBTH, na presença de íons  $\text{Fe(III)}$  (oxidante) em meio ácido, levando a formação de uma azina (intermediário), convertido a um cromóforo de cor azul (Fig. 5). O cromóforo formado pode ser determinado tanto em solução quanto no  $\mu\text{PAD}$ , permitindo avaliar a variação da resposta colorimétrica por meio de ambas estratégias analíticas (Ashour et al., 2011; Granja et al., 2018; Khateeb et al., 2016; Puzanowska-Tarasiewicz, et al., 2005).

**Figura 5.** Representação de formação do cromóforo azul formado após o acoplamento oxidativo dos compostos carbonílicos gerados com MBTH/ $\text{Fe(III)}$ . A. Reação da frutose com o  $\text{KIO}_4$  formando compostos carbonílicos. B. Reação dos compostos carbonílicos com o MBTH gerando um cromóforo de coloração azul.

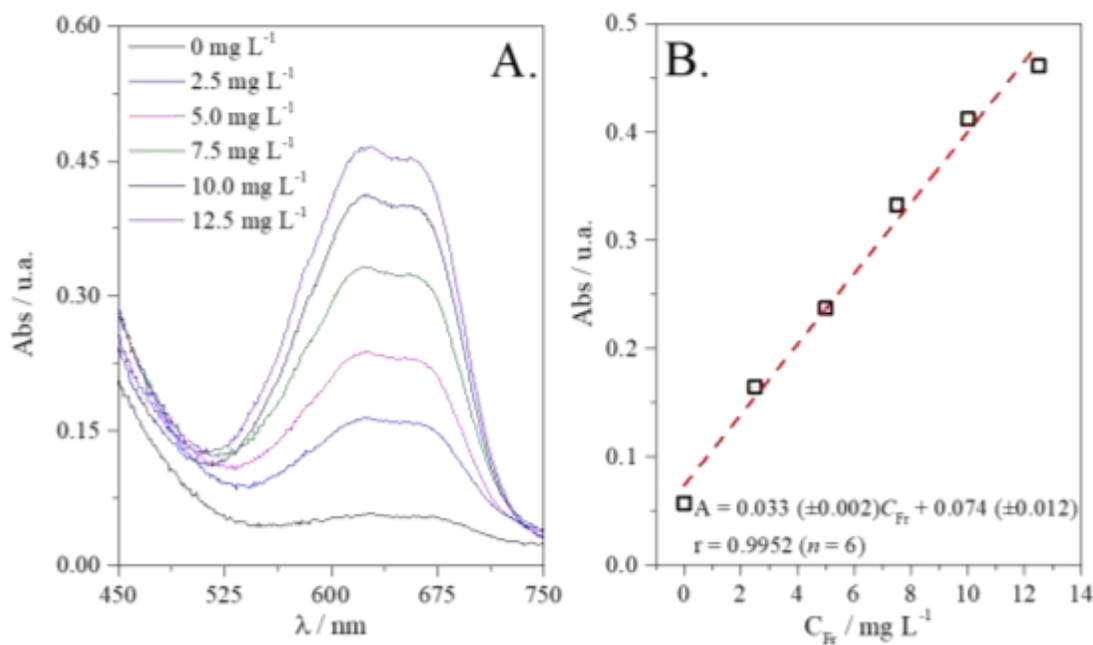


Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 3.1 Otimização das condições experimentais para os ensaios em solução e no $\mu\text{PADs}$

Inicialmente, para estabelecer a faixa linear e tempo de reação, foram avaliadas diferentes concentrações de frutose. As medidas espectrofotométricas foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção do cromóforo ( $\lambda_{\text{max}} = 625 \text{ nm}$ ), após 30 min de reação (Fig. 6). Assim, foi possível estabelecer um intervalo de concentração de frutose com resposta linear ao sinal analítico usado (absorvância).

**Figura 6.** Avaliação inicial da formação do cromóforo em solução a partir da oxidação da frutose e reação com MBTH/Fe(III) em meio ácido. A. Espectros de absorção molecular em função da variação de frutose (0 – 12,5 mg L<sup>-1</sup>) e B. Linearização da curva analítica e obtenção dos parâmetros de regressão linear com a respectiva incerteza para o modelo. Condições reacionais: [KIO<sub>4</sub>] = 0,2 mM, [MBTH] = 2,25 mM e [FeCl<sub>3</sub>] = 2,0 mM a 25°C.



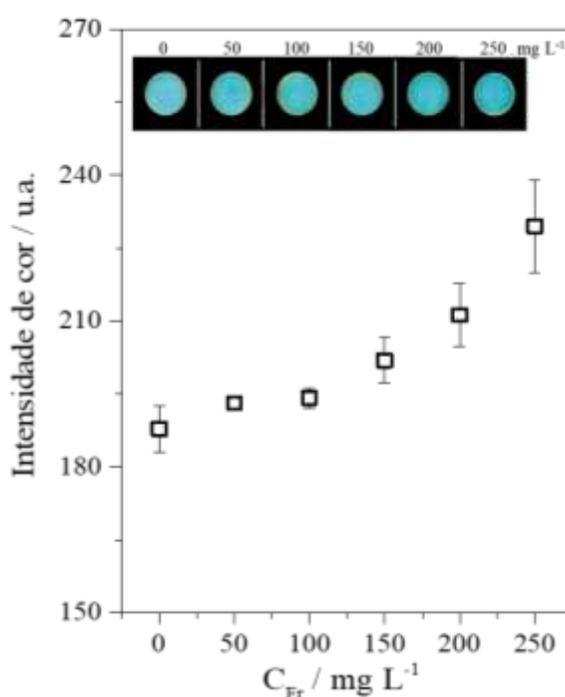
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Os testes foram realizados em meio ácido, pois nestas condições prevalece a forma cíclica dos açúcares redutores (menos reativa), diferentemente do meio básico, que favorece a forma acíclica (mais reativa) (Peterson et al., 2008; Steinbach et al., 2017). Nesse contexto, quando glicose e frutose estão em concentrações semelhantes, a oxidação com KIO<sub>4</sub> ocorre preferencialmente com a frutose, pois sendo uma pentose, é mais reativa que a glicose (hexose) em meio ácido (Guo et al., 2021), tornando o método mais seletivo.

Desta forma, foram testados diferentes sistemas oxidantes (em solução e papel) para geração dos compostos carbonílicos a partir da oxidação da frutose (KIO<sub>4</sub>, KMnO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Andrabi et al., 2007; Rafia et al., 2012; Hansen et al., 2020; Li et al., 2016), contudo, houve geração de subprodutos coloridos, não houve variação expressiva de cor entre o branco analítico e os sistemas com concentrações crescentes de frutose, portanto, os melhores resultados obtidos foram com o uso do KIO<sub>4</sub>. No sistema envolvendo o  $\mu$ PAD, tentou-se a oxidação da frutose diretamente no dispositivo, cuja composição é a celulose (polissacarídeo formado por monômeros de glicose). Desta forma, o KIO<sub>4</sub> também oxidou a celulose,

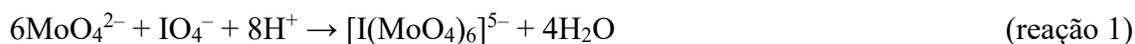
gerando compostos carbonílicos, assim, resultando em elevados valores do branco analítico e baixa capacidade de discriminação entre as diferentes concentrações de frutose (Fig. 7). O uso de  $\text{KIO}_4$  tem sido documentado na literatura quando se deseja promover mudanças na superfície do papel, mediante oxidação seguida de funcionalização envolvendo diferentes compostos (Kaur et al., 2022; Varma; Kulkarni, 2002; Vasconcelos et al., 2020).

**Figura 7.** Curva analítica relativa à intensidade de cor em função da concentração de frutose (0 – 250  $\text{mg L}^{-1}$ ) empregando  $\mu\text{PAD}$  ( $n = 3$ ). Condições:  $[\text{KIO}_4] = 5 \text{ mM}$ ,  $[\text{MBTH}] = 18 \text{ mM}$ ,  $[\text{FeCl}_3] = 20 \text{ mM}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Canal de cor utilizado = CMYK. A figura dentro do gráfico representa as zonas do  $\mu\text{PAD}$  onde ocorreu a reação colorimétrica.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

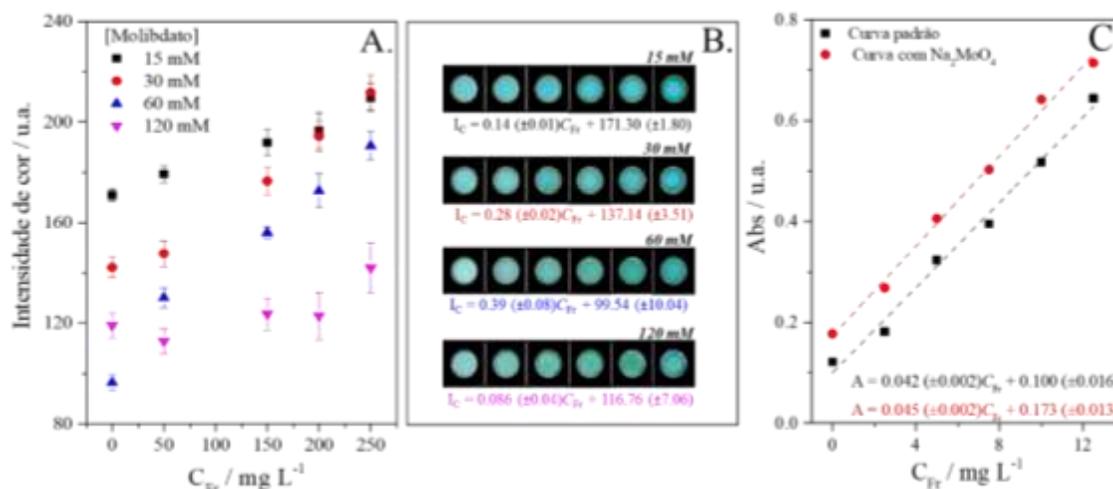
Para evitar a oxidação da celulose na superfície do  $\mu\text{PAD}$  optou-se por realizar a oxidação da frutose em solução (não diretamente no papel). Contudo, para eliminar o excesso de  $\text{KIO}_4$  no meio reacional (reação 1), foi adicionado ao  $\mu\text{PAD}$  solução de molibdato de sódio, minimizando a oxidação da celulose no papel (Santos et al., 2022).



Assim, diferentes proporções foram avaliadas entre o molibdato e o periodato ( $\text{MoO}_4^{2-} : \text{IO}_4^-$ ) = 3:1, 6:1, 12:1 e 24:1, salientado que a estequiometria da reação  $\text{MoO}_4^{2-}$  e

$\text{IO}_4^-$  é 6:1 (reação 1). Quando o  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  foi adicionado diretamente no  $\mu\text{PAD}$  foram obtidas condições com maior sensibilidade e menor valor do branco na concentração de 60 mM (Fig. 8A, B), enquanto concentrações superiores não apresentaram comportamento linear. Contudo, quando se usou o  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  no meio aquoso após a oxidação da frutose pelo  $\text{KIO}_4$ , não se obteve variação apreciável do sinal analítico com aumento da concentração do açúcar (Fig. 8C). Portanto, a condição selecionada foi a oxidação da frutose em solução pelo  $\text{KIO}_4$ , seguida de aplicação prévia do  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  na superfície do  $\mu\text{PAD}$  a 60 mM.

**Figura 8.** Avaliação da influência da concentração de molibdato de sódio [3:1 (15 mM), 6:1 (30 mM), 12:1 (60 mM) e 24:1 (120 mM)]. A. Curva analítica em função da intensidade de cor em diferentes concentrações de molibdato de sódio. B. zonas de reação colorimétrica do  $\mu\text{PAD}$ . C. Avaliação da influência de adição do molibdato de sódio em solução. Condições: concentração de frutose (0 – 250  $\text{mg L}^{-1}$ ) empregando  $\mu\text{PAD}$  ( $n = 3$ ),  $[\text{KIO}_4] = 5 \text{ mM}$ ,  $[\text{MBTH}] = 18 \text{ mM}$ ,  $[\text{FeCl}_3] = 20 \text{ mM}$  a 25 °C. Canal de cor utilizado = Ciano.

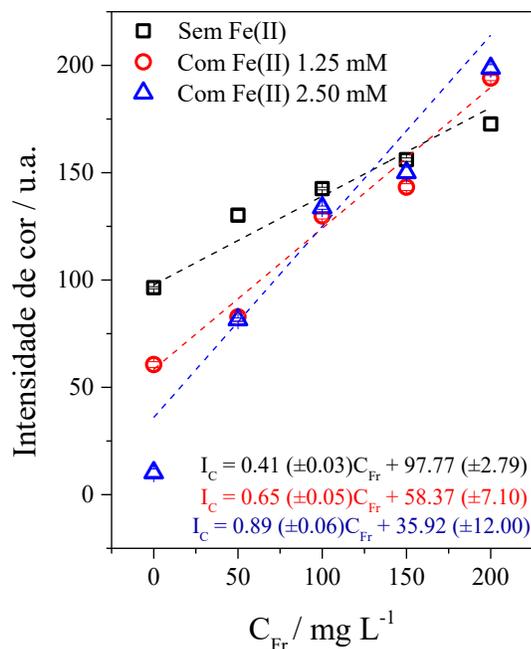


Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Mesmo com o uso do  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  ainda existia uma variação do branco analítico, indicando algum grau de oxidação do papel. Desta forma, para aumentar a sensibilidade e melhorar a diferença visual entre o branco e os outros níveis de concentração de frutose, após a oxidação do açúcar em solução (no eppendorf), foi adicionada uma alíquota de Fe(II). Esta estratégia visava reduzir a concentração em excesso do  $\text{KIO}_4$  (para melhorar o efeito do  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , na superfície do papel), contudo, sem que houvesse excesso do redutor. Além disto, o produto da oxidação do Fe(II) gera Fe(III), o qual constitui o oxidante empregado na reação de acoplamento oxidativo (Huang et al., 2021; Sarhan; Bolm, 2009). Assim, a

concentração de Fe(II) foi avaliada com 1,25 e 2,5 mM (Fig. 9), sendo os melhores resultados obtidos com a maior concentração de íons ferro no meio.

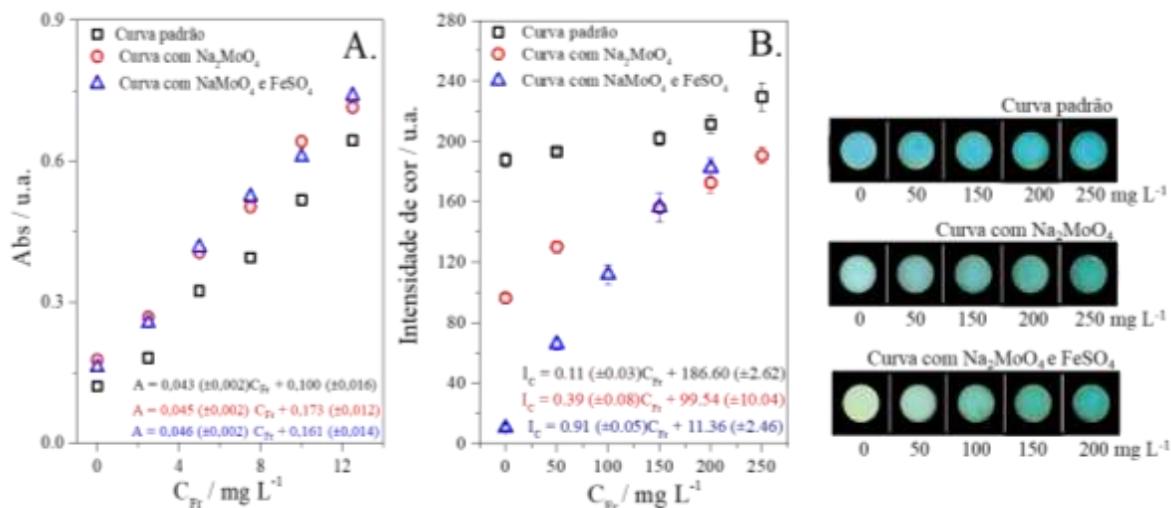
**Figura 9.** Avaliação da adição de Fe(II) em diferentes concentrações empregando  $\mu$ PAD ( $n = 5$ ). Condições: concentração de frutose ( $0 - 200 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $[\text{Na}_2\text{MoO}_4] = 60 \text{ mM}$ ,  $[\text{KIO}_4] = 5 \text{ mM}$ ,  $[\text{MBTH}] = 18 \text{ mM}$ ,  $[\text{FeCl}_3] = 20 \text{ mM}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Canal de cor utilizado = Ciano. A figura dentro do gráfico representa as zonas do  $\mu$ PAD onde ocorreu a reação colorimétrica.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Desta forma, para oxidação prévia da frutose se empregou  $\text{FeSO}_4$  a 2,5 mM, pois nestas condições se obteve melhor performance analítica. Por fim, para aplicação em solução não é necessário adicionar  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  e  $\text{FeSO}_4$ , uma vez que a única fonte passível de oxidação é a frutose (Fig. 10).

**Figura 10.** Influência do molibdato e ferro na formação do cromóforo. A. Curva em solução, condições: concentração de frutose (0 – 12 mg L<sup>-1</sup>), [KIO<sub>4</sub>] = 0,2 mM, [MBTH] = 2,25 mM e [FeCl<sub>3</sub>] = 2,0 mM. B. Curva no μPAD (n = 5). Concentração de frutose (0 – 200 mg L<sup>-1</sup>) empregando, com adição de Fe(II) ao sistema, [Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>] = 60 mM, [KIO<sub>4</sub>] = 5mM, [MBTH] = 18 mM, [FeCl<sub>3</sub>] = 20 mM a 25 °C. Canal de cor utilizado = Ciano. A figura ao lado do gráfico B representa as zonas de μPAD onde ocorreu a reação colorimétrica.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Uma vez que, a reação de complexação entre o molibdato e o periodato ocorre em meio ácido (Ensaifi; Chamjangali, 2003), diferentes sistemas foram avaliados (Tabela 3), sendo que o tampão glicina 10 mM (pH 3,0) apresentou maior sensibilidade e menor branco analítico, melhorando a detectabilidade do método. Esse resultado pode estar relacionado a um possível acoplamento da glicina com espécies presentes no meio, uma vez que, derivados deste aminoácido participam de reações de acoplamento cruzado catalisadas por Fe(III) (Liu, et al., 2012).

**Tabela 3.** Avaliação de condições reacionais para oxidação da frutose em meio ácido (n = 3). Condições reacionais: [Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>] = 0,2 mM, [KIO<sub>4</sub>] = 0,2 mM, [MBTH] = 2,25 mM, [FeCl<sub>3</sub>] = 2,0 mM a 25 °C. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.

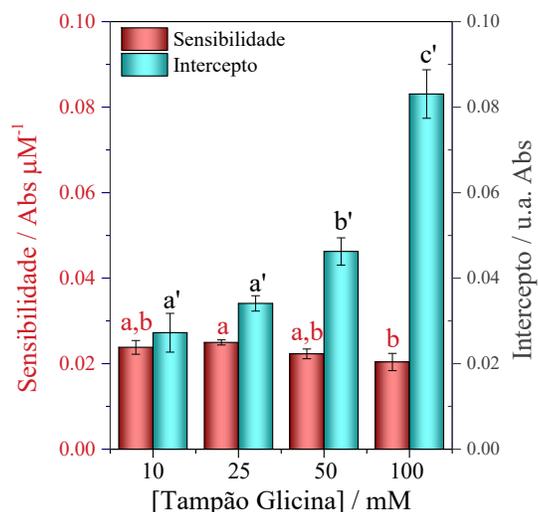
Condições do meio		$^1A = a \times C_{FR} + b$		
		<i>a</i> (coeficiente angular)	<i>b</i> (intercepto)	<i>r</i>
HCl 0,01 M (pH 2,0)	Sem Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0147 ± 0,0012 <sup>a</sup>	0,0575 ± 0,0123 <sup>a'</sup>	0,9842
	Com Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0195 ± 0,0010 <sup>b</sup>	0,0343 ± 0,0081 <sup>a'</sup>	0,9943
Tampão acetato 0,01 M (pH = 3,5)	Sem Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0232 ± 0,0019 <sup>c</sup>	0,1208 ± 0,0200 <sup>b'</sup>	0,9833
	Com Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0211 ± 0,0015 <sup>c</sup>	0,1136 ± 0,0160 <sup>b'</sup>	0,9897
Tampão fosfato 0,01 M (pH 3,0)	Sem Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0194 ± 0,0010 <sup>c</sup>	0,0459 ± 0,0100 <sup>a'</sup>	0,9939
	Com Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0209 ± 0,0070 <sup>c</sup>	0,1965 ± 0,0586 <sup>c'</sup>	0,8658
Tampão glicina 0,01 M (pH 3,0)	Sem Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0240 ± 0,0035 <sup>c</sup>	0,0840 ± 0,0390 <sup>b'</sup>	0,9596
	Com Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0438 ± 0,0021 <sup>d</sup>	0,0028 ± 0,0166 <sup>d'</sup>	0,9952

<sup>1</sup>A = Absorvância // C<sub>FR</sub> = concentração de frutose (mg L<sup>-1</sup>).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Desta forma, optou-se por utilizar tampão glicina nos ensaios em solução e no  $\mu$ PAD, levando a melhoria na resolução das cores, aumentando a sensibilidade e reprodutibilidade. A concentração do tampão glicina foi avaliada (Fig. 11), e observou-se que, o aumento da concentração da solução tampão tinha relação diretamente proporcional ao valor do branco analítico.

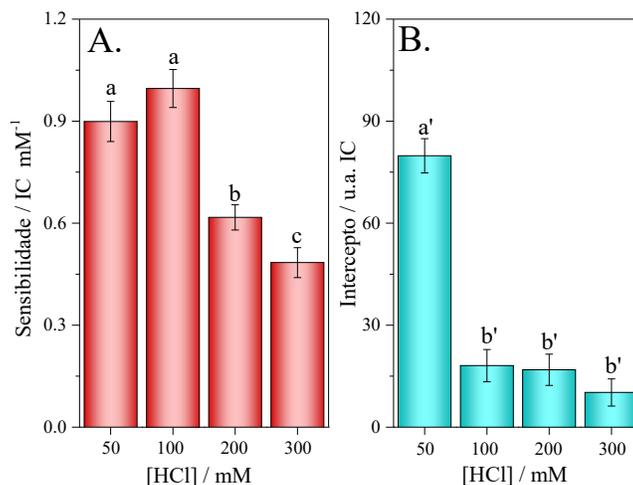
**Figura 11.** Influência da concentração do tampão glicina (pH = 3,0) na reação colorimétrica. Condições: concentração de frutose (0 – 5 mg L<sup>-1</sup>), [KIO<sub>4</sub>] = 0,2 mM, [MBTH] = 2,25 mM e [FeCl<sub>3</sub>] = 2,0 mM. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Assim, a menor concentração do tampão (10 mM) foi selecionada para as etapas posteriores de otimização. Nos ensaios no μPAD, a concentração de HCl no preparo das soluções de MBTH e Fe(III) foi avaliada de 50 a 300 mM (Fig. 12), sendo 100 mM a condição de melhor sensibilidade, pois acima deste valor houve redução da sensibilidade possivelmente devido ao aumento da força iônica e à formação de cloro-complexos de ferro.

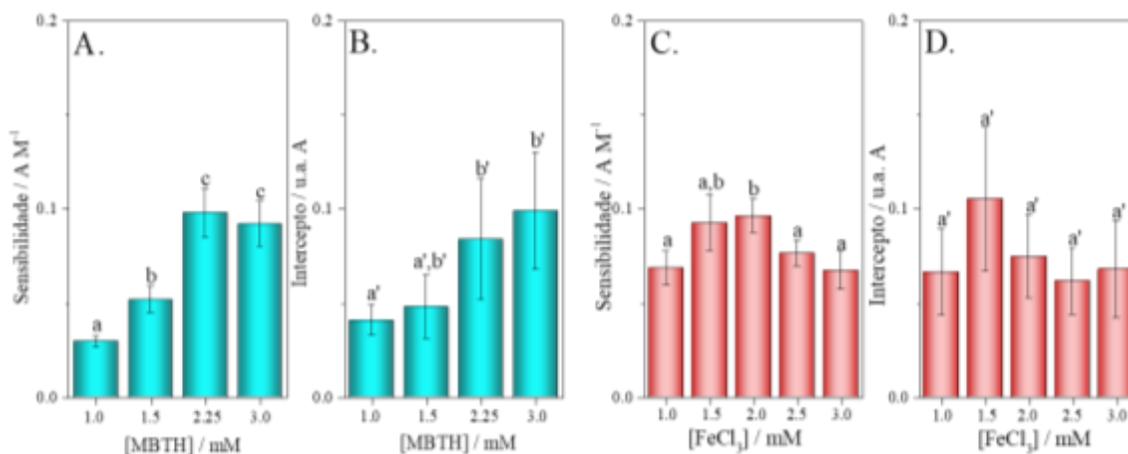
**Figura 12.** Efeito da variação da concentração do ácido. A. Sensibilidade e B. Sinal do branco em função da concentração de HCl. Condições: concentração de frutose (0 – 200 mg L<sup>-1</sup>) empregando μPAD (*n* = 3) a 25 °C. Canal de cor utilizado = Ciano. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

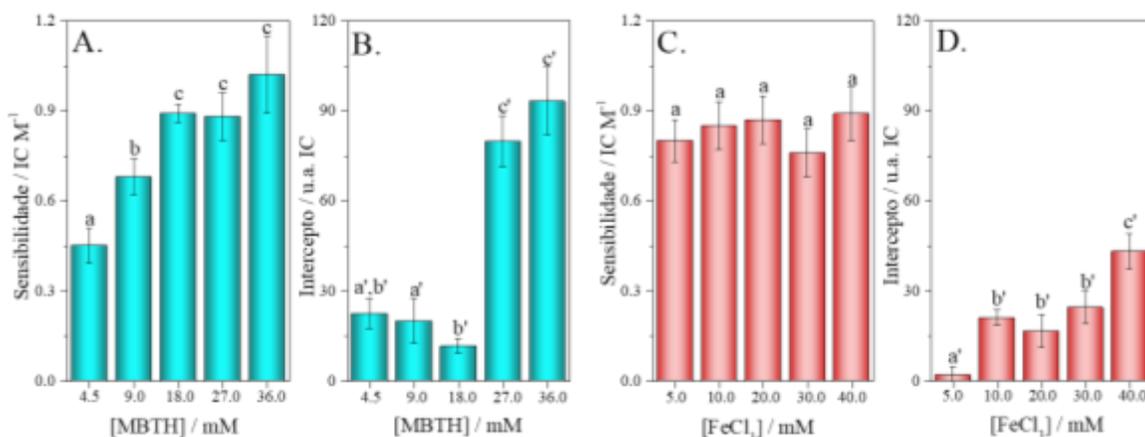
Por fim, as concentrações de MBTH e Fe(III) em solução (Fig. 13) e no  $\mu$ PAD (Fig. 14) foram avaliadas. Os melhores resultados foram obtidos com 2,25 mM de MBTH e 2,0 mM de FeCl<sub>3</sub> em solução, e 18 mM de MBTH e 20 mM de FeCl<sub>3</sub> no  $\mu$ PAD.

**Figura 13.** Influência da concentração do reagente colorimétrico (MBTH) e do Fe(III) na sensibilidade e no sinal do branco em solução. A. Sensibilidade e B. branco em função da variação da concentração de MBTH; C. Sensibilidade e D. branco em função da variação da concentração de Fe(III). Condições: Concentração frutose: (0 – 5 mg L<sup>-1</sup>), [Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>] = 0,2 mM, [KIO<sub>4</sub>] = 0,2 mM, [MBTH] = 2,25 mM, [FeCl<sub>3</sub>] = 2,0 mM a 25 °C. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 14.** Influência da concentração do reagente colorimétrico (MBTH) e do Fe(III) na sensibilidade e no sinal do branco no  $\mu$ PAD. A. Sensibilidade e B. branco em função da variação da concentração de MBTH; C. Sensibilidade e D. branco em função da variação da concentração de Fe(III). Condições: Concentração frutose: (0 – 200 mg L<sup>-1</sup>) empregando  $\mu$ PAD ( $n = 5$ ), [Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>] = 60 mM, [KIO<sub>4</sub>] = 5 mM, [Fe(II)] = 2,5 mM a 25 °C. Canal de cor utilizado = Ciano. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

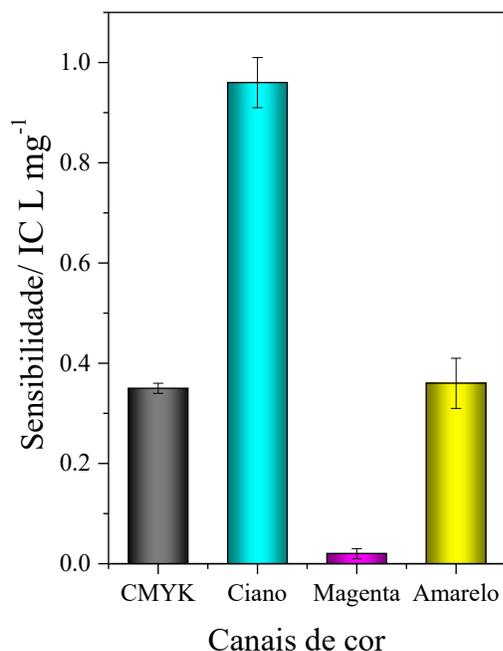
A seleção das condições ótimas considerou a sensibilidade analítica, valor do branco e a diferença visual entre os níveis de concentração e o branco, aspecto essencial para a aplicação do teste em campo e ensaios qualitativos.

### 3.2 Detecção colorimétrica de frutose empregando $\mu$ PAD

#### 3.2.1 Avaliação dos canais de cor

O desenvolvimento de cor no dispositivo em papel devido a reações químicas pode ser avaliado qualitativamente (olho nu) e quantitativamente por meio de imagens. A obtenção de valor numérico decorrente da imagem, associado a uma escala, utiliza um determinado sistema de cor (Phuangsaijai et al., 2021). Desta forma, sistemas de cores como o RGB (vermelho, verde e azul) e o CMYK (ciano, magenta, amarelo, preto), são utilizados. Neste estudo o sistema subtrativo CMYK foi selecionado devido à sua relação direta e não aditiva (Kim et al., 2022). Assim, o canal ciano (cor gerada para detecção de frutose) apresentou maior contribuição, devido à proximidade com a cor da amostra (Fig. 15).

**Figura 15.** Sensibilidade das curvas em função das cores do sistema subtrativo CMYK, contribuição dos canais ciano, magenta e amarelo. Condições: concentração de frutose (0 – 200 mg L<sup>-1</sup>) empregando  $\mu$ PAD ( $n = 3$ ), [Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>] = 60 mM, [KIO<sub>4</sub>] = 5 mM, [MBTH] = 18 mM, [FeCl<sub>3</sub>] = 20 mM a 25 °C.



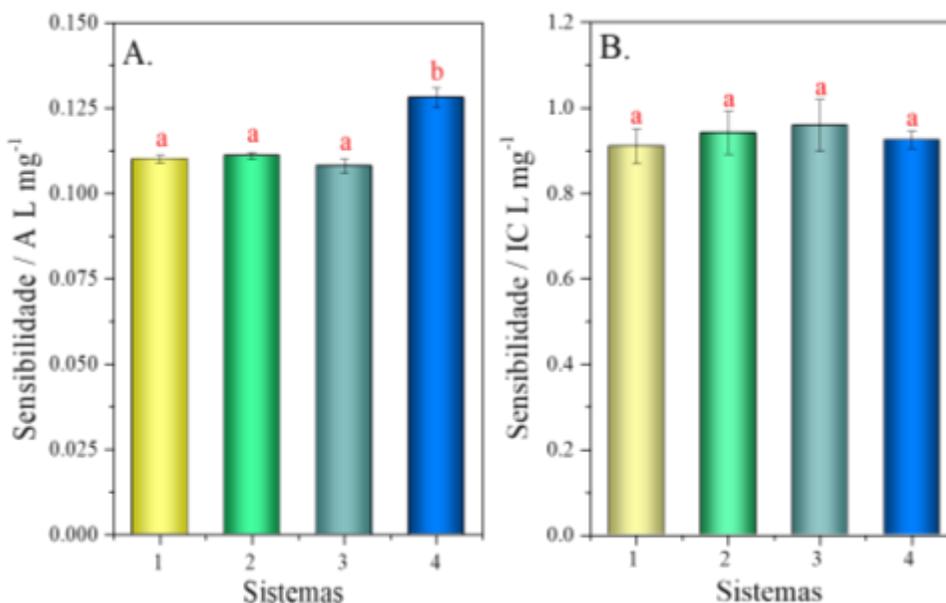
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

A coordenada K não foi representada, pois com o aumento da concentração de frutose permaneceu praticamente inalterada. Assim, o canal ciano foi selecionado para as análises subsequentes por apresentar maior sensibilidade frente aos demais canais.

### 3.3 Avaliação de possíveis interferentes

A influência de diferentes espécies foi avaliada, para investigar a seletividade do método, considerando que o sêmen é uma mistura complexa produzido por diferentes glândulas do sistema reprodutor humano (Gupta; Kumar, 2017). Diante disso, algumas das espécies presentes nesse fluido, são: glicose, inositol, citrato, zinco, cálcio, magnésio e albumina (Homonnai et al., 1978; Das et al., 2021). A glicose (açúcar redutor) e o inositol (composto polihidroxiado) foram avaliados separadamente (Fig. 16), sendo observado que ambos não influenciaram significativamente ( $\alpha = 0,05$ ) na quantificação de frutose. Para testar as demais espécies e outras possam estar presentes na amostra, foi preparado sêmen sintético seguindo protocolo de Owen e Katz (2005), sendo verificado que para os valores de sensibilidade em solução, houve uma diferença de 11% para a solução de sêmen sintético, a qual não inviabiliza a aplicação do método (Fig. 16A). No entanto, no  $\mu$ PAD não diferiram significativamente (Fig. 16B).

**Figura 16.** Avaliação de espécies presentes no sêmen. A. em solução; B. No  $\mu$ PAD. Sistemas: 1. Frutose; 2. Frutose + Glicose (proporção 2,5:1); 3. Frutose e Inositol (proporção 2:1); 4. Sêmen sintético. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.

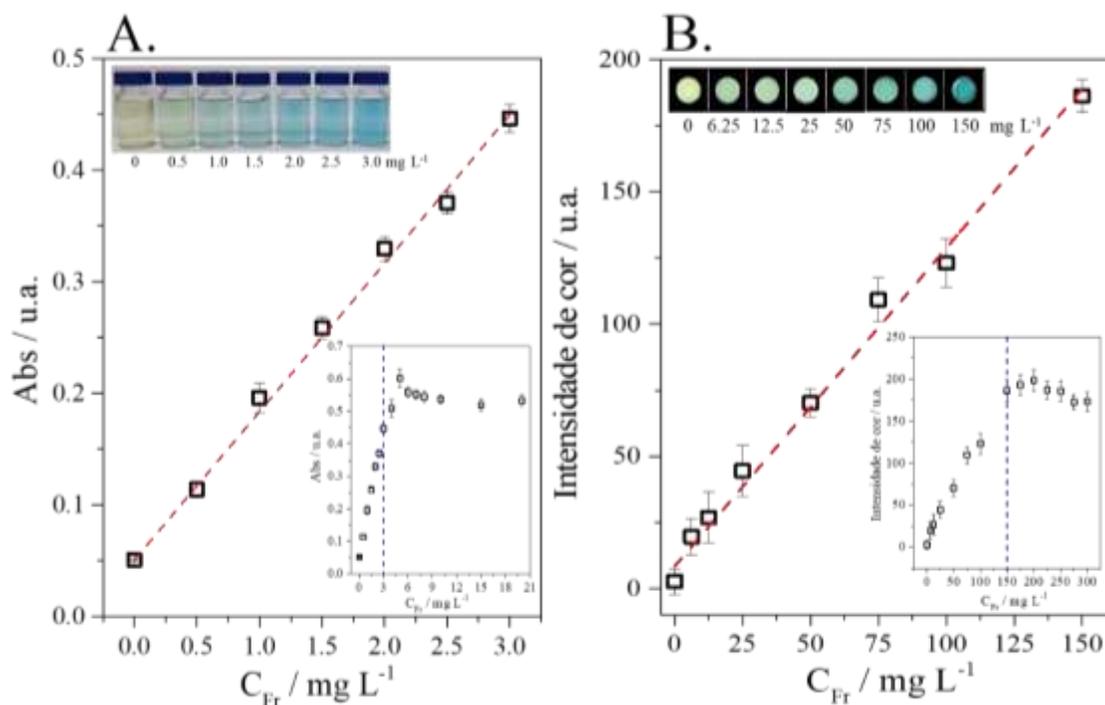


Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 3.4 Figuras de mérito e ensaios de recuperação

Antes de utilizar uma metodologia desenvolvida é necessário validar rigorosamente o método pois as amostras biológicas estão sujeitas a degradação, contaminação, envelhecimento, entre outros fatores. A avaliação das principais figuras de mérito, constitui uma etapa crucial nesse processo, cujo intuito é garantir sua confiabilidade, reprodutibilidade e eficiência (Justino et al., 2010; Sikirzhytskaya et al., 2023). Assim, para estabelecer a faixa linear e o ponto de saturação do sistema, foi construída uma curva analítica com concentrações de frutose variando de 0 a 15 mg L<sup>-1</sup> (solução, Fig. 17A) e 0 a 300 mg L<sup>-1</sup> (μPAD, Fig. 17B).

**Figura 17.** Determinação da faixa linear relativa à reação colorimétrica, medidas de absorbância (Abs.) e intensidade de cor (IC) em função da concentração de frutose. A. Curva analítica em solução, as figuras dentro do gráfico representam a curva de absorbância em função da variação de concentração da frutose até a saturação e os pontos da reação colorimétrica em solução B. Curva analítica no μPAD. A figura dentro do gráfico representa a curva da intensidade de cor em função da variação de concentração da frutose até a saturação e as zonas do μPAD relacionadas as concentrações de frutose na faixa linear.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Em solução, para frutose, foi obtida resposta linear na faixa de 0,5 a 3 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 4), conforme a equação  $A_{625} = 0,132(\pm 0,002) \times C_{Fr} + 0,050(\pm 0,001)$ , com coeficiente de

correlação  $r = 0,9993$  ( $n = 7$ ), empregando um modelo de regressão linear. O limite de detecção (LOD) foi de  $0,64 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto o desvio padrão relativo (RSD) intradiário e interdiário ( $n = 10$ ) foi de  $0,11$  e  $0,32\%$ , respectivamente. Adicionalmente, para método em solução avaliou-se o RSD em diferentes níveis de concentração da solução de referência, variando de  $0,21\%$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) a  $0,65\%$  ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ). No  $\mu\text{PAD}$ , a faixa linear foi de  $12,5$  a  $150 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabela 4) correspondente à equação  $\text{IC} = 1,10 (\pm 0,04) \times C_{\text{Fr}} + 8,39 (\pm 2,55)$ , apresentando  $r = 0,9966$  ( $n = 8$ ). O LOD foi de  $6,25 \text{ mg L}^{-1}$ , e o RSD intradiário e interdiário ( $n = 10$ ) variou de  $2,73$  a  $3,81\%$ . As figuras de mérito do método desenvolvido (em solução ou no  $\mu\text{PAD}$ ) atenderam à finalidade proposta, uma vez que o intervalo de concentração de frutose em amostras de sêmen, em média, varia de  $1000$  a  $6300 \text{ mg L}^{-1}$ , assim, é possível diluir a amostra de  $100$  até  $10000\times$ , a depender da metodologia a ser usada, garantindo a confiabilidade analítica e uso de pequena quantidade de amostra ( $0,1$  a  $1,0 \mu\text{L}$ ).

**Tabela 4.** Principais figuras de mérito do método proposto.

Parâmetros	Solução	$\mu\text{PAD}$
Curva analítica	$0,132(\pm 0,002) \times C_{\text{Fr}} + 0,050(\pm 0,001)$	$1,10 (\pm 0,04) \times C_{\text{Fr}} + 8,39(\pm 2,55)$
Coefficiente de correlação linear (r)	0,9993	0,9966
Faixa linear ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,5 – 3	12,5 – 150
LOD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,64	6,25
RSD intradiário (%)	0,11	2,73
RSD interdiário (%)	0,32	3,81

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

A avaliação do efeito de matriz foi realizada a partir do percentual de recuperação de frutose em amostra de sêmen humano (Tabela 5), considerando como referencial de recuperações quantitativas valores entre  $80$  e  $120\%$  (Cazorla-Reyes et al., 2014; Xing et al., 2022). As recuperações variaram entre  $91$  e  $100\%$  (solução,  $\text{RSD} \leq 0,9\%$ ) e  $99$  a  $102\%$  ( $\mu\text{PAD}$ ,  $\text{RSD} \leq 2\%$ ), demonstrando que a detecção da frutose não sofre influência dos constituintes da amostra biológica, confirmando a exatidão do método para ambas as metodologias empregadas.

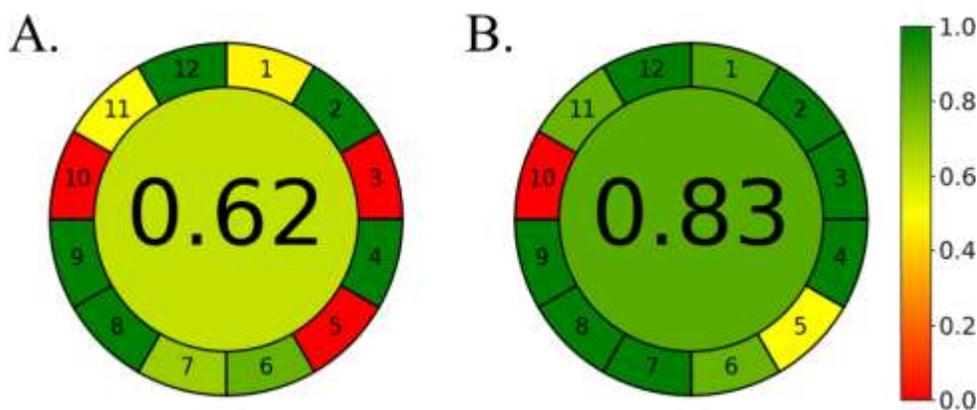
**Tabela 5.** Valores de recuperações com amostra de sêmen em solução (diluição: 6700×) e no  $\mu$ PAD (diluição: 100×).

Sistema	Adicionado ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Encontrado ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Recuperado (%)	RSD (%)
Solução	0	0,54	-	0,2
	0,50	1,04	100	0,9
	1,50	1,86	91	0,3
	2,50	2,96	97	0,4
$\mu$ PAD	0	50,2	-	0,4
	25	74,6	99	0,5
	50	102,2	102	1,3
	100	152,2	101	2,0

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

A fim de avaliar o impacto ambiental das metodologias empregadas, a ferramenta métrica AGREE, que se baseia nos 12 princípios da Química Verde foi utilizada. Com o objetivo de avaliar de forma mais abrangente as metodologias, esta ferramenta associa os princípios a pontuações que variam de 0 a 1. Os critérios avaliados incluem: (1) tratamento da amostra, (2) quantidade de amostra, (3) análise direta, (4) integração dos processos, (5) automatização e miniaturização, (6) derivatização, (7) geração de resíduos, (8) frequência das determinações, (9) consumo energético, (10) origem dos reagentes, (11) toxicidade e (12) segurança do operador (Pena-Pereira et al., 2020; Shi et al., 2023). Os índices obtidos foram 0,62 em solução (Fig. 18A) e 0,83 no  $\mu$ PAD (Fig. 18B), indicando que o  $\mu$ PAD é um procedimento mais sustentável, pois quanto mais próximo da unidade maior é o alinhamento da metodologia com a Química Verde.

**Figura 18.** Avaliação AGREE das metodologias para a detecção de frutose. A. Em solução e B. No  $\mu$ PAD.

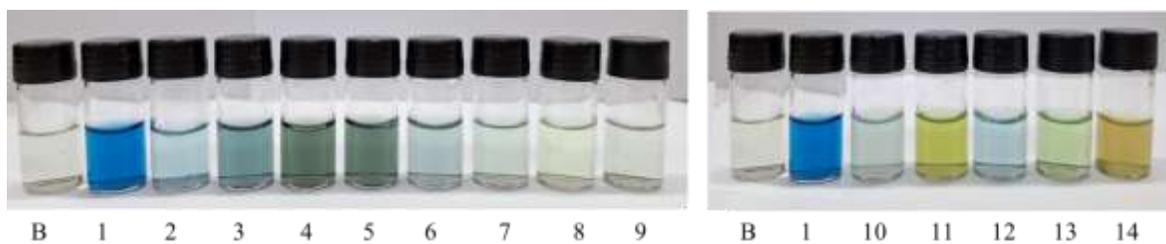


Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 3.5 Ensaios qualitativos com amostras reais

Após a etapa de validação quantitativa a aplicabilidade do método foi avaliada frente a diferentes amostras passíveis de serem encontradas durante as investigações criminais (Harbison; Fleming, 2016; Virkler; Lednev, 2009). Assim, tanto em solução (Fig. 19) como no  $\mu$ PAD (Fig. 20) diferentes fluidos biológicos (fluido vaginal, sangue menstrual, sangue, saliva e urina) e adicionalmente, algumas amostras de alimentos foram investigadas. Visualmente a maioria dessas amostras não foram consideradas como potenciais falsos-positivos, exceto pelo fluido vaginal, urina masculina e clara de ovo (Fig. 19) que apresentam colocação levemente azulada, no entanto, em comparação com a amostra de sêmen, fica evidente a variação de intensidade (para mesma diluição). Desta forma, se houver dúvida no ensaio, ainda pode-se diluir mais a amostra e comparar com um controle positivo, a fim de evitar erros na avaliação.

**Figura 19.** Estudo de diferentes amostras biológicas e alimentícias em solução (amostra:solução = 1:300). Amostras: (B) branco analítico; (1) sêmen; (2) fluido vaginal; (3) sangue menstrual; (4) sangue ♂; (5) sangue ♀; (6) urina ♂; (7) urina ♀; (8) saliva ♂; (9) saliva ♀; (10) leite; (11) suco de abacaxi; (12) clara de ovo; (13) suco de laranja; (14) molho de tomate. Condições:  $[\text{KIO}_4] = 0,2 \text{ mM}$ ,  $[\text{MBTH}] = 2,25 \text{ mM}$  e  $[\text{FeCl}_3] = 2,0 \text{ mM}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

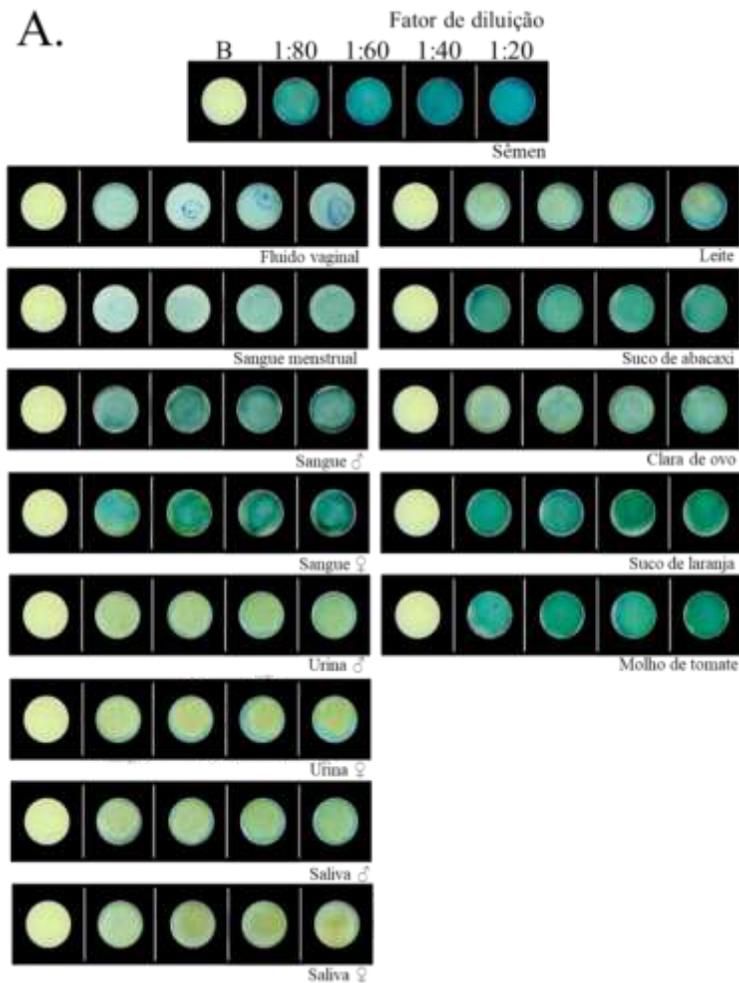


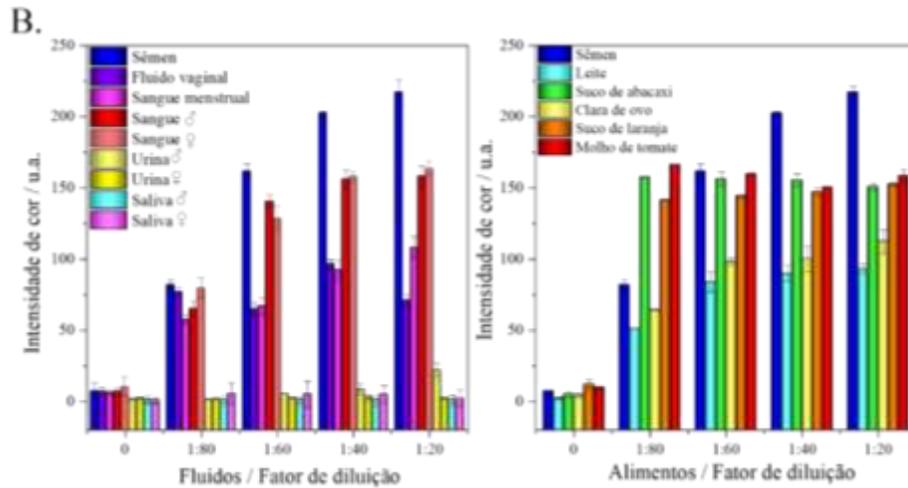
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Uma vez realizada a análise das amostras de fluidos biológicos e alimentos em solução, também foram avaliados no  $\mu$ PAD (Fig. 20A, B), onde pôde-se observar que a amostra que apresentou coloração similar ao sêmen foi o sangue, devido à maior concentração de glicose e aldeídos oriundos de processos oxidativos (Krebs, 1950; Wei et al., 2019). Para o fluido vaginal os resultados no  $\mu$ PAD e em solução foram similares, com uma menor intensidade de cor, a qual pode ser ajustada com processo de diluição. Os alimentos (sucos de frutas, leite, clara de ovo e molho de tomate), de forma geral, apresentaram valores altos, o que era esperado, pois são fontes de frutose, com exceção do

leite e da clara do ovo, os quais, contém elevadas concentrações de lactose e albumina, respectivamente (Hallfrisch, 1990).

**Figura 20.** Avaliação das amostras biológicas e alimentícias no  $\mu$ PAD. A. Avaliação qualitativa e B. Dados quantitativos das amostras. Condições:  $[\text{Na}_2\text{MoO}_4] = 60 \text{ mM}$ ,  $[\text{KIO}_4] = 5 \text{ mM}$ ,  $[\text{Fe(II)}] = 2,5 \text{ mM}$   $[\text{MBTH}] = 18 \text{ mM}$ ,  $[\text{FeCl}_3] = 20 \text{ mM}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Canal de cor utilizado = Ciano.



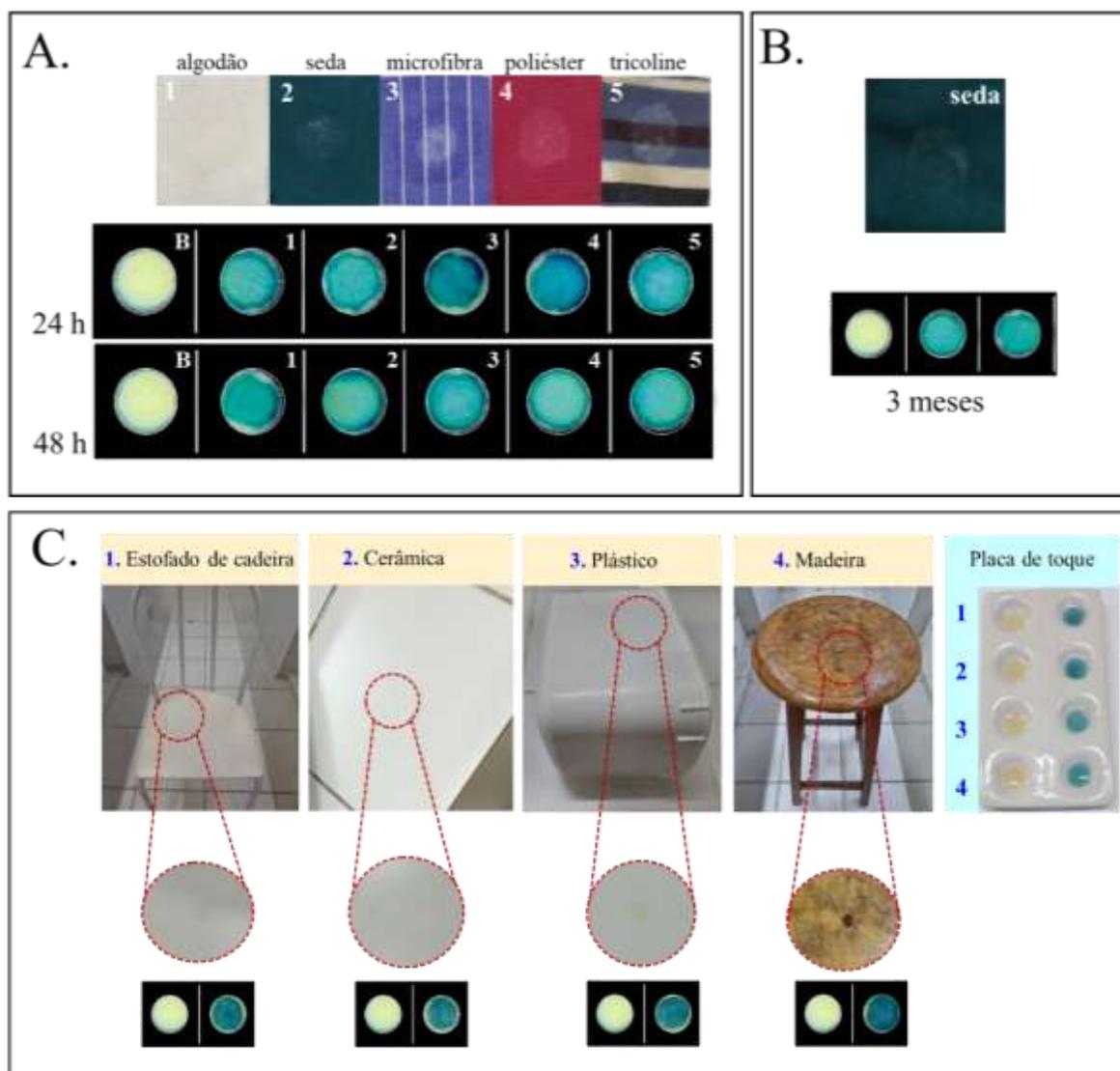


Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Em um ensaio para simular uma condição de possível cena de crime, um pequeno volume da amostra (30  $\mu$ L) foi depositado sobre os tecidos (Fig. 21A), sendo realizada a análise 24 e 48 h após a deposição da amostra. Assim, uma pequena porção do tecido (0,5 cm  $\times$  0,5 cm) foi extraída e incubada diretamente em solução tampão glicina, tendo sido posteriormente utilizada na análise no  $\mu$ PAD. Desta forma, se observou visualmente intensidade de cor similar no dispositivo para todas as amostras de tecidos avaliados (algodão, seda, microfibras, poliéster e tricolina). Uma análise em um maior intervalo de tempo (3 meses) foi realizada após deposição da amostra de sêmen no tecido (seda) exposta às condições ambientais não controladas (ausência de proteção contra luminosidade ou umidade, sem controle da temperatura) (Fig. 21B). Portanto, os resultados indicaram que o ensaio usando o  $\mu$ PAD detectou a frutose independentemente o tipo de tecido e do tempo de exposição.

Adicionalmente, ensaios para detecção de sêmen depositado em diferentes superfícies (estofado de cadeira, cerâmica, plástico, madeira) foram realizados (Fig. 21C). A amostra foi depositada na superfície e analisada após 24 h de exposição. Os resultados obtidos (solução e  $\mu$ PAD) indicaram que a metodologia é passível de ser usada de forma eficiente no local do crime, com a utilização da placa de toque ou  $\mu$ PAD para análises qualitativas usando pequena quantidade de amostra.

**Figura 21.** Avaliação temporal da amostra em diferentes tecidos e superfícies. A. Amostra depositada nos tecidos e analisada no  $\mu$ PAD após 24 e 48 horas sob condições ambientais. B. Amostra depositada no tecido seda avaliada após 3 meses mantida em condições ambiente. C. Amostra depositada em diferentes superfícies e avaliada no  $\mu$ PAD após 24 h. Condições:  $[\text{Na}_2\text{MoO}_4] = 60 \text{ mM}$ ,  $[\text{KIO}_4] = 5 \text{ mM}$ ,  $[\text{Fe(II)}] = 2,5 \text{ mM}$   $[\text{MBTH}] = 18 \text{ mM}$ ,  $[\text{FeCl}_3] = 20 \text{ mM}$  a 22 a 27 °C. Canal de cor utilizado = Ciano.



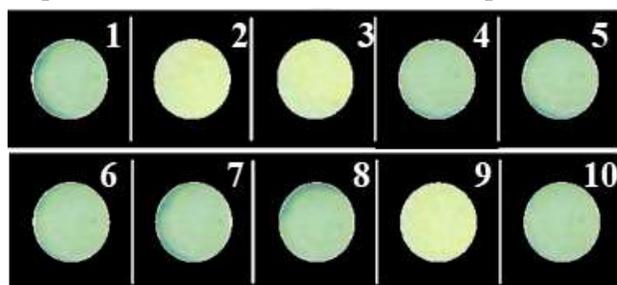
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 3.6 Validação estatística dos métodos para aplicações qualitativas

Durante a validação de um método qualitativo, é essencial avaliar a capacidade de diferenciar o branco analítico das amostras em menor nível de concentração, confirmando que o método é sensível o suficiente para identificar o marcador sem produzir falsos

negativos (Taleuzzaman, 2018). Para tanto, diferentes amostras não contendo frutose (branco) e com concentrações iguais a  $6,25 \text{ mg L}^{-1}$  (LOD, para o  $\mu\text{PAD}$ ) foram analisadas por 10 avaliadores independentes, com o objetivo de verificar a capacidade de discriminação do método entre o branco e o nível de concentração referente ao LOD. Os resultados mostraram que o percentual médio de acertos foi de 94% (Fig. 22), indicando que o método possui boa capacidade de diferenciação entre o branco e amostras contendo frutose.

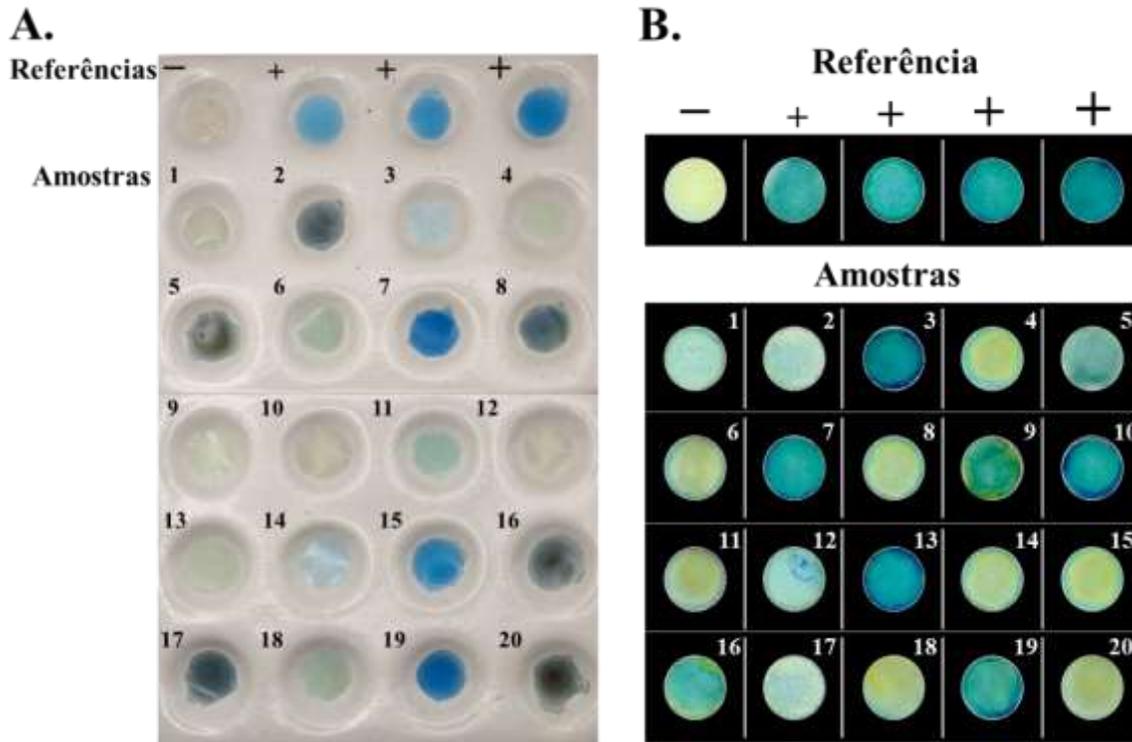
**Figura 22.** Avaliação qualitativa da diferença entre o branco analítico e o LOD. As zonas 2, 3 e 9 representam o branco, enquanto as zonas 1,4,5,6,7,8 e 10 correspondem ao LOD.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Para validação qualitativa das metodologias (Fig. 23) as amostras biológicas foram avaliadas na placa de toque (Fig.23A) e no  $\mu\text{PAD}$  (Fig. 23B) por diferentes indivíduos ( $n \geq 60$ ) empregando formulários eletrônicos.

**Figura 23.** Fotos utilizadas na avaliação presuntiva com diferentes amostras reais. Referência negativa (branco), Referência positiva (Frutose). A. Placa de toque. (1) Urina ♀; (2) Sangue ♀; (3) Fluido vaginal; (4) Saliva ♂; (5) Sangue ♂; (6) Urina ♂; (7) Sêmen; (8) Sangue menstrual; (9) Saliva ♂; (10) Saliva ♀; (11) Urina ♂; (12) Urina ♀; (13) Saliva ♀; (14) Fluido vaginal; (15) Sêmen; (16) Sangue ♀; (17) Sangue menstrual; (18) Urina ♂; (19) Sêmen; (20) Sangue ♂. B.  $\mu$ PAD. (1) Fluido vaginal; (2) Sangue menstrual; (3) Sêmen; (4) Urina ♀; (5) Sangue ♂; (6) Saliva ♂; (7) Sêmen; (8) Urina ♂; (9) Sangue ♂; (10) Sêmen; (11) Saliva ♀; (12) Fluido vaginal; (13) Sêmen; (14) Urina ♂; (15) Urina ♀; (16) Sangue ♀; (17) Sangue menstrual; (18) Saliva ♂; (19) Sêmen; (20) Saliva ♀.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Os testes qualitativos apresentaram alta sensibilidade, especificidade e eficiência ( $\geq 86\%$ ), com melhor desempenho para aplicação em solução usando a placa de toque (Tabela 6), evidenciando a confiabilidade das metodologias desenvolvidas. A sensibilidade e a especificidade de um teste qualitativo são inversamente relacionadas, maior sensibilidade indica uma melhor capacidade de reconhecimento de um padrão classificação para amostras positivas, enquanto o valor de F1-score reflete o percentual de avaliações incorretas, considerando os falsos-positivos. Em testes presuntivos para detecção de sêmen, o ideal é maximizar a sensibilidade para minimizar falsos-negativos, visto que, por se tratar de testes presuntivos e não confirmatórios, falsos-positivos não comprometem o resultado final (Baechtel et al., 1987; Liang et al., 2024). Adicionalmente, os valores preditivos negativos foram superiores a 99%, enquanto os valores preditivos positivos apresentaram um

desempenho satisfatório para amostras reais considerando a comparação com trabalhos da literatura (Huang et al., 2014; Monaghan et al., 2021). Este resultado teve influência direta na classificação das amostras de fluido vaginal e sangue, as quais foram consideradas positivas por alguns indivíduos.

**Tabela 6.** Parâmetros de desempenho da avaliação qualitativa dos métodos analíticos (em solução e no  $\mu$ PAD) por voluntários.

Parâmetro	Sistema	
	Solução ( <i>placa de toque</i> , $n = 63$ )	$\mu$ PAD ( $n = 60$ )
Sensibilidade (%)	100	98
Especificidade (%)	90	86
Eficiência (%)	92	88
Valor preditivo positivo (%)	68	70
Valor preditivo negativo (%)	100	99
Razão de falsos-positivos (%)	10	14
Razão de falsos-negativos (%)	0	2
F1-score (%)	81	82

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Portanto, pode-se considerar os métodos desenvolvidos eficazes, reprodutíveis, e passíveis de aplicação como teste presuntivo para a detecção de frutose (marcador forense) visando aplicação em amostras reais relacionadas a crimes sexuais.

#### 4. CONCLUSÕES

As metodologias desenvolvidas para a detecção quali- e quantitativa de frutose no sêmen foram sensíveis, específicas, reprodutíveis e apresentaram percentuais de recuperação acima de 90%. Desta forma, o teste presuntivo, em solução ou  $\mu$ PAD, permitiu a detecção de sêmen em níveis vestigiais, possibilitando análise rápida e aplicação *in loco*. Estas metodologias podem contribuir em investigações criminais, além de viabilizar a miniaturização do sistema de análise e a redução do volume de amostra, logo, contribuindo com os princípios da Química Verde.

## 5 REFERÊNCIAS

- Agarwal, C., and Csóka, L. (2019). Recent Advances in Paper-Based Analytical Devices: A Pivotal Step Forward in Building Next-Generation Sensor Technology. *Sustainable Polymer Composites and Nanocomposites*, 479-517. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-05399-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-05399-4_18)
- Aksorn, J., & Teepoo, S. (2020). Development of the simultaneous colorimetric enzymatic detection of sucrose, fructose and glucose using a microfluidic paper-based analytical device. *Talanta*, 207, 120302. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120302>
- Alizadeh, N., Salimi, A., and Hallaj, R. (2019). Mimicking peroxidase-like activity of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CeO<sub>2</sub> nanosheets integrated paper-based analytical devices for detection of glucose with smartphone. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.068>
- Ameku, W. A., de Araujo, W. R., Rangel, C. J., Ando, R. A., and Paixao, T. R. (2019). Gold nanoparticle paper-based dual-detection device for forensics applications. *ACS applied nano materials*, 2(9), 5460-5468. <https://doi.org/10.1021/acsnm.9b01057>
- Andrabi, S. M. Z., Malik, M. A., and Khan, Z. (2007). Permanganate partitioning in cationic micelles of cetyltrimethylammonium bromide: A kinetic study of d-fructose oxidation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 299(1-3), 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.11.018>
- Araujo, W. R., Cardoso, T. M., da Rocha, R. G., Santana, M. H., Muñoz, R. A., Richter, E. M., ... & Coltro, W. K. (2018). Portable analytical platforms for forensic chemistry: a review. *Analytica chimica acta*, 1034, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.014>
- Ashour, S., Bahbouh, M., and Khateeb, M. (2011). A novel use of oxidative coupling reactions for determination of some statins (cholesterol-lowering drugs) in pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(3), 913-917. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.08.030>
- Baechtel, F.S., Brown, J., & Terrell, L. D. (1987). Presumptive screening of suspected semen stain in situ using cotton swabs and bromochloroindolyl phosphate to detect prostatic acid phosphatase activity. *Journal of Forensic Sciences*, 32(4), 880-887. <https://doi.org/10.1520/JFS12399J>
- Bales, C. W., Freeland-Graves, J. H., Askey, S., Behmardi, F., Pobocik, R. S., Fickel, J. J., & Greenlee, P. (1990). Zinc, magnesium, copper, and protein concentrations in human saliva: age- and sex-related differences. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(3), 462-469. <https://doi.org/10.1093/ajcn/51.3.462>
- Bazyar, H. (2023). On the Application of Microfluidic-Based Technologies in Forensics: A Review. *Sensors*, 23(13), 5856. <https://doi.org/10.3390/s23135856>
- Boobphahom, S., Nguyet Ly, M., Soum, V., Pyun, N., Kwon, O. S., Rodthongkum, N., and Shin, K. (2020). Recent advances in microfluidic paper-based analytical devices toward high-throughput screening. *Molecules*, 25(13), 2970. <https://doi.org/10.3390/molecules25132970>

- Bryzgunova, O. E., Skvortsova, T. E., Kolesnikova, E. V., Starikov, A. V., Rykova, E. Y., Vlassov, V. V., & Laktionov, P. P. (2006). Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1075*(1), 334-340. [10.1196/annals.1368.045](https://doi.org/10.1196/annals.1368.045)
- Cardozo, D. M., Guelsin, G. A., Clementino, S. L., de Melo, F. C., Braga, M. A., de Souza, C., & Visentainer, J. E. L. (2009). DNA extraction from coagulated human blood for application in genotyping techniques for human leukocyte antigen and immunoglobulin-like receptors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *42*(6). [10.1590/s0037-86822009000600008](https://doi.org/10.1590/s0037-86822009000600008)
- Casey, T., Mistek, E., Halámková, L., and Lednev, I. K. (2020). Raman spectroscopy for forensic semen identification: Method validation vs. environmental interferences. *Vibrational Spectroscopy*, *109*, 103065. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103065>
- Cazorla-Reyes, R., Romero-González, R., Frenich, A. G., Maresca, M. A. R., & Vidal, J. L. M. (2014). Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *89*, 203-212. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.004>
- Christodoulides, N., De La Garza II, R., Simmons, G. W., McRae, M. P., Wong, J., Newton, T. F., and McDevitt, J. T. (2015). Application of programmable bio-nano-chip system for the quantitative detection of drugs of abuse in oral fluids. *Drug and alcohol dependence*, *153*, 306-313. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.04.026>
- Cromartie, R. L., Wardlow, A., Duncan, G., and McCord, B. R. (2019). Development of a microfluidic device (μPADs) for forensic serological analysis. *Analytical Methods*, *11*(5), 587-595. <https://doi.org/10.1039/C8AY02080A>
- Das, T., Ammal, A., Harshey, A., Mishra, V., and Srivastava, A. (2021). Vibrational spectroscopic approaches for semen analysis in forensic investigation: State of the art and way forward. *Microchemical Journal*, *171*, 106810. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106810>
- Engel, K. M., Baumann, S., Rolle-Kampczyk, U., Schiller, J., von Bergen, M., & Grunewald, S. (2019). Metabolomic profiling reveals correlations between spermogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. *PLoS one*, *14*(2), e0211679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211679>
- Ensafi, A. A., and Chamjangali, M. A. (2003). Sequential flow injection determination of iodate and periodate with spectrophotometric detection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *59*(12), 2897-2903. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(03\)00089-1](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(03)00089-1)
- Gamblin, A. P., and Morgan-Smith, R. K. (2020). The characteristics of seminal fluid and the forensic tests available to identify it. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*, *2*(3), e1363. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1363>

- Garbieri, T. F., Brozoski, D. T., Dionisio, T. J., Santos, C. F., & Neves, L. T. D. (2017). Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. *Journal of Applied Oral Science*, 25(2), 147-158.
- García-Moreno, C., Pallitto, C., Devries, K., Stöckl, H., Watts, C., and Abrahams, N. (2013). *Global and regional estimates of violence against women: prevalence and health effects of intimate partner violence and non-partner sexual violence*. World Health Organization.
- Giampaoli, S., Berti, A., Valeriani, F., Gianfranceschi, G., Piccolella, A., Buggiotti, L., ... & Spica, V. R. (2012). Molecular identification of vaginal fluid by microbial signature. *Forensic Science International: Genetics*, 6(5), 559-564. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.01.005>
- Giroux, E. L., Durieux, M., & Schechter, P. J. (1976). A study of zinc distribution in human serum. *Bioinorganic Chemistry*, 5(3), 211-218. [https://doi.org/10.1016/S0006-3061\(00\)82019-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3061(00)82019-0)
- Goodwin, J. F. (1970). Quantification of Serum Inorganic Phosphorus, Phosphatase, and Urinary Phosphate without Preliminary Treatment. *Clinical Chemistry*, 16(9), 776-780. doi:10.1093/clinchem/16.9.776
- Granja, B. S., Filho, J. R. H. M., Oliveira, W.S., and Santos, J. C. C. (2018). Exploring MBTH as a spectrophotometric probe for the determination of total phenolic compounds in beverage samples. *Analytical Methods*, 10(19), 2197-2204. <https://doi.org/10.1039/C8AY00464A>
- Grosser, K., & Tyler, M. (2022). Sexual harassment, sexual violence and CSR: Radical feminist theory and a human rights perspective. *Journal of Business Ethics*, 177(2), 217-232. <https://doi.org/10.1007/s10551-020-04724-w>
- Guo, W., Zhang, Z., Hacking, J., Heeres, H. J., and Yue, J. (2021). Selective fructose dehydration to 5-hydroxymethylfurfural from a fructose-glucose mixture over a sulfuric acid catalyst in a biphasic system: Experimental study and kinetic modelling. *Chemical Engineering Journal*, 409, 128182. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128182>
- Gupta, S., & Kumar, A. (2017). The human semen. *Basics of Human Andrology: A Textbook*, 163-170. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8_11)
- Hallfrisch, J. (1990). Metabolic effects of dietary fructose. *The FASEB Journal*, 4(9), 2652-2660. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.9.2189777>
- Hansen, E. C., Perkins, R., and Ripin, D. H. B. (2020). Oxidations. *Practical Synthetic Organic Chemistry: Reactions, Principles, and Techniques*, 513-562. <https://doi.org/10.1002/9781119448914.ch10>
- Harbison, S. A., & Fleming, R. I. (2016). Forensic body fluid identification: state of the art. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 11-23. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S57994>

- Harms, M., von Maltitz, P., Groß, R., Mayer, B., Deniz, M., Müller, J., & Münch, J. (2022). Utilization of aminoguanidine prevents cytotoxic effects of semen. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8563. <https://doi.org/10.3390/ijms23158563>
- Harshey, A., Kumar, A., Kumar, A., Das, T., Nigam, K., and Srivastava, A. (2023). Focusing the intervention of paper-based microfluidic devices for the forensic investigative purposes. *Microfluidics and Nanofluidics*, 27(10), 65. <https://doi.org/10.1007/s10404-023-02674-z>
- Hoffman, M. C., Hunter, S. J., D'Alessandro, A., Christians, U., Law, A. J., & Freedman, R. (2024). Maternal plasma choline during gestation and small for gestational age infants. *American Journal of Perinatology*, 41(S 01), e939-e948. [10.1055/s-0042-1759775](https://doi.org/10.1055/s-0042-1759775)
- Homonnai, Z. T., Matzkin, H., Fainman, N., Paz, G., and Kraicer, P. F. (1978). The cation composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. *Fertility and Sterility*, 29(5), 539-542. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)43281-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43281-4)
- Hu, W., Sun, D. W., Pu, H., & Pan, T. (2016). Recent developments in methods and techniques for rapid monitoring of sugar metabolism in fruits. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(6), 1067-1079. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12225>
- Huang, J., Jones, A., Waite, T. D., Chen, Y., Huang, X., Rosso, K. M., & Zhang, H. (2021). Fe (II) redox chemistry in the environment. *Chemical Reviews*, 121(13), 8161-8233. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01286>
- Huang, Y., Li, Q., Ge, W., Cai, S., Zhang, S., & Zheng, S. (2014). Predictive power of quantitative and qualitative fecal immunochemical tests for hemoglobin in population screening for colorectal neoplasm. *European Journal of Cancer Prevention*, 23(1), 27–34. [10.1097/CEJ.0b013e328364f229](https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328364f229)
- Jakobsen, H., Rui, H., Thomassen, Y., Hald, T., & Purvis, K. (1989). Polyamines and other accessory sex gland secretions in human seminal plasma 8 years after vasectomy. *Reproduction*, 87(1), 39-45. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870039>
- Jänne, J., Hölttä, E., Haaranen, P., & Elfving, K. (1973). Polyamines and polyamine-metabolizing enzyme activities in human semen. *Clinica Chimica Acta*, 48(4), 393-401. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(73\)90418-X](https://doi.org/10.1016/0009-8981(73)90418-X)
- Johnson, D. J., Calderaro, A. C., & Roberts, K. A. (2007). Variation in nuclear DNA concentrations during urination. *Journal of forensic sciences*, 52(1), 110-113. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00329.x>
- Johnson, J., Flores, M. G., Rosa, J., Han, C., Salvi, A. M., DeMali, K. A., and Haim, H. (2020). The high content of fructose in human semen competitively inhibits broad and potent antivirals that target high-mannose glycans. *Journal of virology*, 94(9), e01749-19. <https://doi.org/10.1128/jvi.01749-19>
- Kaewarsa, P., Laiwattanapaisal, W., Palasuwan, A., and Palasuwan, D. (2017). A new paper-based analytical device for detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Talanta*, 164, 534-539. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.026>

- Kanu, A. B., and Kaplan, L. J. (2016). The quest for confirmatory data in crime scene investigations. *Chem Educator*, 21, 231-239. [10.1333/s00897162723a](https://doi.org/10.1333/s00897162723a)
- Kataguir, L. G., Scatena, L. M., Rodrigues, L. R., and Castro, S. D. S. (2019). Characterization of sexual violence in a state from the southeast region of Brazil. *Texto & Contexto-Enfermagem*, 28, e20180183. [10.1590/1980-265X-TCE-2018-0183](https://doi.org/10.1590/1980-265X-TCE-2018-0183)
- Kaur, J., Sengupta, P., and Mukhopadhyay, S. (2022). Critical review of bioadsorption on modified cellulose and removal of divalent heavy metals (Cd, Pb, and Cu). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 61(5), 1921-1954. [10.1021/acs.iecr.1c04583](https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c04583)
- Kawasaki, T., Akanuma, H., & Yamanouchi, T. (2002). Increased fructose concentrations in blood and urine in patients with diabetes. *Diabetes care*, 25(2), 353-357. [10.2337/diacare.25.2.353](https://doi.org/10.2337/diacare.25.2.353)
- Kelsay, J. L., Behall, K. M., & Clark, W. M. (1974). Glucose, fructose, lactate and pyruvate in blood and lactate and pyruvate in parotid saliva in response to sugars with and without other foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 27(8), 819-825. <https://doi.org/10.1093/ajcn/27.8.819>
- Khateeb, M., Elias, B., and Adi, S. (2016). A novel use of 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate for kinetic spectrophotometric determination of captopril in pharmaceutical formulations. *Int Lett Chem Phys Astron*, 71, 29-39. <https://doi.org/10.56431/p-2g8tq7>
- Kim, K. R., Xin, J. H., & Zeng, L. (2022). CMYK channel modification to optimize optical yarn color mixing effects for multicolored Jacquard artwork reproduction. *Textile Research Journal*, 92(13-14), 2357-2367. <https://doi.org/10.1177/0040517522107965>
- Kirsch, S. H., Herrmann, W., Rabagny, Y., & Obeid, R. (2010). Quantification of acetylcholine, choline, betaine, and dimethylglycine in human plasma and urine using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 878(32), 3338-3344. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.016>
- Kong, S. H., Kim, J. H., & Shin, C. S. (2021). Serum spermidine as a novel potential predictor for fragility fractures. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 106(2), e582-e591. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa745>
- Krebs, H. A. (1950). Chemical composition of blood plasma and serum. *Annual review of biochemistry*, 19(1), 409-430. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.19.070150.002205>
- Li, W., Liu, Q., Ma, Q., Zhang, T., Ma, L., Jameel, H., and Chang, H. M. (2016). A two-stage pretreatment process using dilute hydrochloric acid followed by Fenton oxidation to improve sugar recovery from corn stover. *Bioresource technology*, 219, 753-756. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.025>
- Liang, Y., Wu, J., Zeng, Q., Zhao, Y., Ma, K., Zhang, X., ... & Qi, Y. (2024). Rapid Identification of the Species of Bloodstain Based on Near Infrared Spectroscopy and Convolutional Neural Network-Support Vector Machine Algorithm. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 35(8), e-20240023. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20240023>

- Liu, P., Wang, Z., Lin, J., & Hu, X. (2012). An Efficient Route to Quinolines and Other Compounds by Iron-Catalysed Cross-Dehydrogenative Coupling Reactions of Glycine Derivatives. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201101656>
- Mandal, A., & Bhattacharyya, A. K. (1986). Grouping of human ejaculates according to the degree of coagulation and the relationship to the levels of choline and cholinesterase. *International journal of andrology*, 9(6), 407-415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00903.x>
- Mann, T. (1948). Fructose content and fructolysis in semen. Practical application in the evaluation of semen quality. *The Journal of Agricultural Science*, 38(3), 323-331. <https://doi.org/10.1017/S0021859600006109>
- Mapes, A. A., Kloosterman, A. D., and Poot, C. J. (2015). DNA in the criminal justice system: the DNA success story in perspective. *Journal of forensic sciences*, 60(4), 851-856. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12779>
- Martinez, G. G., Santos, A. L. F., Oliveira, C. D. Q. P., & Moraes, T. I. (2018). Estocagem de DNA a temperaturas variadas: análise da concentração. *Rev. Saúde Foco*.(10), 42-50.
- Miteva, R., Zapryanova, D., Fasulkov, I. V., Yotov, S., & Mircheva, T. (2010). Investigations on acid phosphatase activity in the seminal plasma of humans and animals. *Trakia J. Sci*, 8, 20-23.
- Monaghan, T. F., Rahman, S. N., Agudelo, C. W., Wein, A. J., Lazar, J. M., Everaert, K., & Dmochowski, R. R. (2021). Foundational statistical principles in medical research: sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value. *Medicina*, 57(5), 503. <https://doi.org/10.3390/medicina57050503>
- Musile, G., Grazioli, C., Fornasaro, S., Dossi, N., De Palo, E. F., Tagliaro, F., & Bortolotti, F. (2023). Application of paper-based microfluidic analytical devices ( $\mu$ PAD) in forensic and clinical toxicology: A review. *Biosensors*, 13(7), 743. <https://doi.org/10.3390/bios13070743>
- Nadar, S. S., Patil, P. D., Tiwari, M. S., and Ahirrao, D. J. (2021). Enzyme embedded microfluidic paper-based analytic device ( $\mu$ PAD): A comprehensive review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(7), 1046-1080. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1898327>
- Nair, R. R., Debnath, S., Das, S., Wakchaure, P., Ganguly, B., & Chatterjee, P. B. (2019). A highly selective turn-on biosensor for measuring spermine/spermidine in human urine and blood. *ACS Applied Bio Materials*, 2(6), 2374-2387. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00084>
- Nelson, T. M., Borgogna, J. L. C., Brotman, R. M., Ravel, J., Walk, S. T., & Yeoman, C. J. (2015). Vaginal biogenic amines: biomarkers of bacterial vaginosis or precursors to vaginal dysbiosis?. *Frontiers in physiology*, 6, 253. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00253>
- Neto, A. H. C., Sasaki, K. T., & Nakmune, A. C. D. M. S. (2011). Protein phosphatase activities in the serum and saliva of healthy children. *RPG. Revista de Pós-Graduação*, 18(2), 90-95.

- Nogueira, S. A., Lemes, A. D., Chagas, A. C., Vieira, M. L., Talhavini, M., Morais, P. A., & Coltro, W. K. (2019). Redox titration on foldable paper-based analytical devices for the visual determination of alcohol content in whiskey samples. *Talanta*, *194*, 363-369. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.036>
- Owen, D. H., and Katz, D. F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of andrology*, *26*(4), 459-469. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04104>
- Patel, K. Y., Dedania, Z. R., Dedania, R. R., & Patel, U. (2021). QbD approach to HPLC method development and validation of ceftriaxone sodium. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *7*, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00286-4>
- Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE—Analytical GREEnness metric approach and software. *Analytical chemistry*, *92*(14), 10076-10082. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c01887>
- Peonim, V., Worasuwannarak, W., Sujirachato, K., Teerakamchai, S., Srisont, S., Udnoon, J., and Chudoung, U. (2013). Comparison between prostate specific antigen and acid phosphatase for detection of semen in vaginal swabs from raped women. *Journal of forensic and legal medicine*, *20*(6), 578-581. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2013.06.009>
- Peterson, A. A., Vogel, F., Lachance, R. P., Fröling, M., Antal Jr, M. J., and Tester, J. W. (2008). Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: a review of sub- and supercritical water technologies. *Energy & environmental science*, *1*(1), 32-65. [10.1039/B810100K](https://doi.org/10.1039/B810100K)
- Philibert, R. A., Zadorozhnyaya, O., Beach, S. R., & Brody, G. H. (2008). Comparison of the genotyping results using DNA obtained from blood and saliva. *Psychiatric genetics*, *18*(6), 275-281. [10.1097/YPG.0b013e3283060f81](https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e3283060f81)
- Philp, M., Shimmon, R., Tahtouh, M., & Fu, S. (2016). Development and validation of a presumptive color spot test method for the detection of synthetic cathinones in seized illicit materials. *Forensic Chemistry*, *1*, 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2016.06.001>
- Phuangsaikai, N., Jakmunee, J., & Kittiwachana, S. (2021). Investigation into the predictive performance of colorimetric sensor strips using RGB, CMYK, HSV, and CIELAB coupled with various data preprocessing methods: a case study on an analysis of water quality parameters. *Journal of Analytical Science and Technology*, *12*, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00271-9>
- Ponti, G., Maccaferri, M., Micali, S., Manfredini, M., Milandri, R., Bianchi, G., ... & Tomasi, A. (2018). Seminal cell free DNA concentration levels discriminate between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Anticancer Research*, *38*(9), 5121-5125. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12833>
- Pradeep, A. S., Babu, J., Sandana, J. S., & Deivalakshmi, S. (2024). Innovations in Forensic Science: Comprehensive Review of Hyperspectral Imaging for Bodily Fluid Analysis. *Forensic Science International*, *371*, 112227. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112227>

- Puzanowska-Tarasiewicz, H., Kuzmicka, L., Karpinska, J., and Mielech-Lukasiewicz, K. (2005). Efficient oxidizing agents for determination of 2, 10-disubstituted phenothiazines. *Analytical sciences*, 21(10), 1149-1153. <https://doi.org/10.2116/analsci.21.1149>
- Rafia, A., Raheela, N., Noshab, Q., and Imran, M. (2012). Kinetics and mechanisms of oxidation of d-fructose and d-lactose by permanganate ion in acidic medium. *Natural Science*, 2012. [10.4236/ns.2012.47063](https://doi.org/10.4236/ns.2012.47063)
- Rana, M., Shrivastava, P., Srivastava, A., Kushwaha, P., & Kumawat, R. K. (2023). Forensic Serology. In *Textbook of Forensic Science* (pp. 545-579). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-1377-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-99-1377-0_18)
- Rodriguez, J. J. R. B., Calacal, G. C., Laude, R. P., and Ungria, M. C. A. (2019). Integrating presumptive and confirmatory semen tests into DNA profiling of sexual assault evidence: a Philippine example. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0149-z>
- Roe, J. H. (1934). A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *Journal of Biological Chemistry*, 107(1), 15-22. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)75382-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75382-9)
- Rogers, C., Bernstein, G., Nakamura, R., Endahl, G., & Bhoopat, T. (1988). Vaginal fluid zinc concentration as a marker for intercourse. *Journal of Forensic Sciences*, 33(1), 77-83. <https://doi.org/10.1520/JFS12438J>
- Romijnders, R., Warmerdam, E., Hansen, C., Welzel, J., Schmidt, G., & Maetzler, W. (2021). Validation of IMU-based gait event detection during curved walking and turning in older adults and Parkinson's Disease patients. *Journal of neuroengineering and rehabilitation*, 18(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12984-021-00828-0>
- Rümke, P. (1974). The origin of immunoglobulins in semen. *Clinical and experimental immunology*, 17(2), 287.
- Sakurada, K., Watanabe, K., and Akutsu, T. (2020). Current methods for body fluid identification related to sexual crime: focusing on saliva, semen, and vaginal fluid. *Diagnostics*, 10(9), 693. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10090693>
- Santos, L. O., Rocha, S. F., Barra, C. M., Tubino, M., & Rocha, J. G. (2022). A Simple, Rapid, and Reliable Titrimetric Method for the Determination of Glycerol at Low Concentration. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 33(06), 530-540. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220004>
- Sarhan, A. A., & Bolm, C. (2009). Iron (III) chloride in oxidative C–C coupling reactions. *Chemical Society Reviews*, 38(9), 2730-2744. <https://doi.org/10.1039/B906026J>
- Schuhmacher, M., Domingo, J. L., & Corbella, J. (1994). Zinc and copper levels in serum and urine: relationship to biological, habitual and environmental factors. *Science of the total environment*, 148(1), 67-72. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(94\)90376-X](https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90376-X)
- Seiler, D., Nagel, D., Tritschler, W., & Looser, S. (1983). Acid phosphatase in blood (substrate: alpha-naphthylphosphate): reference values and diagnostic significance. *Journal*

*of clinical chemistry and clinical biochemistry. Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie*, 21(8), 519-525.

Senekowitsch, S., Wietkamp, E., Grimm, M., Schmelter, F., Schick, P., Kordowski, A., ... & Smollich, M. (2023). High-dose spermidine supplementation does not increase spermidine levels in blood plasma and saliva of healthy adults: A randomized placebo-controlled pharmacokinetic and metabolomic study. *Nutrients*, 15(8), 1852. <https://doi.org/10.3390/nu15081852>

Shemshaki, G., Murthy, A. S. N., & Malini, S. S. (2021). Assessment and establishment of correlation between reactive oxidation species, citric acid, and fructose level in infertile male individuals: a machine-learning approach. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 14(2), 129. 10.4103/jhrs.jhrs\_26\_21

Shi, M., Zheng, X., Zhang, N., Guo, Y., Liu, M., & Yin, L. (2023). Overview of sixteen green analytical chemistry metrics for evaluation of the greenness of analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 166, 117211. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117211>

Shohat, B., Maayan, R., Singer, R., Sagiv, M., Kaufman, H., & Zukerman, Z. (1990). *Immunosuppressive Activity and Polyamine Levels of Seminal Plasma in Azo-Ospermic, Oligospermic, and Normospermic Men. Archives of Andrology*, 24(1), 41–50. <https://doi.org/10.3109/01485019008986857>

Sikirzhytskaya, A., Sikirzhytski, V., Pérez-Almodóvar, L., and Lednev, I. K. (2023). Raman spectroscopy for the identification of body fluid traces: Semen and vaginal fluid mixture. *Forensic Chemistry*, 32, 100468. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2023.100468>

Stanković, H., & Mikac-Dević, D. (1976). Zinc and copper in human semen. *Clinica Chimica Acta*, 70(1), 123-126. [10.1016/0009-8981\(76\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(76)90013-9)

Steinbach, D., Kruse, A., and Sauer, J. (2017). Pretreatment technologies of lignocellulosic biomass in water in view of furfural and 5-hydroxymethylfurfural production-a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7, 247-274. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0243-0>

Suzuki, O., Matsumoto, T., Katsumata, Y., & Oya, M. (1982). A new enzymatic method for quantitation of spermine in human semen. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, 88, 67-73. <https://doi.org/10.1007/BF00200737>

Takamura, A., Watanabe, K., Akutsu, T., and Ozawa, T. (2018). Soft and robust identification of body fluid using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric strategies for forensic analysis. *Scientific reports*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26873-9>

Takatori, T., Tomii, S., & Tanaka, T. (1981). The determination of choline in human semen by the enzymic method. *Forensic Science International*, 17(1), 79-84. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(81\)90192-4](https://doi.org/10.1016/0379-0738(81)90192-4)

Takatori, T., Tomii, S., & Terazawa, K. (1984). A medicolegal study on enzymic fluorometry of choline in human semen. *Journal of Forensic Sciences*, 29(2), 618-623. <https://doi.org/10.1520/JFS11713J>

- Taleuzzaman, M. (2018). Limit of blank (LOB), limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). *Org. Med. Chem. Int. J*, 7(5), 127-131. [10.19080/OMCIJ.2018.07.555722](https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.07.555722)
- Tay, J. W., Joudo, J., Tran, T., Ta, H., Botting, J. L., Liew, Y. C., and Rye, M. S. (2021). Comparison of Crime-lite® 82S, Polilight® PL400 and Polilight® PL500 for the detection of semen and saliva stains. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 53(4), 483-493. <https://doi.org/10.1080/00450618.2020.1718208>
- Toragall, M. M., Satapathy, S. K., Kadadevaru, G. G., and Hiremath, M. B. (2019). Evaluation of seminal fructose and citric acid levels in men with fertility problem. *Journal of human reproductive sciences*, 12(3), 199. [10.4103/jhrs.JHRS\\_155\\_18](https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_155_18)
- Trang, N. T., Sang, T. T., Hoang, N., Khanh, N. T. G., and Duc, T. T. (2018). Assessment of the level of seminal zinc and fructose concentration in seminal plasma of Vietnamese infertile men. *MOJ Biorg. Org. Chem*, 2(4), 185-190. [10.15406/mojboc.2018.02.00079](https://doi.org/10.15406/mojboc.2018.02.00079)
- Unuma, K., Sato, H., Wen, S., Makino, Y., Hirakawa, A., and Uemura, K. (2023). The proportion of false-positives in positive Seratec® prostate-specific antigen SemiQuant test results in postmortem screening for seminal fluid. *Legal Medicine*, 62, 102243. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2023.102243>
- Varma, A. J., and Kulkarni, M. P. (2002). Oxidation of cellulose under controlled conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 77(1), 25-27. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00073-3)
- Vasconcelos, N. F., Andrade, F. K., Vieira, L. D. A. P., Vieira, R. S., Vaz, J. M., Chevallier, P., and Rosa, M. D. F. (2020). Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. *Cellulose*, 27(6), 3055-3083. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-02966-5>
- Virkler, K., and Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic science international*, 188(1-3), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>
- Vivoli, G., Borella, P., Bergomi, M., & Fantuzzi, G. (1987). Zinc and copper levels in serum, urine, and hair of humans in relation to blood pressure. *Science of the total environment*, 66, 55-64. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(87\)90077-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(87)90077-5)
- Vyas, B., Halamkova, L., and Lednev, I. K. (2020). A universal test for the forensic identification of all main body fluids including urine. *Forensic Chemistry*, 20, 100247. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100247>
- Wang, Q., Gao, P., Wang, X., & Duan, Y. (2014). Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 427, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.004>
- Wasserstrom, A., Frumkin, D., Davidson, A., Shpitzen, M., Herman, Y., and Gafny, R. (2013). Demonstration of DSI-semen—a novel DNA methylation-based forensic semen

identification assay. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.08.009>

Wei, X., Tian, T., Jia, S., Zhu, Z., Ma, Y., Sun, J., and Yang, C. J. (2015). Target-responsive DNA hydrogel mediated “stop-flow” microfluidic paper-based analytic device for rapid, portable and visual detection of multiple targets. *Analytical chemistry*, 87(8), 4275-4282. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00532>

Wei, X., Yu, K., Wu, D., Huang, P., Sun, Q., and Wang, Z. (2021). Species identification of semen stains by ATR-FTIR spectroscopy. *International Journal of Legal Medicine*, 135, 73-80. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02367-0>

Wei, Y., Wang, M., Liu, H., Niu, Y., Wang, S., Zhang, F., and Liu, H. (2019). Simultaneous determination of seven endogenous aldehydes in human blood by headspace gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1118, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.027>

Wolrath, H., Forsum, U., Larsson, P. G., & Borén, H. (2001). Analysis of bacterial vaginosis-related amines in vaginal fluid by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4026-4031. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4026-4031.2001>

World Health Organization. (2021). *Violence against women prevalence estimates, 2018: Global, regional and national prevalence estimates for intimate partner violence against women and global and regional prevalence estimates for non-partner sexual violence against women. Executive summary*. World Health Organization.

Xing, L., Zhang, W., Fu, L., Lorenzo, J. M., & Hao, Y. (2022). Fabrication and application of electrochemical sensor for analyzing hydrogen peroxide in food system and biological samples. *Food Chemistry*, 385, 132555. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132555>

Yao, T., Han, X., Guan, T., Wang, Z., Zhang, S., Liu, C., and Chen, L. (2020). Effect of indoor environmental exposure on seminal microbiota and its application in body fluid identification. *Forensic science international*, 314, 110417. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110417>

Zapata, F., de la Ossa, M. Á. F., and García-Ruiz, C. (2015). Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 64, 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.011>

Zaviačič, M., Doležalová, S., Holomán, I. K., Zaviačičová, A., Mikulecký, M., & Brázdil, V. (1988). Concentrations of fructose in female ejaculate and urine: A comparative biochemical study. *Journal of Sex Research*, 24(1), 319-325. [10.1080/00224498809551431](https://doi.org/10.1080/00224498809551431)

Zha, S., Wei, X., Fang, R., Wang, Q., Lin, H., Zhang, K., and Wang, Z. (2020). Estimation of the age of human semen stains by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a preliminary study. *Forensic Sciences Research*, 5(2), 119-125. <https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1642567>

Zhao, W., and van den Berg, A. (2008). Lab on paper. *Lab on a Chip*, 8(12), 1988-1991. <https://doi.org/10.1039/B814043J>

## 5. CAPÍTULO 2: Detecção colorimétrica de zinco em amostras seminais: avaliação sistemática de estratégias de análise

### Resumo

Evidências forenses desempenham um papel fundamental em investigações criminais, principalmente em casos de agressão sexual, uma vez que podem auxiliar na obtenção de provas que corroborem na investigação dos atos sexuais cometidos e consequentemente identificação dos suspeitos. Diante disso, o presente estudo teve como intuito avaliar a detecção de zinco, um marcador químico, presente em elevadas concentrações no sêmen frente a diferentes azocorantes (zincon, PAN, PAR e Br-PADAP), empregando testes em solução e em dispositivo analítico microfluídico em papel ( $\mu$ PAD). Em ambas as estratégias empregadas (solução e  $\mu$ PAD), o Br-PADAP demonstrou maior sensibilidade, com limite de detecção (LOD) de 0,02  $\mu$ M em solução e 2,86  $\mu$ M no  $\mu$ PAD. Em solução, o zincon, PAN e PAR apresentaram LOD de 0,09; 0,05 e 0,1  $\mu$ M, respectivamente. No  $\mu$ PAD, os valores de LOD obtidos para estes reagentes foram 3,44  $\mu$ M para o PAN e 4,95  $\mu$ M para o PAR. As recuperações obtidas variaram entre 94 e 120% com desvio padrão relativo menor que 3,7%, indicando a exatidão e precisão das estratégias analíticas empregadas. Na validação qualitativa frente a diferentes amostras, todos os reagentes apresentaram sensibilidade superior a 98%, com destaque para as reações realizadas no  $\mu$ PAD, que também apresentaram elevada especificidade e eficiência ( $\geq 97\%$ ). Assim, visando maior praticidade e portabilidade, os métodos desenvolvidos conferem versatilidade para aplicações *in loco*, podendo contribuir significativamente na investigação de crimes sexuais.

**Palavras-chaves:** Azocorantes; microfluídica; placa de toque; sêmen; colorimetria; investigação criminal.

## 1. INTRODUÇÃO

A análise elementar tem se consolidado como uma ferramenta fundamental em diversas áreas do conhecimento, devido à sua capacidade de fornecer informações cruciais para a compreensão de fenômenos naturais, processos biológicos e industriais. Neste contexto, o zinco apresenta relevante importância biológica, uma vez que possui funções catalíticas, estruturais e regulatórias no organismo humano, e sua concentração pode variar significativamente entre os diferentes tecidos (Tapiero; Tew, 2003; Roohani et al., 2013). Este elemento, encontra-se presente em quantidades elevadas no sêmen variando de 1200 a 4200  $\mu\text{M}$  (Chia et al., 2000; Henkel et al., 1999; Osadchuk et al., 2021; Yamaguchi et al., 2009), enquanto no plasma a concentração de zinco chega a ser cerca de 1000 vezes menor, geralmente quantificado entre 12 a 16  $\mu\text{M}$  (Rink; Gabriel, 2000). Desta forma, o zinco é considerado um biomarcador potencialmente valioso não só em avaliações clínicas, mas também em investigações forenses sendo essencial em casos de crime sexual (Gamblin; Morgan-Smith, 2020), uma vez que a detecção desse metal pode fornecer informações importantes acerca dos vestígios encontrados no contexto da tentativa ou realização do ato criminoso.

Dentre as técnicas utilizadas para a detecção de zinco (total ou iônico) em amostras biológicas, destacam-se a Espectrometria de Absorção Atômica (AAS), a Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), a espectrofluorimetria, técnicas eletroquímicas, a Espectrometria de Fluorescência de Raios X de Reflexão Total (TXRF) e a colorimetria. Todas essas técnicas são eficazes no sentido de detectar ou quantificar o zinco, embora algumas apresentem vantagens específicas em determinados aspectos. A TXRF, por exemplo, se destaca por sua sensibilidade e pela necessidade de uma baixa quantidade de amostra, além da capacidade de detectar simultaneamente diferentes analitos (Jablan et al., 2021). Por outro lado, a ICP OES e a AAS permitem medir diferentes elementos de forma simultânea ou sequencial, contudo, são consideradas mais onerosas e demoradas, exigindo uma preparação mais complexa das amostras (procedimentos de extração ou decomposição), além do custo relacionado aos equipamentos e manutenção (Hameed et al., 2025).

Quando se consideram o custo e praticidade, técnicas colorimétricas se sobressaem em relação às demais, visto que apresentam um custo relativamente baixo, além disto,

possuem ampla acessibilidade dos equipamentos, permitindo aplicação em diversos contextos com mínima infraestrutura (Jothimuthu et al., 2013; Yu et al., 2019). Adicionalmente, adaptações podem ser implementadas para análises *in loco*, permitindo a medição de zinco diretamente no local da amostragem. A partir disso, a colorimetria, por meio de kits de teste portáteis, surge como alternativa viável para análises rápidas e descentralizadas.

Nesse contexto, diversos métodos colorimétricos têm sido desenvolvidos para a detecção de íons zinco. Desta forma, sensores químicos fundamentados em sondas moleculares cromogênicas e fluorogênicas têm sido desenvolvidos, como aqueles baseados em 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD) (Xu et al., 2009) e *N,N',N''*-tris(salicylidene)(2-aminoethyl) amine (Kim et al., 2013), ou empregando nanomateriais, a exemplo do uso de nanopartículas de prata (Ihsan et al., 2015; Lee et al., 2016). Assim, diferentes estratégias que permitem a detecção de zinco em solução, sendo aplicáveis a amostras biológicas e ambientais. Nesta linha, o uso de corantes azo na detecção de íons Zn(II) é amplamente relatado, dentre os quais pode-se citar o zincon, PAN, PAR, Br-PADAP e nitro-PAPS. Esses reagentes atuam como agentes complexantes formando produtos coloridos e estáveis de forma relativamente rápida (Banjare et al., 2005; Säbel et al., 2009; Szabó et al., 2011; Kocyła et al., 2017). Azo reagentes costumam ser bem-sucedidos para detecção de zinco em solução e no caso do PAN, por exemplo, já se mostrou efetivo em suportes alternativos como os dispositivos analíticos microfluídicos em papel ( $\mu$ PADs) (Pérez-Rodríguez; Cañizares-Macías, 2023) ou em fibras fiadas (Silva et al., 2025), estratégias que permitem aplicações *in situ*. Chabaud et al. (2018) criaram um  $\mu$ PAD para identificar simultaneamente sais metálicos em resíduos de explosivos, visando aplicações forenses no local do crime. Pérez-Rodríguez e Cañizares-Macías (2023) desenvolveram um protótipo de  $\mu$ PAD cromático para a determinação simultânea de cobre e zinco em urina, com foco em análises clínicas. Logo, as principais vantagens desse tipo de abordagem são o baixo custo, portabilidade e facilidade de uso, resultando em análises rápidas e acessíveis.

A partir disso, o presente estudo tem como objetivo comparar diferentes azocorantes (zincon, PAN, PAR e Br-PADAP) para detecção colorimétrica de zinco em sêmen, utilizando diferentes sistemas de detecção. No contexto forense, essa avaliação almeja identificar quais desses reagentes apresentam maior potencial para aplicação em testes presuntivos em locais

de crime, considerando a influência de possíveis interferentes e a ocorrência de falsos positivos. Além disso, buscando aprimorar a praticidade e a portabilidade dos ensaios, os métodos foram otimizados tanto em solução quanto em  $\mu$ PAD, possibilitando uma versatilidade de aplicações em análises de campo.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiais e soluções

Todos os reagentes utilizados possuem pureza analítica, as soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade  $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) obtida de um purificador Master System MS3000 (Gehaka, Brasil). Os reagentes foram obtidos de Sigma-Aldrich (USA) e as soluções estoque preparadas como descrito a seguir:  $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM e 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) 2 mM foram preparadas diretamente em água ultrapura; 2-carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzene (zincon) 1 mM foi preparada em NaOH 0,1 M (Dinâmica, Brazil); 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) 4 mM foi preparada de acordo procedimento descrito por Hoofstede et al. (1992); e 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethylamino)phenol (BR-PADAP) 4 mM foi preparada em EtOH (Êxodo Científica, Brazil) a 75% (v/v). A solução mascarante para evitar a interferência de outros íons metálicos foi preparada com citrato, fluoreto, iodeto, tartarato e tiosulfato (0,1 M) solubilizados em Triton X-100 1% (v/v) e tampão Tris.HCl 0,04 M (pH 9,5).

Por fim, todas as soluções foram diluídas para a concentração final desejada em tampão borato 50 ou 100 mM (pH 9,0 e 9,5), a depender do azocorante empregado. As medidas de pH foram realizadas em pHmetro (AK151, AKSO, Brasil) com eletrodo combinado de vidro previamente calibrado. As medidas de massa dos reagentes e padrões para preparo das soluções foram realizadas em balanças analíticas (AG200, Gehaka, Brasil) com precisão de 0,1 mg.

### 2.2 Confeção do dispositivo de papel

Os  $\mu$ PADs foram produzidos em laboratório a partir de papel cromatográfico Whatman 3MM CHR (20 cm  $\times$  20 cm), com as faces protegidas por adesivo de vinil (preto). O design dos  $\mu$ PADs foi elaborado no *software* Silhouette Studio (Fig. 24) e recortado com precisão

por uma impressora de corte Silhouette Cameo, permitindo a obtenção de 72 dispositivos por cada folha de papel cromatográfico.

**Figura 24.** Representação da confecção dos dispositivos empregando impressora de corte.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

## 2.3 Procedimentos

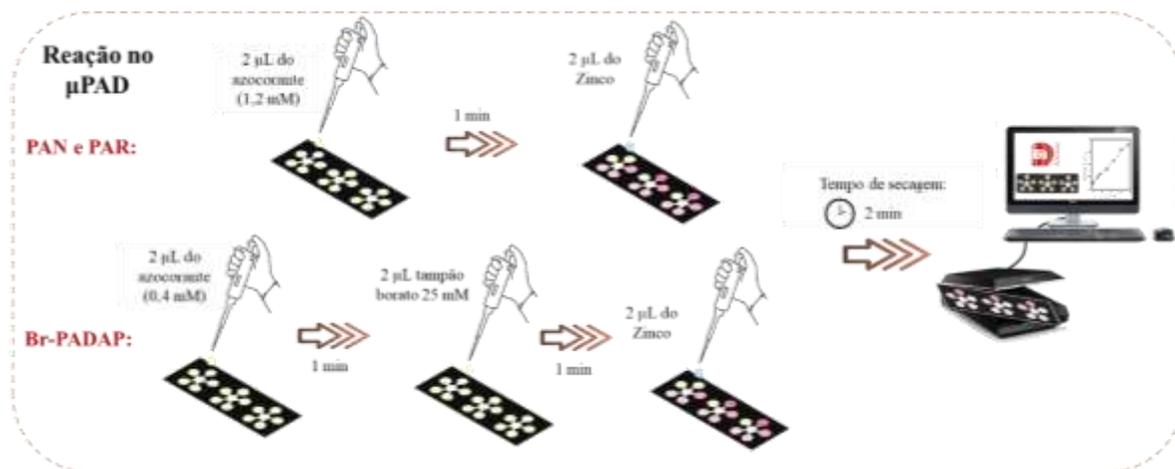
### 2.3.1 Detecção colorimétrica em solução

Nas condições otimizadas em solução empregou-se 20, 40 e 60  $\mu\text{M}$  de Br-PADAP, PAN e zincon, respectivamente, em tampão borato (pH 9; 50 mM), enquanto para o PAR (40  $\mu\text{M}$ ), foi usado tampão borato (pH 9,5; 100 mM). As medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro de duplo feixe (AJX 6100, Micronal, Brasil) com cubeta de quartzo e caminho óptico de 1 cm, após 5 min de reação nos seguintes comprimentos de onda: zincon (617 nm), PAN (556 nm), Br-PADAP (579 nm) e PAR (486 nm), usando volume final de 2 mL.

### 2.3.2 Detecção colorimétrica empregando $\mu\text{PAD}$

No  $\mu\text{PAD}$  empregou-se soluções estoque dos azocorantes nas concentrações 0,4 mM para Br-PADAP e 1,2 mM para PAN e PAR. Na condição otimizada para o PAN e PAR, a ordem de aplicação foi azocorante  $\rightarrow$  zinco (marcador), enquanto para o Br-PADAP se usou azocorante  $\rightarrow$  tampão borato  $\rightarrow$  zinco (marcador) (Fig. 25). Em todos os  $\mu\text{PAD}$  foram aplicados 2  $\mu\text{L}$  de cada solução na superfície do papel, com um tempo total de secagem de 4 min. As imagens foram registradas em *scanner* Epson (Perfection v19, 4800 dpi) e convertidas para o formato CMYK empregando o *software* Corel Photo-Paint® (CorelDRAW, Graphics Suite). A intensidade média da cor na zona de reação foi então calculada para obter uma resposta analítica quantitativa do sistema.

**Figura 25.** Representação da reação colorimétrica entre os azocorantes e íons zinco na zona reacional do  $\mu$ PAD.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 2.3.3 Amostras reais e avaliação qualitativa de possíveis interferentes

As amostras biológicas de sêmen, sangue, urina e saliva foram adquiridas de voluntários autodeclarados saudáveis, com pelo menos 18 anos de idade, que estavam cientes do objetivo do trabalho (CAAE 57998116800005013) e assinaram termo de livre consentimento. Amostras de alimentos e potenciais interferentes também foram avaliadas: leite, suco de laranja, suco de abacaxi, clara de ovo, ketchup, lubrificante sexual, camisinha, pomada para assadura, desinfetante, cerveja e água sanitária (hipoclorito de sódio). Nos ensaios qualitativos, as amostras foram depositadas em placa de toque ou no  $\mu$ PAD, onde os reagentes PAN, Br-PADAP e PAR foram aplicados. Nestes ensaios, foram avaliadas 3 diluições do sêmen: sêmen bruto, 1:10 e 1:25 (placa de toque), enquanto no  $\mu$ PADs se usou, sêmen bruto, 1:5 e 1:10. As placas de toque colocadas em estúdio de luz anelar de 25 cm, com iluminação com placa de LEDs e fotografadas usando *smartphone* (resolução da imagem de 8000×6000 pixels), enquanto as imagens dos  $\mu$ PADs foram registradas por *scanner*, como previamente descrito no item 2.3.2.

A avaliação qualitativa dos testes foi efetuada por meio de formulário eletrônico (Anexo 1) no qual 20 amostras foram classificadas (negativa, positiva e inconclusiva) por voluntários da comunidade acadêmica/profissional. Ao final do ensaio, o resultado era apresentado indicando o percentual de acerto e a classificação correta por cada amostra. Estes

resultados foram usados para estabelecer os principais parâmetros estatísticos de validação dos ensaios qualitativos.

#### **2.3.4 Análise estatística e figuras de mérito**

Os experimentos foram realizados em triplicata ( $n = 3$ ) e expressos como média  $\pm$  SD (desvio padrão). No processo de otimização dos parâmetros analíticos, a sensibilidade foi usada como critério com base na respectiva inclinação da curva analítica (*slope*) para cada condição de estudo. As curvas analíticas foram construídas com um mínimo de cinco pontos de acordo com a equação:  $Y = S \times C_{Zn} + b$ , onde  $Y$  representa a absorvância ou a intensidade de cor,  $C_{Zn}$  a concentração de zinco,  $S$  o *slope* e  $b$  o intercept. O limite de detecção (LOD,  $3\sigma$ ) foi calculado de acordo com a seguinte equação:  $LOD = (3 \times \sigma_b) / S$ , onde  $\sigma_b$  é o desvio padrão do branco analítico ( $n = 10$ ) e  $S$  corresponde ao *slope* da curva analítica empregada. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a equação:  $RSD = (\sigma_p / x_p) \times 100\%$ , onde  $\sigma_p$  é equivalente ao desvio padrão de um determinado padrão analítico dentro do intervalo linear, e  $x_p$  é o valor médio encontrado para repetibilidade deste padrão ( $n = 10$ ). Quando necessário, teste de hipótese para amostras em par (teste  $t$  de Student) e ou em grupo (ANOVA, análise de variância) foram utilizados para avaliar os resultados, considerando intervalo de confiança de 95% para todos os procedimentos. O tratamento estatístico dos dados foi executado usando o *software* OriginLab 2018 (Northampton, EUA).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Reações em solução**

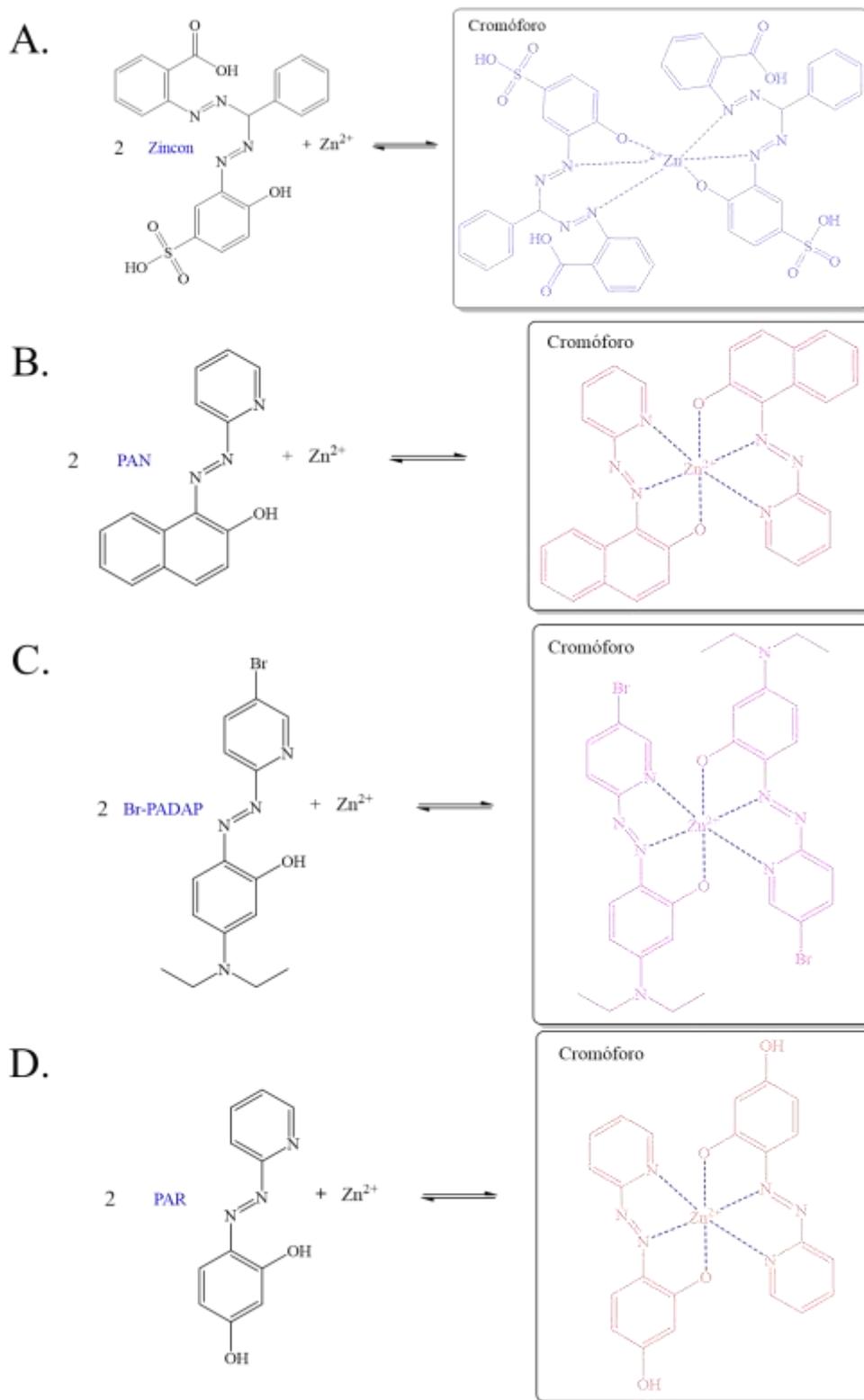
##### **3.1.1 Otimização dos parâmetros reacionais**

Os azocorantes zincon, PAN, Br-PADAP e PAR, de maneira geral, são capazes de formar complexos coloridos, estáveis e hidrossolúveis com diversos metais, dentre eles o zinco (Banjare et al., 2005; Säbel et al., 2009; Szabó et al., 2011; Kocyla et al., 2017). A fim de estabelecer as melhores condições para a quelação de cada reagente com o íon metálico Zn(II) (Fig. 26), as concentrações dos reagentes foram inicialmente avaliadas em relação a uma solução padrão de Zn(II) 40  $\mu$ M, em meio alcalino (tampão borato 50 mM pH 9). As concentrações de zincon, PAN, Br-PADAP e PAR que demonstraram maior sensibilidade

foram 60, 40, 20 e 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Fig. 27). A formação desses complexos é favorecida em meio alcalino e o tampão borato é comumente utilizado nessas reações (Ackerman; Kothe, 1979; Krystek et al., 1993; Crow et al., 1997; Banjare et al., 2005; Wei et al., 2008; Säbel et al., 2010), a partir disso o pH de cada reação foi avaliado entre 8 e 10. O pH ótimo para a formação do complexo de zincon, PAN e Br-PADAP foi 9, enquanto a melhor condição para a reação com PAR foi pH 9,5 (Fig. 28). Além disso, a sensibilidade da reação em função da concentração do tampão foi avaliada e 50 mM demonstrou ser a melhor condição para a reação de zincon, PAN e Br-PADAP e 100 mM para PAR (Fig. 29).

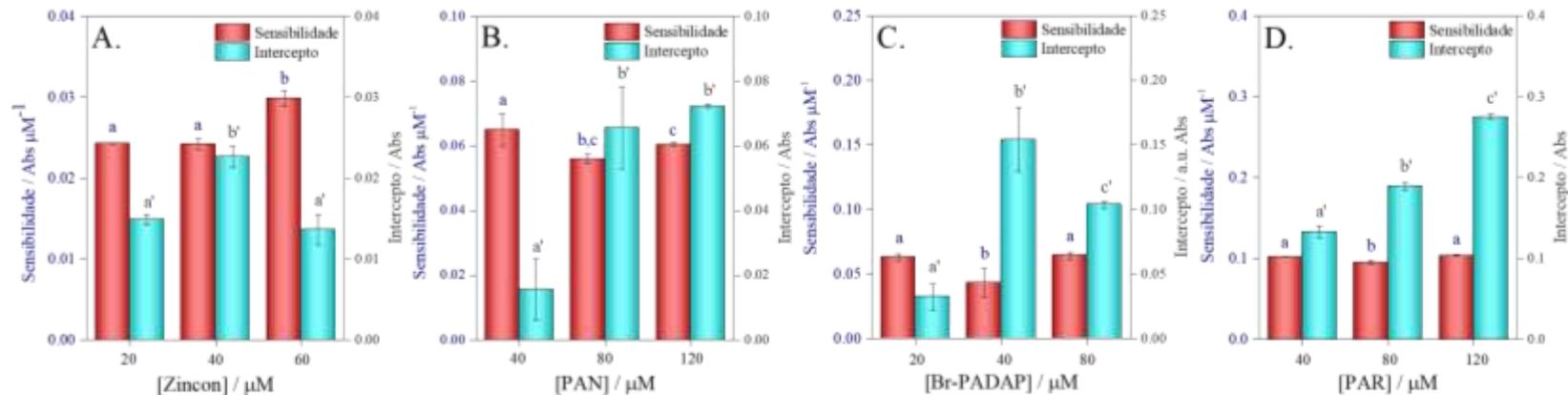
A reação de formação dos complexos é colorimétrica e ocorre imediatamente após a adição do azocorante à solução de zinco. Apesar disso, um ensaio cinético com duração de 30 min foi realizado a fim de avaliar a estabilidade do complexo formado. Em todos os casos, o produto se manteve estável até o final do experimento (Fig. 30) e o tempo de reação de 5 minutos foi escolhido para a realização das medidas espectrofotométricas.

**Figura 26.** Representação dos cromóforos formados a partir das reações de complexação com os azocorantes. A. zincon, B. PAN, C. Br-PADAP e, D. PAR.



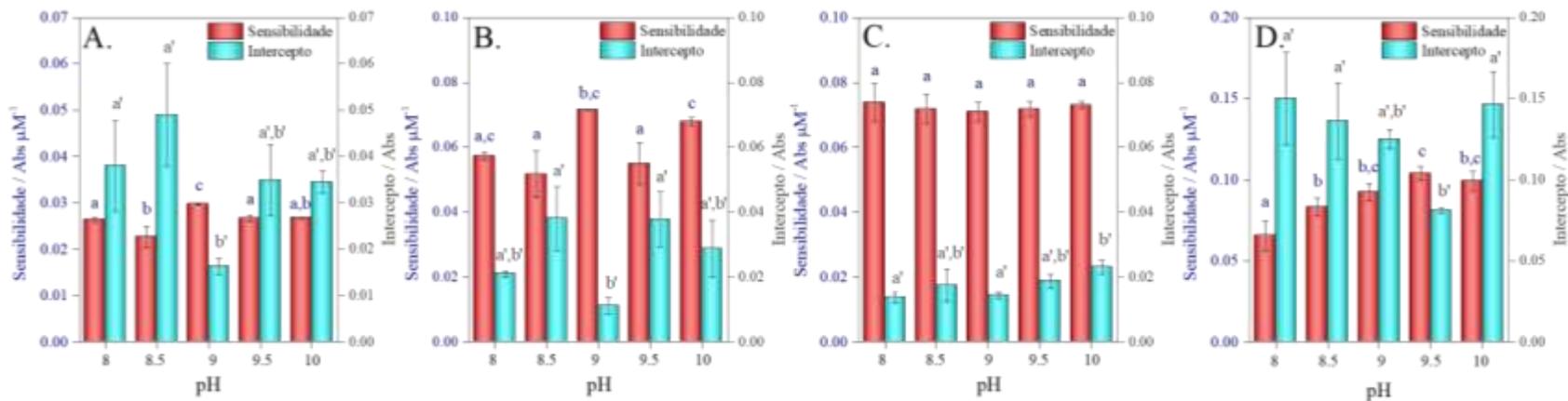
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 27.** Influência da concentração do azorante na formação do complexo. A. zincon, B. PAN, C. Br-PADAP e D. PAR. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



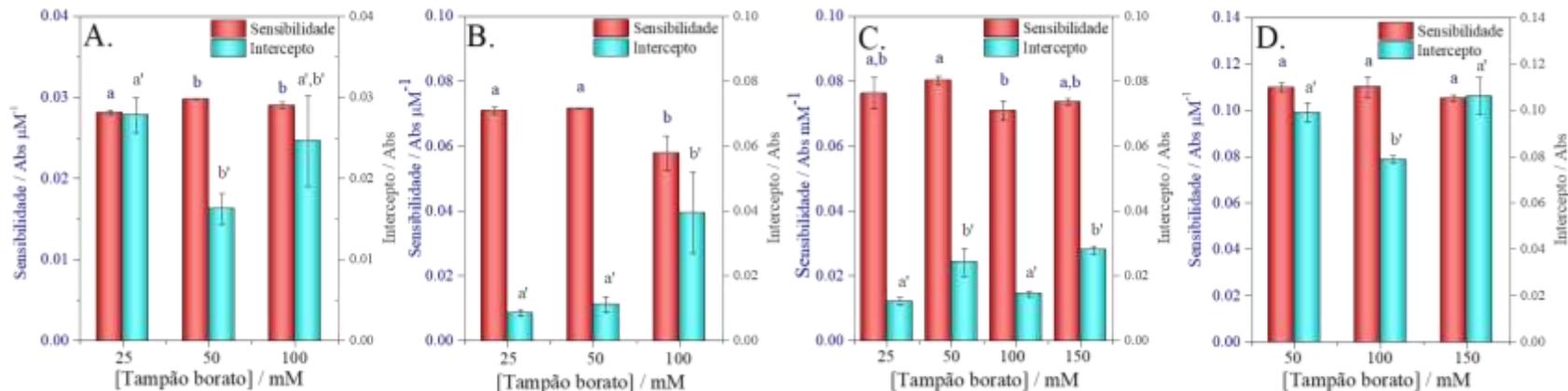
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 28.** Efeito do pH do meio na formação do complexo. A. zincon, B. PAN, C. Br-PADAP e D. PAR. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



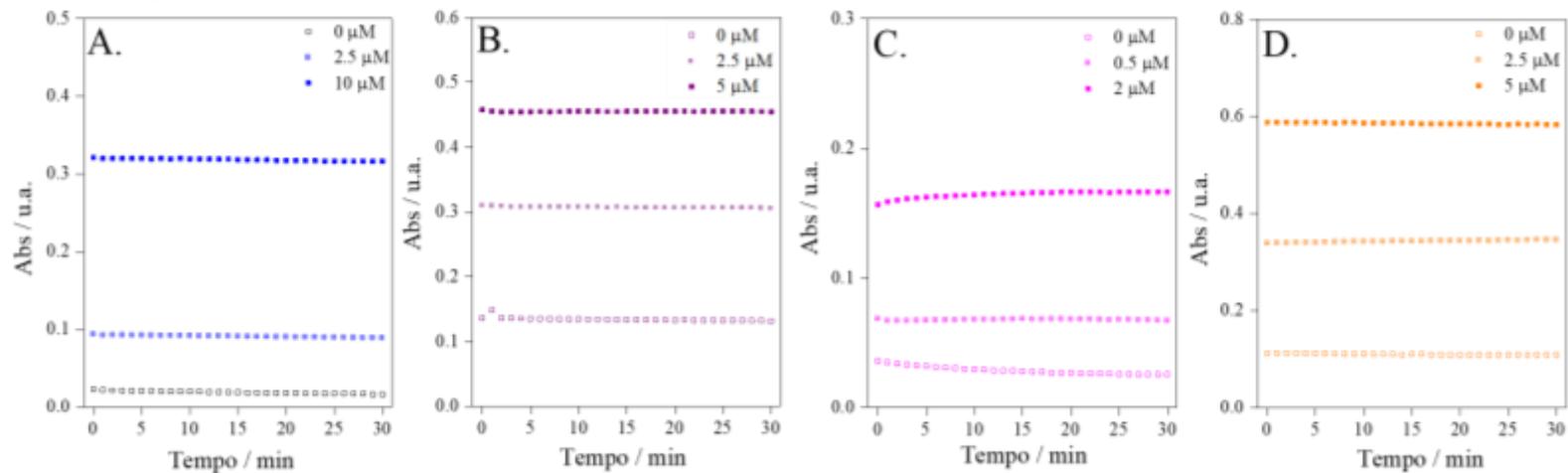
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 29.** Avaliação da influência da concentração do tampão nas reações colorimétricas. A. zincon, B. PAN, C. Br-PADAP e D. PAR. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 30.** Avaliação cinética dos azocorantes. A. zincon, B. PAN, C. Br-PADAP e D. PAR.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### ***3.1.2 Figuras de mérito e ensaios de recuperação***

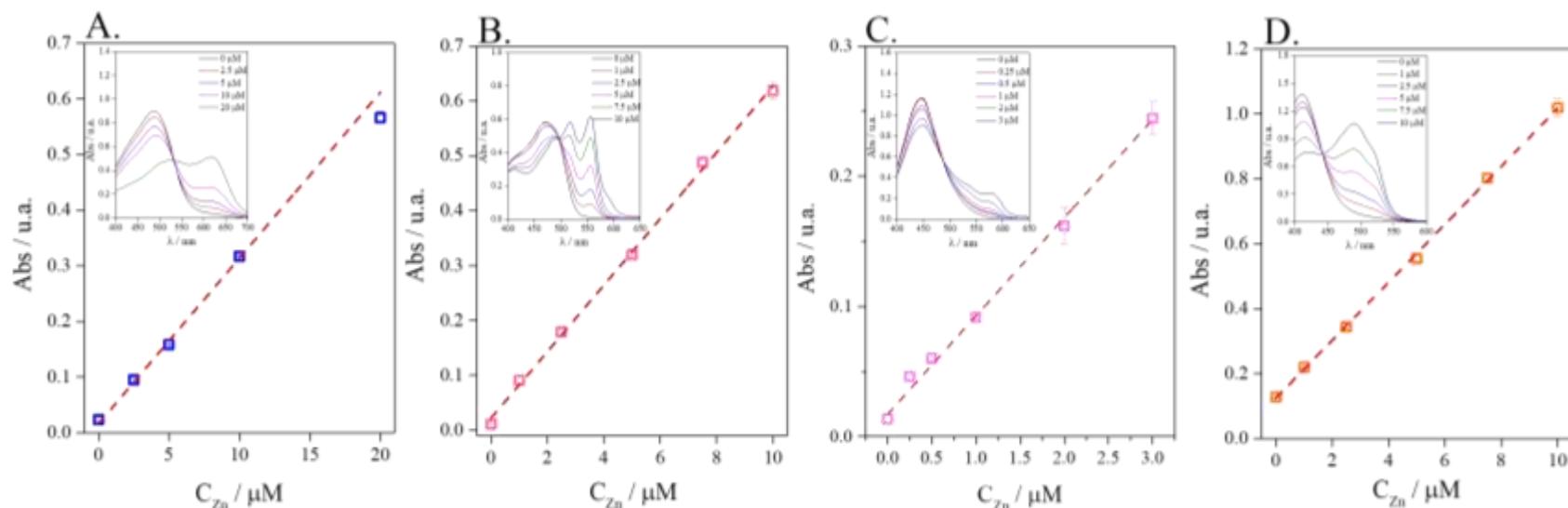
Sob as condições otimizadas as principais figuras de mérito foram estabelecidas para cada reagente e todos os dados podem ser observados na Tabela 7. As curvas analíticas e os espectros para cada método são apresentados na Fig.31. Para o zincon foi obtida resposta linear de 1 a 20  $\mu\text{M}$ , com  $\text{LOD} = 0,09 \mu\text{M}$  e  $\text{RSD} \leq 1,2\%$ . O PAN nas condições de melhor desempenho analítico apresentou faixa linear 1 a 10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{LOD} = 0,05 \mu\text{M}$  e  $\text{RSD} \leq 3,7\%$ . O Br-PADAP exibiu perfil linear de 0,25 a 3  $\mu\text{M}$ ,  $\text{LOD} = 0,02 \mu\text{M}$  e  $\text{RSD} \leq 3,4\%$ . Para o PAR, a faixa linear obtida foi de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , com  $\text{LOD} = 0,1 \mu\text{M}$  e  $\text{RSD} \leq 2,3\%$ .

**Tabela 7.** Condições otimizadas para os reagentes e principais figuras de mérito para os reagentes em solução.

Reagente	Azocorante (μM)	Solução tampão (mM)	pH	Faixa linear (μM)	Equação	r	LOD (μM)	RSD (%)
Zincon	60	50	9,0	1 - 20	$A_{617} = 0,0298(\pm 0,0001) \times C_{Zn} + 0,0150(\pm 0,0018), n = 5$	0,9957	0,09	0,8 - 1,2
PAN	40	50	9,0	1 - 10	$A_{556} = 0,0714(\pm 0,0003) \times C_{Zn} + 0,0095(\pm 0,0024), n = 6$	0,9995	0,05	3,2 - 3,7
Br-PADAP	20	50	9,0	0,25 - 3	$A_{579} = 0,0811(\pm 0,0012) \times C_{Zn} + 0,0211(\pm 0,0043), n = 6$	0,9917	0,02	2,3 - 3,4
PAR	40	100	9,5	1 - 10	$A_{486} = 0,1070(\pm 0,0043) \times C_{Zn} + 0,0800(\pm 0,0017), n = 6$	0,9957	0,10	2,0 - 2,3

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 31.** Linearização da curva analítica e obtenção dos parâmetros de regressão linear. A figura dentro do gráfico são os espectros de absorção molecular em função da variação da concentração de íons Zn(II) para cada reagente. A. Zincon 60 μM, B. PAN 40 μM, C. Br-PADAP 20 μM e, D. PAR 40 μM.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Dentre esses reagentes, apenas PAN e PAR são amplamente conhecidos e relacionados ao contexto forense na detecção de zinco em fluido seminal (Suzuki et al., 1983; Lampugnani; Maccheroni, 1984; Hoofst; Van De Voorde, 1990). Para além dessa aplicação, esses reagentes também são utilizados em amostras farmacêuticas e em estudos associados a metaloproteínas (Krystek et al., 1993; Thanasarakhan et al., 2007; Doyle et al., 2019). Zincon e Br-PADAP, apesar de não serem aplicados para fins forenses, são reagentes muito utilizados em uma variedade de estudos de detecção e quantificação de metais. O zincon é um dos agentes complexantes mais utilizados para detecção colorimétrica de zinco em diversas matrizes como leite em pó, cabelo, pomadas a base de ZnO, entre outros (Rastegarzadeh; Rezaei, 2008; Cunha et al., 2021). É importante ressaltar que este agente não é específico para zinco, podendo ser usado para detecção e quantificação de outros metais como cobre e cobalto (Säbel et al., 2010), além de ser capaz de complexar com estruturas livres de metal como as poliaminas espermina e espermidina (Fukushima; Aikawa, 2019), isso indica que o uso de agentes mascarantes e um controle adequado de pH podem ser determinantes para a efetividade do método. De forma similar, o Br-PADAP é utilizado na detecção de zinco em produtos cosméticos, farmacêuticos e até mesmo na detecção de mercúrio em amostras ambientais (Agnihotri et al., 2005; Banjare et al., 2005). Apesar da relevância desses trabalhos, alguns deles não trazerem informações completas acerca das principais figuras de mérito.

De maneira geral, as faixas de trabalho descritas, em sua maioria, são próximas as dos métodos propostos. Além disso, este trabalho se destaca pelos baixos limites de detecção. Outro ponto a ser destacado é o tempo de execução do ensaio, em todos os casos a reação colorimétrica é instantânea e a medida é feita após poucos segundos ou minutos, mas nos métodos em que incluem etapas de desnaturação de proteínas, digestão ou agitação para extração de metais de amostras complexas como solo, o tempo total do procedimento pode se aproximar de 6h. Os principais pontos dos estudos supracitados estão dispostos na Tabela 8.

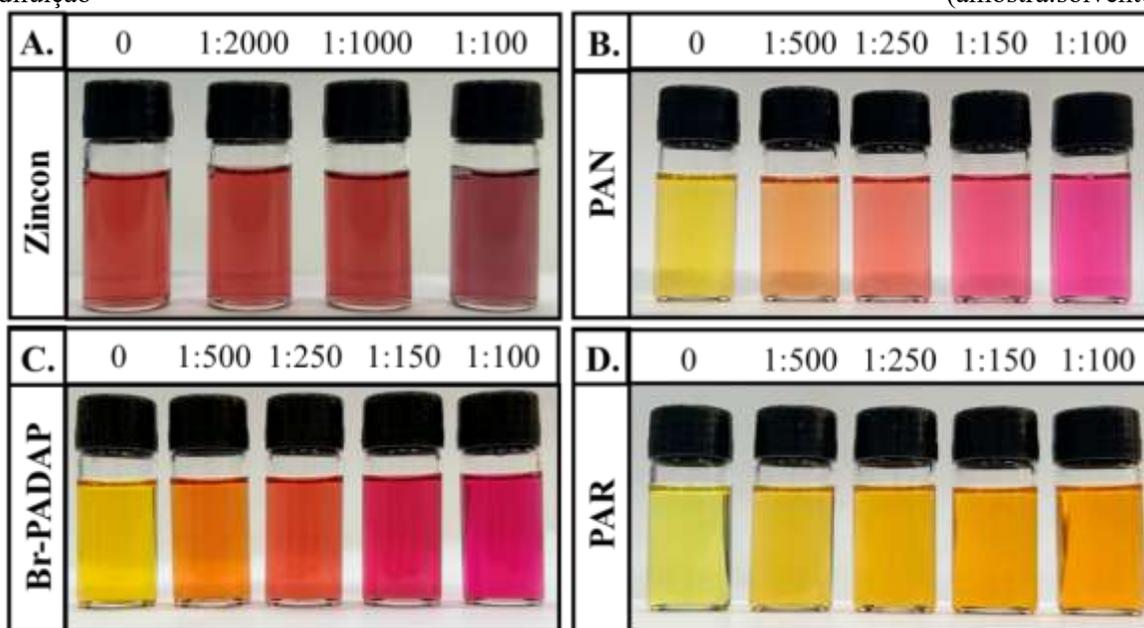
**Tabela 8.** Comparação de métodos analíticos (em solução) empregando os azocorantes (Zincon, PAN, Br-PADAP e PAR) aplicados em amostras distintas.

Reagente	$\lambda_{\max}$ (nm)	Faixa linear ( $\mu\text{M}$ )	LOD ( $\mu\text{M}$ )	Tempo (min)	Amostra	Comentários	Referência
<b>Zincon</b>	618	15 - 125	0,09	1	Pomada (ZnO)	Sistema colorimétrico via imagem digital	Cunha et al., 2021
	615	0 - 30	0,2	5	Metaloproteína: superóxido dismutase (SOD) bovina	Quantificação de Zn(II), Cu(II) e Co(II)	Säbel et al., 2010
	620	1,5 - 38,2	-	-	ZnO	Avalia a complexação do Zn(II) liberado pelo ZnO em meio aquoso.	Kaya et al., 2023
	645	0,76 - 30,60	0,16	12	Leite em pó e cabelo	Sensor óptico	Rastegarzadeh; Rezaei, 2008
	<b>617</b>	<b>1 - 20</b>	<b>0,09</b>	<b>5</b>	-	-	<b>Este trabalho</b>
<b>PAN</b>	554	1,5-15	-	10	Insulina	-	Krystek et al., 1993
	553	1,5-15	0,3	2	Amostras farmacêuticas (multivitamínicos)	Método espectrofotométrico de análise por injeção sequencial (SIA)	Thanasarakhan et al., 2007
	525	-	$1,12 \times 10^{-4}$	-	ZnSO <sub>4</sub>	Sensor optoeletrônico multiespectral. Simula sistemas hidrológicos.	Braga et al., 2017
	<b>556</b>	<b>1-10</b>	<b>0,05</b>	<b>5</b>	<b>sêmen</b>	-	<b>Este trabalho</b>
<b>Br-PADAP</b>	550	0 - 6	0,09	10	Cosméticos e produtos farmacêuticos	-	Banjare et al., 2005
	555	15 - 46	-	3	Soro sanguíneo	Estudo comparativo entre Br-PADAP e 5-Br-PAPS.	Homsher & Zak, 1985
	569	1 - 10	-	360	folhas e algas	Determinação simultânea Hg(II) e Zn(II) em amostras ambientais.	Agnihotri et al., 2005
	<b>579</b>	<b>0,25 - 3</b>	<b>0,02</b>	<b>5</b>	<b>sêmen</b>	-	<b>Este trabalho</b>
<b>PAR</b>	416	0 - 25	-	40	Metaloproteína: superóxido dismutase 1 (SOD1) humana	Quantifica simultaneamente Cu(II) e Zn(II) em solução.	Doyle et al., 2019
	500	1-12	-	30	Aspartato transcarbamoilase (ATCase)	Liberação de Zn(II) da aspartato transcarbamoilase (ATCase) de <i>Escherichia coli</i> .	Hunt et al., 1985
	496	25 - 40	-	40	solo	Detecção de Zn(II) em solo.	-
	<b>486</b>	<b>1-10</b>	<b>0,1</b>	<b>5</b>	<b>sêmen</b>	-	<b>Este trabalho</b>

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Para avaliar a viabilidade do método em amostras reais de sêmen, foi realizado um ensaio de recuperação. Os quatro azocorantes foram testados previamente em soluções de sêmen para verificar sua eficácia em uma matriz complexa como o sêmen. Diferentes diluições (1:100 a 1:2000) foram analisadas, e apenas o zincon não apresentou coloração azul semelhante ao padrão, apresentando em vez disso, coloração violeta (Fig. 32A). Esse resultado, similar ao descrito por (Fukushima; Aikawa, 2019) na detecção das poliaminas espermina e espermidina, resultando na exclusão do zincon nas próximas etapas. Esse resultado indica que o método proposto com zincon, apesar de não ser indicado para a detecção de zinco em sêmen, tem potencial para aplicação similar detectando outros possíveis biomarcadores de sêmen. Os demais reagentes indicaram a formação de seus respectivos complexos (Fig. 32B,C,D). Sendo assim a recuperação foi realizada para os demais azocorantes (Tabela 9), as recuperações obtidas para o PAN, Br-PADAP e PAR foram 102 - 106%, 94 - 120% e 100 - 106%, respectivamente. Essas concentrações de padrão foram adicionadas a soluções de sêmen diluídas 500 vezes para os métodos PAN e PAR e 2000 vezes para o método Br-PADAP. Esses resultados sugerem a efetividade da aplicação prática desses métodos.

**Figura 32.** Ensaio preliminar em amostra real com os azocorantes nas condições otimizadas. A. Zincon, B. PAN, C. Br-PADAP e, D. PAR. Os números dentro das caixas referem-se aos fatores de diluição (amostra:solvente).



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Tabela 9.** Valores de recuperações com amostra de sêmen para o PAN, Br-PADAP e PAR.

PAN <sup>(a)</sup>				Br-PADAP <sup>(b)</sup>				PAR <sup>(c)</sup>			
Adicionado (µM)	Encontrado (µM)	Recuperado (%)	RSD (%)	Adicionado (µM)	Encontrado (µM)	Recuperado (%)	RSD (%)	Adicionado (µM)	Encontrado (µM)	Recuperado (%)	RSD (%)
0	2,84	-	1,23	0	0,42	-	7,74	0	2,45	-	0,13
1	4,09	106	1,67	0,5	1,10	120	2,14	1	3,66	106	2,87
2	5,01	104	0,85	1	1,42	100	4,22	2	4,44	100	0,30
4	6,99	102	1,60	2	2,36	98	2,93	4	6,43	100	0,59

Fatores de diluição do sêmen em solução: (a), (c) 1:500; (b) 1:2000.

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

## 3.2 Reações colorimétricas no $\mu$ PAD

### 3.2.1 Otimização das condições reacionais e canais de cor no $\mu$ PAD

Após a otimização das condições em solução, iniciou-se os testes no  $\mu$ PAD. Uma vez que, o zincon não apresentou resultados satisfatórios na detecção de zinco em amostras reais, ele não foi avaliado no  $\mu$ PAD. Dessa forma, a ordem das reações foi analisada para os três reagentes selecionados: PAN, Br-PADAP e PAR. Nesta avaliação, foi observado uma sensibilidade maior quando o zinco foi adicionado após o azocorante [ordem 1, reagente  $\rightarrow$  Zn(II)] para o PAN e o PAR (Fig. 33A,C), comparada a ordem 2 [Zn(II)  $\rightarrow$  reagente]. Para o Br-PADAP (Fig. 33B) a maior sensibilidade foi alcançada quando o tampão foi adicionado entre o azocorante e o zinco [ordem 3, reagente  $\rightarrow$  tampão  $\rightarrow$  Zn(II)]. Apenas para o Br-PADAP foi necessária adição de solução tampão separadamente pois à preparação da solução estoque deste reagente foi em etanol a 75% (v/v), enquanto os demais azocorantes foram preparados diretamente em solução tampão.

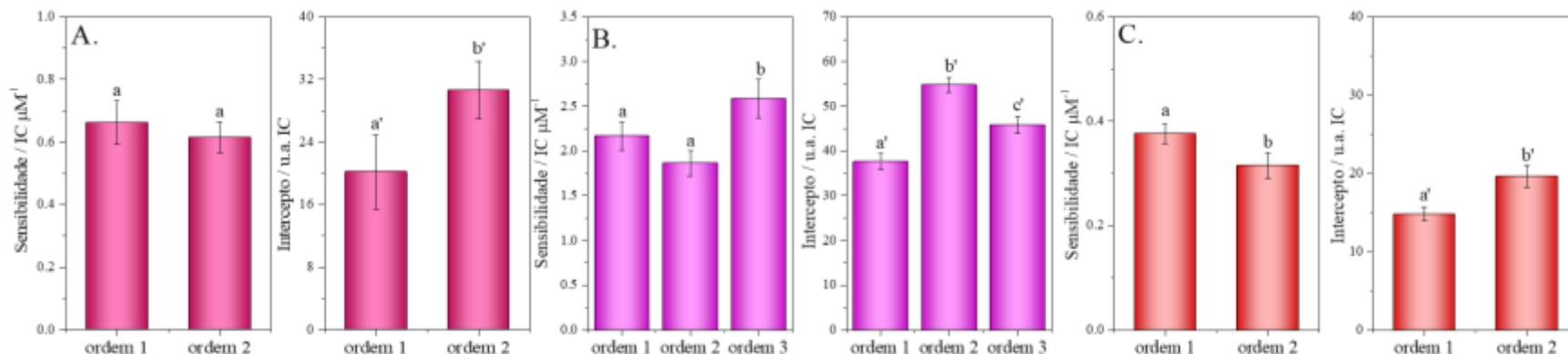
A avaliação quantitativa relativa à formação do cromóforo no  $\mu$ PAD é realizada por meio de imagens, cujo valores numéricos são obtidos utilizando um determinado sistema de cor (Phuangsaikai et al., 2021), a exemplo do RGB (vermelho, verde e azul) e o CMYK (ciano, magenta, amarelo e preto). Neste trabalho, o modelo subtrativo CMYK foi utilizado, por sua natureza não aditiva e relação direta com as cores (Ivančević et al., 2023). Para todos os azocorantes avaliados o canal magenta apresentou maior contribuição e consequentemente, maior sensibilidade, sendo assim selecionado para as análises subsequentes (Fig. 34). A contribuição negativa (redução da intensidade de cor com aumento da concentração de zinco no meio) do canal amarelo está associada a coloração dos azocorantes não complexado (forma livre), que reduz gradualmente à medida que o complexo se forma. A coordenada K não foi representada, pois se manteve inalterada com o aumento da concentração dos íons Zn(II).

Em seguida, os volumes de amostra e reagentes no  $\mu$ PAD foi avaliado, variando entre 1 e 3  $\mu$ L (Fig. 35), sendo 2  $\mu$ L escolhido como volume ideal, garantindo melhor desempenho analítico. A concentração do tampão borato foi avaliada no  $\mu$ PAD em uma faixa de 25 a 150 mM (Fig. 36), visando garantir a estabilidade e eficiência da reação. Os resultados indicaram que a maior sensibilidade foi observada para o PAN e o Br-PADAP na menor concentração

testada (25 mM), enquanto para o PAR a condição ideal foi obtida com uma concentração de 50 mM.

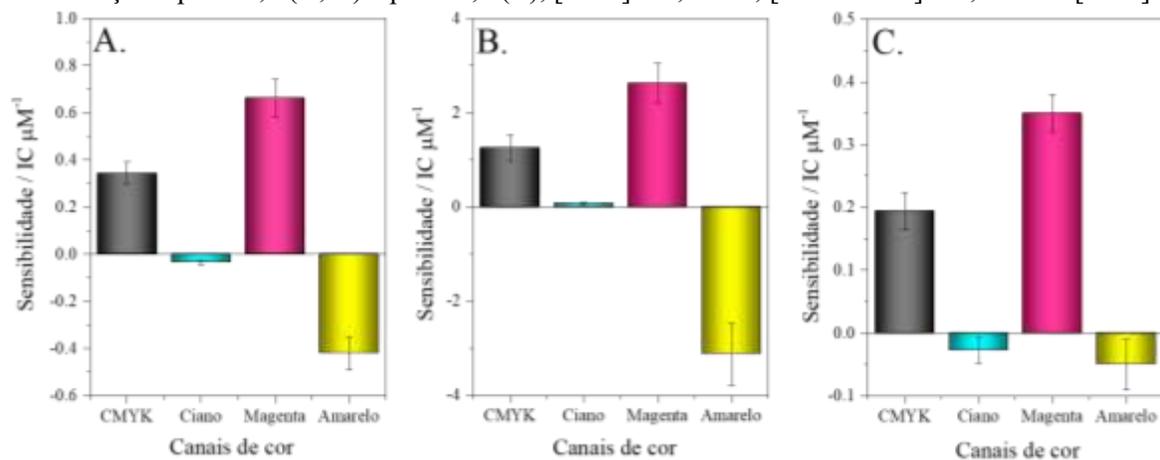
As concentrações do PAN, Br-PADAP e PAR foram avaliadas dentro de uma faixa predefinida (Fig. 37), observando-se que os valores que proporcionaram maior sensibilidade foram 1,2 mM para PAN, 0,4 mM para Br-PADAP e 1,2 mM para PAR. O decréscimo na sensibilidade com o aumento da concentração, pode estar associado ao aumento do sinal do branco, devido a coloração do azocorante. Esse efeito é perceptível principalmente para o Br-PADAP.

**Figura 33.** Avaliação da ordem de adição dos reagentes no  $\mu$ PAD. A. PAN, B. Br-PADAP e, C. PAR. Condições: pH = 9,0 (A, B) e pH = 9,5 (B), [PAN] = 1,0 mM, [Br-PADAP] = 0,6 mM e [PAR] = 1,0 mM. Ordens avaliadas: (1) Azocorante  $\rightarrow$  Zn(II), (2) Zn(II)  $\rightarrow$  Azocorante e (3) Azocorante  $\rightarrow$  tampão borato  $\rightarrow$  Zn(II). Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



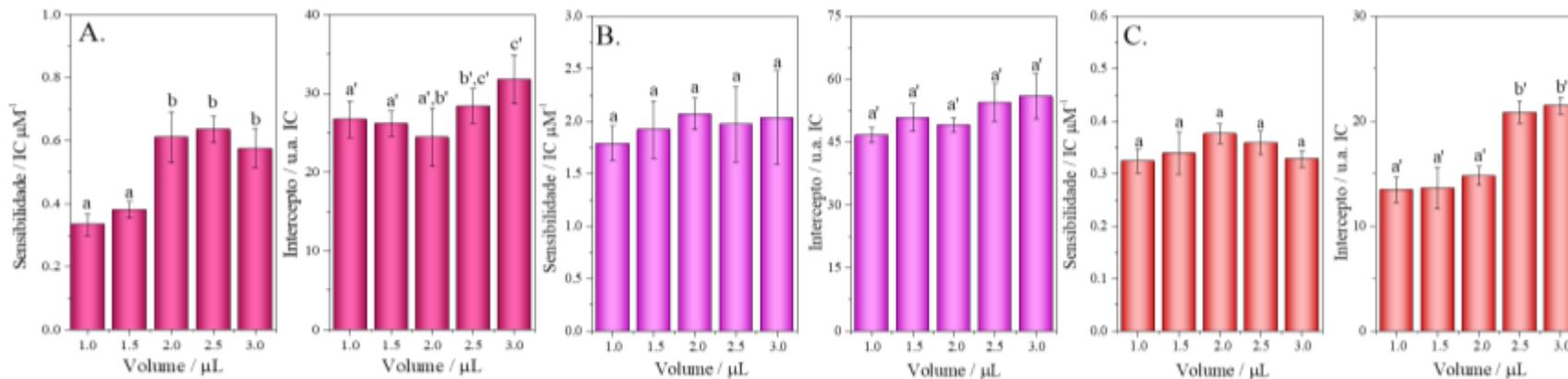
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 34.** Sensibilidade das curvas em função das cores do sistema subtrativo CMYK, contribuição dos canais ciano, magenta e amarelo. A. PAN, B. Br-PADAP e, C. PAR. Condições: pH = 9,0 (A, B) e pH = 9,5 (B), [PAN] = 1,0 mM, [Br-PADAP] = 0,6 mM e [PAR] = 1,0 mM.



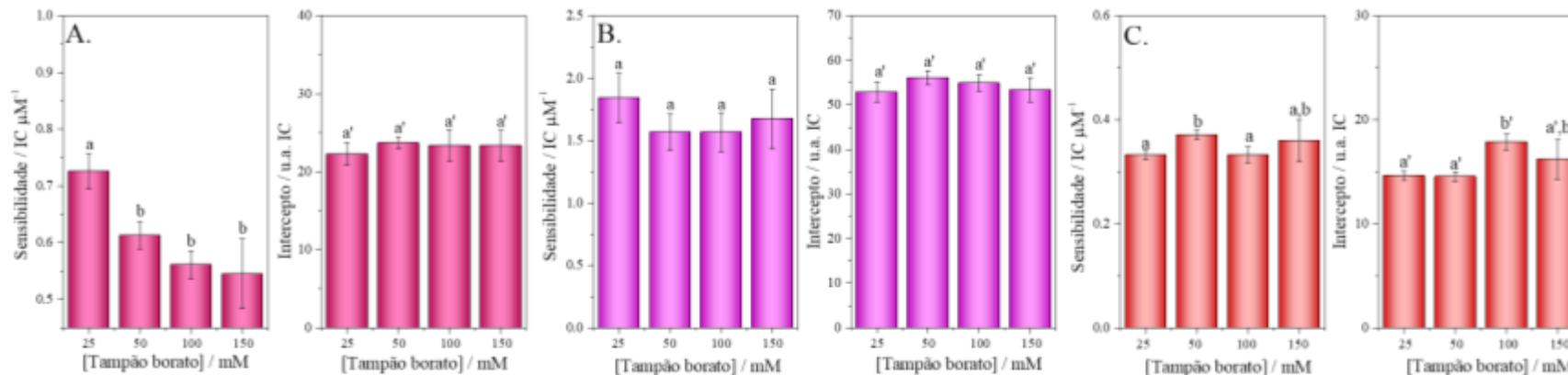
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 35.** Variação dos volumes das alíquotas dos reagentes adicionadas ao  $\mu$ PAD. A. PAN, B. Br-PADAP e, C. PAR. Condições: pH = 9,0 (A, B) e pH = 9,5 (B), [PAN] = 1,0 mM, [Br-PADAP] = 0,6 mM e [PAR] = 1,0 mM. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



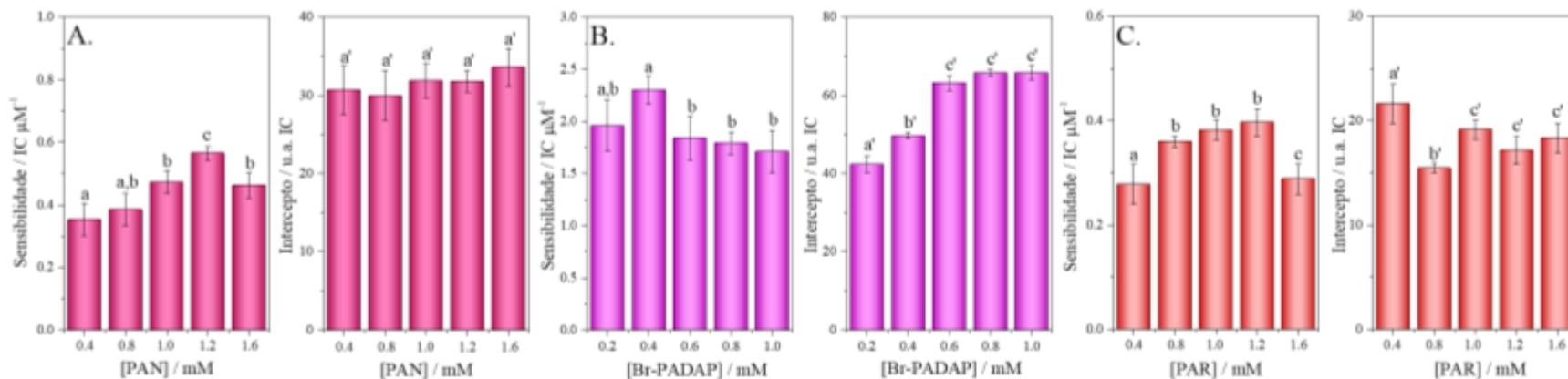
Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 36.** Influência da concentração do tampão borato na reação colorimétrica no  $\mu$ PAD. A. PAN, B. Br-PADAP e, C. PAR. Condições: pH = 9,0 (A, B) e pH = 9,5 (B), [PAN] = 1,0 mM, [Br-PADAP] = 0,6 mM e [PAR] = 1,0 mM. Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 37.** Avaliação da concentração do azocorante na reação colorimétrica no  $\mu$ PAD. A. PAN, B. Br-PADAP e, C. PAR. Condições: 25 mM, pH = 9,0 (A, B) e 50 mM, pH = 9,5 (B). Teste aplicado: ANOVA *One Way*, nível de confiança de 95%.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### ***3.2.2 Figuras de mérito e ensaios de recuperação***

Uma vez estabelecidas as figuras de mérito em solução, etapa crucial na validação de uma metodologia, as principais figuras foram determinadas também no  $\mu$ PAD (Tabela 10) nas condições otimizadas para cada azocorante (Fig. 38). Para o PAN foi obtida resposta linear de 10 a 75  $\mu$ M, ajustada pelo modelo de regressão linear, com LOD = 3,44  $\mu$ M e RSD  $\leq$  2,9%. O Br-PADAP nas condições de melhor desempenho analítico apresentou faixa linear de 4 a 15  $\mu$ M, LOD = 2,86  $\mu$ M e RSD  $\leq$  2,2%, enquanto para o PAR, obteve-se resposta linear de 10 a 60  $\mu$ M, LOD = 4,95  $\mu$ M e RSD  $\leq$  3,6%. Desta forma, os métodos apresentaram boa repetibilidade, conforme observado pelos valores de desvio padrão relativo (RSD).

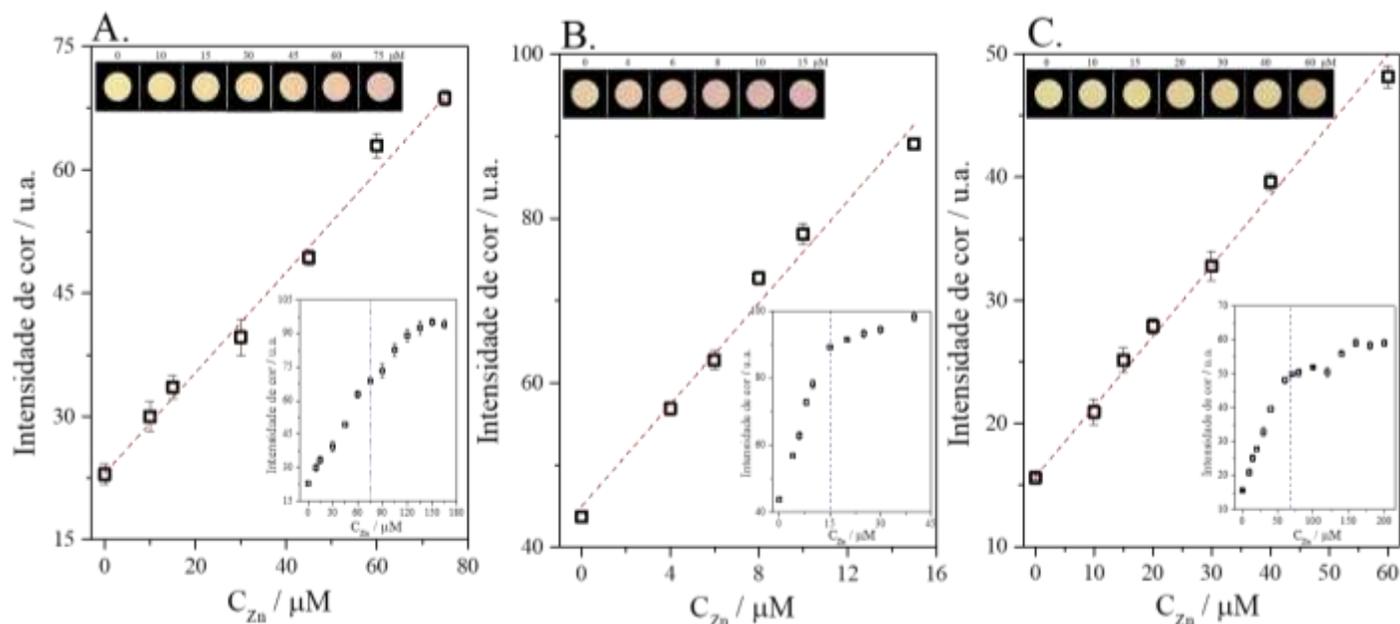
O efeito de matriz foi avaliado com base no percentual de recuperação do zinco em amostras de sêmen humano (Tabela 11), com valores dentro da faixa aceitável para amostras de composição complexa (80 - 120%) (Nascentes et al., 2022). As concentrações de analito em diferentes níveis foram adicionadas a soluções de sêmen diluídas 20 vezes para PAN e PAR e 50 vezes para Br-PADAP. Os valores de recuperação obtidos variaram de 100 a 101% (RSD  $\leq$  3,9%) para o PAN, de 98 a 108% (RSD  $\leq$  1,8%) para o Br-PADAP e, por fim, para o PAR de 94 a 100% (RSD  $\leq$  3,2%). Portanto, constata-se que a detecção de zinco pelos diferentes azocorantes não sofre influência da composição da amostra biológica, comprovando a exatidão do método para os reagentes avaliados.

**Tabela 10.** Condições otimizadas e principais figuras de mérito para os azocorantes no  $\mu$ PAD.

Reagente	Azocorante (mM)	Solução tampão (mM)	pH	Faixa linear ( $\mu$ M)	Equação	r	LOD ( $\mu$ M)	RSD (%)
PAN	1,2	25	9,0	10 - 75	$IC = 0,61(\pm 0,02) \times C_{Zn} + 23,11(\pm 1,15), n = 7$	0,9965	3,44	1,8 - 2,9
Br-PADAP	0,4	25	9,0	4 - 15	$IC = 3,09(\pm 0,20) \times C_{Zn} + 45,00(\pm 1,61), n = 6$	0,9915	2,86	2,1 - 2,2
PAR	1,2	50	9,5	10 - 60	$IC = 0,57(\pm 0,01) \times C_{Zn} + 15,65(\pm 0,20), n = 7$	0,9983	4,95	2,4 - 3,6

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 38.** Determinação da faixa linear no  $\mu$ PAD relativa à intensidade de cor (IC) em função da concentração de íons Zn(II). A. PAN, B. Br-PADAP, e C. PAR. As figuras dentro do gráfico representam as curvas da intensidade de cor em função da variação de concentração de íons Zn(II) até a saturação e as zonas do  $\mu$ PAD relacionadas as concentrações de íons Zn(II) na faixa linear.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Tabela 11.** Percentuais de recuperações com amostra de sêmen no  $\mu$ PAD para os azocorantes PAN, Br-PADAP e PAR.

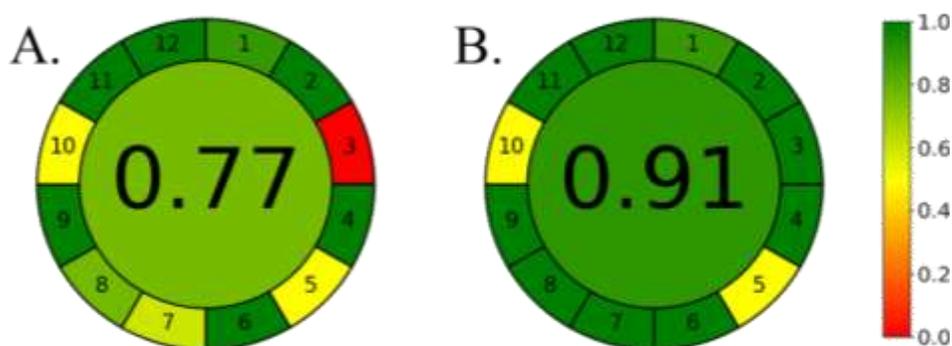
PAN <sup>(a)</sup>				Br-PADAP <sup>(b)</sup>				PAR <sup>(c)</sup>			
Adicionado ( $\mu$ M)	Encontrado ( $\mu$ M)	Recuperado (%)	RSD (%)	Adicionado ( $\mu$ M)	Encontrado ( $\mu$ M)	Recuperado (%)	RSD (%)	Adicionado ( $\mu$ M)	Encontrado ( $\mu$ M)	Recuperado (%)	RSD (%)
0	27,50	-	2,1	0	8,70	-	0,6	0	32,70	-	0,4
12,50	39,89	100	2,2	1,3	10,83	108	0,2	7,3	38,37	96	3,2
22,50	50,31	101	3,9	3,8	12,31	98	0,6	17,3	50,26	100	2,1
32,50	60,43	101	2,0	6,3	15,25	102	1,8	27,3	56,32	94	1,8

Fatores de diluição do sêmen no  $\mu$ PAD: (a), (c) 1:20; (b) 1:50.

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Visando investigar o impacto ambiental das metodologias avaliadas, empregou-se a ferramenta métrica AGREE, que se baseia nos 12 princípios da Química Verde. Essa calculadora considera critérios como toxicidade, quantidade de reagentes, geração de resíduos, consumo de energia, miniaturização e análises in situ (Sajid; Płotka-Wasyłka, 2022; Shi et al., 2023). Os índices obtidos foram 0,77 em solução (Fig. 39A) e 0,91 no  $\mu$ PAD (Fig. 39B), indicando que o  $\mu$ PAD é uma metodologia mais sustentável e alinhada com os princípios da Química verde.

**Figura 39.** Avaliação das metodologias para a detecção de zinco empregando a ferramenta métrica AGREE. A. Em solução e B. No  $\mu$ PAD.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

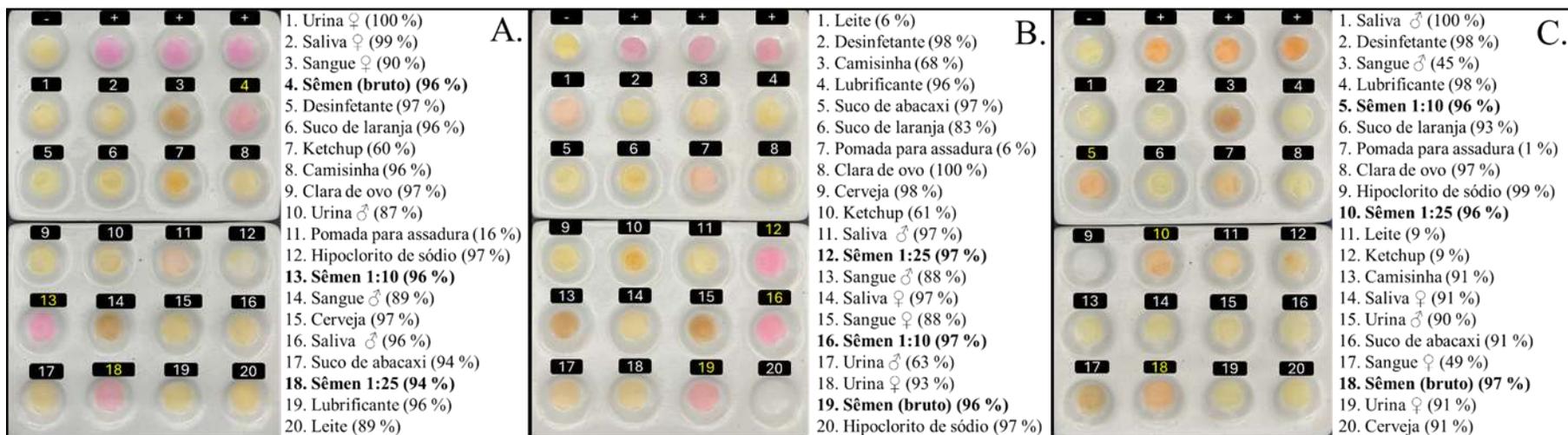
### 3.3 Ensaio em amostras reais

No contexto forense, os testes presuntivos colorimétricos são rotineiramente utilizados tanto para detecção de drogas quanto de marcadores biológicos em locais de crime (Philp; Fu, 2018). Desta forma, os reagentes PAN, Br-PADAP e PAR foram utilizados para os testes presuntivos em placa de toque (Fig. 40) e no  $\mu$ PAD (Fig. 41), sendo avaliados por voluntários. A distribuição das diferentes amostras avaliadas foi feita de forma randômica em cada um dos ensaios. Em todos os casos o percentual de acerto por parte da avaliação dos voluntários para sêmen foi  $\geq 94\%$  (Fig. 40 e 41), sugerindo a efetividade dos métodos. De forma geral, em solução (placa de toque), as amostras que apresentaram menor percentual de acerto foram as amostras de pomada para assadura ( $200 \text{ mg g}^{-1}$  a base de ZnO) e o leite ( $45 - 190 \text{ }\mu\text{M}$ , Paixão et al., 2022; Tola et al., 2024), as quais, naturalmente possuem zinco em sua composição, portanto, esse resultado indica que essas amostras podem gerar falsos positivos neste tipo de avaliação. No método com PAR as amostras de sangue e *ketchup*

apresentaram menor percentual de acerto devido à similaridade da coloração do complexo com zinco e a cor da amostra. Contudo, o aumento do fator de diluição para alguns tipos de amostras (leite, sangue e *ketchup*), assim como, treinamento direcionado para uso das metodologias em solução poderia contornar esta limitação.

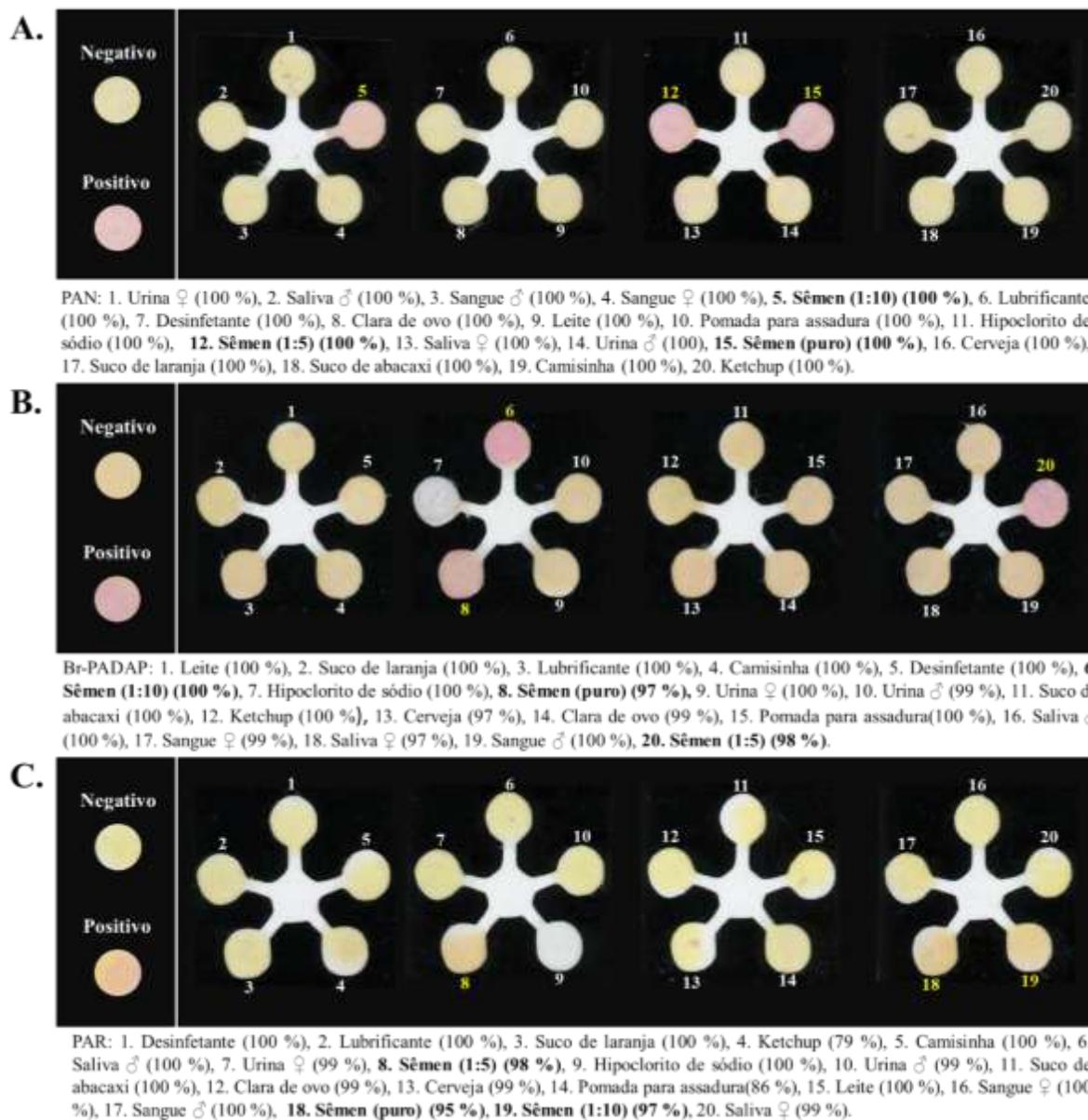
No  $\mu$ PAD (Fig. 41), empregando o PAR, as amostras de *ketchup* e pomada para assadura apresentaram percentual de acerto menor 79 e 86 %, respectivamente em comparação com as outras amostras. Ainda assim, apresentando um melhor desempenho quando comparado ao teste em solução (placa de toque). Para o Br-PADAP e o PAN todas as amostras apresentaram percentual de acerto superior ou igual a 97%, indicando maior eficácia dos métodos usando o  $\mu$ PAD. Adicionalmente, para concluir a validação qualitativa dos métodos, alguns parâmetros de desempenho foram determinados em solução e no  $\mu$ PAD (Tabela 12). Nesta avaliação, se observa que os métodos apresentaram uma alta sensibilidade, especificidade e eficiência, os parâmetros avaliados no  $\mu$ PAD ( $\geq 97\%$ ), apresentaram um desempenho superior aos ensaios em solução (placa de toque). Por fim, concordante com os valores de F<sub>1</sub> score (que indica o percentual de avaliações incorretas, associado a ocorrência de falsos-positivos), fica evidente que o PAN e Br-PADAP foram os métodos mais precisos e sensíveis para detecção de zinco em sêmen em comparação ao PAR.

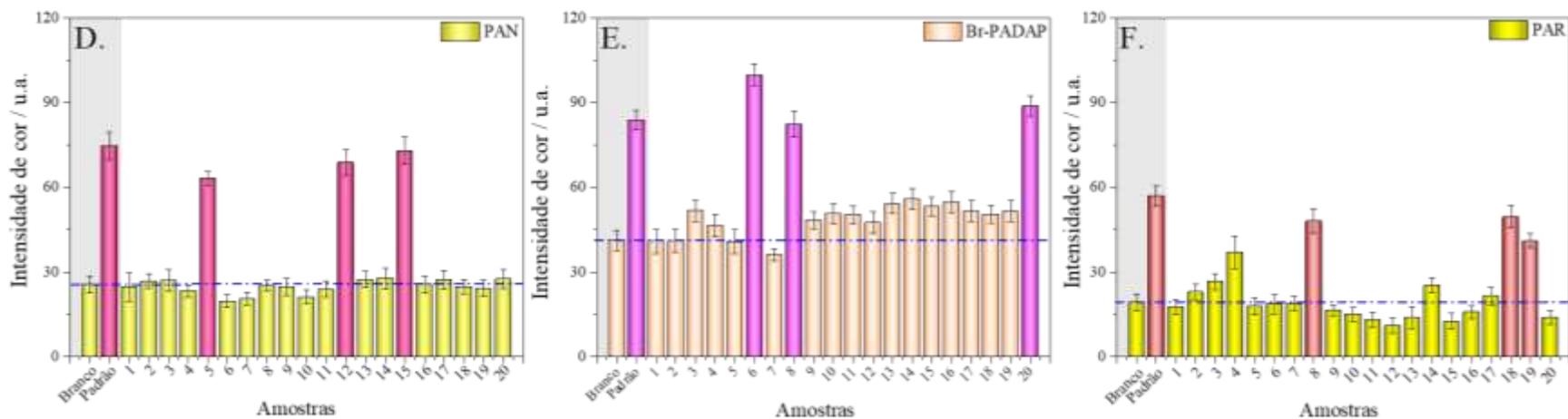
**Figura 40.** Fotos com diferentes amostras reais na placa de toque empregadas na avaliação presuntiva e percentuais de acerto. A. PAN, B. Br-PADAP e, C. PAR.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Figura 41.** Fotos utilizadas na avaliação presuntiva com as diferentes amostras reais no  $\mu$ PAD, com os percentuais de acertos. A. PAN, B. Br-PADAP e, C. PAR. Tratamento quantitativo em função da Intensidade de Cor (IC) para as diferentes amostras . D. PAN, E. Br-PADAP e, F. PAR.





Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Tabela 12.** Parâmetros de desempenho da avaliação qualitativa dos métodos analíticos para os azocorantes (em solução e no  $\mu$ PAD) realizada por voluntários ( $n \geq 68$ ).

Parâmetros de desempenho	Azocorante					
	PAN		Br-PADAP		PAR	
	Solução ( $n = 68$ )	$\mu$ PAD ( $n = 89$ )	Solução ( $n = 70$ )	$\mu$ PAD ( $n = 76$ )	Solução ( $n = 69$ )	$\mu$ PAD ( $n = 86$ )
Sensibilidade (%)	98	100	98	99	98	98
Especificidade (%)	96	100	92	100	83	98
Eficiência (%)	96	100	92	99	85	97
Valor Preditivo Positivo (%)	86	100	73	98	50	91
Valor preditivo negativo (%)	100	100	100	100	100	99
Razão de falsos positivos (%)	4	0	8	1	17	2
Razão de falsos negativos (%)	2	0	2	1	2	2
F <sub>1</sub> -score (%)	92	100	83	98	66	94

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

## 4. CONCLUSÃO

As metodologias desenvolvidas para a detecção de íons zinco no sêmen demonstraram alta sensibilidade, especificidade, eficácia e reprodutibilidade, com recuperações acima de 94% e RSD  $\leq 3,7\%$ . Esses resultados indicam que os métodos propostos se mostram adequados para aplicação forense, principalmente como testes presuntivos para identificação de sêmen em diferentes ambientes, destacando-se o desempenho do PAN e Br-PADAP, que obtiveram os maiores valores de sensibilidade, especificidade, eficiência e F<sub>1</sub>-score. Adicionalmente, a utilização das reações colorimétricas explorando  $\mu$ PADs para análises qualitativas e quantitativas, possibilitam a miniaturização do sistema de análise, simplicidade e rapidez em aplicações *in loco*.

## 5. REFERÊNCIAS

- Ackermann, G., & Kothe, J. (1979). VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG AN REAGENTIEN ZUR SPEKTRALPHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG. *Talanta*, 26, 693–703. <https://doi.org/0039-9140/79/0801-0693502.00/9>
- Agnihotri, N. K., Ratnani, S., & Singh, V. K. (2005). Nonextractive trace level simultaneous determination of mercury(II) and zinc(II) in environmental samples with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol and cetylpyridinium chloride. *Analytical Letters*, 38(12), 1999–2013. <https://doi.org/10.1080/00032710500232877>
- Banjare, R. K., Thakur, M., & Deb, M. K. (2005). Determination of free and total zinc using 2-[(5-bromo-2-pyridylazo)]-5-diethylaminophenol in mixed surfactant medium. In *Indi an Journal of Chemistry* (Vol. 44).
- Braga, M. S., Jaimes, R. F. V. V., Borysow, W., Gomes, O. F., & Salcedo, W. J. (2017). Portable multispectral colorimeter for metallic ion detection and classification. *Sensors (Switzerland)*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/s17081730>
- Chabaud, K. R., Thomas, J. L., Torres, M. N., Oliveira, S., & McCord, B. R. (2018). Simultaneous colorimetric detection of metallic salts contained in low explosives residue using a microfluidic paper-based analytical device ( $\mu$ PAD). *Forensic Chemistry*, 9, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2018.03.008>
- Chia, S. E., Ong, C. N., Chua, L. H., Ho, L. M., & Tay, S. K. (2000). Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *Journal of Andrology*, 21(1), 53–57. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03275.x>
- Crow, J. P., Sampson, ~jacindab, Zhuang, Y., Thompson, T., & Beckman, S. (1997). Decreased Zinc Affinity of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated Superoxide Dismutase Mutants Leads to Enhanced Catalysis of Tyrosine Nitration by Peroxynitrite. In *J. Neurochem* (Vol. 69).

- Cunha, F. A. da S., de Almeida Junior, P. L., Fernandes, J. P. A., de Almeida, L. F., de Araújo, M. C. U., & Lyra, W. da S. (2021). Flow-batch digital image colorimetric system to zinc oxide determination in ointments. *Revista Virtual de Química*, 13(4), 1062–1068. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20210030>
- Doyle, C. M., Naser, D., Bauman, H. A., Rumfeldt, J. A. O., & Meiering, E. M. (2019). Spectrophotometric method for simultaneous measurement of zinc and copper in metalloproteins using 4-(2-pyridylazo)resorcinol. *Analytical Biochemistry*, 579, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.007>
- Fukushima, Y., & Aikawa, S. (2019). Colorimetric detection of spermine and spermidine by zincon in aqueous solution. *Tetrahedron Letters*, 60(49). <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151302>
- Gamblin, A. P., & Morgan-Smith, R. K. (2020). The characteristics of seminal fluid and the forensic tests available to identify it. *WIREs Forensic Science*, 2(3). <https://doi.org/10.1002/wfs2.1363>
- Hameed, Y. A. S., Alkhatami, N., Snari, R. M., Munshi, A. M., Alaysuy, O., Hadi, M., Alsharif, M. A., Khalil, M. A., & El-Metwaly, N. M. (2025). Novel amino-functionalized MOF-based sensor for zinc ion detection in water and blood serum samples. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 327. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.125432>
- Henkel, R., Rg Bittner, J., Weber, R., Hü, F., & Miska, W. (1999). *Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility*.
- Homsher, R., & Zak, B. (1985). Spectrophotometric Investigation of SensitiveComplexingAgentsfor the Determination of Zinc in Serum. In *CLIN. CHEM* (Vol. 31, Issue 8). <https://academic.oup.com/clinchem/article/31/8/1310/5651741>
- Hooft, P. J., & Van De Voorde, H. P. (1990). THE ZINC TEST AS AN ALTERNATIVE FOR ACID PHOSPHATASE SPOT TESTS IN THE PRIMARY IDENTIFICATION OF SEMINAL TRACES. In *Forensic Science International* (Vol. 47).
- Hooft, P., Van De Voorde, H., & Van Dijck, P. (1992). A MORE SENSITIVE MODIFICATION OF THE ZINC TEST FOR SEMINAL TRACES SUITABLE FOR STABLE TEST PAPER STRIPS. In *Forensic Science International* (Vol. 53).
- Hunt, J. B., Neece, S. H., & Ginsburg~, A. (1985). The Use of 4-(2-Pyridylazo)resorcinol in Studies of Zinc Release from Escherichia coli Aspartate Transcarbamoylase'. In *ANALYTICAL BI~HEMISTRY* (Vol. 146).
- Ihsan, M., Niaz, A., Rahim, A., Zaman, M. I., Arain, M. B., Sirajuddin, Sharif, T., & Najeeb, M. (2015). Biologically synthesized silver nanoparticle-based colorimetric sensor for the selective detection of Zn<sup>2+</sup>. *RSC Advances*, 5(111), 91158–91165. <https://doi.org/10.1039/c5ra17055a>
- Ivančević, T. K., Loknar, N. S., Rudolf, M., & Bratić, D. (2023). Manipulating Pixels in Computer Graphics by Converting Raster Elements to Vector Shapes as a Function of Hue. *Journal of Imaging*, 9(6), 106. <https://doi.org/10.3390/jimaging9060106>

- Jablan, J., Besalú, E., Žarak, M., Dumić, J., & Marguí, E. (2021). Analytical potential of total reflection X-ray fluorescence spectrometry for simultaneous determination of iron, copper and zinc in human blood serum and plasma. *Talanta*, *233*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122553>
- Jothimuthu, P., Wilson, R. A., Herren, J., Pei, X., Kang, W., Daniels, R., Wong, H., Beyette, F., Heineman, W. R., & Papautsky, I. (2013). Zinc Detection in Serum by Anodic Stripping Voltammetry on Microfabricated Bismuth Electrodes. *Electroanalysis*, *25*(2), 401–407. <https://doi.org/10.1002/elan.201200530>
- Kaya, H., Karabacak, R. B., Çelik, Y., Peake, J., Watkins, S., Sayer, R., & Suvacı, E. (2023). Application of zincon analysis to investigate the zinc speciation in aqueous media for further understanding of ZnO solubility. *Microchemical Journal*, *191*. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108772>
- Kim, K. B., Kim, H., Song, E. J., Kim, S., Noh, I., & Kim, C. (2013). A cap-type Schiff base acting as a fluorescence sensor for zinc(ii) and a colorimetric sensor for iron(ii), copper(ii), and zinc(ii) in aqueous media. *Dalton Transactions*, *42*(47), 16569–16577. <https://doi.org/10.1039/c3dt51916c>
- Kocyla, A., Pomorski, A., & Krężel, A. (2017). Molar absorption coefficients and stability constants of Zincon metal complexes for determination of metal ions and bioinorganic applications. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *176*, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.006>
- Krystek, J., Kobytecka, J., & Ptaszyrski, B. (1993). Spectrophotometric Determination of Zinc with 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol and Cetyltrimethylammonium Bromide in Insulin. In *Chern. Anal. (Warsaw)* (Vol. 38).
- Lampugnani, L., & Maccheroni, M. (1984). Rapid Colorimetry of Zinc in Seminal Fluid. In *CLINICAL CHEMISTRY* (Vol. 30, Issue 8). <https://academic.oup.com/clinchem/article/30/8/1366/5668642>
- Lee, S., Nam, Y. S., Lee, H. J., Lee, Y., & Lee, K. B. (2016). Highly selective colorimetric detection of Zn(II) ions using label-free silver nanoparticles. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *237*, 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.06.141>
- Nascentes, C. C., Aguilar, I., Gil-Ramírez, G., & Gonzalez-Rodriguez, J. (2022). Electropolymerization of Metallo-Octaethylporphyrins: A Study to Explore Their Sensing Capabilities. *Materials*, *15*(19), 6598. <https://doi.org/10.3390/ma15196598>
- Osadchuk, L., Kleshchev, M., Danilenko, A., & Osadchuk, A. (2021). Impact of seminal and serum zinc on semen quality and hormonal status: A population-based cohort study of Russian young men. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *68*. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126855>
- Paixão Teixeira, J. L., Baptista, D. P., Orlando, E. A., Gigante, M. L., & Pallone, J. A. L. (2022). Effect of processing on the bioaccessibility of essential minerals in goat and cow milk and dairy products assessed by different static in vitro digestion models. *Food chemistry*, *374*, 131739. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131739>

Pérez-Rodríguez, M., & Cañizares-Macías, M. del P. (2023). A prototype microfluidic paper-based chromatic device for simultaneous determination of copper(II) and zinc(II) in urine. *Talanta Open*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2022.100178>

Philp, M., & Fu, S. (2018). A review of chemical ‘spot’ tests: A presumptive illicit drug identification technique. *Drug Testing and Analysis*, 10(1), 95–108. <https://doi.org/10.1002/dta.2300>

Phuangsaichai, N., Jakmunee, J., & Kittiwachana, S. (2021). Investigation into the predictive performance of colorimetric sensor strips using RGB, CMYK, HSV, and CIELAB coupled with various data preprocessing methods: a case study on an analysis of water quality parameters. *Journal of Analytical Science and Technology*, 12(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00271-9>

Rastegarzadeh, S., & Rezaei, V. (2008). An optical sensor for zinc determination based on Zincon as sensing reagent. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 129(1), 327–331. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.08.016>

Rink, L., & Gabriel, P. (2000). Zinc and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59(4), 541–552. <https://doi.org/10.1017/S0029665100000781>

Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., & Schulin, R. (2013). Zinc and its importance for human health: An integrative review. In *Journal of Research in Medical Sciences* (Issue 144).

Säbel, C. E., Neureuther, J. M., & Siemann, S. (2010). A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon. *Analytical Biochemistry*, 397(2), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.10.037>

Säbel, C. E., Shepherd, J. L., & Siemann, S. (2009). A direct spectrophotometric method for the simultaneous determination of zinc and cobalt in metalloproteins using 4-(2-pyridylazo)resorcinol. *Analytical Biochemistry*, 391(1), 74–76. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.007>

Sajid, M., & Płotka-Wasyłka, J. (2022). Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta*, 238, 123046. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123046>

Silva, J. de O. S., Alvarenga, A. D., Correa, D. S., Mercante, L. A., & Santana, R. M. M. (2025). Blown spun fibers-based colorimetric sensor for detecting trace zinc in seminal fluid. *Biosensors and Bioelectronics*, 270, 116943. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116943>

Suzuki, O., Asano, M., Kido, A., & OYA, M. (1983). ZINC TEST AS A NEW TOOL FOR IDENTIFICATION OF HUMAN SEMINAL STAINS. In *Forensic Science International* (Vol. 22).

Szabó, L., Leopold, L. F., Cozar, B. I., Leopold, N., Herman, K., & Chiş, V. (2011). SERS approach for Zn(II) detection in contaminated soil. *Central European Journal of Chemistry*, 9(3), 410–414. <https://doi.org/10.2478/s11532-011-0019-5>

- Tapiero, H., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *57*(9), 399–411. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00081-7)
- Thanasarakhan, W., Liawruangrath, S., Wangkarn, S., & Liawruangrath, B. (2007). Sequential injection spectrophotometric determination of zinc(II) in pharmaceuticals based on zinc(II)-PAN in non-ionic surfactant medium. *Talanta*, *71*(5), 1849–1855. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.08.034>
- Tola, A. T., Geleta, G. S., & Feyissa, G. R. (2024). Assessment of essential and potentially toxic metals in raw cow milk from Mukaturi town, Oromia Regional State, Ethiopia. *Science of The Total Environment*, *926*, 171987. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171987>
- Wei, L., Zhang, X., Dai, Y., Huang, J., Xie, Y. H., & Xiao, K. (2008). Online preconcentration and determination of trace amounts of zinc in nature waters. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, *2008*. <https://doi.org/10.1155/2008/742319>
- Xu, Z., Kim, G. H., Han, S. J., Jou, M. J., Lee, C., Shin, I., & Yoon, J. (2009). An NBD-based colorimetric and fluorescent chemosensor for Zn<sup>2+</sup> and its use for detection of intracellular zinc ions. *Tetrahedron*, *65*(11), 2307–2312. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.01.035>
- Yamaguchi, S., Miura, C., Kikuchi, K., Celino, F. T., Agusa, T., Tanabe, S., & Miura, T. (2009). Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(26), 10859–10864. <https://doi.org/10.1073/pnas.090060210>
- Yu, Q., Sun, X., Zhao, J., Zhao, L., Chen, Y., Fan, L., Li, Z., Sun, Y., Wang, M., & Wang, F. (2019). The effects of zinc deficiency on homeostasis of twelve minerals and trace elements in the serum, feces, urine and liver of rats. *Nutrition and Metabolism*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0395-y>

## **6. CAPÍTULO 3: Detecção simultânea de zinco e fosfatase ácida em amostras forenses empregando análise por injeção sequencial com detecção colorimétrica**

### **Resumo**

A identificação de fluidos corporais é uma etapa crucial na investigação criminal, especialmente em casos de crimes sexuais que apresentam alta incidência. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), estima-se que uma a cada três mulheres no mundo sofreram violência física e/ou sexual. Neste contexto, para confirmar o estupro, realiza-se a coleta das amostras biológicas, como sêmen, encontradas na cena do crime ou na vítima. Assim, tem-se desenvolvido diferentes metodologias que possam suprimir as limitações existentes nos testes convencionais. Neste trabalho foi empregado um sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA) com detecção espectrofotométrica para detecção dual de fosfatase ácida (AP) e íons zinco, marcadores presentes no sêmen em concentrações elevadas. Nas condições otimizadas o sistema apresentou limite de detecção de  $9,4 \text{ U L}^{-1}$  para AP e  $3,1 \text{ }\mu\text{M}$  para Zn(II), com RSD menores que 2,8% e recuperações entre 97 e 110%. A seletividade do método foi avaliada empregando diferentes amostras biológicas (sêmen, saliva, urina e soro sanguíneo), sendo apenas a amostra de sêmen a que apresentou sinal significativo para ambos os marcadores. Logo, o sistema SIA desenvolvido permite realizar análises quali- e quantitativas com reduzido volume de amostra, assim, podendo ser uma importante ferramenta auxiliar na elucidação de crimes sexuais.

**Palavras-chaves:** Aplicação forense; detecção colorimétrica; marcadores; sêmen; SIA; espectrofotometria.

## 1. INTRODUÇÃO

Os crimes sexuais representam uma preocupação global, com estimativas que uma em cada três mulheres em todo o mundo (cerca de 736 milhões) sofrem violência física e/ou sexual ao longo da vida (WHO, 2021). Diante dos elevados níveis de subnotificação associados a esse tipo de crime, estima-se que o número real de casos seja significativamente maior que o registrado (Pallitto et al., 2013; Potter et al., 2021). Trata-se de uma causa importante, principalmente, para as mulheres e um problema global de saúde pública. Adicionalmente é um indicador do objetivo 5 estabelecido nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que trata da igualdade de gênero e do empoderamento de mulheres e meninas (United Nations, 2015).

Considerando as estatísticas e cenário, a ciência forense possui um papel fundamental no processo de investigação, uma vez que identificação de fluidos corporais constitui uma etapa crucial em estabelecer uma relação entre os vestígios coletados na vítima ou cena do crime e os suspeitos dos atos criminosos (Das et al., 2021; Sijen; Harbison, 2021). O sêmen, fluido com composição diversa e complexa, inclui frutose, colina, espermina, ácido cítrico, zinco e fosfatase ácida, entre outras espécies, é evidência mais encontrada e examinada em crimes sexuais (Gamblin; Morgan-Smith, 2020; Hoof; van de Voorde, 1997; Sakurada et al., 2020). O sêmen é considerado um marcador confiável em casos de estupro, coito anal e outras ocorrências forenses, onde diferentes metodologias de identificação são empregadas para determinar a presença ou ausência desse fluido corporal (Wasserstrom et al., 2013; Zha, et al., 2020). Após resultado positivo advindo de aplicação de um teste presuntivo, a confirmação da presença do sêmen, ocorre mediante identificação microscópica de espermatozoides, considerada como técnica de referência (Allery et al., 2001; Unuma et al., 2023), contudo, a quantidade e a temporalidade da amostra são fatores que pode comprometer a qualidade da análise. Além disto, existem também ensaios imunológicos de confirmação, como o teste do antígeno prostático específico (PSA) (Hussein et al., 2020; Johnson; Kotowski, 1993), todavia como limitação, este ensaio apresenta falsos positivos (Bitner, 2012; Unuma et al., 2023).

Os testes presuntivos, por sua vez, são empregados na triagem inicial de identificação dos fluidos biológicos e oferecem vantagens como, simplicidade e fácil manuseio (Vyas et al., 2020). Dentre os testes disponíveis tem-se as diferentes fontes de luz alternativas (ALS) e uso das reações enzimáticas (Vandenberg; Van Oorschot, 2006; Thang et al., 2018). As ALS comumente empregadas incluem lâmpadas de Wood, Bluemaxx, polilight e luz UV, porém, uma das principais limitações dessa estratégia é a

necessidade de usar variados comprimentos de onda para a detecção de diferentes fluidos corporais, além de resultados falso-positivos que podem ser gerados devido a presença de cosméticos na detecção de sêmen (Auvdel, 1987; Santucci et al., 1999; Tay, et al., 2021). O teste presuntivo com reação enzimática mais comum para detectar a presença de sêmen é o de fosfatase ácida (AP) (Herman et al., 2018). Essa enzima catalisa a hidrólise de fosfatos orgânicos, gerando um produto passível de reagir com um reagente cromogênico, e desta forma, alteração de cor (Greenfield; Sloan, 2002; Guo et al., 2019). Esse é o princípio associado aos testes que detectam a AP, os quais usam  $\alpha$ -naftil e o Brentamine Fast Blue (Gamblin; Morgan-Smith, 2020),  $\beta$ -naftol com Fast Garnet B (Ekundina et al., 2023) e o  $\alpha$ -naftol com Fast Red AL (Virkler; Lednev, 2009). No entanto, esses testes tendem a dar resultados falso-positivos e/ou falsos negativos, além da possibilidade de degradação da enzima em algumas situações (Bamberg et al., 2021).

Dadas as limitações dos testes presuntivos para detecção de sêmen, é necessário desenvolver novas metodologias que possam apresentar maior sensibilidade e seletividade durante a identificação deste tipo de amostra frente a outros fluidos corporais. Suzuki et al. (1983) apresentaram um método para a detecção de sêmen baseado na presença de zinco seminal, que não gerou resultados falso-positivos em outros fluidos corporais. Assim, os íons zinco pode ser considerados com um marcador melhor que a AP, além de ser menos suscetível à degradação (Budiman et al., 2023; Suttipasit, 2015). Nesse contexto, a detecção simultânea de AP e zinco pode reduzir a probabilidade de falsos negativos ou positivos, além de aumentar a confiabilidade dos resultados, uma vez que a presença de ambos os marcadores reforça a identificação do tipo material biológico (Hooft; van de Voorde, 1992).

Nesse sentido, a detecção simultânea desses marcadores pode ser monitorada em um sistema de análise de injeção sequencial (SIA), uma técnica analítica que se destaca por sua capacidade de automatizar e simplificar procedimentos laboratoriais. O SIA permite a introdução sequencial de amostras e reagentes, resultando em um controle rigoroso dos volumes utilizados, tempo de reação e medida dos sinais analíticos, além da minimização de erros associados ao operador (Hartwell, 2012; Tambaru et al., 2024). Essa abordagem reduz significativamente o consumo de reagentes e amostra, além de diminuir o tempo de análise, aumentando a eficiência do processo. O SIA é uma técnica conhecida por sua alta reprodutibilidade, garantindo a precisão e confiabilidade dos resultados. Além disso, é uma ferramenta útil em diferentes áreas, incluindo a química

forense (Chen et al., 2006; Economou, 2005; Hartwell; Grudpan, 2010; Pereira et al., 2022; Silvestre et al., 2011). Assim, neste trabalho, empregou-se um sistema SIA com detecção espectrofotométrica para detecção simultânea de íons zinco e AP presentes no sêmen, visando superar as limitações existentes nos testes presuntivos atuais.

## **2. EXPERIMENTAL**

### **2.1. Reagentes e soluções**

Todos os reagentes utilizados são de pureza analítica, não sendo necessários passos adicionais de purificação. A água ultrapura (condutividade  $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) utilizada para a preparação das soluções foi obtida de um purificador Milli-Q water plus (Millipore, Danvers, MA, EUA). A fosfatase ácida de batata (AP), o fenilfosfato de sódio dibásico di-hidratado (PP), a 4-aminoantipirina (4-AAP), o hexacianoferrato(III) de potássio, o fosfato dissódico, o tris(hidroximetil)aminometano e o ácido bórico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O sulfato de zinco heptahidratado, o 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), o dimetilsulfóxido (DMSO) e o acetato de sódio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A solução estoque de zinco a 31 mM foi preparada dissolvendo-se 10 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em 2 mL de água ultrapura. Para a solução estoque da enzima a  $7600 \text{ U L}^{-1}$ , 1 mg (7,6 U) foi dissolvido em 1 mL de tampão acetato 0,05 M (pH 5). A solução estoque de PAN a 4 mM foi preparada conforme a metodologia proposta por Hoofst et al. (1992). As soluções de 4-AAP a 2% (m/v) e de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  a 2% (m/v) foram preparadas em tampão Tris (0,2 M, pH 8,0). Todas as soluções foram diluídas, quando necessário, até a concentração final desejada.

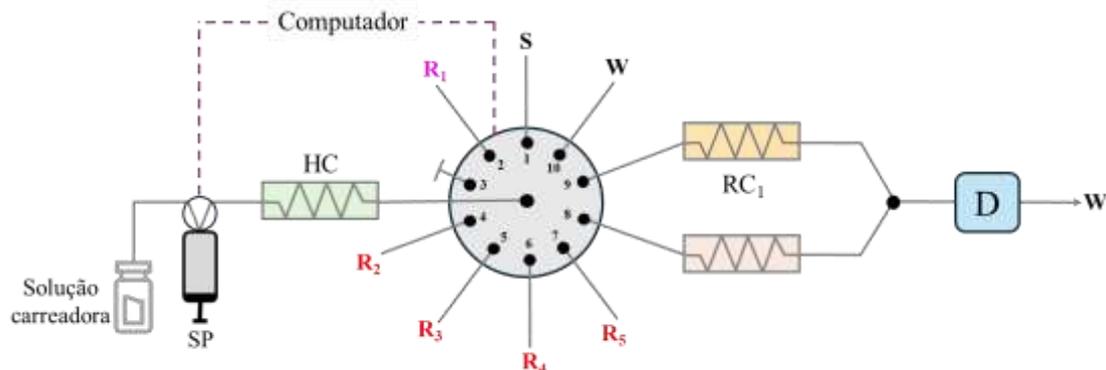
As soluções tampão foram preparadas pesando-se o sal apropriado para cada tampão, diluindo em água e, em seguida, ajustando o pH e o volume final aos níveis desejados: Tris (0,2 mM, pH 8,0), fosfato (0,2 mM, pH 8,0), borato (0,2 mM, pH 8,0) e acetato (0,05 mM, pH 5,0).

### **2.2 Sistema SIA**

O sistema SIA (Fig. 42) foi utilizado para o gerenciamento, mistura e operações relacionadas aos métodos espectrofotométricos de detecção de AP e  $\text{Zn}^{2+}$ . Esse sistema consistia em um módulo de seringa Bu1S da Crison Instruments SA (Allela, Barcelona, Espanha) para a propulsão das soluções e uma válvula multiposição Cheminert™ com

dez portas. O controle do sistema foi realizado por meio do software Microsoft QuickBasic 4.5.

**Figura 42.** Sistema SIA para a detecção de íons AP e  $Zn^{2+}$ . Solução transportadora (tampão Tris, 0,2 M, pH 8,0); *Syringe Pump* (SP); *Holding coil* (HC, 100 cm, diâmetro interno de 0,8 mm);  $R_1$  (PAN);  $R_2$  (substrato, PP);  $R_3$  (tampão acetato, 0,05 M, pH 5);  $R_4$  (4-AAP);  $R_5$  (oxidante,  $K_3Fe(CN)_6$ ); *Reaction coil* (RC, 15 cm); S (amostra); D (detector, 515 nm) e W (resíduo).



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

As medições foram realizadas a 515 nm utilizando um espectrofotômetro JenwayVR 6300 (Cole-Palmer Instrument Company, Antylia Scientific, Vernon Hills, IL, EUA), equipado com uma célula de fluxo de 10 mm e volume de 80  $\mu$ L (Hellma GmbH, Müllheim, Alemanha).

### 2.3 Procedimento de Análises por Injeção Sequencial

O ciclo analítico (Tabela 13) para a detecção simultânea dos marcadores consiste em 13 etapas, com um tempo total de análise de aproximadamente 6 minutos.

**Tabela 13.** Ciclo analítico SIA utilizado para a detecção de AP e íons  $Zn^{2+}$ . A vazão utilizada foi de 1 mL  $min^{-1}$  em todas as etapas.

Etapa	Posição	Solução	Volume ( $\mu$ L)	Tempo (s)	Ação
1	4	Substrato (PP)	80	4,8	Aspiração
2	1	Amostra (AP)	80	4,8	Aspiração
3	5	Tampão acetato	60	3,6	Aspiração
4	6	4-AAP	40	2,4	Aspiração
5	7	$K_3Fe(CN)_6$	40	2,4	Aspiração
6	8	Mistura	180	10,8	Propulsão para o detector e tempo de parada
7	1	Amostra ( $Zn^{2+}$ )	30	1,8	Aspiração
8	2	PAN	30	1,8	Aspiração
9	1	Amostra ( $Zn^{2+}$ )	30	1,8	Aspiração
10	2	PAN	30	1,8	Aspiração
11	9	Mistura	2000	120	Propulsão para o detector
12	8	Mistura	0	25	Período de parada na bobina de reação
13	8	Mistura	1840	110,4	Propulsão para o detector

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Para detecção da AP, 80 µL de substrato (PP), 80 µL da amostra, 60 µL de tampão acetato (pH 5), 40 µL de 4-AAP e 40 µL de oxidante (etapas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente) foram aspirados e enviados para o reator 1 (etapa 6). Em seguida, para detecção de  $Zn^{2+}$  foram aspirados 30 µL da solução de  $Zn^{2+}$  (etapa 7 e 9) e 30 µL de PAN (etapa 8 e 10), as quais foram propulsionadas para o reator 2, e em seguida para o sistema de detecção (etapa 11). Durante a aspiração das alíquotas (etapa 7 a 10) e detecção do zinco, o fluxo da AP permaneceu interrompido durante 180 s (etapa 12) para melhorar a mistura e aumentar o tempo de reação. De forma consecutiva, a AP foi detectada (etapa 13) após a detecção dos íons  $Zn^{2+}$ , ambos em 515 nm. Dessa forma, foram obtidos dois picos proporcionais a concentração dos analitos, ao final de cada ciclo analítico, correspondentes à AP e ao  $Zn^{2+}$ , respectivamente.

#### 2.4 Amostras reais e sintéticas

A metodologia foi aplicada em amostras de sêmen, saliva, soro sanguíneo e urina obtidas a partir de voluntários, com idade a partir de 18 anos e cientes do objetivo do trabalho (CAAE 57998116800005013). As amostras foram armazenadas em tubos falcon e condicionadas em freezer a  $-18^{\circ}C$ .

O sêmen sintético (SS) foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Owen e Katz (2005). Assim, para cada 10 mL de SS em solução tampão fosfato (0,01 M, pH 8,2), foram adicionados: citrato de sódio (81,3 mg), cloreto de potássio (9,1 mg), hidróxido de potássio (8,8 mg), frutose (27,2 mg), glicose (10,2 mg), ácido láctico (6,2 mg), ureia (4,5 mg), albumina sérica bovina (504 mg), cloreto de cálcio (10,1 mg), cloreto de magnésio (9,2 mg), cloreto de zinco (3,4 mg) e metilcelulose (0,17% m/v). A saliva foi preparada conforme a metodologia descrita por Shellis (1978), com adaptações. Para cada 5 mL de solução, foram adicionados: cloreto de cálcio (7,0 mg), cloreto de magnésio (1,0 mg), fosfato monopotássico (13 mg), fosfato dissódico (13 mg), cloreto de potássio (78 mg), cloreto de amônio (22 mg), tiocianato de potássio (11,5 mg), bicarbonato de sódio (32 mg), ureia (14,5 mg), mucina (12,5 mg), albumina (2,0 mg) e  $\alpha$ -amilase ( $3 \times 10^5$  unidades Somogyi). A urina foi preparada seguindo a metodologia proposta por Wilsenach et al. (2007), considerando a seguinte composição para 10 mL: cloreto de cálcio (3,2 mg), cloreto de magnésio (3,2 mg), cloreto de sódio (23 mg), sulfato de sódio (11,5 mg), citrato de sódio (3,2 mg), fosfato monopotássico (21 mg), cloreto de potássio (8,0 mg), cloreto de amônio (5,0 mg), ureia (125 mg) e creatinina (5,5 mg). O soro

sanguíneo foi avaliado utilizando o Cormay Serum HN (Polônia). Essas amostras foram utilizadas em ensaios de recuperação e na avaliação de potenciais interferentes.

## **2.5 Análise estatística**

Todas as análises foram feitas em triplicata, e os dados obtidos tratados matematicamente no software Excel para Windows (Microsoft) e Origin 9.0 (Microcal Software, USA), representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão (SD) com  $n \geq 3$ . A sensibilidade analítica foi estabelecida como principal critério de avaliação, definida a partir da inclinação da curva empregado modelo de regressão linear. A comparação entre os resultados de diferentes sistemas foi realizada por meio do teste *t* de Student (pareado), com um intervalo de confiança de 95%.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **3.1 Otimização do sistema SIA**

Inicialmente, no desenvolvimento do sistema SIA para avaliação dos marcadores de sêmen, as condições reacionais para detecção espectrofotométrica de AP e íons  $Zn^{2+}$  foram otimizadas (Tabela 14). Desta forma, diferentes parâmetros físico-químicos capazes de afetar o sinal analítico foram avaliados, dentre eles: ordem de aspiração dos reagentes e amostra, pH, sistema tampão, concentrações dos reagentes, volumes da amostra e reagente, e parâmetros intrínsecos do sistema em fluxo (tamanho do reator, vazões, tempo de parada de fluxo) e comprimentos de onda. A hidrólise do PP mediada pela AP gera fenol em meio ácido, o qual reage por condensação oxidativa com 4-AAP em meio alcalino empregando  $K_3Fe(CN)_6$  como oxidante gerando um produto colorido (Emerson; Kelly, 1948; Kim et al., 2015; Thongchai et al., 2009), enquanto os íons  $Zn^{2+}$  reagem com PAN formando um complexo colorido (Safari et al., 2011; Woźnica et al., 2014). A seleção das condições ótimas para cada marcador se baseou na sensibilidade analítica e reprodutibilidade (RSD).

**Tabela 14.** Parâmetros da otimização do sistema SIA para detecção de AP e íons  $Zn^{2+}$ .

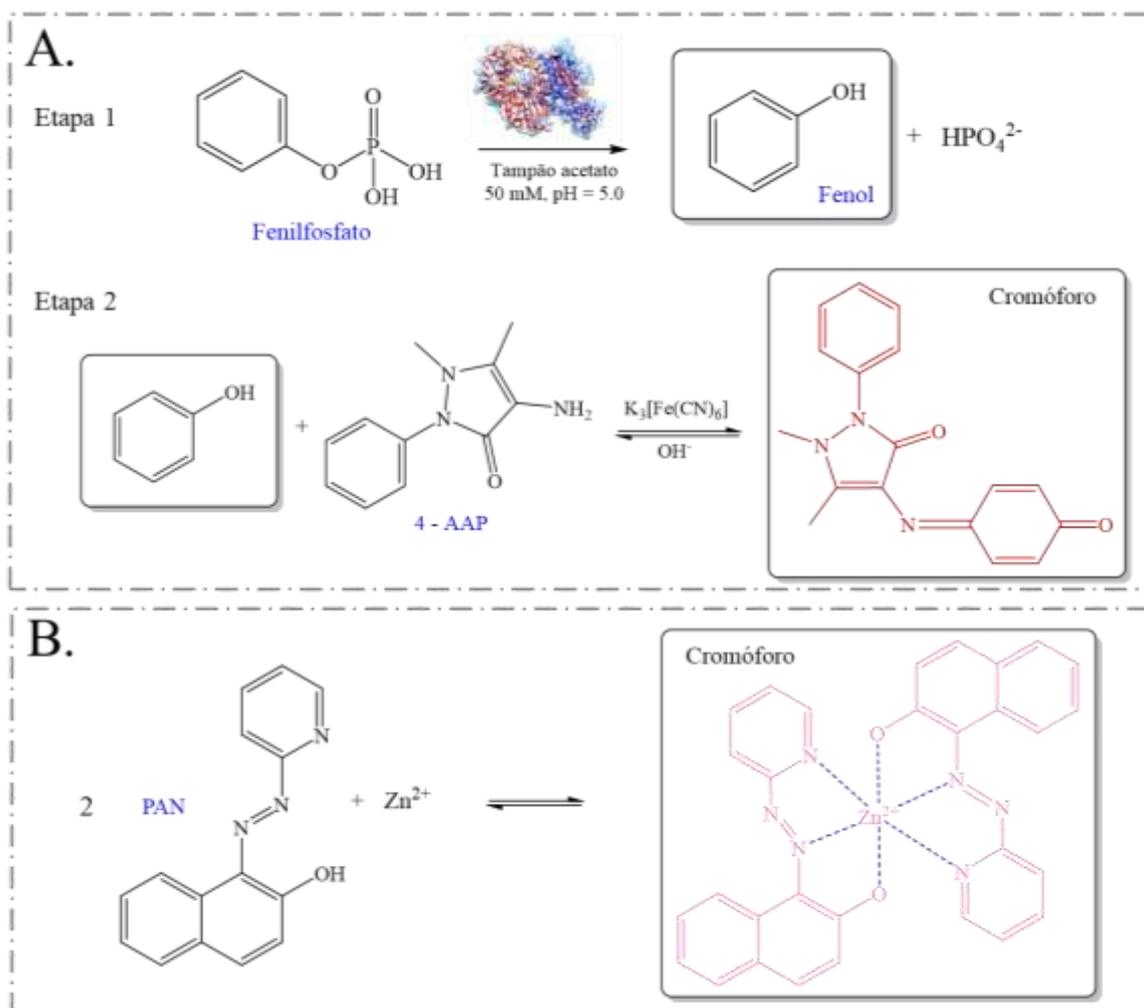
Analito	Parâmetros	Faixa avaliada	Condição selecionada
AP	Volume enzima / $\mu\text{L}$	60 - 100	80
	Volume substrato (PP) / $\mu\text{L}$	60 - 100	80
	Volume 4-AAP / $\mu\text{L}$	40 - 80	40
	Volume $K_3Fe(CN)_6$ / $\mu\text{L}$	40 - 80	40
	Concentração substrato (PP) / mM	5 - 20	10
	Concentração 4-AAP / % m/m	0,4 - 0,8	0,6
	Concentração $K_3Fe(CN)_6$ / % m/m	0,8 - 1,2	1,0
	Tamanho do reator 1 / cm	15 - 30	15
	Vazão 1 / $\text{mL min}^{-1}$	1,0 - 1,5	1,0
$Zn^{2+}$	Volume $Zn^{2+}$ / $\mu\text{L}$	20 - 80	60
	Volume PAN	40 - 100	60
	Concentração PAN / mM	50 - 500	250
	Tamanho do reator 2 / cm	15 - 30	15
	Vazão 2 / $\text{mL min}^{-1}$	1,0 - 1,5	1,0
Ambos	Comprimento de onda / nm	508 - 520	515

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 3.1.1 Ordem da reação e aspiração das alíquotas

No SIA as linhas contendo os reagentes são aspiradas sequencialmente para o reator, ocorrendo a formação dos cromóforos, os quais em seguida são transportados para o sistema de detecção (Worsfold et al., 2013). Para a reação enzimática (Fig. 43A), foram avaliadas três diferentes ordens de aspiração dos reagentes: (1) enzima - substrato (PP) - tampão acetato - 4-AAP - oxidante, (2) enzima - substrato - tampão acetato - oxidante - 4-AAP, e (3) substrato - enzima - tampão acetato - 4-AAP - oxidante (Tabela 15), essas ordens foram consideradas uma vez que na reação de acoplamento oxidativo, o fenol precisa ser previamente gerado a partir da hidrólise do substrato (Aljeboree et al., 2019; Powell; Smith, 1954). A ordem 1 proporcionou os melhores resultados, devido à maior sensibilidade na detecção do cromóforo. Esse resultado decorre da mistura mais efetiva da 4-AAP com o produto da reação enzimática, assegurando a disponibilidade do fenol para a reação de acoplamento.

**Figura 43.** Representação dos cromóforos formados após as reações. A. Geração do cromóforo de cor vermelha após a hidrólise do fenil fosfato (PP) na presença de AP, resultando na produção de fenol, que reage por condensação oxidativa com 4-AAP na presença de  $K_3Fe(CN)_6$  como oxidante. B. Formação do cromóforo de cor magenta após a reação dos íons  $Zn^{2+}$  com PAN.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Tabela 15.** Avaliação da ordem de reação para a detecção de AP e íons zinco.

Analito	Ordem	Sensibilidade ( $\times 10^{-3}$ A L $U^{-1}$ )	Intercepto
AP	1	$1,0600 \pm 0,0232^a$	$0,0474 \pm 0,0050^a$
	2	$0,6681 \pm 0,0244^b$	$0,0060 \pm 0,0053^b$
	3	$0,3008 \pm 0,0395^c$	$0,0043 \pm 0,0086^b$
$Zn^{2+}$	Ordem	Sensibilidade ( $\times 10^{-3}$ A $\mu M^{-1}$ )	Intercepto
	1	$3,2100 \pm 0,4675^d$	$0,0130 \pm 0,0160^d$
	2	$3,0300 \pm 0,3411^d$	$0,0167 \pm 0,0117^d$
	3	$4,7000 \pm 0,3752^f$	$0,0398 \pm 0,0128^c$
	4	$3,0886 \pm 0,2369^d$	$0,0255 \pm 0,0781^f$

As comparações pelo teste  $t$  de Student (pareado) são avaliadas separadamente entre os parâmetros (Sensibilidade e Intercepto) e os marcadores ( $Zn^{2+}$  e AP).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Na reação entre os íons  $Zn^{2+}$  e o PAN (Fig. 43B) também foram avaliadas diferentes ordens reacionais e adicionalmente, visando melhorar a homogeneidade da mistura e favorecer a formação do produto (Bourne, 2003). Foram duas condições: (i)  $Zn^{2+}$  - PAN e (ii) PAN -  $Zn^{2+}$ , sendo a primeira ordem a que propiciou os melhores resultados. As alíquotas da amostra e reagente foram aspiradas de forma intercaladas visando melhorar a mistura reacional e aumentar a formação do complexo. Desta forma, a condição selecionada foi com aspirações intercaladas de 30  $\mu$ L ( $Zn^{2+}$  - PAN -  $Zn^{2+}$  - PAN) perfazendo um volume total de 60  $\mu$ L de cada solução (Tabela 15). Esta estratégia ocasionou um aumento na sensibilidade de 47% quando comparado a condição inicial (aspiração de 60  $\mu$ L de cada solução). Contudo, fracionando o procedimento de aspiração em alíquotas de 15  $\mu$ L ( $Zn^{2+}$  - PAN -  $Zn^{2+}$  - PAN -  $Zn^{2+}$  - PAN), não houve aumento da sensibilidade comparada a condição anterior, indicando que a mistura foi efetiva quando se usou alíquotas de 30  $\mu$ L (amostra e reagente).

### ***3.1.2 Avaliação do pH e seleção do tampão***

A seleção do pH é uma etapa crítica na otimização de sistemas analíticos que envolvem derivados de ácidos fracos e enzimas, além disto, a compatibilidade da solução tampão com reagentes e macromoléculas, é um fator essencial para sensibilidade do método. Na hidrólise do substrato (PP) mediada pela AP, foi empregado o tampão acetato (50 mM, pH 5,0), uma vez que o pH ótimo para a atividade enzimática é  $\sim 5,0$  (Ajay et al., 2019). A condensação oxidativa da 4-AAP com o produto da reação enzimática, requer um meio suficientemente alcalino para favorecer a formação do cromóforo de coloração magenta (Kim et al., 2015; Thongchai et al., 2009), sendo descrito que em pH 8 a reação apresenta máxima sensibilidade (Dannis, 1951; Faust; Mikulewicz, 1967; Hu et al., 2021). Desta forma, este pH foi fixado para este sistema, ocorrendo apenas a avaliação do sistema tampão.

A complexação dos íons metálicos como  $Zn^{2+}$  com PAN também é favorecida em meio básico, contudo, deve-se considerar que pH superior a 9,0 pode levar a formação de precipitado e hidroxicomplexos de zinco no meio, assim, comprometendo a precisão e a sensibilidade do sistema SIA (Alabidi et al., 2021). Assim, a sensibilidade foi avaliada em pH 8 e 9 (Tabela 16) usando tampão borato pois apresenta eficiência de tamponamento entre 8 e 10 ( $pK_a = 9,24$ ) (Lopalco et al., 2020). O pH 8 apresentou

aumento de 20% na sensibilidade comparado a condição em pH 9, sendo desta forma, selecionado para investigações posteriores.

**Tabela 16.** Avaliação do pH na complexação de íons  $Zn^{2+}$  utilizando tampão borato.

Tampão	pH	Sensibilidade ( $\times 10^{-3}$ A $\mu M^{-1}$ )	Intercepto
Borato	8,0	$3,8700 \pm 0,3513^a$	$0,0312 \pm 0,0254^a$
	9,0	$3,0900 \pm 0,2002^b$	$0,0286 \pm 0,0099^a$

As comparações pelo teste *t* de Student (pareado) são avaliadas separadamente entre os parâmetros (Sensibilidade e Intercepto) e os marcadores ( $Zn^{2+}$  e AP).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Nas reações de condensação oxidativa (fenol + 4-AAP +  $K_3Fe(CN)_6$ ) e complexação dos íons  $Zn^{2+}$  com PAN, foram avaliados diferentes tampões no preparo dos reagentes e composição da solução carreadora. Uma vez estabelecido pH 8 como melhor condição em relação a sensibilidade dos métodos espectrofotométricos para detecção de AP e íons  $Zn^{2+}$ , avaliou-se os tampões Tris, fosfato e borato, todos a 200 mM (pH = 8,0). Para a reação de detecção da AP, o tampão Tris apresentou melhor sensibilidade, sendo 23% mais sensível que o fosfato, e 30% que o tampão borato. Na complexação dos íons  $Zn^{2+}$  com PAN os sistemas tampão avaliados não influenciaram significativamente na sensibilidade analítica, contudo, em tampão Tris houve redução de 60% dos valores do branco analítico (Tabela 17). Portanto, o tampão Tris (200 mM, pH 8,0) foi usando para detecção dos marcadores AP e  $Zn^{2+}$  no sistema SIA desenvolvido.

**Tabela 17.** Análise de tampões para reações envolvendo AP e íons  $Zn^{2+}$  em pH 8,0.

Analito	Tampão	Sensibilidade ( $\times 10^{-5}$ A L $U^{-1}$ )	Intercepto
AP	Borato	$2,4062 \pm 0,1055^a$	$0,0056 \pm 0,0023^a$
	Fosfato	$2,6183 \pm 0,3518^a$	$0,0062 \pm 0,0080^a$
	Tris	$3,3955 \pm 0,2882^b$	$0,0072 \pm 0,0048^a$
$Zn^{2+}$	Tampão	Sensibilidade ( $\times 10^{-3}$ A $\mu M^{-1}$ )	Intercepto
	Borato	$3,2700 \pm 0,0875^a$	$0,0319 \pm 0,0198^a$
	Fosfato	$3,1100 \pm 0,2433^a$	$0,0321 \pm 0,0062^a$
	Tris	$3,3000 \pm 0,0886^a$	$0,0132 \pm 0,0058^b$

As comparações pelo teste *t* de Student (pareado) são avaliadas separadamente entre os parâmetros (Sensibilidade e Intercepto) e os marcadores ( $Zn^{2+}$  e AP).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 3.1.3 Tempo de parada de fluxo

A complexação entre os íons  $Zn^{2+}$  e o PAN ocorre de forma imediata, evidenciada pela rápida formação do complexo colorido. Comparando a sensibilidade do método, houve redução de 24% para condição com parada de fluxo (3 min) (Tabela 18). Desta

forma, a condição selecionada para as próximas etapas foi sem parada de fluxo. O efeito da parada de fluxo também foi avaliado para o sistema com a AP, considerando as etapas de hidrólise e da reação colorimétrica (3 min), visando aumentar o contato entre a enzima e substrato, assim como, com reagentes.

**Tabela 18.** Avaliação do tempo de parada de fluxo na otimização analítica.

Analito	Tempo de parada (s)	Sensibilidade ( $\times 10^{-4}$ A L U <sup>-1</sup> )	Intercepto	
AP	0	1,2519 $\pm$ 0,1676 <sup>a</sup>	0,0095 $\pm$ 0,0270 <sup>a</sup>	
	180	1,5184 $\pm$ 0,1246 <sup>b</sup>	0,1672 $\pm$ 0,0144 <sup>b</sup>	
		Tempo de parada (s)	Sensibilidade ( $\times 10^{-3}$ A $\mu$ M <sup>-1</sup> )	Intercepto
Zn <sup>2+</sup>	0	2,9400 $\pm$ 0,0416 <sup>a</sup>	0,0068 $\pm$ 0,0003 <sup>a</sup>	
	180	2,1800 $\pm$ 0,1370 <sup>b</sup>	0,0035 $\pm$ 0,0073 <sup>a</sup>	

As comparações pelo teste *t* de Student (pareado) são avaliadas separadamente entre os parâmetros (Sensibilidade e Intercepto) e os marcadores (Zn<sup>2+</sup> e AP).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

O uso da estratégia de parada de fluxo para detecção da AP levou ao aumento de 18% na sensibilidade do método. Desta forma, durante o período de parada de fluxo referente a reação da AP, era possível realizar a detecção dos íons Zn<sup>2+</sup>, não comprometendo frequência analítica dos métodos.

### 3.1.4 Volume e concentração dos reagentes

O volume ótimo das soluções da enzima (amostra) e do substrato foram avaliados entre 60 e 100  $\mu$ L. De acordo com os valores de sensibilidade obtidos selecionou-se 80  $\mu$ L para cada solução, uma vez que maiores volumes maiores não resultaram em aumento proporcional da sensibilidade (Tabela 19), possivelmente devido a saturação do sistema e/ou efetividade da mistura entre as zonas dos reagentes e amostra.

Para melhorar a hidrólise do substrato (PP) frente a AP foi selecionado um volume de 60  $\mu$ L de solução tampão acetato (50 mM) entre as alíquotas da enzima e do reagente cromogênico (4-AAP), uma vez que, o processo catalítico é favorecido em meio ácido e que, as demais soluções foram preparadas em meio alcalino (Nigam et al., 1959). Para as soluções de 4-AAP e o K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, o intervalo de volume avaliada foi de 40 a 80  $\mu$ L, sendo escolhido para ambos o volume de 40  $\mu$ L, pois, evidenciou-se aumento do sinal do branco analítico em maiores volumes desses reagentes e consequente perda de detectabilidade do método.

Na reação de complexação entre os íons  $Zn^{2+}$  e o PAN, foram avaliados volumes de 20 a 80  $\mu L$  para a solução de zinco (amostra), enquanto para o reagente cromogênico de 60 a 100  $\mu L$ . O volume ótimo selecionado para o analito e o PAN foi de 60  $\mu L$  para ambos, decorrente da condição de melhor sensibilidade. O incremento do volume da solução do PAN (maior excesso do reagente) ocasionou um aumento do sinal do branco, desta forma, comprometendo a sensibilidade do método (Tabela 19).

**Tabela 19.** Variação dos volumes de reagentes utilizados no sistema SIA.

Analito	Reagente	Volume ( $\mu L$ )	Sensibilidade ( $\times 10^{-3} A L U^{-1}$ )	Intercepto
AP	Amostra	60	$0,9233 \pm 0,0637^a$	$0,0079 \pm 0,0156^a$
		80	$1,0300 \pm 0,0161^a$	$0,0456 \pm 0,0049^b$
		100	$1,0100 \pm 0,0175^a$	$0,0206 \pm 0,0033^c$
	Substrato (PP)	60	$0,9812 \pm 0,0300^a$	$0,0610 \pm 0,0058^a$
		80	$1,0300 \pm 0,0001^a$	$0,0568 \pm 0,0001^a$
		100	$1,0600 \pm 0,0052^a$	$0,0501 \pm 0,0020^a$
	4-AAP	40	$0,8185 \pm 0,0295^a$	$0,0442 \pm 0,0082^a$
		60	$0,5656 \pm 0,0611^b$	$0,0245 \pm 0,0225^b$
		80	$0,5913 \pm 0,0110^b$	$0,0456 \pm 0,0157^a$
	$K_3Fe(CN)_6$	40	$0,7719 \pm 0,0634^a$	$0,1051 \pm 0,0180^a$
		60	$0,7355 \pm 0,1323^a$	$0,0802 \pm 0,0252^a$
		80	$0,3535 \pm 0,0614^b$	$0,0456 \pm 0,0157^b$
$Zn^{2+}$	Reagente	Volume ( $\mu L$ )	Sensibilidade ( $\times 10^{-3} A \mu M^{-1}$ )	Intercepto
	Amostra	20	$1,1500 \pm 0,2574^a$	$0,0049 \pm 0,0111^a$
		60	$2,0200 \pm 0,2694^b$	$0,0351 \pm 0,0094^b$
		80	$1,1300 \pm 0,3437^a$	$0,0044 \pm 0,0144^a$
	PAN	40	$2,8600 \pm 0,4893^a$	$0,0132 \pm 0,0171^a$
		60	$3,8800 \pm 0,1328^b$	$0,0225 \pm 0,0042^a$
		100	$3,5100 \pm 0,0642^c$	$0,0443 \pm 0,0020^b$

As comparações pelo teste  $t$  de Student (pareado) são avaliadas separadamente entre os parâmetros (Sensibilidade e Intercepto) e os marcadores ( $Zn^{2+}$  e AP).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

O sinal analítico é diretamente proporcional ao aumento da concentração do analito, exceto, quando ocorre saturação do sistema ou formação de produtos secundários (Pérez-Olmos et al., 2005). Assim, após definir o volume das soluções variou-se a concentração dos reagentes para ambos os métodos (Tabela 20).

**Tabela 20.** Avaliação das concentrações de reagentes utilizadas na detecção dos marcadores AP e íons  $Zn^{2+}$ .

Analito	Reagente	Concentração	Sensibilidade ( $\times 10^{-3} A L U^{-1}$ )	Intercepto	
AP	Substrato (PP) / mM	5	0,6987 $\pm$ 0,0393 <sup>a</sup>	0,1322 $\pm$ 0,0152 <sup>a</sup>	
		10	1,0200 $\pm$ 0,0823 <sup>b</sup>	0,0841 $\pm$ 0,0259 <sup>b</sup>	
		15	1,1700 $\pm$ 0,0242 <sup>b</sup>	0,1128 $\pm$ 0,0085 <sup>c</sup>	
		20	1,0400 $\pm$ 0,1004 <sup>b</sup>	0,1736 $\pm$ 0,0364 <sup>d</sup>	
	4-AAP / % m/m	0,40	0,5980 $\pm$ 0,0398 <sup>a</sup>	0,1658 $\pm$ 0,0302 <sup>a</sup>	
		0,60	1,0200 $\pm$ 0,1027 <sup>b</sup>	0,0984 $\pm$ 0,0472 <sup>b</sup>	
		0,80	0,6740 $\pm$ 0,0905 <sup>a</sup>	0,2411 $\pm$ 0,0671 <sup>c</sup>	
	$K_3Fe(CN)_6$ / % m/m	0,80	0,7336 $\pm$ 0,0753 <sup>a</sup>	0,1246 $\pm$ 0,0287 <sup>a</sup>	
		1,00	0,9694 $\pm$ 0,0802 <sup>b</sup>	0,1068 $\pm$ 0,0331 <sup>b</sup>	
		1,20	0,8728 $\pm$ 0,0681 <sup>c</sup>	0,1577 $\pm$ 0,0129 <sup>a</sup>	
$Zn^{2+}$	PAN / mM	Reagente	Concentração	Sensibilidade ( $\times 10^{-3} A \mu M^{-1}$ )	Intercepto
		50	0,5750 $\pm$ 0,0914 <sup>a</sup>	0,0092 $\pm$ 0,0039 <sup>a</sup>	
		100	0,9912 $\pm$ 0,2364 <sup>b</sup>	0,0120 $\pm$ 0,0129 <sup>a</sup>	
		250	1,1200 $\pm$ 0,2887 <sup>b</sup>	0,0193 $\pm$ 0,0125 <sup>b</sup>	
		500	0,8323 $\pm$ 0,1898 <sup>c</sup>	0,0348 $\pm$ 0,0166 <sup>c</sup>	

As comparações pelo teste *t* de Student (pareado) são avaliadas separadamente entre os parâmetros (Sensibilidade e Intercepto) e os marcadores ( $Zn^{2+}$  e AP).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Para o substrato (PP) da reação enzimática, foi adotada uma concentração de 10 mM, uma vez que, acima desse valor a sensibilidade não foi alterada (Tabela 20). De forma similar, para a 4-AAP e  $K_3Fe(CN)_6$ , foi observado um acréscimo na sensibilidade até 0,6 e 1,0% (m/v), respectivamente, após esses valores não foi observado aumento significativo da sensibilidade analítica. Por fim, para a reação de complexação com o  $Zn^{2+}$ , a concentração de PAN foi avaliada de 50 a 500 mM, sendo selecionado a condição com 250 mM, a qual, resultou em um aumento de duas vezes na sensibilidade em relação a menor concentração do reagente cromogênico. Em concentrações superiores, observou-se redução na sensibilidade e aumento do sinal do branco analítico.

### 3.1.5 Tamanho do reator e vazão das soluções

O tamanho do reator e vazão das soluções foram avaliados, pois, a mistura eficiente dos reagentes e amostras na análise de fluxo é regulada por características geométricas e hidrodinâmicas do sistema (Tambaru et al., 2024). Assim, foram avaliados reatores de 15 e 30 cm, visando favorecer a mistura (Taljaard; Van Staden, 1998). Para ambas as reações, o reator de 15 cm mostrou-se ideal nas condições avaliadas, pois, com aumento do comprimento foi observada redução da sensibilidade de 13 a 18% para a AP e  $Zn^{2+}$  (Tabela 21), respectivamente, devido ao aumento da diluição das soluções.

**Tabela 21.** Influência do tamanho do reator na mistura das soluções.

Analito	Reator / cm	Sensibilidade ( $\times 10^{-4}$ A L U <sup>-1</sup> )	Intercepto
AP	15	7,5061 $\pm$ 0,7125 <sup>a</sup>	0,0771 $\pm$ 0,0472 <sup>a</sup>
	30	6,6254 $\pm$ 0,2778 <sup>b</sup>	0,0554 $\pm$ 0,0171 <sup>a</sup>
	Reator / cm	Sensibilidade ( $\times 10^{-3}$ A $\mu$ M <sup>-1</sup> )	Intercepto
Zn <sup>2+</sup>	15	2,1700 $\pm$ 0,0427 <sup>a</sup>	0,0034 $\pm$ 0,0015 <sup>a</sup>
	30	1,8700 $\pm$ 0,1112 <sup>b</sup>	0,0110 $\pm$ 0,0041 <sup>b</sup>

As comparações pelo teste *t* de Student (pareado) são avaliadas separadamente entre os parâmetros (Sensibilidade e Intercepto) e os marcadores (Zn<sup>2+</sup> e AP).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

A vazão da solução transportadora no sistema SIA regula o tempo de residência e o fator de diluição das espécies no sistema, logo, constitui um parâmetro relevante durante a otimização das condições, pois influencia diretamente na sensibilidade do sistema (Aldstadt III et al., 2006). A vazão da solução transportadora (tampão Tris, 200 mM, pH 8) foi avaliada em 1,0 e 1,5 mL min<sup>-1</sup> (Tabela 22). O aumento da vazão resultou na redução da sensibilidade, assim, para as investigações posteriores foi adotado 1,0 mL min<sup>-1</sup> para ambas as reações, pois favorece a mistura entre os reagentes.

**Tabela 22.** Variação na vazão da solução transportadora.

Analito	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Sensibilidade ( $\times 10^{-4}$ A L U <sup>-1</sup> )	Intercepto
AP	1,0	7,5858 $\pm$ 0,0607 <sup>a</sup>	0,0484 $\pm$ 0,0012 <sup>a</sup>
	1,5	7,4400 $\pm$ 0,1527 <sup>a</sup>	0,0680 $\pm$ 0,0103 <sup>a</sup>
	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Sensibilidade ( $\times 10^{-3}$ A $\mu$ M <sup>-1</sup> )	Intercepto
Zn <sup>2+</sup>	1,0	2,1700 $\pm$ 0,0427 <sup>a</sup>	0,0034 $\pm$ 0,0015 <sup>a</sup>
	1,5	1,7700 $\pm$ 0,0771 <sup>b</sup>	0,0020 $\pm$ 0,0035 <sup>a</sup>

As comparações pelo teste *t* de Student (pareado) são avaliadas separadamente entre os parâmetros (Sensibilidade e Intercepto) e os marcadores (Zn<sup>2+</sup> e AP).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 3.1.6 Avaliação do comprimento de onda

A reação de acoplamento oxidativo entre fenol e 4-AAP gera um cromóforo que apresenta uma única banda de absorção com máximo em 508 nm, enquanto, na reação de complexação entre íons zinco e PAN se observa duas bandas de absorção estreitas quase simétricas em 520 e 555 nm. No processo de otimização foi empregado 508 nm para medir o sinal referente a atividade enzimática da AP, e 520 nm para o sistema Zn<sup>2+</sup>/PAN. Desta forma, ambas as reações foram avaliadas nos comprimentos de onda de 508, 515 e 520 nm visando simplificar a detecção de dois marcadores em apenas um único comprimento de onda. Assim, foi selecionado 515 nm para realização das medidas espectrofotométricas (Tabela 23), pois esta condição que apresentou sensibilidade

adequada para ambos os marcadores considerando os parâmetros instrumentais avaliados e as concentrações destes em amostras de sêmen.

**Tabela 23.** Influência do comprimento de onda na detecção.

$\lambda$ / nm	Sensibilidade		Intercepto	
	AP ( $\times 10^{-3}$ A L U <sup>-1</sup> )	Zn <sup>2+</sup> ( $\times 10^{-3}$ A $\mu$ M <sup>-1</sup> )	AP	Zn <sup>2+</sup>
508	1,7900 $\pm$ 0,2876 <sup>a</sup>	0,8082 $\pm$ 0,0255 <sup>a</sup>	0,0096 $\pm$ 0,0219 <sup>a</sup>	0,0396 $\pm$ 0,0013 <sup>a</sup>
515	2,2400 $\pm$ 0,1914 <sup>b</sup>	3,3500 $\pm$ 0,1949 <sup>b</sup>	0,0223 $\pm$ 0,0113 <sup>b</sup>	0,0229 $\pm$ 0,0097 <sup>b</sup>
520	1,4600 $\pm$ 0,0931 <sup>c</sup>	2,4800 $\pm$ 0,1029 <sup>c</sup>	0,0731 $\pm$ 0,0078 <sup>c</sup>	0,0138 $\pm$ 0,0051 <sup>c</sup>

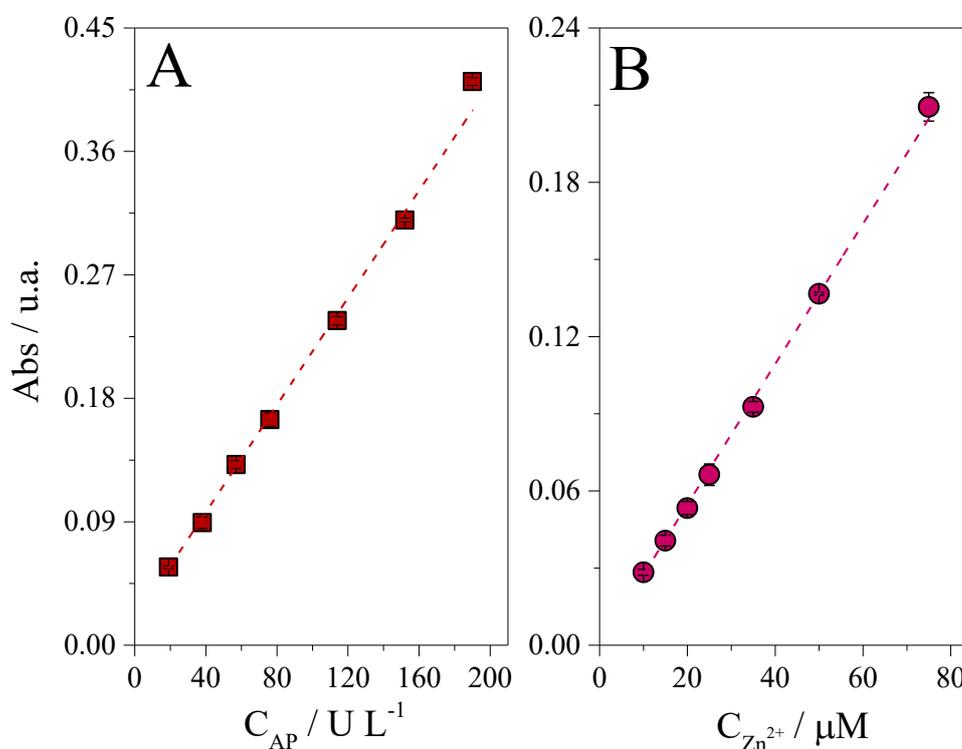
As comparações pelo teste *t* de Student (pareado) são avaliadas separadamente entre os parâmetros (Sensibilidade e Intercepto) e os marcadores (Zn<sup>2+</sup> e AP).

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 3.2 Figuras de mérito

Nas condições otimizadas do método para os marcadores AP e íons Zn<sup>2+</sup> (Fig. 44) foram determinadas as principais figuras de mérito (Tabela 24). Para a AP foi obtida resposta linear de 19 a 190 U L<sup>-1</sup> correspondente equação  $A_{515} = 0,0020(\pm 0,0001) \times C_{AP} + 0,0130(\pm 0,0043)$ , com  $R^2 = 0,9960$  ( $n = 7$ ) empregando modelo de regressão linear, com LOD = 9,4 U L<sup>-1</sup> e RSD de 1,3 a 2,2%. Para os íons Zn<sup>2+</sup> nas condições de melhor performance analítica apresentou faixa linear de 10 a 75  $\mu$ M correspondente equação  $A_{515} = 0,0028(\pm 0,0001) \times C_{Zn} + 0,0002(\pm 0,0011)$ , com  $R^2 = 0,9984$  ( $n = 7$ ) com LOD = 3,1  $\mu$ M e RSD de 0,7 a 2,8%. O método apresentou boa repetibilidade baseado nos valores de desvio padrão relativo (RSD) em diferentes níveis de concentração da amostra.

**Figura 44.** Linearização da curva analítica e obtenção dos parâmetros de regressão linear com os valores de incerteza para o método. A. Curva para detecção de AP; B. Curva para detecção dos íons  $Zn^{2+}$ .



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Tabela 24.** Figuras de mérito do método SIA.

Figuras de mérito	AP (U L <sup>-1</sup> )	Zn <sup>2+</sup> (μM)
Faixa linear	19 – 190	10 – 75
Equação de regressão ( $n = 7$ )	$0,0020 \times C_{AP} + 0,0188$	$0,0028 \times C_{Zn} + 0,0002$
R <sup>2</sup>	0,9960	0,9984
Limite de detecção ( $3\sigma$ , $n = 10$ )	9,4	3,1
RSD, % ( $n = 10$ ) (amostra conc.)	2,2 - 1,3% (38 and 114 U L <sup>-1</sup> )	0,7 - 2,8 % (10 and 50 μM)
Frequência de determinação, número determ. h <sup>-1</sup>	10	20
determinação única		
determinações sequenciais		10

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

As condições otimizadas possibilitaram uma frequência de 10 e 20 determinações por hora, para AP e íon  $Zn^{2+}$ , respectivamente, para determinações individuais dos marcadores. Considerando as determinações de forma sequencial, a frequência é de aproximadamente 10 determinações por hora, uma vez que, a reação dos íons  $Zn^{2+}$  ocorrem durante a parada de fluxo da reação enzimática.

### 3.3 Aplicação do método em amostras

Os estudos de recuperação foram realizados adicionando diferentes níveis de AP e íons  $Zn^{2+}$  em amostras de sêmen humano (Tabela 25). As recuperações apresentaram valores entre 99 a 110% para AP, enquanto para o  $Zn^{2+}$  se obteve de 97 a 104%, indicando o método não apresenta efeito de matriz. Os valores de recuperação encontram-se dentro do intervalo de 80 - 120% para amostras de composição complexa, indicando que é exato (Fang; Qian, 2005; Montagner; Jardim, 2011; Speltini et al., 2017).

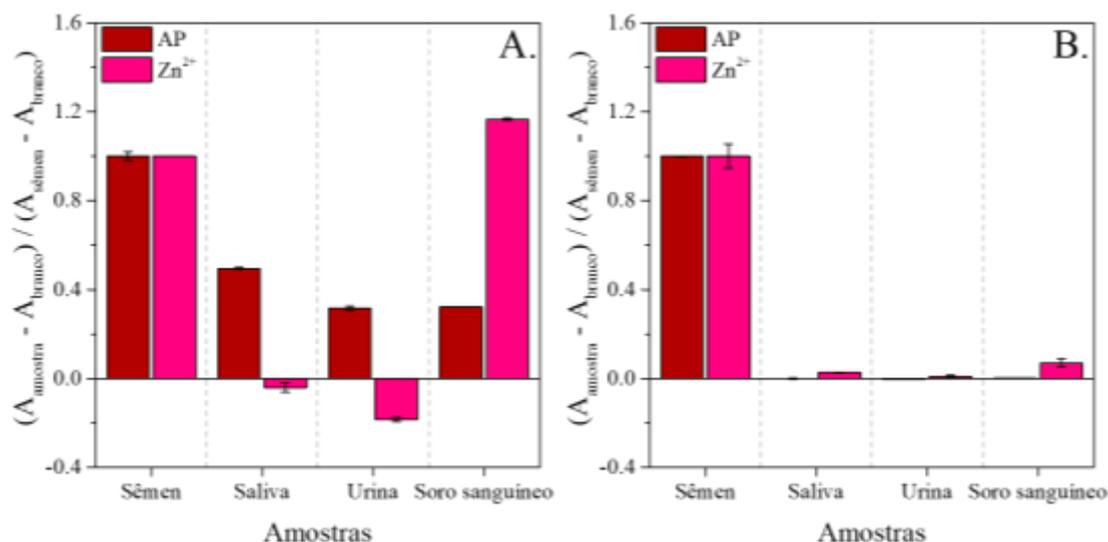
**Tabela 25.** Valores de recuperações em amostra sintética de sêmen para AP e  $Zn^{2+}$ .

Marcador	Adicionado ( $U L^{-1}$ )	Encontrado ( $U L^{-1}$ )	Recuperado (%)	RSD (%)
AP	0	25,5	-	1,7
	50	76,2	101	0,7
	75	110,8	110	0,3
	125	148,9	99	2,0
	Adicionado ( $\mu M$ )	Encontrado ( $\mu M$ )	Recuperado (%)	RSD (%)
$Zn^{2+}$	0	18,8	-	0,2
	10	28,0	97	0,3
	20	40,4	104	0,7
	40	58,6	100	0,9

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Diferentes fluídos corporais podem ser encontrados na cena de crime, logo, avaliar a possível interferência dessas amostras frente ao método analítico é uma etapa essencial (Virkler; Lednev, 2009). Assim, foi avaliada a seletividade do método para os dois marcadores (AP e  $Zn^{2+}$ ), empregando diferentes amostras sintéticas e reais (sêmen, saliva, urina e soro sanguíneo) (Fig. 45). A diluição em todas as amostras sintéticas foi de 100 vezes, condição necessária para avaliação na amostra de sêmen (Fig. 45A). As amostras reais foram diluídas em 4000 vezes para a AP e 250 vezes para os íons de zinco, nenhuma das demais amostras avaliadas apresentaram interferência (Fig. 45B).

**Figura 45.** Avaliação da seletividade do método frente a diferentes amostras biológicas. A. Amostras sintéticas, B. Amostras reais. O sinal analítico foi normalizado, usando o branco analítico e o sinal da amostra de sêmen como referência.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Ao comparar a detecção dos analitos no método SIA desenvolvido com os procedimentos em batelada empregado para detecção de AP e Zn<sup>2+</sup> em diferentes amostras (Tabela 26) observou-se que o método é adequado para a finalidade proposta, com faixa linear, limites de detecção e recuperações comparáveis a métodos descritos na literatura (batelada) com diferentes sistemas de detecção (espectrofotométrica, espectrofluorimétrica e eletroquímicos).

O método SIA mostrou-se seletivo para detecção de sêmen empregando a estratégia de detecção dual baseada nos marcadores AP e íons Zn<sup>2+</sup>. Essa abordagem reduz aspectos relacionados a falsos positivos, uma vez que o sêmen apresenta concentrações elevadas de ambos os analitos. Quando aplicado à diferentes amostras, a seletividade do método foi comprovada, visto que, somente o sêmen apresentou um sinal expressivo para ambos os marcadores, isto é, as demais amostras testaram negativo para pelo menos um dos marcadores avaliados. Portanto, o método SIA proposto apresenta alta confiabilidade na identificação de sêmen, minimizando potenciais interferências.

**Tabela 26.** Comparação entre os métodos SIA e batelada na detecção do analito.

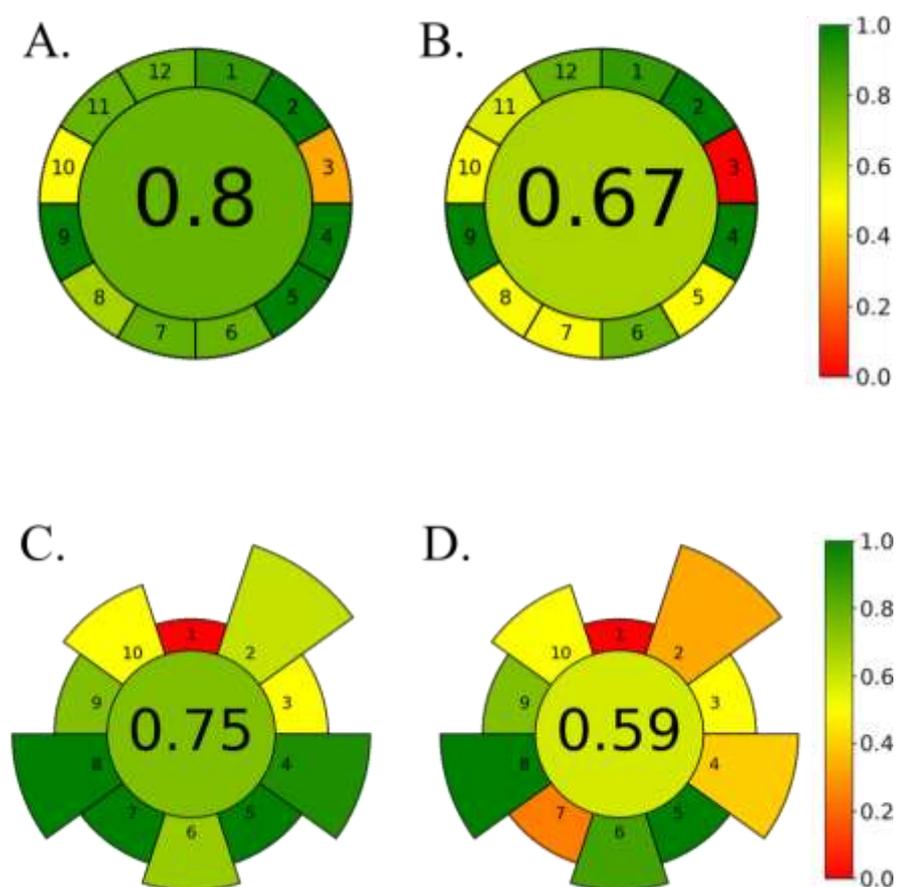
	Este trabalho	Hu et al., 2016	Guo et al., 2019	Qian et al., 2015	Huang et al., 2016	Huang et al., 2020	
<i>AP</i>	Amostra	Semen	blood	serum	-	serum	
	Método	SIA	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada	
	Faixa linear (U L <sup>-1</sup> )	19 – 190	20 - 220	0,05 – 40	18,2 – 1300	3,8 – 22,8	0,05 - 100
	Deteção	espectrofotométrica	espectrofotométrica	espectrofotométrica	fluorescente	fluorescente	Fotoeletroquímica
	LOD (U L <sup>-1</sup> )	9,4	3,2	0,0088	5,5	1,3	0,016
	RSD (%)	1,0	-	4,3	-	1,2	5,2
	Recuperação (%)	93,0 - 100,9	-	-	80	97,8 - 98,8	97,0 – 104,0
	Este trabalho	Uddin et al., 2013	Islam; Ahmed, 2013	Amin; Issa, 2003	van Staden; Tsanwani, 2001	Ribeiro; Masini, 2014	
<i>Zn<sup>2+</sup></i>	Amostra	Semen	water	blood	serum	pharmaceutical	
	Método	SIA	Batelada	Batelada	Batelada	SIA	
	Faixa linear (µM)	10 – 75	15 - 185	0,3 – 61	0,1 – 5,4	150 - 915	0,3 - 7,7
	Deteção	espectrofotométrica	espectrofotométrica	espectrofotométrica	espectrofotométrica	espectrofotométrica	eletroquímica
	LOD (µM)	3,0	4,4	0,076	0,024	6,4	0,06
	RSD (%)	0,7	4,4	1,0	1,5	0,9	7,0
	Recuperação (%)	87,7 - 99,3	94,8 - 102,0	-	98,3 – 101,2	98,5	71,7 – 105,0

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

### 3.4 Comparação dos métodos SIA e batelada com base nos princípios da química verde

Procedimentos analíticos mais seguros para os usuários e menos agressivos ao meio ambiente são o foco da química analítica verde. Para avaliar o impacto ambiental de uma metodologia analítica diferentes critérios podem ser avaliados, como a quantidade e toxicidade dos reagentes utilizados, geração de resíduos, consumo energético, miniaturização e automação do procedimento (Kowtharapu et al., 2023; Yin et al., 2024). Assim, para avaliar as características do procedimento que aderem aos princípios da química verde, foram comparadas duas ferramentas métricas para cálculo, o AGREE (Fig. 46A, B) e AGREEprep (Fig. 46C, D) (Pena-Pereira et al., 2020; Wojnowski et al., 2022), realizando a comparação entre o procedimento em SIA e os métodos em batelada. O desempenho do procedimento em cada princípio é representado por uma escala de cores intuitiva, que varia entre o vermelho, amarelo e verde, além de uma escala métrica, sendo que mais próximo da unidade indica maior proximidade com um procedimento mais verde.

**Figura 46.** Avaliação AGREE dos métodos de detecção de íons AP e  $Zn^{2+}$ : (A) SIA e (B) em batelada. Avaliação AGREEprep (C) SIA e (D) em batelada.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Para o método SIA (Fig. 46A) e batelada (Fig. 46B) utilizando a calculadora AGREE, que compreende os 12 princípios da química verde, obteve-se os valores de 0,8 e 0,67, respectivamente. Indicando que o SIA é um procedimento mais verde (mais próximo de 1), assim, o método é considerado mais verde. Visto que, o AGREE possui algumas limitações como, não considerar a ecologização da preparação da amostra e consumo energético, o AGREEprep foi proposto para preencher essa lacuna (López-Lorente et al., 2022), contudo, essa ferramenta avalia 10 princípios da química verde focando na preparação de amostra, assim, foram obtidos índices de 0,75 para o procedimento em SIA (Fig. 46C) e 0,59 para batelada (Fig. 46D). Desta forma, ambas as ferramentas foram concordantes em relação ao procedimento SIA como sendo mais sustentável. Portanto, os índices calculados estão associados as diferentes vantagens que o sistema SIA desenvolvido possui, como: redução do consumo de amostra, reagentes e da geração de resíduos, processo automatizado, detecção dual, tempo de análise reduzido e a exposição do operador é minimizada.

#### 4. CONCLUSÃO

O sistema desenvolvido SIA com detecção dual de AP e íons  $Zn^{2+}$  mostrou-se sensível, preciso, seletivo e passível de ser implementado em análise de rotina para identificação de amostras de sêmen. Os LOD obtidos permitem identificar a amostra de sêmen em níveis vestigiais, conferindo alta eficácia e confiabilidade a metodologia. A seletividade do método foi comprovada frente a amostras sintéticas complexas e amostras reais (salina, urina e soro sanguíneo), demonstrado que a detecção dual dos marcadores AP e  $Zn^{2+}$  permite a identificação do sêmen de forma inequívoca. Assim, o método desenvolvido pode contribuir em investigações criminais, minimizando falsos positivos, reduzindo o volume e a manipulação da amostra, e superando limitação dos métodos existentes.

#### 5. REFERÊNCIAS

- Ajay, S., Priyanka, V., Hiren, V., & Priyanka, M. (2019). Study on Acid Phosphatase Enzyme Activity in Semen Mixed with Various Body Fluids. *Journal of Forensic Science & Criminal Investigation*, 11(5), 555-558. [10.19080/JFSCI.2019.11.555823](https://doi.org/10.19080/JFSCI.2019.11.555823)
- Alabidi, H. M., Farhan, A. M., & Al-Rufaie, M. M. (2021). Espectrofotométrica determination of Zn (II) in pharmaceutical formulation using a new Azo reagent as derivative of 2-naphthol. *Current Applied Science and Technology*, 176-187. [10.14456/cast.2021.17](https://doi.org/10.14456/cast.2021.17)
- Aldstadt III, J. H., Olson, D. C., Wolcott, D. K., Marshall, G. D., & Stieg, S. W. (2006). Flow and sequential injection analysis techniques in process analysis. *Encyclopedia of*

*Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation.*  
10.1002/9780470027318.a2104

Aljeboree, A. M., Alshirifi, A. N., Abdulrazzak, F. H., Abbas, A. S., & Alkaim, A. F. (2019). Colorimetric Determination of pharmaceutical dyes Using 4-Aminoantipyrine: Oxidative coupling review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(3), 912-918.

Allery, J. P., Telmon, N., Mieusset, R., Blanc, A., & Rougé, D. (2001). Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *Journal of forensic sciences*, 46(2), 349-351. <https://doi.org/10.1520/JFS14970J>

Amin, A. S., & Issa, Y. M. (2003). Utility of formazans and cetylpyridinium chloride in rapid espectrofotométrica determination of zinc in biological materials and pharmaceutical formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 31(3), 491-497. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00683-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00683-0)

Auvdel, M. J. (1987). Comparison of laser and ultraviolet techniques used in the detection of body secretions. *Journal of Forensic Sciences*, 32(2), 326-345. <https://doi.org/10.1520/JFS11136J>

Bamberg, M., Dierig, L., Kulstein, G., Kunz, S. N., Schwender, M., Hadrys, T., & Wiegand, P. (2021). Development and validation of an mRNA-based multiplex body fluid identification workflow and a rectal mucosa marker pilot study. *Forensic Science International: Genetics*, 54, 102542. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102542>

Bitner, S. E. (2012). False positives observed on the Seratec® PSA SemiQuant cassette test with condom lubricants. *Journal of forensic sciences*, 57(6), 1545-1548. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02141.x>

Bourne, J. R. (2003). Mixing and the selectivity of chemical reactions. *Organic Process Research & Development*, 7(4), 471-508. <https://doi.org/10.1021/op020074q>

Budiman, F., Gabriella, M., & Christabel, M. (2023). Medicolegal Aspects and Sperm Examination Procedures in Rape Cases: A Narrative Literature Review. *Sriwijaya Journal of Forensic and Medicolegal*, 1(1), 12-19. <https://doi.org/10.59345/sjfm.v1i1.39>

Chen, Y., Carroll, A. D., Scampavia, L., & Ruzicka, J. (2006). Automated method, based on micro-sequential injection, for the study of enzyme kinetics and inhibition. *Analytical sciences*, 22(1), 9-14. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.9>

Dannis, M. (1951). Determination of phenols by the amino-antipyrine method. *Sewage and Industrial wastes*, 1516-1522. doi:10.2307/25031773

Das, T., Ammal, A., Harshey, A., Mishra, V., & Srivastava, A. (2021). Vibrational spectroscopic approaches for semen analysis in forensic investigation: State of the art and way forward. *Microchemical Journal*, 171, 106810. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106810>

Economou, A. (2005). Sequential-injection analysis (SIA): a useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 416-425. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.12.004>

Ekundina, V., Ejelue, C., & Omon, E. (2023). Rape: The role of histocytopathologist in Nigeria. *AlQalam Journal of Medical and Applied Sciences*, 113-126.

Emerson, E., & KELLY, K. (1948). The condensation of aminoantipyrine. VI. A study of the effect of excess base on the reaction of amino-antipyrine with phenolic compounds in the presence of oxidizing agents. *The Journal of Organic Chemistry*, 13(4), 532-534.

Fang, Y., & Qian, M. C. (2005). Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique. *Journal of Chromatography A*, 1080(2), 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.024>

Faust, S. D., & Mikulewicz, E. W. (1967). Factors influencing the condensation of 4-aminoantipyrine with derivatives of hydroxybenzene—II. Influence of hydronium ion concentration on absorptivity. *Water Research*, 1(7), 509-522. doi:10.1016/0043-1354(67)90027-9

Gamblin, A. P., & Morgan-Smith, R. K. (2020). The characteristics of seminal fluid and the forensic tests available to identify it. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*, 2(3), e1363. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1363>

Greenfield, A., & Sloan, M. M. (2002). Identification of biological fluids and stains. In *Forensic Science* (pp. 231-248). CRC Press. <https://doi.org/10.4324/9781482274103>

Guo, Y., Li, X., Dong, Y., & Wang, G. L. (2019). Acid phosphatase invoked exquisite enzyme cascade for amplified colorimetric bioassay. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(8), 7572-7579. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05719>

Hartwell, S. K., & Grudpan, K. (2010). Flow based immuno/bioassay and trends in micro-immuno/biosensors. *Microchimica Acta*, 169, 201-220. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0333-1>

Herman, Y., Feine, I., & Gafny, R. (2018). Acid phosphatase test on Phadebas® sheets—An optimized method for presumptive saliva and semen detection. *Forensic science international*, 288, 218-222. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.04.047>

Hooft, P., & Van de Voorde, H. (1992). Evaluation of the modified zinc test and the acid phosphatase test as preliminary screening methods in sexual assault case material. *Forensic science international*, 53(2), 135-141. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(92\)90189-4](https://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90189-4)

Hooft, P., Van de Voorde, H., & Van Dijck, P. (1992). A more sensitive modification of the zinc test for seminal traces suitable for stable test paper strips. *Forensic science international*, 53(2), 131-133. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(92\)90188-3](https://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90188-3)

Hooft, P. J., & van de Voorde, H. P. (1997). Bayesian evaluation of the modified zinc test and the acid phosphatase spot test for forensic semen investigation. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 18(1), 45-49.

Hu, Q., Zhou, B., Li, F., Kong, J., & Zhang, X. (2016). Turn-on colorimetric platform for dual activity detection of acid and alkaline phosphatase in human whole blood. *Chemistry–An Asian Journal*, *11*(21), 3040-3045. <https://doi.org/10.1002/asia.201601006>

Hu, C. Y., Jiang, Z. W., Huang, C. Z., & Li, Y. F. (2021). Cu<sup>2+</sup>-modified MOF as laccase-mimicking material for colorimetric determination and discrimination of phenolic compounds with 4-aminoantipyrine. *Microchimica Acta*, *188*, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04944-5>

Huang, Y., Feng, H., Liu, W., Zhou, Y., Tang, C., Ao, H., & Qian, Z. (2016). Luminescent aggregated copper nanoclusters nanoswitch controlled by hydrophobic interaction for real-time monitoring of acid phosphatase activity. *Analytical chemistry*, *88*(23), 11575-11583. [10.1021/acs.analchem.6b02957](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02957)

Huang, M., Tian, J., Zhou, C., Bai, P., & Lu, J. (2020). Photoelectrochemical determination for acid phosphatase activity based on an electron inhibition strategy. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *307*, 127654. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127654>

Hussein, A. A., Baban, R., & Hussein, A. (2020). Prostate-specific antigen and free prostate-specific antigen/prostate-specific antigen ratio in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Baghdad Journal of Biochemistry and Applied Biological Sciences*, *1*(01), 18-26. <https://doi.org/10.47419/bjbabs.v1i01.28>

Islam, M. T., & Ahmed, M. J. (2013). A simple espectrofotométrica method for the trace determination of zinc in some real, environmental, biological, pharmaceutical, milk and soil samples using 5, 7-dibromo-8-hydroxyquinoline. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, *14*(1), 1.

Johnson, E. D., & Kotowski, T. M. (1993). Detection of prostate specific antigen by ELISA. *Journal of forensic sciences*, *38*(2), 250-258. <https://doi.org/10.1520/JFS13403J>

Kim, H. Y., Lee, H. J., and Chang, S. K. (2015). Reaction-based colorimetric signaling of Cu<sup>2+</sup> ions by oxidative coupling of phenols with 4-aminoantipyrine. *Talanta*, *132*, 625-629. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.048>

Kradtap Hartwell, S. (2012). Flow injection/sequential injection analysis systems: potential use as tools for rapid liver diseases biomarker study. *International journal of hepatology*, *2012*(1), 281807. <https://doi.org/10.1155/2012/281807>

Kowtharapu, L. P., Katari, N. K., Muchakayala, S. K., & Mariseti, V. M. (2023). Green metric tools for analytical methods assessment critical review, case studies and crucify. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *166*, 117196. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117196>

Lopalco, A., Lopedota, A. A., Laquintana, V., Denora, N., & Stella, V. J. (2020). Boric acid, a Lewis acid with unique and unusual properties: formulation implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *109*(8), 2375-2386. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.04.015>

López-Lorente, Á. I., Pena-Pereira, F., Pedersen-Bjergaard, S., Zuin, V. G., Ozkan, S. A., & Psillakis, E. (2022). The ten principles of green sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 148, 116530. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116530>

Montagner, C. C., & Jardim, W. F. (2011). Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 1452-1462. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000800008>

Nigam, V. N., Davidson, H. M., & Fishman, W. H. (1959). Kinetics of hydrolysis of the orthophosphate monoesters of phenol, p-nitrophenol, and glycerol by human prostatic acid phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 234(6), 1550-1554. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70048-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70048-3)

Owen, D. H., and Katz, D. F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of andrology*, 26(4), 459-469. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04104>

Pallitto, C. C., García-Moreno, C., Jansen, H. A., Heise, L., Ellsberg, M., & Watts, C. (2013). Intimate partner violence, abortion, and unintended pregnancy: results from the WHO Multi-country Study on Women's Health and Domestic Violence. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 120(1), 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2012.07.003>

Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE—Analytical GREENness metric approach and software. *Analytical chemistry*, 92(14), 10076-10082. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c01887>

Pereira, S. A. P., Baptista L, A. C., Biancalana, L., Marchetti, F., Dyson, P. J., & Saraiva, M. L. M. F. S. (2022). Automated approach for the evaluation of glutathione-S-transferase P1-1 inhibition by organometallic anticancer compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 1527–1536. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2073443>

Pérez-Olmos, R., Soto, J. C., Zárate, N., Araújo, A. N., Lima, J. L. F. C., & Saraiva, M. L. M. F. S. (2005). Application of sequential injection analysis (SIA) to food analysis. *Food Chemistry*, 90(3), 471-490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.046>

Potter, L. C., Morris, R., Hegarty, K., García-Moreno, C., & Feder, G. (2021). Categories and health impacts of intimate partner violence in the World Health Organization multi-country study on women's health and domestic violence. *International journal of epidemiology*, 50(2), 652-662. <https://doi.org/10.1093/ije/dyaa220>

Powell, M. E. A., & Smith, M. J. H. (1954). The determination of serum acid and alkaline phosphatase activity with 4-aminoantipyrine (AAP). *Journal of Clinical Pathology*, 7(3), 245. [10.1136/jcp.7.3.245](https://doi.org/10.1136/jcp.7.3.245)

Qian, Z., Chai, L., Zhou, Q., Huang, Y., Tang, C., Chen, J., & Feng, H. (2015). Reversible fluorescent nanoswitch based on carbon quantum dots nanoassembly for real-time acid

phosphatase activity monitoring. *Analytical chemistry*, 87(14), 7332-7339. [10.1021/acs.analchem.5b01488](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01488)

Ribeiro, L. F., & Masini, J. C. (2014). Automated determination of Cu (II), Pb (II), Cd (II) and Zn (II) in environmental samples by square wave voltammetry exploiting sequential injection analysis and screen printed electrodes. *Electroanalysis*, 26(12), 2754-2763. <https://doi.org/10.1002/elan.201400462>

Safari, Z., Gholivand, M. B., & Hosseinzadeh, L. (2011). Espectrofotométrica study of complex formations between 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) and some metal ions in organic solvents and the determination of thermodynamic parameters. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(5), 1606-1610. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.02.014>

Sakurada, K., Watanabe, K., & Akutsu, T. (2020). Current methods for body fluid identification related to sexual crime: focusing on saliva, semen, and vaginal fluid. *Diagnostics*, 10(9), 693. [10.3390/diagnostics10090693](https://doi.org/10.3390/diagnostics10090693)

Santucci, K. A., Nelson, D. G., McQuillen, K. K., Duffy, S. J., & Linakis, J. G. (1999). Wood's lamp utility in the identification of semen. *Pediatrics*, 104(6), 1342-1344. <https://doi.org/10.1542/peds.104.6.1342>

Shellis, R. P. (1978). A synthetic saliva for cultural studies of dental plaque. *Archives of Oral Biology*, 23(6), 485-489. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(78\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0003-9969(78)90081-X)

Speltini, A., Scalabrini, A., Maraschi, F., Sturini, M., & Profumo, A. (2017). Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review. *Analytica Chimica Acta*, 974, 1-26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.042>

Sijen, T., & Harbison, S. (2021). On the identification of body fluids and tissues: a crucial link in the investigation and solution of crime. *Genes*, 12(11), 1728. <https://doi.org/10.3390/genes12111728>

Silvestre, C. I., Pinto, P. C., Segundo, M. A., Saraiva, M. L. M., & Lima, J. L. (2011). Enzyme based assays in a sequential injection format: A review. *Analytica Chimica Acta*, 689(2), 160-177. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.048>

Suttiposit, P. (2015). Comparison of two seminal detection methods, the acid phosphatase test and the zinc test for sensitivities in sexually assaulted females positive of sperm. *Siriraj Medical Journal*, 67(4).

Suzuki, O., Kido, A., & Oya, M. (1983). Zinc test as a new tool for identification of human seminal stains. *Forensic Science International*, 22(2-3), 231-235. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(83\)90018-X](https://doi.org/10.1016/0379-0738(83)90018-X)

Taljaard, R. E., & Van Staden, J. F. (1998). Application of sequential-injection analysis as process analyzers. *Laboratory Robotics and Automation*, 10(6), 325-337. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2728\(1998\)10:6<325::AID-LRA3>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2728(1998)10:6<325::AID-LRA3>3.0.CO;2-L)

Trang, N. T., Sang, T. T., Hoang, N., Khanh, N. T. G., & Duc, T. T. (2018). Assessment of the level of seminal zinc and fructose concentration in seminal plasma of vietnamese infertile men. *International Journal of Research Science and Management*, 5(7), 71-82. [10.5281/zenodo.1314131](https://doi.org/10.5281/zenodo.1314131)

Thongchai, W., Liawruangrath, B., and Liawruangrath, S. (2009). Flow injection analysis of total curcuminoids in turmeric and total antioxidant capacity using 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Food chemistry*, 112(2), 494-499. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.083>

Uddin, M. N., Salam, M. A., & Hossain, M. A. (2013). Espectrofotométrica measurement of Cu (DDTC) 2 for the simultaneous determination of zinc and copper. *Chemosphere*, 90(2), 366-373. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.07.029>

United Nations. (2015). Transforming our world: The 2030 Agenda for Sustainable Development. <https://sdgs.un.org/>

Unuma, K., Sato, H., Wen, S., Makino, Y., Hirakawa, A., and Uemura, K. (2023). The proportion of false-positives in positive Seratec<sup>®</sup> prostate-specific antigen SemiQuant test results in postmortem screening for seminal fluid. *Legal Medicine*, 62, 102243. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2023.102243>

Vandenberg, N., & Van Oorschot, R. A. (2006). The use of Polilight<sup>®</sup> in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests. *Journal of Forensic Sciences*, 51(2), 361-370. [10.1111/j.1556-4029.2006.00065.x](https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00065.x)

van Staden, K. J., & Tsanwani, M. (2001). Determination of zinc in pharmaceutical products by use of a sequential injection analysis system. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 371, 376-379. <https://doi.org/10.1007/s002160100975>

Virkler, K., and Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1-3), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>

Vyas, B., Halamkova, L., & Lednev, I. K. (2020). A universal test for the forensic identification of all main body fluids including urine. *Forensic Chemistry*, 20, 100247. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100247>

Wasserstrom, A., Frumkin, D., Davidson, A., Shpitzen, M., Herman, Y., and Gafny, R. (2013). Demonstration of DSI-semen - a novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.08.009>

Wilsenach, J. A., Schuurbijs, C. A. H., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2007). Phosphate and potassium recovery from source separated urine through struvite precipitation. *Water research*, 41(2), 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.waters.2006.10.014>

Wojnowski, W., Tobiszewski, M., Pena-Pereira, F., & Psillakis, E. (2022). AGREEprep-analytical greenness metric for sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 149, 116553. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>

World Health Organization. (2021). *Violence against women prevalence estimates, 2018: global, regional and national prevalence estimates for intimate partner violence against women and global and regional prevalence estimates for non-partner sexual violence against women*. World Health Organization.

World Health Organization. (2021). *Violence against women prevalence estimates, 2018: global, regional and national prevalence estimates for intimate partner violence against women and global and regional prevalence estimates for non-partner sexual violence against women*. World Health Organization.

Worsfold, P. J., Clough, R., Lohan, M. C., Monbet, P., Ellis, P. S., Quétel, C. R., ... & McKelvie, I. D. (2013). Flow injection analysis as a tool for enhancing oceanographic nutrient measurements—A review. *Analytica Chimica Acta*, 803, 15-40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.06.015>

Woźnica, E., Maksymiuk, K., & Michalska, A. (2014). Polyacrylate microspheres for tunable fluorimetric zinc ions sensor. *Analytical chemistry*, 86(1), 411-418. doi:10.1021/ac4033142

Tambaru, D., Nagul, E. A., Almeida, M. I. G., & Kolev, S. D. (2024). Development of a sequential injection analysis method for the automatic speciation of inorganic selenium in water samples. *Microchemical Journal*, 201, 110688. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110688>

Tay, J. W., Joudo, J., Tran, T., Ta, H., Botting, J. L., Liew, Y. C., and Rye, M. S. (2021). Comparison of Crime-lite® 82S, Polilight® PL400 and Polilight® PL500 for the detection of semen and saliva stains. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 53(4), 483-493. <https://doi.org/10.1080/00450618.2020.1718208>

Trang, N. T., Sang, T. T., Hoang, N., Khanh, N. T. G., & Duc, T. T. (2018). Assessment of the level of seminal zinc and fructose concentration in seminal plasma of Vietnamese infertile men. *MOJ Biorg. Org. Chem*, 2(4), 185-190. [10.15406/mojboc.2018.02.00079](https://doi.org/10.15406/mojboc.2018.02.00079)

Yin, L., Yu, L., Guo, Y., Wang, C., Ge, Y., Zheng, X., ... & Shi, M. (2024). Green analytical chemistry metrics for evaluating the greenness of analytical procedures. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 101013. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2024.101013>

Zha, S., Wei, X., Fang, R., Wang, Q., Lin, H., Zhang, K., and Wang, Z. (2020). Estimation of the age of human semen stains by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a preliminary study. *Forensic Sciences Research*, 5(2), 119-125. <https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1642567>

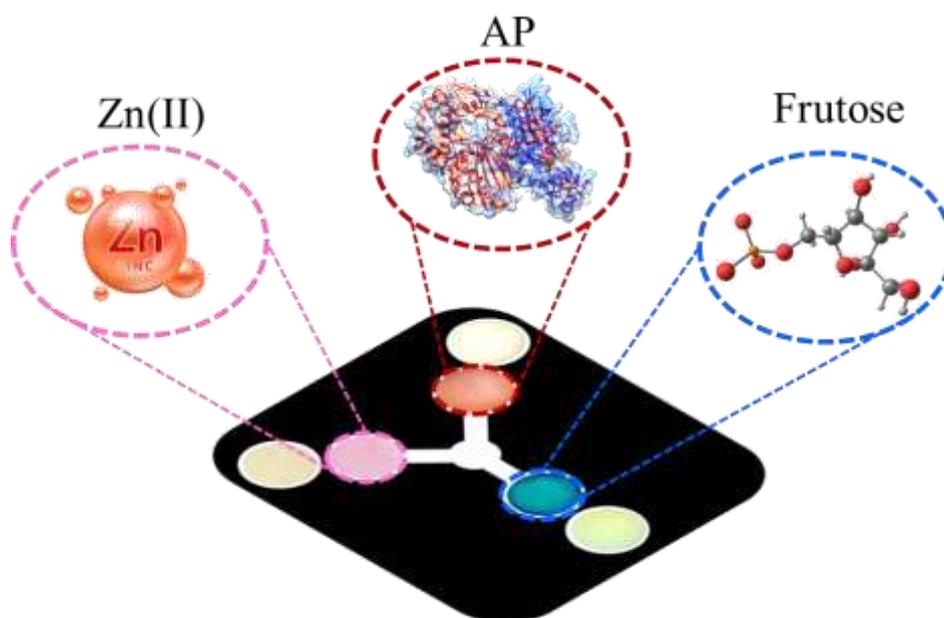
## 7. CONCLUSÃO GERAL

Em decorrência do número excessivo de casos de violência sexual contra a mulher, o desenvolvimento de dispositivos portáteis, capazes de detectar de forma simples e rápida marcadores forenses em fluidos biológicos, são possíveis alternativas para coibir esse tipo de crime. As metodologias desenvolvidas visam uma aplicação qualitativa e quantitativa, para frutose, fosfatase ácida e zinco, presentes no sêmen. Concordante com os resultados obtidos observam-se metodologias sensíveis, confiáveis e reprodutíveis, permitindo análises rápidas com aplicação *in loco*, apresentando forte contribuição científico-acadêmica e social. Diante disso, podem auxiliar nas investigações criminais, uma vez que, não apresentam as limitações expressas em outros testes, além da seletividade frente a outros fluidos biológicos e potenciais interferentes. Adicionalmente, esses métodos podem ser utilizados também como outros tipos de testes, a exemplo testes de infertilidade e diagnóstico de doenças.

## 8. PERSPECTIVAS

- Finalizar os ensaios com a Fosfatase ácida no  $\mu$ PAD (Anexo 2).
- Confecção e teste do  $\mu$ PAD com tripla detecção (Fig. 47).

**Figura 47.** Designer do COLOR – A, dispositivo com tripla detecção (frutose, fosfatase ácida e zinco).



Fonte: elaborado pela autora, 2025.

## 9. REFERÊNCIAS GERAIS

- Abe, K., Suzuki, K., and Citterio, D. (2008). Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. *Analytical chemistry*, 80(18), 6928-6934. <https://doi.org/10.1021/ac800604v>
- Agarwal, C., and Csóka, L. (2019). Recent Advances in Paper-Based Analytical Devices: A Pivotal Step Forward in Building Next-Generation Sensor Technology. *Sustainable Polymer Composites and Nanocomposites*, 479-517. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-05399-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-05399-4_18)
- Ahmad, M. K., Mahdi, A. A., Shukla, K. K., Islam, N., Jaiswar, S. P., and Ahmad, S. (2008). Effect of Mucuna pruriens on semen profile and biochemical parameters in seminal plasma of infertile men. *Fertility and sterility*, 90(3), 627-635. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1314>
- Ahmed, Z., Khan, M. S., Khan, M. A., ul Haq, A., and ur Rahman, J. (2010). Seminal fructose in various classes of infertile patients. *Pakistan Journal of Physiology*, 6(1), 36-38. <https://doi.org/10.69656/pjp.v6i1.744>
- Akyazi, T., Basabe-Desmonts, L., and Benito-Lopez, F. (2018). Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. *Analytica chimica acta*, 1001, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.010>
- Alaloosh, A., and Aljubori, N. (2019). Detection of Semen on the Underwear of Females Involved in Sexual Assaults by Using Prostate Specific Antigen (PSA) Kit and its Medicolegal Significance. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, 2(2), 18-24.
- Alizadeh, N., Salimi, A., and Hallaj, R. (2019). Mimicking peroxidase-like activity of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CeO<sub>2</sub> nanosheets integrated paper-based analytical devices for detection of glucose with smartphone. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.068>
- Allouche-Fitoussi, D., & Breitbart, H. (2020). The role of zinc in male fertility. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7796. <https://doi.org/10.3390/ijms21207796>
- Ameku, W. A., de Araujo, W. R., Rangel, C. J., Ando, R. A., and Paixao, T. R. (2019). Gold nanoparticle paper-based dual-detection device for forensics applications. *ACS applied nano materials*, 2(9), 5460-5468. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b01057>
- Amidu, N., Owiredo, W. K. B. A., Bekoe, M. A. T., and Quaye, L. (2012). The impact of seminal zinc and fructose concentration on human sperm characteristic. *Journal of Medical and Biomedical sciences*, 1(1), 14-20.
- Andrade, L. M., Romanholo, P. V., Ananias, A. C. A., Venancio, K. P., Silva-Neto, H. A., Coltro, W. K., and Sgobbi, L. F. (2023). Pocket test for instantaneous quantification of starch adulterant in milk using a counterfeit banknote detection pen. *Food Chemistry*, 405, 134844. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134844>
- Araujo, W. R., Cardoso, T. M., da Rocha, R. G., Santana, M. H., Muñoz, R. A., Richter, E. M., ... & Coltro, W. K. (2018). Portable analytical platforms for forensic chemistry: a review. *Analytica chimica acta*, 1034, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.014>

Assi, N., Rypar, T., Macka, M., Adam, V., and Vaculovicova, M. (2023). Microfluidic paper-based fluorescence sensor for L-homocysteine using a molecularly imprinted polymer and in situ-formed fluorescent quantum dots. *Talanta*, 255, 124185. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124185>

Ataide, V. N., Pradela Filho, L. A., Guinati, B. G. S., Moreira, N. S., Gonçalves, J. D., Ribeiro, C. M. G., and Paixão, T. R. L. C. (2023). Combining chemometrics and paper-based analytical devices for sensing: An overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117091. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117091>

Bales, C. W., Freeland-Graves, J. H., Askey, S., Behmardi, F., Pobocik, R. S., Fickel, J. J., & Greenlee, P. (1990). Zinc, magnesium, copper, and protein concentrations in human saliva: age- and sex-related differences. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(3), 462–469. <https://doi.org/10.1093/ajcn/51.3.462>

Basile, K. C., Black, M. C., Breiding, M. J., Chen, J., Merrick, M. T., Smith, S. G., ... & Walters, M. L. (2011). National intimate partner and sexual violence survey: 2010 summary report.

Bazyar, H. (2023). On the Application of Microfluidic-Based Technologies in Forensics: A Review. *Sensors*, 23(13), 5856. <https://doi.org/10.3390/s23135856>

Boobphahom, S., Nguyet Ly, M., Soum, V., Pyun, N., Kwon, O. S., Rodthongkum, N., and Shin, K. (2020). Recent advances in microfluidic paper-based analytical devices toward high-throughput screening. *Molecules*, 25(13), 2970. <https://doi.org/10.3390/molecules25132970>

Boward, E. S., and Wilson, S. L. (2013). A comparison of ABACard® p30 and RSID™-Semen test kits for forensic semen identification. *Journal of forensic and legal medicine*, 20(8), 1126-1130. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2013.09.007>

Brito-Pereira, R., Macedo, A. S., Ribeiro, C., Cardoso, V. F., & Lanceros-Méndez, S. (2022). Natural based reusable materials for microfluidic substrates: The silk road towards sustainable portable analytical systems. *Applied Materials Today*, 28, 101507. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2022.101507>

Bruzewicz, D. A., Reches, M., and Whitesides, G. M. (2008). Low-cost printing of poly (dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Analytical chemistry*, 80(9), 3387-3392. <https://doi.org/10.1021/ac702605a>

Bryzgunova, O. E., Skvortsova, T. E., Kolesnikova, E. V., Starikov, A. V., Rykova, E. Y., Vlassov, V. V., & Laktionov, P. P. (2006). Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1), 334-340. [10.1196/annals.1368.045](https://doi.org/10.1196/annals.1368.045)

Canale, D., Bartelloni, M., Negroni, A., Meschini, P., Izzo, P. L., Bianchi, B., & Menchini-Fabris, G. F. (1986). Zinc in human semen. *International journal of andrology*, 9(6), 477-480. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00909.x>

Cardozo, D. M., Guelsin, G. A., Clementino, S. L., de Melo, F. C., Braga, M. A., de Souza, C., & Visentainer, J. E. L. (2009). DNA extraction from coagulated human blood for application in genotyping techniques for human leukocyte antigen and immunoglobulin-like

receptors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(6). [10.1590/s0037-86822009000600008](https://doi.org/10.1590/s0037-86822009000600008)

Carrilho, E., Martinez, A. W., and Whitesides, G. M. (2009). Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical chemistry*, 81(16), 7091-7095. <https://doi.org/10.1021/ac901071p>

Casey, T., Mistek, E., Halámková, L., and Lednev, I. K. (2020). Raman spectroscopy for forensic semen identification: Method validation vs. environmental interferences. *Vibrational Spectroscopy*, 109, 103065. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103065>

Cate, D. M., Noblitt, S. D., Volckens, J., and Henry, C. S. (2015). Multiplexed paper analytical device for quantification of metals using distance-based detection. *Lab on a Chip*, 15(13), 2808-2818. <https://doi.org/10.1039/C5LC00364D>

Chhabra, P., Bhati, K., & Yadav, S. (2022). Sexual Offences: Recent Methods of Investigation. In *Crime Scene Management within Forensic Science: Forensic Techniques for Criminal Investigations* (pp. 155-183). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-6683-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-16-6683-4_7)

Chia, S. E., Ong, C. N., Chua, L. H., Ho, L. M., & Tay, S. K. (2000). Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *Journal of andrology*, 21(1), 53-57. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03275.x>

Childhood. A violência sexual infantil no Brasil (2019). Disponível em: <https://www.childhood.org.br/a-violencia-sexual-infantil-no-brasil/>. Acesso em: 06 de abril de 2025.

Christodoulides, N., De La Garza II, R., Simmons, G. W., McRae, M. P., Wong, J., Newton, T. F., and McDevitt, J. T. (2015). Application of programmable bio-nano-chip system for the quantitative detection of drugs of abuse in oral fluids. *Drug and alcohol dependence*, 153, 306-313. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.04.026>

Collins, K. A. (1998). The laboratory's role in detecting sexual assault. *Laboratory Medicine*, 29(6), 361-365. <https://doi.org/10.1093/labmed/29.6.361>

Cromartie, R. L., Wardlow, A., Duncan, G., and McCord, B. R. (2019). Development of a microfluidic device ( $\mu$ PADs) for forensic serological analysis. *Analytical Methods*, 11(5), 587-595. <https://doi.org/10.1039/C8AY02080A>

Dahlberg, L. L., and Krug, E. G. (2006). Violence a global public health problem. *Ciência & Saúde Coletiva*, 11(2), 277-292.

Dallmayr, R., Meyer, H., Gkinis, V., Laepple, T., Behrens, M., Wilhelms, F., & Hörhold, M. (2025). Assessment of continuous flow analysis (CFA) for high-precision profiles of water isotopes in snow cores. *The Cryosphere*, 19(3), 1067-1083. <https://doi.org/10.5194/tc-19-1067-2025>

Das, S., Gagandeep, and Bhatia, R. (2022). based microfluidic devices: Fabrication, detection, and significant applications in various fields. *Reviews in Analytical Chemistry*, 41(1), 112-136. <https://doi.org/10.1515/revac-2022-0037>

Das, T., Ammal, A., Harshey, A., Mishra, V., and Srivastava, A. (2021). Vibrational spectroscopic approaches for semen analysis in forensic investigation: State of the art and way forward. *Microchemical Journal*, *171*, 106810. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106810>

Dejous, C., and Krishnan, U. M. (2021). Sensors for diagnosis of prostate cancer: Looking beyond the prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, *173*, 112790. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112790>

Dissanayake, D. M. A. B., Wijesinghe, P. S., Ratnasooriya, W. D., & Wimalasena, S. (2010). Relationship between seminal plasma zinc and semen quality in a subfertile population. *Journal of human reproductive sciences*, *3*(3), 124-128. [10.4103/0974-1208.74153](https://doi.org/10.4103/0974-1208.74153)

Dube, S., Tharmavaram, M., Pandey, G., Rawtani, D., and Mustansar Hussain, C. (2020). Sensors for the detection of biological fluids. *Technology in Forensic Science: Sampling, Analysis, Data and Regulations*, 239-258. <https://doi.org/10.1002/9783527827688.ch12>

Dungchai, W., Chailapakul, O., and Henry, C. S. (2009). Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Analytical chemistry*, *81*(14), 5821-5826. <https://doi.org/10.1021/ac9007573>

Economou, A. (2005). Sequential-injection analysis (SIA): a useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *24*(5), 416-425. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.12.004>

Engel, K. M., Baumann, S., Rolle-Kampczyk, U., Schiller, J., von Bergen, M., & Grunewald, S. (2019). Metabolomic profiling reveals correlations between spermiogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. *PloS one*, *14*(2), e0211679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211679>

Fallah, A., Mohammad-Hasani, A., & Colagar, A. H. (2018). Zinc is an essential element for male fertility: a review of Zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization. *Journal of reproduction & infertility*, *19*(2), 69.

Fenton, E. M., Mascarenas, M. R., López, G. P., and Sibbett, S. S. (2009). Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. *ACS applied materials & interfaces*, *1*(1), 124-129. <https://doi.org/10.1021/am800043z>

Fleming, R. I., and Harbison, S. (2010). The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Science International: Genetics*, *4*(4), 244-256. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.006>

Fórum Brasileiro de Segurança Pública. Anuário brasileiro de segurança pública 2024. Disponível em: <https://forumseguranca.org.br/anuario-brasileiro-seguranca-publica/>

Gamblin, A. P., and Morgan-Smith, R. K. (2020). The characteristics of seminal fluid and the forensic tests available to identify it. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*, *2*(3), e1363. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1363>

- Garbieri, T. F., Brozoski, D. T., Dionisio, T. J., Santos, C. F., & Neves, L. T. D. (2017). Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. *Journal of Applied Oral Science*, 25(2), 147-158.
- García-Moreno, C., Pallitto, C., Devries, K., Stöckl, H., Watts, C., and Abrahams, N. (2013). *Global and regional estimates of violence against women: prevalence and health effects of intimate partner violence and non-partner sexual violence*. World Health Organization.
- Giampaoli, S., Berti, A., Valeriani, F., Gianfranceschi, G., Piccolella, A., Buggiotti, L., ... & Spica, V. R. (2012). Molecular identification of vaginal fluid by microbial signature. *Forensic Science International: Genetics*, 6(5), 559-564. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.01.005>
- Giroux, E. L., Durieux, M., & Schechter, P. J. (1976). A study of zinc distribution in human serum. *Bioinorganic Chemistry*, 5(3), 211-218. [https://doi.org/10.1016/S0006-3061\(00\)82019-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3061(00)82019-0)
- Goodwin, J. F. (1970). Quantification of Serum Inorganic Phosphorus, Phosphatase, and Urinary Phosphate without Preliminary Treatment. *Clinical Chemistry*, 16(9), 776–780. doi:10.1093/clinchem/16.9.776
- Haas, C., Klessner, B., Maake, C., Bär, W., and Kratzer, A. (2009). mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Science International: Genetics*, 3(2), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.11.003>
- Harms, M., von Maltitz, P., Groß, R., Mayer, B., Deniz, M., Müller, J., & Münch, J. (2022). Utilization of aminoguanidine prevents cytotoxic effects of semen. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8563. <https://doi.org/10.3390/ijms23158563>
- Harshey, A., Kumar, A., Kumar, A., Das, T., Nigam, K., and Srivastava, A. (2023). Focusing the intervention of paper-based microfluidic devices for the forensic investigative purposes. *Microfluidics and Nanofluidics*, 27(10), 65. <https://doi.org/10.1007/s10404-023-02674-z>
- Henkel, R., Bittner, J., Weber, R., Hüther, F., & Miska, W. (1999). Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertility and sterility*, 71(6), 1138-1143. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00141-7)
- Herman, Y., Feine, I., & Gafny, R. (2018). Acid phosphatase test on Phadebas® sheets—An optimized method for presumptive saliva and semen detection. *Forensic science international*, 288, 218-222. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.04.047>
- Hoffman, M. C., Hunter, S. J., D'Alessandro, A., Christians, U., Law, A. J., & Freedman, R. (2024). Maternal plasma choline during gestation and small for gestational age infants. *American Journal of Perinatology*, 41(S 01), e939-e948. 10.1055/s-0042-1759775
- Hooft, P. J., & Van De Voorde, H. P. (1990). The zinc test as an alternative for acid phosphatase spot tests in the primary identification of seminal traces. *Forensic science international*, 47(3), 269-275. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(90\)90296-B](https://doi.org/10.1016/0379-0738(90)90296-B)

Huang, X. F., He, Y., Fan, Q., Wang, Q., & Ning, K. Q. (2013). Yiqi Zhujing granule for idiopathic oligoasthenozoospermia: a clinical study. *Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology*, *19*(12), 1119-1123.

Idris, A. M. (2010). Flow injection, overlooked techniques in forensic analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *40*(4), 218-225. <https://doi.org/10.1080/10408347.2010.515448>

Idris, A. M., & Alnajjar, A. O. (2008). Exploiting sequential injection analysis technique to automate on-line sample treatment and quantitative determination of morphine in human urine. *Talanta*, *77*(2), 522-526. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.016>

Jakobsen, H., Rui, H., Thomassen, Y., Hald, T., & Purvis, K. (1989). Polyamines and other accessory sex gland secretions in human seminal plasma 8 years after vasectomy. *Reproduction*, *87*(1), 39-45. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870039>

Jänne, J., Hölttä, E., Haaranen, P., & Elfving, K. (1973). Polyamines and polyamine-metabolizing enzyme activities in human semen. *Clinica Chimica Acta*, *48*(4), 393-401. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(73\)90418-X](https://doi.org/10.1016/0009-8981(73)90418-X)

Johnson, D. J., Calderaro, A. C., & Roberts, K. A. (2007). Variation in nuclear DNA concentrations during urination. *Journal of forensic sciences*, *52*(1), 110-113. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00329.x>

Johnson, J., Flores, M. G., Rosa, J., Han, C., Salvi, A. M., DeMali, K. A., and Haim, H. (2020). The high content of fructose in human semen competitively inhibits broad and potent antivirals that target high-mannose glycans. *Journal of virology*, *94*(9), e01749-19. <https://doi.org/10.1128/jvi.01749-19>

Kaewarsa, P., Laiwattanapaisal, W., Palasuwan, A., and Palasuwan, D. (2017). A new paper-based analytical device for detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Talanta*, *164*, 534-539. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.026>

Kanu, A. B., and Kaplan, L. J. (2016). The quest for confirmatory data in crime scene investigations. *Chem Educator*, *21*, 231-239. [10.1333/s00897162723a](https://doi.org/10.1333/s00897162723a)

Kataguir, L. G., Scatena, L. M., Rodrigues, L. R., and Castro, S. D. S. (2019). Characterization of sexual violence in a state from the southeast region of Brazil. *Texto & Contexto-Enfermagem*, *28*, e20180183. <https://doi.org/10.1590/1980-265X-TCE-2018-0183>

Kawasaki, T., Akanuma, H., & Yamanouchi, T. (2002). Increased fructose concentrations in blood and urine in patients with diabetes. *Diabetes care*, *25*(2), 353-357. [10.2337/diacare.25.2.353](https://doi.org/10.2337/diacare.25.2.353)

Kelsay, J. L., Behall, K. M., & Clark, W. M. (1974). Glucose, fructose, lactate and pyruvate in blood and lactate and pyruvate in parotid saliva in response to sugars with and without other foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *27*(8), 819-825. <https://doi.org/10.1093/ajcn/27.8.819>

Kirsch, S. H., Herrmann, W., Rabagny, Y., & Obeid, R. (2010). Quantification of acetylcholine, choline, betaine, and dimethylglycine in human plasma and urine using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, *878*(32), 3338-3344. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.016>

- Kong, H. Y., and Byun, J. (2013). Emerging roles of human prostatic acid phosphatase. *Biomolecules & therapeutics*, 21(1), 10. [10.4062/biomolther.2012.095](https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.095)
- Kong, S. H., Kim, J. H., & Shin, C. S. (2021). Serum spermidine as a novel potential predictor for fragility fractures. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 106(2), e582-e591. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa745>
- Krause, N., and Wegner, A. (2020). Fructose metabolism in cancer. *Cells*, 9(12), 2635. <https://doi.org/10.3390/cells9122635>
- Le-Vinh, B., Akkuş-Dağdeviren, Z. B., Le, N. M. N., Nazir, I., and Bernkop-Schnürch, A. (2022). Alkaline phosphatase: a reliable endogenous partner for drug delivery and diagnostics. *Advanced Therapeutics*, 5(2), 2100219. <https://doi.org/10.1002/adtp.202100219>
- Lewis, J., Baird, A., McAlister, C., Siemieniuk, A., Blackmore, L., McCabe, B., and Wilson, N. (2013). Improved detection of semen by use of direct acid phosphatase testing. *Science & Justice*, 53(4), 385-394. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.04.009>
- Li, C. Y., Yam, L. T., and Lam, K. W. (1970). Acid phosphatase isoenzyme in human leukocytes in normal and pathologic conditions. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 18(7), 473-481. <https://doi.org/10.1177/18.7.473>
- Li, X., Tian, J., Nguyen, T., and Shen, W. (2008). based microfluidic devices by plasma treatment. *Analytical chemistry*, 80(23), 9131-9134. <https://doi.org/10.1021/ac801729t>
- Liu, H., and Crooks, R. M. (2011). Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami. *Journal of the American Chemical Society*, 133(44), 17564-17566. <https://doi.org/10.1021/ja2071779>
- Lu, Y., Shi, W., Jiang, L., Qin, J., and Lin, B. (2009). Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*, 30(9), 1497-1500. <https://doi.org/10.1002/elps.200800563>
- Mandal, A., & Bhattacharyya, A. K. (1986). Grouping of human ejaculates according to the degree of coagulation and the relationship to the levels of choline and cholinesterase. *International journal of andrology*, 9(6), 407-415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00903.x>
- Mann, T. (1948). Fructose content and fructolysis in semen. Practical application in the evaluation of semen quality. *The Journal of Agricultural Science*, 38(3), 323-331. <https://doi.org/10.1017/S0021859600006109>
- Manousi, N., Kabir, A., Furton, K. G., & Anthemidis, A. (2023). Sol-gel graphene oxide-coated fabric disks as sorbents for the automatic sequential-injection column preconcentration for toxic metal determination in distilled spirit drinks. *Molecules*, 28(5), 2103. <https://doi.org/10.3390/molecules28052103>
- Mapes, A. A., Kloosterman, A. D., and Poot, C. J. (2015). DNA in the criminal justice system: the DNA success story in perspective. *Journal of forensic sciences*, 60(4), 851-856. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12779>

- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., and Whitesides, G. M. (2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie*, 119(8), 1340-1342. <https://doi.org/10.1002/ange.200603817>
- Martinez, G. G., Santos, A. L. F., Oliveira, C. D. Q. P., & Moraes, T. I. (2018). Estocagem de DNA a temperaturas variadas: análise da concentração. *Rev. Saúde Foco*.(10), 42-50.
- Marzec-Wróblewska, U., Kamiński, P., Łakota, P., Szymański, M., Wasilow, K., Ludwikowski, G., ... & Michałkiewicz, J. (2011). Zinc and iron concentration and SOD activity in human semen and seminal plasma. *Biological trace element research*, 143, 167-177. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8868-x>
- Mesquita, R. B., & Rangel, A. O. (2009). A review on sequential injection methods for water analysis. *Analytica chimica acta*, 648(1), 7-22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.030>
- Mettakoonpitak, J., Boehle, K., Nantaphol, S., Teengam, P., Adkins, J. A., Srisa-Art, M., and Henry, C. S. (2016). Electrochemistry on paper-based analytical devices: a review. *Electroanalysis*, 28(7), 1420-1436. <https://doi.org/10.1002/elan.201501143>
- Miteva, R., Zapryanova, D., Fasulkov, I. V., Yotov, S., & Mircheva, T. (2010). Investigations on acid phosphatase activity in the seminal plasma of humans and animals. *Trakia J. Sci*, 8, 20-23.
- Miteva, R., Zapryanova, D., Fasulkov, I. V., Yotov, S., & Mircheva, T. (2010). Investigations on acid phosphatase activity in the seminal plasma of humans and animals. *Trakia J. Sci*, 8, 20-23.
- Moreira, T. M. A., Randig, A., Goulart, J., Schultz, L. F., and Turmina, J. (2022). Estudo de violência sexual em crianças e adolescentes em Joinville, SC. *Revista de APS*, 25(3). <https://doi.org/10.34019/1809-8363.2022.v25.35727>
- Mukherjee, A. G., and Gopalakrishnan, A. V. (2023). Unlocking the mystery associated with infertility and prostate cancer: an update. *Medical Oncology*, 40(6), 160. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02028-3>
- Nadar, S. S., Patil, P. D., Tiwari, M. S., and Ahirrao, D. J. (2021). Enzyme embedded microfluidic paper-based analytic device ( $\mu$ PAD): A comprehensive review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(7), 1046-1080. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1898327>
- Nair, R. R., Debnath, S., Das, S., Wakchaure, P., Ganguly, B., & Chatterjee, P. B. (2019). A highly selective turn-on biosensor for measuring spermine/spermidine in human urine and blood. *ACS Applied Bio Materials*, 2(6), 2374-2387. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00084>
- Negrete, M. A. A., Wrobel, K., Barrientos, E. Y., Escobosa, A. R. C., Donis, I. E., & Wrobel, K. (2022). Determination of chromium (III) picolinate in dietary supplements by flow injection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, using cobalt (II) picolinate as internal standard. *Talanta*, 240, 123161. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123161>
- Nelson, T. M., Borgogna, J. L. C., Brotman, R. M., Ravel, J., Walk, S. T., & Yeoman, C. J. (2015). Vaginal biogenic amines: biomarkers of bacterial vaginosis or precursors to vaginal dysbiosis?. *Frontiers in physiology*, 6, 253. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00253>

Neto, A. H. C., Sasaki, K. T., & Nakmune, A. C. D. M. S. (2011). Protein phosphatase activities in the serum and saliva of healthy children. *RPG. Revista de Pós-Graduação*, 18(2), 90-95.

Noiphung, J., Nguyen, M. P., Punyadeera, C., Wan, Y., Laiwattanapaisal, W., and Henry, C. S. (2018). Development of paper-based analytical devices for minimizing the viscosity effect in human saliva. *Theranostics*, 8(14), 3797. [10.7150/thno.24941](https://doi.org/10.7150/thno.24941)

Nsonwu-Anyanwu, A. C., Ekong, E. R., Ofor, S. J., Awusha, O. F., Orji, O. C., Umoh, E. I., ... & Usoro, C. A. O. (2019). Heavy metals, biomarkers of oxidative stress and changes in sperm function: A case-control study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 17(3), 163. [10.18502/ijrm.v17i3.4515](https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i3.4515)

Nurak, T., Praphairaksit, N., and Chailapakul, O. (2013). Fabrication of paper-based devices by lacquer spraying method for the determination of nickel (II) ion in waste water. *Talanta*, 114, 291-296. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.037>

Oliveira, J. S. S., Alvarenga, A. D., Correa, D. S., Mercante, L. A., & Santana, R. M. (2025). Blown spun fibers-based colorimetric sensor for detecting trace zinc in seminal fluid. *Biosensors and Bioelectronics*, 270, 116943. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116943>

Osadchuk, L., Kleshchev, M., Danilenko, A., & Osadchuk, A. (2021). Impact of seminal and serum zinc on semen quality and hormonal status: A population-based cohort study of Russian young men. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 68, 126855. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126855>

Oteef, M. D., & Idris, A. M. (2023). Flow Injection Techniques for Tetracycline Quantification: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 53(2), 396-414. <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1964343>

Owen, D. H., and Katz, D. F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of andrology*, 26(4), 459-469. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04104>

Peonim, V., Worasuwannarak, W., Sujirachato, K., Teerakamchai, S., Srisont, S., Udnoon, J., and Chudoung, U. (2013). Comparison between prostate specific antigen and acid phosphatase for detection of semen in vaginal swabs from raped women. *Journal of forensic and legal medicine*, 20(6), 578-581. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2013.06.009>

Perez-Olmos, R., Soto, J. C., Zarate, N., Araújo, A. N., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2005). Sequential injection analysis using electrochemical detection: A review. *Analytica chimica acta*, 554(1-2), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.08.032>

Philibert, R. A., Zadorozhnyaya, O., Beach, S. R., & Brody, G. H. (2008). Comparison of the genotyping results using DNA obtained from blood and saliva. *Psychiatric genetics*, 18(6), 275-281. [10.1097/YPG.0b013e3283060f81](https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e3283060f81)

Pinheiro, A. C. N., Ferreira, V. S., and Lucca, B. G. (2022). Stamping method based on 3D printing and disposable napkin: Cheap production of paper analytical devices for alcohol determination in beverages aiming forensics and food control. *Microchemical Journal*, 180, 107604. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107604>

Ponti, G., Maccaferri, M., Micali, S., Manfredini, M., Milandri, R., Bianchi, G., ... & Tomasi, A. (2018). Seminal cell free DNA concentration levels discriminate between prostate cancer

and benign prostatic hyperplasia. *Anticancer Research*, 38(9), 5121-5125. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12833>

Primpray, V., Chailapakul, O., Tokeshi, M., Rojanarata, T., and Laiwattanapaisal, W. (2019). A paper-based analytical device coupled with electrochemical detection for the determination of dexamethasone and prednisolone in adulterated traditional medicines. *Analytica chimica acta*, 1078, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.072>

Qiao, J. (2020). Dynamic flow approaches for automated radiochemical analysis in environmental, nuclear and medical applications. *Molecules*, 25(6), 1462. <https://doi.org/10.3390/molecules25061462>

Rodriguez, J. J. R. B., Calacal, G. C., Laude, R. P., and Ungria, M. C. A. (2019). Integrating presumptive and confirmatory semen tests into DNA profiling of sexual assault evidence: a Philippine example. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0149-z>

Rogers, C., Bernstein, G., Nakamura, R., Endahl, G., & Bhoopat, T. (1988). Vaginal fluid zinc concentration as a marker for intercourse. *Journal of Forensic Sciences*, 33(1), 77-83. <https://doi.org/10.1520/JFS12438J>

Rümke, P. (1974). The origin of immunoglobulins in semen. *Clinical and experimental immunology*, 17(2), 287.

Sakurada, K., Watanabe, K., & Akutsu, T. (2020). Current methods for body fluid identification related to sexual crime: focusing on saliva, semen, and vaginal fluid. *Diagnostics*, 10(9), 693. [10.3390/diagnostics10090693](https://doi.org/10.3390/diagnostics10090693)

Sarazin, C., Delaunay, N., Costanza, C., Eudes, V., and Gareil, P. (2012). Application of a new capillary electrophoretic method for the determination of carbohydrates in forensic, pharmaceutical, and beverage samples. *Talanta*, 99, 202-206. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.040>

Schisterman, E. F., Sjaarda, L. A., Clemons, T., Carrell, D. T., Perkins, N. J., Johnstone, E., ... & Mumford, S. L. (2020). Effect of folic acid and zinc supplementation in men on semen quality and live birth among couples undergoing infertility treatment: a randomized clinical trial. *Jama*, 323(1), 35-48. [10.1001/jama.2019.18714](https://doi.org/10.1001/jama.2019.18714)

Schuhmacher, M., Domingo, J. L., & Corbella, J. (1994). Zinc and copper levels in serum and urine: relationship to biological, habitual and environmental factors. *Science of the total environment*, 148(1), 67-72. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(94\)90376-X](https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90376-X)

Seiler, D., Nagel, D., Tritschler, W., & Looser, S. (1983). Acid phosphatase in blood (substrate: alpha-naphthylphosphate): reference values and diagnostic significance. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie*, 21(8), 519-525.

Senekowitsch, S., Wietkamp, E., Grimm, M., Schmelter, F., Schick, P., Kordowski, A., ... & Smollich, M. (2023). High-dose spermidine supplementation does not increase spermidine levels in blood plasma and saliva of healthy adults: A randomized placebo-controlled pharmacokinetic and metabolomic study. *Nutrients*, 15(8), 1852. <https://doi.org/10.3390/nu15081852>

- Sengupta, P., Durairajanayagam, D., and Agarwal, A. (2020). Fuel/energy sources of spermatozoa. *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART and Antioxidants*, 323-335. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4_26)
- Shemshaki, G., Murthy, A. S. N., & Malini, S. S. (2021). Assessment and establishment of correlation between reactive oxidation species, citric acid, and fructose level in infertile male individuals: a machine-learning approach. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 14(2), 129. [10.4103/jhrs.jhrs\\_26\\_21](https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs_26_21)
- Shohat, B., Maayan, R., Singer, R., Sagiv, M., Kaufman, H., & Zukerman, Z. (1990). *Immunosuppressive Activity and Polyamine Levels of Seminal Plasma in Azo-Ospermic, Oligospermic, and Normospermic Men*. *Archives of Andrology*, 24(1), 41–50. <https://doi.org/10.3109/01485019008986857>
- Sia, S. K., and Kricka, L. J. (2008). Microfluidics and point-of-care testing. *Lab on a Chip*, 8(12), 1982-1983. <https://doi.org/10.1039/B817915H>
- Silva, C. S., Pimentel, M. F., Amigo, J. M., Honorato, R. S., & Pasquini, C. (2017). Detecting semen stains on fabrics using near infrared hyperspectral images and multivariate models. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 95, 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.026>
- Silva, M. J., dos Anjos, E. V., Honorato, R. S., Pimentel, M. F., & Paim, A. P. S. (2008). Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis. *Analytica chimica acta*, 629(1-2), 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.09.030>
- Skok, A., Manousi, N., Anthemidis, A., & Bazel, Y. (2024). Automated Systems with Fluorescence Detection for Metal Determination: A Review. *Molecules*, 29(23), 5720. <https://doi.org/10.3390/molecules29235720>
- Smith, S. G., & Sinkford, J. C. (2022). Gender equality in the 21st century: Overcoming barriers to women's leadership in global health. *Journal of Dental Education*, 86(9), 1144-1173. <https://doi.org/10.1002/jdd.13059>
- Songjaroen, T., Dungchai, W., Chailapakul, O., and Laiwattanapaisal, W. (2011). Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. *Talanta*, 85(5), 2587-2593. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.024>
- Stanković, H., & Mikac-Dević, D. (1976). Zinc and copper in human semen. *Clinica Chimica Acta*, 70(1), 123-126. [10.1016/0009-8981\(76\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(76)90013-9)
- Stefanidou, M., Maravelias, C., Dona, A., & Spiliopoulou, C. (2006). Zinc: a multipurpose trace element. *Archives of toxicology*, 80, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0009-5>
- Suttipasit, P. (2015). Comparison of two seminal detection methods, the acid phosphatase test and the zinc test for sensitivities in sexually assaulted females positive of sperm. *Siriraj Medical Journal*, 67(4).
- Suzuki, O., Matsumoto, T., Katsumata, Y., & Oya, M. (1982). A new enzymatic method for quantitation of spermine in human semen. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, 88, 67-73. <https://doi.org/10.1007/BF00200737>

- Takamura, A., Watanabe, K., Akutsu, T., and Ozawa, T. (2018). Soft and robust identification of body fluid using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric strategies for forensic analysis. *Scientific reports*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26873-9>
- Takatori, T., Tomii, S., & Tanaka, T. (1981). The determination of choline in human semen by the enzymic method. *Forensic Science International*, 17(1), 79-84. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(81\)90192-4](https://doi.org/10.1016/0379-0738(81)90192-4)
- Takatori, T., Tomii, S., & Terazawa, K. (1984). A medicolegal study on enzymic fluorometry of choline in human semen. *Journal of Forensic Sciences*, 29(2), 618-623. <https://doi.org/10.1520/JFS11713J>
- Tay, J. W., Joudo, J., Tran, T., Ta, H., Botting, J. L., Liew, Y. C., and Rye, M. S. (2021). Comparison of Crime-lite® 82S, Polilight® PL400 and Polilight® PL500 for the detection of semen and saliva stains. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 53(4), 483-493. <https://doi.org/10.1080/00450618.2020.1718208>
- Theodoridis, G. A., Zacharis, C. K., & Voulgaropoulos, A. N. (2007). Automated sample treatment by flow techniques prior to liquid-phase separations. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(2), 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.013>
- Toragall, M. M., Satapathy, S. K., Kadadevaru, G. G., and Hiremath, M. B. (2019). Evaluation of seminal fructose and citric acid levels in men with fertility problem. *Journal of human reproductive sciences*, 12(3), 199. [10.4103/jhrs.JHRS\\_155\\_18](https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_155_18)
- Trang, N. T., Sang, T. T., Hoang, N., Khanh, N. T. G., and Duc, T. T. (2018). Assessment of the level of seminal zinc and fructose concentration in seminal plasma of Vietnamese infertile men. *MOJ Biorg. Org. Chem*, 2(4), 185-190. [10.15406/mojboc.2018.02.00079](https://doi.org/10.15406/mojboc.2018.02.00079)
- Trinklein, T. J., Thapa, M., Lanphere, L. A., Frost, J. A., Koresch, S. M., & Aldstadt III, J. H. (2021). Sequential injection analysis coupled to on-line benchtop proton NMR: Method development and application to the determination of synthetic cathinones in seized drug samples. *Talanta*, 231, 122355. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122355>
- Trojanowicz, M., & Kołacińska, K. (2016). Recent advances in flow injection analysis. *Analyst*, 141(7), 2085-2139. <https://doi.org/10.1039/C5AN02522B>
- Unuma, K., Sato, H., Wen, S., Makino, Y., Hirakawa, A., and Uemura, K. (2023). The proportion of false-positives in positive Seratec® prostate-specific antigen SemiQuant test results in postmortem screening for seminal fluid. *Legal Medicine*, 62, 102243. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2023.102243>
- Virkler, K., and Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1-3), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>
- Virkler, K., and Lednev, I. K. (2010). Raman spectroscopic signature of blood and its potential application to forensic body fluid identification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396, 525-534. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3207-9>
- Vishawanath, T., Sumana, S., & Sharanagouda, J. (2023). Application of Enzymes in Disease Diagnosis. *ENZYMES-MECHANISMS AND ACTION*, 25.

Vivoli, G., Borella, P., Bergomi, M., & Fantuzzi, G. (1987). Zinc and copper levels in serum, urine, and hair of humans in relation to blood pressure. *Science of the total environment*, 66, 55-64. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(87\)90077-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(87)90077-5)

Vyas, B., Halamkova, L., and Lednev, I. K. (2020). A universal test for the forensic identification of all main body fluids including urine. *Forensic Chemistry*, 20, 100247. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100247>

Wang, Q., Gao, P., Wang, X., & Duan, Y. (2014). Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 427, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.004>

Wasserstrom, A., Frumkin, D., Davidson, A., Shpitzen, M., Herman, Y., and Gafny, R. (2013). Demonstration of DSI-semen - a novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.08.009>

Wei, X., Tian, T., Jia, S., Zhu, Z., Ma, Y., Sun, J., and Yang, C. J. (2015). Target-responsive DNA hydrogel mediated “stop-flow” microfluidic paper-based analytic device for rapid, portable and visual detection of multiple targets. *Analytical chemistry*, 87(8), 4275-4282. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00532>

Wei, X., Yu, K., Wu, D., Huang, P., Sun, Q., and Wang, Z. (2021). Species identification of semen stains by ATR-FTIR spectroscopy. *International Journal of Legal Medicine*, 135, 73-80. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02367-0>

Wolrath, H., Forsum, U., Larsson, P. G., & Borén, H. (2001). Analysis of bacterial vaginosis-related amines in vaginal fluid by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4026-4031. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4026-4031.2001>

Wong, W. Y., Flik, G., Groenen, P. M., Swinkels, D. W., Thomas, C. M., Copius-Peereboom, J. H., ... & Steegers-Theunissen, R. P. (2001). The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reproductive toxicology*, 15(2), 131-136. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(01\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(01)00113-7)

World Health Organization. (2021). *Violence against women prevalence estimates, 2018: Global, regional and national prevalence estimates for intimate partner violence against women and global and regional prevalence estimates for non-partner sexual violence against women. Executive summary*. World Health Organization.

Xue, Y., Hassan, Q., Noroozifar, M., Sullan, R. M. A., & Kerman, K. (2024). Microfluidic flow injection analysis system for the electrochemical detection of dopamine using diazonium-grafted copper nanoparticles on multi-walled carbon nanotube-modified surfaces. *Talanta*, 266, 125030. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125030>

Yakoh, A., Pimpitak, U., Rengpipat, S., Hirankarn, N., Chailapakul, O., and Chaiyo, S. (2021). based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 176, 112912. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112912>

Yam, L. T. (1974). Clinical significance of the human acid phosphatases: a review. *The American journal of medicine*, 56(5), 604-616. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(74\)90630-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(74)90630-5)

Yamaguchi, S., Miura, C., Kikuchi, K., Celino, F. T., Agusa, T., Tanabe, S., & Miura, T. (2009). Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(26), 10859-10864. <https://doi.org/10.1073/pnas.090060210>

Yang, R., Li, F., Zhang, W., Shen, W., Yang, D., Bian, Z., and Cui, H. (2019). Chemiluminescence immunoassays for simultaneous detection of three heart disease biomarkers using magnetic carbon composites and three-dimensional microfluidic paper-based device. *Analytical chemistry*, 91(20), 13006-13013. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03066>

Yao, T., Han, X., Guan, T., Wang, Z., Zhang, S., Liu, C., and Chen, L. (2020). Effect of indoor environmental exposure on seminal microbiota and its application in body fluid identification. *Forensic science international*, 314, 110417. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110417>

Yetisen, A. K., Akram, M. S., and Lowe, C. R. (2013). based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 13(12), 2210-2251. <https://doi.org/10.1039/C3LC50169H>

Yu, J., Ge, L., Huang, J., Wang, S., and Ge, S. (2011). Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. *Lab on a Chip*, 11(7), 1286-1291. <https://doi.org/10.1039/C0LC00524J>

Zapata, F., de la Ossa, M. Á. F., and García-Ruiz, C. (2015). Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 64, 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.011>

Zaviačič, M., Doležalová, S., Holomán, I. K., Zaviačičová, A., Mikulecký, M., & Brázdil, V. (1988). Concentrations of fructose in female ejaculate and urine: A comparative biochemical study. *Journal of Sex Research*, 24(1), 319-325. [10.1080/00224498809551431](https://doi.org/10.1080/00224498809551431)

Zha, S., Wei, X., Fang, R., Wang, Q., Lin, H., Zhang, K., and Wang, Z. (2020). Estimation of the age of human semen stains by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a preliminary study. *Forensic Sciences Research*, 5(2), 119-125. <https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1642567>

Zhang, X., Vos, H. R., Tao, W., and Stoorvogel, W. (2020). Proteomic profiling of two distinct populations of extracellular vesicles isolated from human seminal plasma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7957. <https://doi.org/10.3390/ijms21217957>

Zhao, W., and van den Berg, A. (2008). Lab on paper. *Lab on a Chip*, 8(12), 1988-1991. <https://doi.org/10.1039/B814043J>

Zhou, J., Li, B., Qi, A., Shi, Y., Qi, J., Xu, H., & Chen, L. (2020). ZnSe quantum dot based ion imprinting technology for fluorescence detecting cadmium and lead ions on a three-dimensional rotary paper-based microfluidic chip. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 305, 127462. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127462>

# **ANEXOS**

**Anexo 1.** Modelo dos formulários eletrônicos empregados na coleta de dados para validação qualitativa.

Seção 1 de 2

### TESTE PRESUNTIVO PARA DETECÇÃO DE SÊMEN - REAGENTE 3 EM PLACA DE TOQUE

Este formulário faz parte de um estudo baseado em imagens que visa desenvolver um kit colorimétrico para detecção de fluido seminal (sêmen) frente a possíveis interferentes e falsos positivos empregando um reagente específico. Esse estudo faz parte do Projeto Crimes contra a mulher: desenvolvimento de kits para identificação de marcadores forenses em fluidos biológicos explorando sondas colorimétricas e fluorescentes fomentado pelo Programa de Cooperação Acadêmica em Segurança Pública e Ciências Forenses (Processo: 88881.51646/2020-01) e desenvolvido no Laboratório de Instrumentação em Química Analítica (LIQA) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (IQB-UFAL).

Este formulário está coletando automaticamente os e-mails de todos os participantes. [Alterar configurações](#)

Enquadramento funcional \*

Estudante

Professor(a)/pesquisador(a)

Profissional

---

Se estudante, qual seu nível de escolaridade?

Superior incompleto

Superior completo

Pós-graduação

Se professor(a)/pesquisador(a) ou profissional, qual sua área de atuação?

Texto de resposta curta

---

Se estudante, qual curso e período?

Texto de resposta curta

Você irá avaliar por imagem 20 amostras dispostas em uma placa de toque e deverá indicar sua conclusão para cada uma delas.

**SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA:**

A primeira linha da placa de toque possui 4 poços de referência para auxiliar na comparação durante a classificação. No sentido da esquerda para direita, o primeiro poço é o branco analítico [controle negativo (-), ausência de sêmen] e os outros 3 poços são controles positivos (+) com diferentes diluições da solução padrão do marcador (coloração alaranjada).

**AMOSTRAS REAIS:**

A indicação de um resultado como positivo deve ser visualmente semelhante aos controles positivos (alaranjado), enquanto o resultado negativo, similar ao controle negativo (amarelo claro). Contudo, após adição dos reagentes, existe a possibilidade de ocorrer variações de cor nas amostras diferentes daquelas observadas nos controles. Esta variação pode ocorrer a depender da coloração original de alguns tipos de amostra.

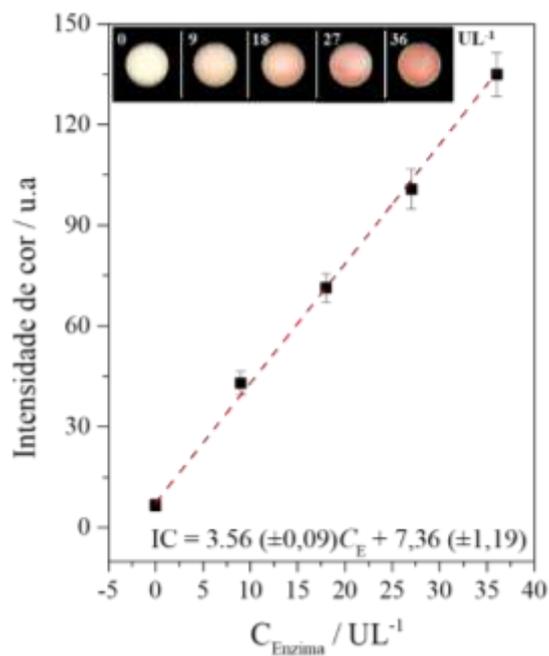
**OBSERVAÇÃO:**

Existe a possibilidade de repetição do mesmo tipo de amostra biológica no ensaio considerando aspectos como a variação do sexo do voluntário(a), quantidade de amostra (efeito de diluição), temporalidade (idade da amostra), entre outros fatores.

	É sêmen	Não é sêmen	Inconclusivo
Amostra 1	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Amostra 2	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Amostra 3	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Amostra 4	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Amostra 5	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Amostra 6	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Amostra 7	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Amostra 8	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

**Anexo 2.** Gráfico da intensidade de cor em função da concentração da AP ( $0 - 36 \text{ U L}^{-1}$ ), [Fenilfosfato] = 10 mM,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  a 1% (m/v), 4-AAP a 0,6 (m/v) a 25 °C. Canal de cor utilizado: Magenta. A figura dentro do gráfico representa as zonas do  $\mu\text{PAD}$  onde ocorreu a reação colorimétrica.



Fonte: elaborado pela autora, 2025.