

UFAL

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

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA FOSFATASE ÁCIDA VISANDO APLICAÇÕES FORENSES

BEATRIZ DO NASCIMENTO OLIVEIRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

BEATRIZ DO NASCIMENTO OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO
PARA DETERMINAÇÃO DA FOSFATASE ÁCIDA
VISANDO APLICAÇÕES FORENSES**

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

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Maceió – AL
2023

Catálogo na Fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central

Divisão de Tratamento Técnico

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

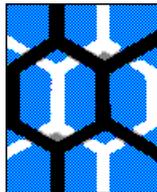
O48d Oliveira, Beatriz do Nascimento Oliveira.
Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação da
fosfatase ácida visando aplicações forenses / Beatriz do Nascimento
Oliveira. – 2023.
69 f. : il color.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.
Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 62-69.

1. Delitos sexuais. 2. Sêmen. 3. Fosfatase ácida. 4. Colorimetria. 5.
Ciências forenses. I. Título.

CDU: 606:343.98



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda Beatriz do Nascimento Oliveira intitulada: “*Desenvolvimento de método colorimétrico para detecção da fosfatase ácida visando aplicações forenses*”, apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 27 de julho de 2023, às 9 h, por meio de videoconferência.

Maceió, 27 de julho de 2023.

Comissão Examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **José Luiz da Costa, PROFESSOR ASSOCIADO I**, em 31/07/2023, às 12:12 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: **64C13E3D F6FA4B66 AA646EFB D30528CC**



Dr. JOSÉ LUIZ DA COSTA, UNICAMP
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
gov.br CINTYA D ANGELES DO ESPIRITO SANTO E
Data: 29/07/2023 23:04:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. CINTYA D'ANGELES DO ESPÍRITO SANTO BARBOSA, UFAL
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS
Data: 31/07/2023 16:00:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. JOSUÉ CARINHANHA CALDAS SANTOS, UFAL
Presidente da banca

AGRADECIMENTOS

Sempre ouvia boatos que os dois anos de mestrado passavam muito rápido e tive a certeza ao entrar na pós graduação. No início parecia um sonho fui aprovada em 2 instituições PUC-Rio e PPGQB-UFAL, a vontade de morar fora e adquirir novas vivências parecia estar tão perto até o começo dos problemas pessoais. Decidi ficar na minha casa, UFAL, local que terminei minha graduação e agora termino o mestrado, ufa! Pensei por vários momentos que não daria certo, mas a vontade d'Ele é maior, agradeço primeiramente a Deus por guiado todos os meus passos.

Aos meus pais, Ezyll Vania e Israel Oliveira, pelo amor e compreensão nos momentos mais difíceis e por não medirem esforços para acompanhar meu projeto de vida.

Aos meus irmãos, William Victor, Maria Eduarda e Carlos Eduardo, à minha família e aos meus amigos de infância e da trupe pelo companheirismo, apoio e pela compreensão as minhas ausências em diversos momentos devido aos compromissos com a Universidade.

Ao meu "namorado", Alessandro pela paciência nos meus momentos de estresses com a pesquisa, por em ser meu uber quando eu largava muito tarde, e por todo apoio nesta jornada.

Ao meu orientador Josué Carinhonha pela disponibilidade e aceite antes mesmo da minha decisão em permanecer na UFAL. Agradeço pelos 158 artigos sobre o tema, broncas durante os experimentos e escrita, caronas, e em especial pelo amparo e sugestões fornecidas ao longo dessa trajetória.

A todos os colegas de profissão conhecidos dentro do Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica (LINQA) que me acolheram muito bem desde o primeiro momento. Particularmente, a Ellen Barros, minha companheira desde a graduação, congressos, viagens e de vida. Ao Emeson 02, que acompanhava meus experimentos até madrugada e nos finais de semanas. Aos demais colegas, Emerson, Amanda, Marcos, Fátima, Emilly, Danda, Sangela, Ary que fizeram parte do meu ciclo de amizades na correria da pesquisa, tornando meus dias mais alegres e especiais, espero manter sempre o contato.

Agradecer aos mestres da Universidade Federal de Alagoas, em especial os do Instituto de Química e Biotecnologia, pelos conhecimentos compartilhados nas aulas, pelospuxões de orelha, conselhos e conversas.

Agradecer aos professores que aceitaram compor a banca de avaliação deste trabalho.

Agradecimentos aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq, FAPEAL, Fineq.

Agradeço imensamente a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho. Muito feliz e grata por encerrar mais uma etapa na minha vida!

RESUMO

Crimes sexuais são aqueles que atentam contra a dignidade e liberdade sexual, caracterizados como uma forma de violência de maior incidência ao gênero feminino. Desta forma, a identificação de fluidos biológicos como sangue, saliva e sêmen constitui uma das etapas cruciais na análise de amostras ou cenas de crime para perícia. Dentre esses fluidos, a presença de fluido seminal (sêmen) pode constituir uma evidência criminal quando encontrado na vítima ou em roupas, por exemplo. O sêmen possui uma composição complexa, contudo, a enzima fosfatase ácida (AP) pode ser empregada como um marcador, uma vez que possui concentrações no líquido seminal até 400 vezes maior comparada a outros fluidos corporais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para detecção colorimétrica da AP utilizando uma pequena quantidade de amostra, sendo passível de ser usada em campo, com resposta rápida e seletiva, assim, auxiliando na confirmação de evidências de crimes sexuais. O método proposto se baseia na detecção da AP empregando como substrato o ácido ascórbico 2-fosfato (AA_P), o qual, na presença da enzima libera fosfato inorgânico e o ácido ascórbico reduzido (AA_r) em pH 5,0, sendo este, usado para detectar a enzima no meio. Neste caso, o AA_r reage com os íons Fe(III) levando a formação de Fe(II) e ácido ascórbico oxidado (AA_o). Portanto, foi explorada a reação dos íons Fe(II) gerados *in situ* com K₃[Fe(CN)₆] em meio ácido levando a formação do azul da Prússia (PB) (Fe₄[Fe(CN)₆]₃), um coloide azul escuro ($\lambda = 710 \text{ nm}$). O uso do PB como sonda colorimétrica com $\lambda_{\text{max}} > 500 \text{ nm}$ evita possíveis interferências espectrais em função da composição de amostras complexas. Inicialmente, os principais parâmetros reacionais foram otimizados empregando AA_r, nas condições de melhor performance analítica usou-se Fe(III) a 1,5 μM e K₃Fe(CN)₆ a 1,5 mM, ambos em HNO₃ 0,45 M. Para melhorar a estabilidade do PB gerado empregou-se a polivinilpirrolidona (PVP) 0,20% (m/v). Em seguida, aplicou-se as condições otimizadas na detecção de AP, usando AA_P (0,75 mM) como substrato a pH 5,0 (HAc/NaAc, 100 mM). Nestas condições, se obteve uma curva analítica para AP, com faixa linear de 0,25 a 3,0 U L⁻¹, correspondente a equação $A_{710 \text{ nm}} = 0,32 (\pm 0,01) \times C_{\text{AP}} + 0,002 (\pm 0,017)$ ($n = 9$, $r = 0,9960$) e LOD = 0,04 U L⁻¹, aguardando um tempo de 45 min. Como prova de conceito, o método foi aplicado com êxito em uma amostra de sêmen real para uma avaliação qualitativa após diluição do sêmen em solução, aplicado na superfície de um tecido (algodão), *swab* e no dispositivo analítico baseado em papel (PAD). O PAD apresentou melhor condição uma vez que foi possível monitorar a intensidade da cor utilizando o volume de 0,5 μL da amostra. Além disso, foi possível determinar as figuras de mérito para ácido ascórbico, uma segunda espécie marcadora, em solução (LOD = 0,29 μM) e no PAD (LOD = 48,53 μM). Nesta linha, enzima AP também foi avaliada em PAD com LOD = 18,55 U L⁻¹. Ademais, o método foi avaliado frente a possíveis interferentes como saliva, sangue, urina, lubrificante, clara de ovo, molho de tomate, suco de abacaxi e leite, para este teste o molho de tomate e o suco de abacaxi apresentaram valores similares a amostra seminal, considerando o teor de ácido ascórbico, enquanto para ácido ascórbico foi a clara do ovo e o molho de tomate. No ensaio de recuperação para o ácido ascórbico se obteve valores de 81 a 100%, enquanto AP variou em 82 a 101%, ambos com RSD inferior a 4%. Por fim, o método proposto mostrou-se passível de ser aplicado em diferentes situações, incluindo uma dupla resposta em relação a AP bem como o ácido ascórbico reduzido, sendo uma alternativa viável para aplicações em campo, e contribuindo para uma tomada rápida de decisão, se necessário.

Palavras-chave: Crimes sexuais; Sêmen; Fosfatase ácida; Detecção colorimétrica; Ciências forenses;

ABSTRACT

Sexual crimes are those that threaten sexual dignity and freedom, characterized as a form of violence with a higher incidence of female gender. In this way, the identification biological fluids such as blood, saliva and semen are one of the crucial steps in the analysis of samples or crime scenes for forensics. Among these fluids, the presence of seminal fluid (semen) may constitute criminal evidence when found on the victim or on clothing, for example. Semen has a complex composition, however, the enzyme acid phosphatase (AP) can be used as a marker, since it has concentrations in seminal fluid upto 400 times higher compared to other body fluids. In this sense, the objective of this work was to develop a methodology for colorimetric detection of AP using a small amount of sample, being able to be used in the field, with a quick and selective response, thus helping to confirm evidence of sexual crimes. The proposed method is based on the detection of AP using ascorbic acid 2-phosphate (AA_P) as substrate, which, in the presence of the enzyme, releases inorganic phosphate and reduced ascorbic acid (AA_r) at pH 5.0, which is used to detect the enzyme in the medium. In this case, AA_r reacts with Fe(III) ions leading to the formation of Fe(II) and oxidized ascorbic acid (AA_o). Therefore, the reaction of Fe(II) ions generated in situ with $K_3[Fe(CN)_6]$ in acid medium was explored, leading to the formation of Prussian blue (PB) ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$), a dark blue colloid ($\lambda = 710$ nm). The use of PB as a colorimetric probe with $\lambda_{max} > 500$ nm avoids possible spectral interference due to the composition of complex samples. Initially, the main reaction parameters were optimized using AA_r , under the best analytical performance conditions Fe(III) at $1.5 \mu M$ and $K_3Fe(CN)_6$ at 1.5 mM were used, both in 0.45 M HNO_3 . To improve the stability of the PB generated, polyvinylpyrrolidone (PVP) 0.20% (w/v) was used. Then, the optimized conditions in the detection of AP were applied, using AA_P (0.75 mM) as substrate at pH 5.0 (HAc/NaAc, 100 mM). Under these conditions, an analytical curve for AP was obtained, with a linear range from 0.25 to 3.0 U L⁻¹, corresponding to the equation $A_{710\text{ nm}} = 0.32 (\pm 0.01) \times CAP + 0.002 (\pm 0.017)$ ($n = 9$, $r = 0.9960$) and LOD = 0.04 U L⁻¹, waiting for a time of 45 minutes. As a proof of concept, the method was successfully applied on a real semen sample for a qualitative evaluation after semen dilution in solution, applied on the surface of a tissue (cotton), swab and on the analytical device paper-based (PAD). The PAD presented a better condition since it was possible to monitor the color intensity using a volume of $0.5 \mu L$ of the sample. Furthermore, it was possible to determine figures of merit for ascorbic acid, a second marker species, in solution (LOD = $0.29 \mu M$) and in PAD (LOD = $48.53 \mu M$). In this line, AP enzyme was also evaluated in PAD with LOD = 18.55 UL⁻¹. In addition, the method was evaluated against possible interferences such as saliva, blood, urine, lubricant, egg white, tomato sauce, pineapple juice and milk, for this test tomato sauce and pineapple juice showed values similar to the sample seminal, considering the ascorbic acid content, while for ascorbic acid it was egg white and tomato sauce. In the recovery assay for the ascorbic acid, values from 81 to 100%, were obtained, while AP ranged from 82 to 101%, both with RSD less than 4%. Finally, the proposed method proved to be capable of being applied in different situations, including a double response in relation to AP as well as reduced ascorbic acid, being a viable alternative for field applications, and contributing to a quick decision making when necessary.

Keywords: Sexual crimes; Semen; acid phosphatase; Colorimetric detection; Forensic sciences;

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Estatísticas relacionadas a estupro no Brasil e Alagoas. (A) Evolução do número de estupros e estupros de vulnerável no Brasil 2011-2021; (B) Números de estupro e estupro de vulnerável em relação a faixa etária das vítimas no Brasil em 2021 e (C) Evolução do número de casos de violência sexual em Alagoas, considerando o sexo das vítimas. 18
- Fig. 2.** Esquema representativo da geração do AA_r a partir da ação da fosfatase ácida (AP) frente ao AA_p, e posterior reação do Fe(II) gerado formando o azul da Prússia. Sendo, AA_o = ácido ascórbico oxidado. 27
- Fig. 3.** (A) Variação da sensibilidade analítica em função da concentração de HNO₃, (B) Espectro de absorção molecular, (C) curva analítica para AA_r e (D) cinética de formação relacionado ao azul da Prússia empregando-se [HNO₃] = 0,45 M. 39
- Fig. 4.** (A) Estrutura química do polímero polivinilpirrolidona; (B) Estrutura química do polímero quitosana. 40
- Fig. 5.** (A) Avaliação da concentração final de PVP na reação colorimétrica para geração do azul da Prússia. (B) Avaliação temporal da precipitação do coloide considerando os frascos de vidro, sendo (a) ausência do polímero e (b) adição do polímero considerando (1) tempo zero, início da reação; (2) 2 h; (3) 4 h; (4) após 30 h de reação. 42
- Fig. 6.** Avaliação cinética em relação ao tempo de incubação entre AP (2 U L⁻¹) e substrato AA_p (1 mM) e tampão acetato de sódio (pH 5, 20 mM) (n = 3). 44
- Fig. 7.** Avaliação da concentração do AA_p frente ao sistema com a enzima AP (2 U L⁻¹) em tampão HAc/NaAc (pH 5, 20 mM). 45
- Fig. 8.** (A) Avaliação do pH do meio de incubação do AA_p e AP com tampão acetato (50 mM); (B) Avaliação do pH do meio de incubação do AA_p e AP com tampão citrato (50 mM); (C) Avaliação do pH da amostra real de sêmen com diluição 1:10 e 1:20 no tampão acetato e citrato (50 mM) e (D) Avaliação da concentração do tampão acetato. 47
- Fig. 9** Avaliação do tempo de incubação entre AP, AA_p e tampão acetato a 100 mM e a temperatura do sistema considerando à ambiente e a etapa de aquecimento em banho-maria. 48
- Fig. 10** (A). Avaliação do inibidor tungstato; (B) Avaliação do inibidor 50

molibdato; (C) Avaliação do inibidor fluoreto de sódio.	
Fig. 11. Avaliação da concentração do inibidor tungstato em 40 µL da amostra seminal diluída em 10 vezes utilizada como referência, em (b) ausência do analito, branco e as concentrações do WO ₄ ²⁻ (A) Na presença do substrato AAP e (B) Na ausência do substrato AAP.	50
Fig. 12 (A). Avaliação qualitativa da amostra de sêmen humano (50 µL) em tecido de algodão, sendo (Controle) tecido não contaminado (antes da reação), (Sêmen) tecido contaminado, amostra de sêmen diluída em (1:20) e (1:10); (B) Avaliação qualitativa da amostra de sêmen humano (30 µL) no swab, considerando o (Branco) ausência do analito no teste, amostra não diluída (aplicação direta – concentrado) e as amostras com diluição de (1:20) e (1:10); (C) Avaliação qualitativa da amostra de sêmen humano (0,5 µL) em dispositivo analítico baseado em papel (PAD), considerando a coluna da esquerda como respectivos ensaios do branco analítico e a coluna da direita a variação da concentração da amostra, não diluída e com a diluição de (1:20) e (1:10).	52
Fig. 13 (A) Avaliação qualitativa da amostra de sêmen humano (20 µL) em tecido de algodão com a exposição de 2 meses; (B) Incubação dos tecidos em eppendorfs com tampão acetato de sódio 100 mM (pH = 5) por 10 minutos; (C) Análise qualitativa dos tecidos para detecção de fosfatase ácida; (D) Análise qualitativa dos tecidos para detecção de ácido ascórbico, onde (b) ausência do analito, (tb) tecido branco e (te) tecido estampado.	52
Fig. 14 Avaliação de figuras de mérito (A) Espectro de absorção molecular (B) Curva analítica para determinação de ácido ascórbico.	54
Fig. 15 Avaliação de figuras de mérito (A) Espectro de absorção molecular (B) Curva analítica para enzima de AP.	55
Fig. 16 (A) Curva analítica para determinação de ácido ascórbico em PAD; (B) Curva analítica para determinação da enzima de fosfatase em PAD, em função da intensidade de cor utilizando o software Corel Photo Paint™ X7.	57
Fig. 17 (A) Determinação da enzima de AP utilizando o substrato pNPP; (B) Determinação da enzima de AP utilizando o substrato AAP, método proposto.	58
Fig. 18 (A) Determinação de ácido ascórbico com fator de diluição 5, 10 e 20 vezes; (B) Determinação de fosfatase ácida com fator de diluição de 250, 500, 1000 e 1500 vezes da amostra seminal de referência.	59 - 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais testes forenses para detecção de sêmen.	22
Tabela 2. Ensaios comerciais para detecção de fosfatases.	28
Tabela 3. Avaliação da concentrações de FeCl_3 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ mantendo-se a proporção de 1:5 fixa entre os compostos e se empregando AAr como analito (n = 3).	36
Tabela 4. Avaliação da concentrações de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ mantendo-se constante de FeCl_3 (150 μM) e se empregando AAr como analito (n = 3).	37
Tabela 5. Avaliação dos diferentes polímeros (0,2% m/v) na estabilização da cor e sensibilidade do método.	41
Tabela 6. Aplicação do método colorimétrica para análise de amostra seminal enriquecida com diferentes quantidades de AAr considerando a diluição de 10 vezes do sêmen (n = 3).	53
Tabela 7. Aplicação do método colorimétrica para análise de amostra seminal enriquecida com diferentes quantidades de AP considerando a diluição de 2000 vezes do sêmen (n = 3).	53
Tabela 8. Comparação dos métodos para determinação de fosfatase ácida	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AAP	4-aminoantipirina
4-MU	4-metilumbeliferona
4-MUP	4-metilumbeliferona fosfato
A	Absorvância
AA _o	Ácido ascórbico oxidado
AA _p	Ácido ascórbico 2-fosfato
AA _r	Ácido ascórbico reduzido
ALS	<i>Alternate Light Sources</i>
ANOVA	Análise de Variância
AP	Fosfatase ácida, do inglês <i>acid phosphatase</i>
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
COVID-19	Corona Virus Disease
CP	Código Penal
CPP	Código Processo Penal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECA	Estatuto de Criança e Adolescente
EDX	Raios-X de Energia Dispersiva
FBSP	Fórum Brasileiro de Segurança Pública
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
HPTLC	Cromatografia em Camada Fina de Alto Desempenho
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
IML	Instituto Médico Legal
IR	Espectroscopia de Infravermelho
PAD	Dispositivo analítico baseado em papel
PAP	Fosfatase Ácida Prostática, do inglês <i>Prostatic Acid Phosphatase</i>
PB	Azul da Prússia, do inglês <i>Prussian Blue</i>
PNPP	p-nitrofenil fosfato
PRET	Transferência de Energia por Ressonância de Plasma
PSA	Antígeno Específico da Próstata
PVP	Polivinilpirrolidona
SD	Desvio padrão
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura

SESAU	Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas
SUS	Sistema Único de Saúde
TEPT	Transtorno de Estresse Pós-Traumático
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta no visível
WL	Lâmpada de Wood
XRF	Espectroscopia de Fluorescência de raios-X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Crimes sexuais – conceito e questões legais	14
2.1.1 Estupro	14
2.1.2 Estupro de vítima vulnerável	14
2.1.3 Violência mediante fraude	15
2.1.4 Assédio sexual	15
2.2 Perícia criminal	15
2.3 Exame de corpo de delito	16
2.4 Dados estatísticos no Brasil e Alagoas	17
2.5 O poder da palavra da vítima	19
2.6 Fluídos biológicos nas Ciências Forenses	20
2.6.1 Sêmen	21
2.7 Fosfatase ácida	24
2.7.1 Métodos para determinação de fosfatase ácida e princípio do método proposto	25
2.8 Determinação de fosfatase ácida (sondas e <i>kits</i>)	27
2.9 Importância do trabalho para a sociedade	30
3 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 EXPERIMENTAL	32
4.1 Preparo de soluções	32
4.2 Soluções e procedimentos	32
4.3 Amostra real	33
4.4 Equipamentos utilizados	34
4.5 Parâmetros estatísticos dos dados	34
4.6 Procedimento para os sistemas alternativos	34
4.7 Avaliação com a sonda comercial p-nitrofenil fosfato (pNPP) e adição do cofator MgCl ₂	35
4.8 Parâmetros para avaliação de (possíveis) interferentes	35
4.9 Parâmetros para ensaios de recuperação	35

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Avaliação da concentração dos reagentes FeCl_3 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	36
5.2 Avaliação da concentração do HNO_3	37
5.3 Avaliação da estabilidade do corante formado: uso de sistemas poliméricos	40
5.4 Avaliação do mix de reagentes	42
5.5 Testes iniciais com a enzima de fosfatase ácida	43
5.6 Avaliação da concentração do ácido ascórbico 2-fosfato	44
5.7 (Re)avaliação da ordem dos reagentes FeCl_3 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	45
5.8 Avaliação do sistema tampão e pH do meio reacional	46
5.9 Avaliação do efeito da temperatura	49
5.10 Avaliação dos inibidores	50
5.11 Uso de sistemas alternativos	52
5.12 Ensaio de recuperação	53
5.13 Figuras de mérito	54
5.14 Avaliação comparativa com o substrato pNPP e adição do cofator MgCl_2	58
5.15 Avaliação dos (possíveis) interferentes	59
6 CONCLUSÃO	61
7 PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o cenário atual, a violência sexual ocorre em diferentes contextos, familiar, religioso e social, contudo, tem-se uma vasta distorção entre o registro formal e o real número de agressões sofridas (subnotificação). Entre os diferentes crimes sexuais destacam-se o estupro e estupro de vulnerável caracterizado como a realização do ato libidinoso ou conjunção carnal. Independente da faixa etária, as mulheres são mais expostas devido questões históricas relacionadas ao desenvolvimento da Sociedade.

Segundo o Anuário Brasileiro de Segurança Pública (2022), o aumento no número de registros reforça a necessidade de políticas de prevenção, considerando que tais atos são praticados, geralmente, por membros da família ou de confiança das crianças/adolescentes, revelando padrões de violência intrafamiliar. Assim, para validação do crime, a vítima é encaminhada ao exame de corpo de delito com o intuito de verificar se houve lesões, como presença de escoriações, hematomas, incluindo a identificação de fluídos biológicos como sêmen, saliva, urina, sangue e cabelo (FRANCEZ et al., 2020).

Neste sentido, a presença de fluido seminal (sêmen) na vítima ou em roupas, por exemplo, pode constitui uma evidência criminal fundamental. A sequência de ações quanto a este fluído biológico consiste predominantemente no tempo desde a deposição, identificação, determinação de espécie e raça, além do perfil de DNA. O sêmen possui uma composição complexa, contudo, a enzima fosfatase ácida (AP) presente nesta matriz pode ser empregada como um marcador químico, esta apresenta níveis no líquido seminal até 400 vezes maior comparada a outros fluidos corporais (GAMBLIN & MORGAN-SMITH, 2020).

Atualmente, existem vários *kits* para determinação de fosfatase ácida incluindo ensaios clínicos e estudos *in vitro*, entre os reagentes comercializados destacam-se aqueles que usam reações colorimétricas, assim, passíveis de monitorar diretamente os produtos coloridos da hidrólise de substratos por espectrofotometria UV-vis, assim como, para alguns casos a detecção visual. Seguindo nesta perspectiva, o objetivo do trabalho consiste na determinação de AP em função da redução de Fe(III) a Fe(II) empregando a reação de formação do azul da Prússia, utilizando uma pequena quantidade de amostra seminal, com resposta rápida e seletiva, e que seja passível de ser usada em campo, auxiliando na confirmação de evidências criminais de crimes sexuais com a possibilidade de tomada de decisão por parte da equipe técnica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Crimes sexuais – Conceitos e questões legais

Crimes sexuais consistem em ações essencialmente dolosas que se consumam com a prática do ato libidinoso sem a anuência da vítima, com objetivo de satisfação de lascívia própria ou de terceiros. No Brasil, os atos violentos de natureza sexual são qualificados como crime e estão incluídos no Código Penal (CP). A Lei nº 12.015/2009 proporcionou uma reforma quanto aos aspectos relativos à disciplina dos crimes sexuais, servindo de amparo ao indivíduo vitimizado por *crimes contra a dignidade sexual e contra a liberdade sexual*. Diante do contexto, este trabalho apresenta uma introdução a respeito dos principais crimes de violência sexual.

2.1.1 Estupro

O crime de estupro é punível a título de dolo, conforme previsto no artigo 213 do CP, a maneira de execução do crime, sua pena e suas qualificadoras, *in verbis*:

Art. 213. Constranger alguém, mediante violência ou grave ameaça, a ter conjunção carnal ou a praticar ou permitir que com ele se pratique outro ato libidinoso: Pena – reclusão, de 6 (seis) a 10 (dez) anos. § 1º Se da conduta resultar lesão corporal de natureza grave ou se a vítima é menor de 18 (dezoito) ou maior de 14 (catorze) anos: Pena – reclusão, de 8 (oito) a 12 (doze) anos. § 2º Se da conduta resultar morte: Pena – reclusão, de 12 (doze) a 30 (trinta) anos.

Dessa forma, a violação sexual, pode ocorrer por meio de conjunção carnal (cópula vagínica) ou com a prática de qualquer outro ato libidinoso. No primeiro caso, para a consumação do crime, é necessário haver a introdução do órgão sexual masculino, contudo, não sendo necessária a ejaculação. Por outro lado, a prática precisa ser efetiva no ato libidinoso, a princípio para ambos os casos, deve haver ação de promoção do “*constrangimento*” por intermédio de violência ou grave ameaça.

2.1.2 Estupro de vulnerável

O crime de estupro de vulnerável ocorre quando a vítima: a) for menor de 14 anos; b) apresenta algum tipo de enfermidade e/ou deficiência mental; c) ou por qualquer outra causa que não podem oferecer resistência ao ato sexual, conforme o artigo 217-A, na Lei 12.015/2009. Nesta modalidade, o limite de idade está amparado na condição de inocência *consilli*, que envolve na falta de ciência no que se refere os fatos sexuais

(RANGEL, 2020).

Ao contrário do estupro comum, o autor não se vale de violência ou grave ameaça, entretanto, se caracteriza por tirar vantagem da vítima pela falta de discernimento ou capacidade de resistir à sua intenção libidinoso. Considerando o consentimento da vítima é possível discutir sobre duas espécies de vulnerabilidade, sendo uma absoluta (menor de quatorze anos) e a outra relativa (menor de dezoito anos) (BARROS, 2022).

2.1.3 Violência mediante fraude

O crime de violência sexual mediante fraude é descrito no artigo 215 do CP como doloso e admite-se a tentativa. De modo oposto ao estupro, o autor não utiliza de violência ou grave ameaça para atingir sua finalidade, por sua vez a prática do ato libidinoso dificulta ou impede a livre manifestação de vontade da vítima (BARROS, 2022). Como exemplo, o comportamento de um indivíduo que ejacula sobre a vítima no interior de transporte coletivo, aproveitando-se do aglomerado de pessoas no transporte público e/ou ao fato da atenção da vítima não estar focado no autor, mas este satisfaz a sua lasciva praticando um ato libidinoso que consiste em se masturbar próximo da vítima e ejacular sobre ela.

2.1.4 Assédio Sexual

A infração prevista no artigo 216-A do CP é direcionada às relações de trabalho, cargo ou função. Assim, decorre quando a vítima é coagida por seu superior hierárquico, aproveitando-se de sua posição, a fim de obter vantagem ou favorecimento sexual. Ademais, existe uma lacuna em relação à clareza que um tipo incriminador deve conter, a coação exercida pelo agente pode ser físico, moral, direto ou indireto, por gestos ou palavras. Portanto, o constrangimento não pode ser inferido ou adivinhado, ainda se não estiver expressamente previsto em lei, fica fora do alcance prático (NUCCI, 2022).

2.2 Perícia criminal

Considerando a premissa que *“todo contato deixa uma marca”*, no contexto criminalístico, reconhece-se que os vestígios são todos os elementos encontrados em uma cena de crime, os quais, podem vir a ser elucidados pela perícia criminal, e desta forma, podem relacionar ou não com o fato apurado. Em relação aos crimes sexuais, a perícia criminal pode ser classificada por dois aspectos, a perícia no local onde o crime ocorreu e a perícia no corpo da vítima (FERREIRA, 2019).

Dentre os vestígios biológicos em crimes sexuais mais comuns tem-se o sangue, sêmen, pelos, saliva, urina, frequentemente associados a peças de roupas, objetos e preservativos. A avaliação do exame de corpo de delito de prática sexual delituosa, segue um protocolo tradicional e normalmente é realizado pelos peritos médico-legistas, procurando por evidências de lesões relacionadas ao fato ou qualquer forma de violência. Ademais, o médico-legista conduz uma entrevista com a vítima buscando informações importantes para embasar as investigações (SALA, 2018).

Após a análise inicial, os vestígios biológicos coletados são submetidos a exame de DNA de modo tentar identificar o perfil genético do infrator. Contudo, a ausência de provas materiais dificulta a investigação criminal, bem como, a determinação de autoria do agressor (FERREIRA, 2019). Assim, a perícia criminal é uma prova material baseada na fundamentação científica com um caráter imparcial utilizada para auxiliar nas decisões judiciais (RIGO et al., 2022).

2.3 Exame de corpo de delito

Normalmente os crimes sexuais ocorrem em ambientes reservados, privados ou isolados, propiciando o contato com a vítima, quando a infração deixar vestígios segundo o artigo 158 do Código Processo Penal é indispensável a realização do exame de corpo de delito, direto ou indireto, não podendo supri-lo a confissão do acusado. Por esta razão, a vítima ao chegar em uma delegacia será submetida a realização do exame de corpo de delito. O exame direto é aquele em que os peritos dispõem dos vestígios para análise, a percepção ocorre sem intermediários. Por sua vez, no exame indireto os peritos utilizam elementos acessórios para a elaboração do laudo, como fotografias, prontuários médicos (BASOLI et al., 2021).

Conseqüentemente a presença de trauma genital ou anal, associado ou não ao trauma extragenital (hematoma, escoriações de diferentes extensões, lesões contundentes e lesões perfurocortantes), resulta na positividade do exame de corpo de delito (LOPES JR, 2020). Neste contexto, o exame poderá ser realizado em qualquer dia e a qualquer hora em parceria com a perícia criminal, contudo, existem poucos protocolos para condições de atendimento; análise e avaliação dos vestígios, sendo assim, é importante analisar as particularidades de cada caso respeitando o estado de saúde físico e mental da vítima e os sinais de violência.

2.4 Dados estatísticos no Brasil e Alagoas

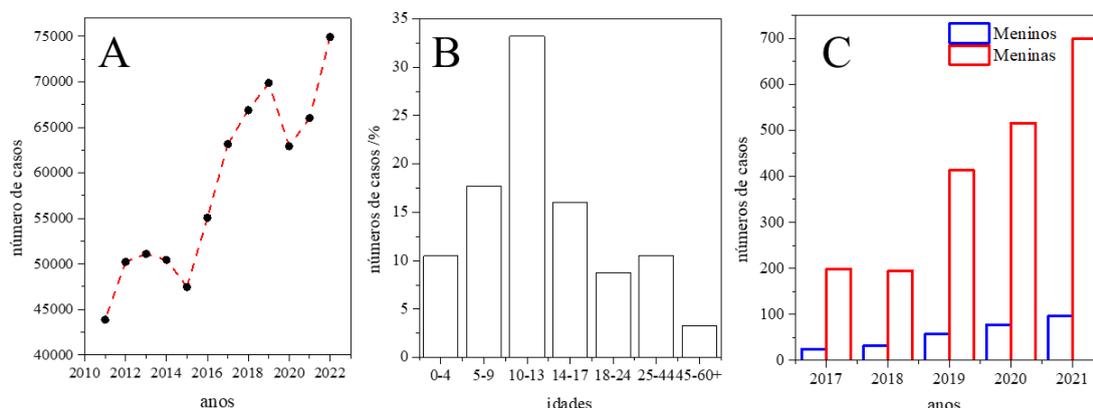
O Fórum Brasileiro de Segurança Pública (FBSP) é o principal órgão de divulgação das estatísticas criminais ocorridas no país, incluindo os crimes sexuais realizados preferencialmente em mulheres, adolescentes e crianças. O cenário apresentado no Anuário Brasileiro de Segurança Pública (2022) aponta uma queda de crimes letais, entretanto, outros indicadores relativos à violência contra mulheres, como taxa de lesões corporais, notificações de ameaças e assédio sexual, apresentaram crescimento no ano de 2021. Estima-se que no Brasil ocorram 822 mil casos anuais de estupro/estupro de vulnerável, de acordo com o IPEA 8,5% são reportados às polícias e apenas 4,2% são reportados pelo sistema de saúde (FERREIA et al., 2023). Vale ressaltar, a coleta de dados referentes ao crime de divulgação de cena de estupro/estupro de vulnerável, sexo e pornografia, previsto no Art. 218-C da lei 13.718/2018, entretanto, ainda existe dificuldade por parte da Polícia em identificar e classificar estes delitos (FBSP, 2022).

Durante a última década (2011 a 2021), teve-se um total de 627.025 pessoas que foram vítimas de estupro e estupro de vulnerável no Brasil, além disso, no ano de 2022 se registrou cerca de 74.930 boletins de ocorrência sobre esses crimes, levando a um crescimento de 8,2% em relação ao ano de 2021 (Fig. 1A). De acordo com os registros policiais, estas informações equivalem as vítimas que efetivamente denunciaram o crime em uma delegacia, logo, é provável que o número de casos seja maior do que os valores do levantamento (FBSP, 2022), e desta forma tenha subnotificação.

Nota-se um aumento no número de registros de estupro entre 2020 - 2021, os quais podem estar relacionados com a pandemia de Covid-19, momento que as mulheres estiveram mais tempo em suas residências convivendo com os supostos “agressores” (Fig. 1A). Os números apresentados pelo FBSP apontam que 75,8 % das vítimas são relacionadas a estupro de vulnerável, incluindo crianças menores de 14 anos e/ou pessoas adultas incapazes de consentir, o que torna a situação ainda mais complexa.

A violência sexual contra crianças e adolescentes é definida como qualquer ato que tenha por intuito estimular sexualmente a criança e/ou adolescente, bem como, utilizá-la para obter qualquer tipo de estimulação sexual (TRAJANO et al., 2021). No Brasil, se considerarmos as crianças e adolescentes entre 0 e 13 anos, que automaticamente são enquadradas como vulneráveis, temos 61,3% de todas as vítimas (Fig. 1B).

Fig. 1. Estatísticas relacionadas a estupro no Brasil e Alagoas. (A) Evolução do número de estupros e estupros de vulnerável no Brasil 2011-2022; (B) Números de estupro e estupro de vulnerável em relação a faixa etária das vítimas no Brasil em 2022 e (C) Evolução do número de casos de violência sexual em Alagoas, considerando o sexo das vítimas.



Fonte: Adaptado do Anuário Brasileiro de Segurança Pública, 2022 (Fig. 1A-B) e Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas (Sesau), 2022 (Fig. 1C).

A faixa etária de 10 - 13 anos, reúne 33,2% dos registros, destacando uma forte concentração na transição da pré-adolescência, período que inicia a puberdade (Fig. 1B). Em referência ao perfil, as mulheres representam 88,7% das vítimas, sendo a maioria em todas as faixas etárias, enquanto as vítimas do sexo masculino são, predominantemente, crianças. Pela primeira vez o Anuário Brasileiro de Segurança Pública (2022) registrou uma diferença entre o perfil étnico racial, onde 56,8% das vítimas eram negras, 42,3% brancas, e amarelas e indígenas totalizaram menos de 1%, indicando que este fator não é determinante para o crime.

De acordo com dados da Polícia Civil, o Estado de Alagoas registrou 952 casos de violência sexual, com uma média de 2,6 abusos por dia de janeiro a dezembro de 2022. Em concordância com os elementos disponibilizados observa-se a evolução dos números referentes as vítimas do sexo feminino (Fig. 1C). Ademais, a Sesau (2023) ressalta que em janeiro de 2023, o estado de Alagoas contabilizou 43 casos de violência sexual, sendo 40 meninas e 3 meninos, com maior incidência para os adolescentes entre 12 - 17 anos.

Considerando o vínculo entre vítima e autor, as agressões sexuais podem ser classificadas em violência sexual aguda (episódio único) e violência sexual crônica (episódios repetitivos). A primeira é definida pelo envolvimento das vítimas com faixa etária mais elevada, por estarem mais associadas às agressões físicas, na maioria dos casos com agressores fora do convívio comum. Em contrapartida, a segunda categorização relaciona a agressões sexuais de ambiente familiar, com vítimas com faixa etária mais baixa (crianças e adolescentes), sendo de baixa notificação policial (SERAFIM &

MENDES, 2021).

Em geral, segundo o FBSP (2022), de 8 cada 10 casos registrados no ano de 2021 foram de autoria de um conhecido da vítima, sendo que 40,8% eram pais ou padrastos; 37,2% irmãos, primos ou outro parente e 8,7% avós. Outro fator importante é o local da ocorrência, estima-se que a maioria dos casos de agressão sexual ocorram na própria residência da vítima (68,3%), ou durante o percurso do trabalho/escola, ou durante atividades realizadas próximas à residência (OLIVEIRA et al., 2021)

Dessa forma, a escola é um ambiente estratégico e fundamental para o enfrentamento do estupro de vulnerável, uma vez que é o local onde as crianças e adolescentes tendem a passar mais tempo durante o dia, auxiliando no processo de identificação e denuncia, mas, sobretudo, no processo de prevenção (FAGUNDES, 2020). Ao dar visibilidade aos números, o Fórum Brasileiro de Segurança Pública pretende auxiliar para que projetos de lei, políticas públicas e ações da sociedade civil sejam colocados em prática para a preservação e proteção da vida, em especial de meninas e mulheres.

2.5 O poder da palavra da vítima

O depoimento da vítima, também chamada de ofendida, consiste um meio de prova previsto no Art. 201 do Código Processo Penal, deste modo, a palavra da vítima em consonância com outros elementos da investigação, é um componente de alta importância, validando a autorização da conclusão do caso e consequente condenação do acusado (SILVA & PASCHOALICK, 2020).

Em conformidade com a Lei nº 12.845/2013 (Lei do Minuto Seguinte) é garantido o atendimento imediato, emergencial e integral a todas às vítimas de estupro pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Anteriormente a lei, a vítima de violência sexual precisava se dirigir à delegacia, em seguida seria encaminhada ao Instituto Médico Legal para a realização do exame de corpo de delito e por último receberia auxílio médico. Neste sentido, é fundamental que os profissionais da Saúde que realizem o atendimento possam também, quando possível, realizar obtenção de amostras (vestígios) e/ou ensaios preliminares, que venha a subsidiar e dar força a palavra da vítima.

Paralelamente a Lei nº 13.431/2017, o Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA) foi alterado visando protege-los de violência, assim, realizando o procedimento da escuta especializada e do depoimento em um ambiente acolhedor com a participação de um profissional especializado, garantindo sua privacidade.

Neste contexto, é irreparável que a violência sexual provoca uma série de traumas para o estado psicológico e emocional da vítima. Dentre os efeitos mais visíveis e imediatos são a gravidez indesejada, lesões físicas e doenças sexualmente transmissíveis. Os frutos desses delitos revelam que vítimas manifestam com frequência transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), ansiedade, depressão, distúrbios sexuais e do humor, maior tendência ao uso ou abuso de álcool, drogas e outras substâncias, transtornos alimentares, bem como risco de suicídio (FERREIRA, 2021).

Via de regra recomenda-se obter o máximo de informações sobre o acontecimento, uma vez que é muito difícil provar a ocorrência sexual por outras evidências além do testemunho da vítima. As provas necessitam ser averiguadas de acordo com o caso, para que não seja imposta sanção a quem não fez nada de errado, violando os princípios fundamentais do direito penal (OTTON & NINGELLISK, 2022). Desta forma, a investigação criminal é um conjunto de processos que engloba desde a identificação de matrizes biológicas e análises destas amostras até a elucidação do crime.

2.6 Flúidos biológicos nas Ciências Forenses

A identificação de fluídos biológicos consiste em uma etapa primordial para as investigações forenses, podendo auxiliar na reconstrução de cenas e facilitar o processo de identificação de uma vítima ou suspeito que estiveram presentes e envolvidos no crime (SIJEN & HARBISON, 2021). O estudo sobre a identificação dos fluídos emprega diferentes ensaios químicos, testes baseados na atividade catalítica de enzima, métodos sorológicos e biológicos, além da aplicação de diferentes métodos baseados em técnicas espectroscópicas e microscópicas (SAKURADA, WATANABE & AKUTSU, 2020).

Além disso, os testes presuntivos são aplicados para indicar a identidade de um marcador, enquanto que os testes confirmatórios adicionais são conduzidos para comprovar a origem e identidade da amostra (RODRIGUEZ et al., 2019). Em contrapartida, ensaios que levem a destruição ou que usem elevados volumes da amostra são impasses na aplicação de testes no processo de caracterização inicial. Cada fluido biológico apresenta uma composição única, diferindo em relação ao número de componentes específicos (marcadores), assim, componentes comuns a vários fluídos, pode alternar a base de identificação correta do tipo de amostra (KIM et al., 2020).

Dentre os fluídos corporais mais comuns de interesse forense destacam-se sangue, sêmen, saliva, fluído vaginal, urina e suor. Considerando o sangue, por exemplo, o teste presuntivo mais simples é baseado na reação quimioluminescente do luminol com H₂O₂ catalisada pela hemoglobina, gerando emissão de luz azul (DO VALLE FRAGOSO et al., 2021). Por outro lado, analisando o fluido oral, a detecção da atividade da amilase é extensivamente aceita para detectar a presença de saliva, seja por métodos físicos usando fluorescência ou imunocromatográficos por meio de anticorpos monoclonais (D'AMONE, MATZEU & OMENETTO, 2021)

Embora não seja habitual de serem encontrados em cenas de crimes, o fluido vaginal e a urina podem ser detectados via métodos enzimáticos, o primeiro explorando a peptidase vaginal (enzima), utilizando a técnica de eletroforese em gel; enquanto o segundo fluido pode ser identificado a partir da atividade da urease, que libera NH₃ e CO₂ ao hidrolisar ureia, e assim, por meio de reações colorimétricas constata-se a presença da enzima (SAKURADA, WATANABE & AKUTSU, 2020). A técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM), acoplado ao raios-X de energia dispersiva (EDX) identifica presumivelmente a presença de suor, determinando as concentrações relativas de alguns elementos metálicos, por exemplo, cloro, sódio, fósforo, potássio, enxofre. (CASEY et al., 2020). Seguindo a perspectiva forense, o sêmen é o fluido corporal mais significativo em relação aos casos de agressão sexual.

2.6.1 Sêmen

O sêmen é um fluido corporal de aspecto leitoso e levemente amarelo, em sua composição estão presentes componentes químicos e bioquímicos celulares e não celulares gerados a partir de diferentes glândulas do sistema reprodutor humano. Desta maneira, os constituintes do sêmen são de duas fontes: esperma e líquido seminal, sendo o último gerado pela contribuição da vesícula seminal (45 - 80%), próstata (15 - 30%) e glândulas bulbouretrais (aproximadamente 5%) (CASEY et al., 2020).

A próstata é uma glândula do sistema genital masculino que atua como fonte de fosfatase ácida (AP), antígeno prostático específico (PSA), ácido cítrico, zinco, cálcio e magnésio. No período da ejaculação, é liberado entre 1,5 a 6 mL do fluido seminal, que é geralmente heterogêneo em razão da mistura incompleta dentro do corpo humano. Assim, o cheiro e sabor do sêmen correspondem as aminas, como a espermina, espermidina, putrescina e cadaverina. Estas bases possuem papel de neutralizar o ambiente ácido do canal vaginal (que é muito nocivo ao esperma), e protegem o DNA

dentro do esperma em função da desnaturação ácida (ZHA et al., 2020).

Antes do sêmen secar, ele dispõe um odor característico e contém milhões de espermatozoides. Normalmente, em um indivíduo saudável o número de espermatozoides varia de 10^7 a 10^8 , entretanto este intervalo pode ser alterado em caso de espermatogênese múltipla e outros distúrbios como oligospermia, azoospermia, aspermia, entre outros (LIU et al., 2020). Após a secagem, perde-se o cheiro e conseqüentemente os espermatozoides morrem, apresentando uma coloração branco-acinzentada ou amarelada, proporcionando aos tecidos um efeito engomado (ZHA et al., 2020).

Tal vestígio pode ser identificado em manchas nos lençóis, vestuários, pisos, almofadas, veículos, entre outros, a identificação pelo esperma visa individualizar as evidências biológicas para confronto com possíveis suspeitos (WARRIER & KANCHAN, 2021). Por esta razão, o sêmen possui uma importância em relação à reconstrução do momento do crime para confirmar a ocorrência, e adicionalmente identificar/encontrar o agressor. Assim, para identificação do sêmen existem diversos tipos de testes, Tabela 1.

Tabela 1. Principais testes forenses para detecção de sêmen.

Tipo	Classificação	Marcador / Ensaio	Referências
Químico	Presuntivo	Fosfatase ácida	Zhang et al., 2021
Espectroscópio	Presuntivo	ALS e SEM-EDX	Rodriguez et al., 2019
Microscópio	Confirmatório	Árvore de Natal	Kim et al., 2020
Imunológico	Confirmatório	PSA	Basset et al., 2022
Teste de Cristal	Presuntivo	Florença e Barbeiro	Panicker, D'Silva & Surve, 2022

Fonte: Autora, 2023.

O teste presuntivo mais conhecido e aceito para a indicar a presença de sêmen é o teste da fosfatase ácida (AP). Esta enzima tem a capacidade de catalisar a hidrólise de fosfatos orgânicos, e a depender da sonda usada, pode-se confirmar a presença da enzima devido a formação de um cromóforo (mudança de cor) (ZHANG et al., 2021). A AP possui concentrações no líquido seminal até 400 vezes maior comparada a outros fluidos corporais (GAMBLIN & MORGAN-SMITH, 2020), deste modo, trata-se de um marcador confiável para ensaios preliminares visando a confirmação da presença de sêmen em amostras complexas. Adicionalmente, o sêmen pode ser detectado usando incidência de fonte de luz alternativa (ALS), como a luz ultravioleta. A lâmpada de Wood (WL) é um dispositivo que emite radiação eletromagnética de 320 a 400 nm com alta intensidade, além disto, possui baixo custo, seguro e fácil de usar detectando fluorescência basal da amostra até 72 h depois de praticada o crime de violência sexual.

Apesar disso, quando a WL é testada em outros fluidos, pomadas e/ou cremes podem apresentar resultados falsos positivos (RODRIGUEZ et al., 2019). A análise de microscópio de varredura (SEM) acoplado ao raios-X de energia dispersiva (EDX) pode determinar a concentração de metais como sódio, fósforo, cloro, enxofre presente em uma mancha encontrada na cena do crime (CASEY et al., 2020).

Em relação as técnicas confirmatórias, a identificação microscópica das células espermáticas é amplamente confiável. O sêmen é o único fluido corporal que possui células espermáticas, e elevada quantidade de DNA nas cabeças dos espermatozoides, as quais, podem ser tratadas com reagentes específicos, tornar o esperma visível. A mancha mais conhecida utilizada neste caso possui a designação de mancha de árvore de Natal, e é popular pelas cores características que mancham as cabeças dos espermatozoides de vermelho e as caudas de verde (KIM et al., 2020).

Entretanto, o teste confirmatório mais comum para o sêmen é o teste do antígeno específico da próstata (PSA). Os métodos de detecção de PSA são baseados em testes imunocromatográficos baseados na formação de um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo quando o PSA está presente na amostra testada. Os estudos de AP e PSA são de grande importância nos casos envolvendo agressores azoospermicos (patologia ou cirurgia/vasectomia) ou oligospermicos, pois a ausência ou a baixa concentração de espermatozoides não impedirá a indicação da presença de líquido seminal na vítima (KARADAYI et al., 2021).

Além disso, as técnicas espectroscópicas direcionadas a moléculas, ou seja, espectrofotometria UV-visível, espectrofluorimetria molecular, fluorescência de raios X (XRF), espectroscopia no infravermelho (IR próximo e médio) e Raman apresentam vantagens pois são ensaios não destrutivos (em instâncias principais). Enquanto técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia em camada fina de alto desempenho (HPTLC), podem levar a destruição parcial ou total da amostra, afetando as propriedades do fluido (DAS et al., 2020).

Desta forma, todas as estratégias oferecem vantagens e limitações em relação à sensibilidade, considerando a mudança na estrutura física e química da mancha ou da amostra de fluido. Entre os testes citados, a detecção da fosfatase ácida apresenta um grande potencial para determinação do fluido seminal. O presente trabalho consiste no desenvolvimento de um método colorimétrico que possam ter ação confirmatória com análises mais sensíveis e seletivas, permitindo as vantagens de identificação e garantindo a portabilidade para aplicações forenses.

2.7 Fosfatase ácida (AP)

De forma geral, as fosfatases são hidrolases que atuam (preferencialmente) sobre compostos orgânicos de fósforo, encontradas em várias formas moleculares. Deste modo, podem ser classificadas como fosfatases alcalinas, neutras e ácidas, dependendo do pH necessário para o desenvolvimento de sua atividade ótima (LIU et al., 2021). Fosfatases ácidas (*acid phosphatase*, AP, EC 3.1.3.2), ou fosfohidrolases de monoéster ortofosfórico são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de uma variedade de ésteres de ortofosfato, bem como reações de transfosforilação em meio ácido, com pH ótimo entre 5 e 6 (RAN et al., 2021).

Esta enzima possui grande importância no diagnóstico de determinadas doenças que acometem os seres humanos, sendo onipresentes e amplamente distribuídas na natureza em plantas, células animais e microrganismos. A fosfatase ácida derivada da próstata apresenta maior relevância clínica, uma vez que a presença desta enzima no soro é amplamente utilizada como diagnóstico do câncer prostático; que normalmente emprega como parâmetro o antígeno específico da próstata (PSA) como um marcador sensível nos estágios iniciais da doença, enquanto que a fosfatase ácida prostática (PAP) é empregada no monitoramento e também em investigações forenses (GAMBLIN & MORGAN-SMITH, 2020).

Ademais, é encontrada no fígado, rins, eritrócitos, baço, leucócitos, plaquetas e ossos, essa vasta distribuição em organismos sugere que eles podem estar envolvidos em reações fundamentais nos organismos. Além disto, existe em diversas formas isoenzimáticas, distintas em termos moleculares, especificidade quanto ao substrato, sensibilidade a inibidores, presença e número de carboidratos ligados à cadeia polipeptídica (TANG et al., 2019).

Normalmente, explora-se a ação da enzima com uma sonda fosfatada, com a liberação de um composto colorido ou fluorescente que indica a presença da fosfatase ácida. A detecção/identificação do sêmen pode ser realizada via dois tipos de métodos: direto e indireto. No teste direto, um item como um *swab* íntimo é umedecido e enrolado sobre um pedaço de papel de filtro. Em teste indireto, também conhecido como teste de pressão, a triagem de um objeto grande para a presença de manchas de sêmen é realizada colocando uma folha de papel de filtro sobre o item, umedecendo com água, e, em seguida, pressionando firmemente com a mão para transferir parte do sêmen para o papel (AJAY et al., 2019). Atualmente, o desenvolvimento de métodos para a determinação de fosfatase ácida são baseados em uma abordagem rápida e sensível com análises em

diferentes campos de pesquisa.

2.7.1 Métodos para determinação de fosfatase ácida e princípio do método proposto

A anormalidade da atividade da fosfatase está intimamente associada a uma variedade de doenças, como câncer de próstata, disfunção hepática, leucemias, doença de Gaucher (ZHANG et al., 2021). Em meio ácido, a enzima realiza um papel essencial na conversão de ortofosfato. Neste contexto, diversos métodos foram propostos para a detecção de fosfatase ácida, por exemplo, análise eletroquímica (GAN et al., 2021), colorimetria (ZHENG, 2020), fluorescência molecular (QU et al., 2019), cromatografia líquida de alta desempenho (HPLC) (BUTMEE et al., 2021) e transferência de energia por ressonância de plasma (PRET) (YAN et al., 2019). Embora estes métodos possibilitem estratégias eficazes para detecção da AP, alguns, precisam de equipamentos de elevado custo e complexos ou preparo da amostra envolvendo muitas etapas ou com certo grau de complexidade.

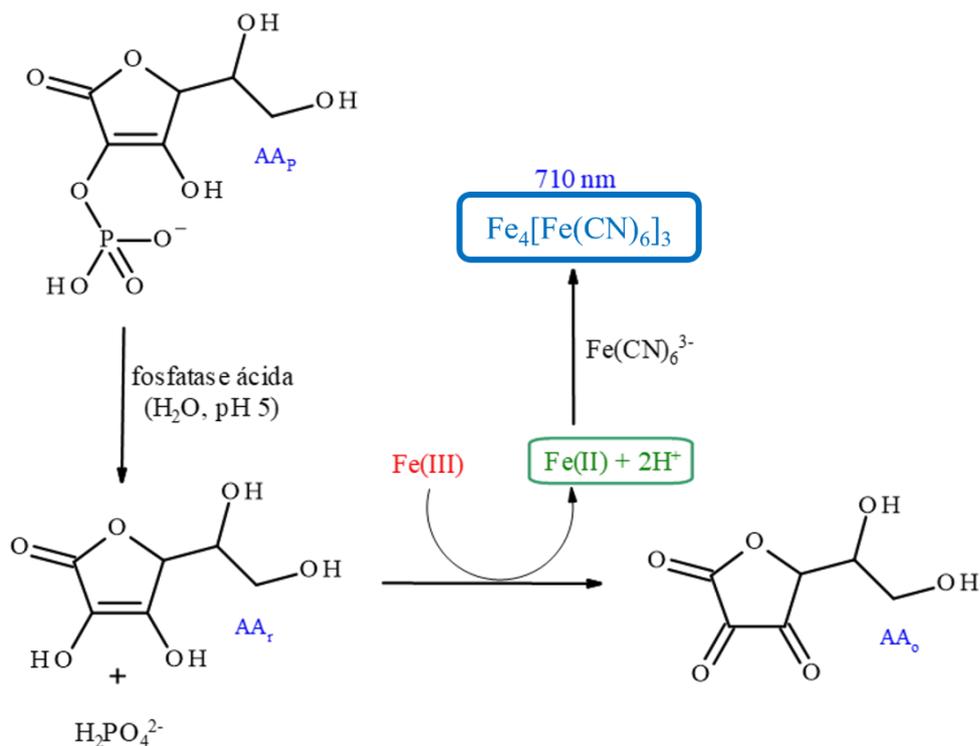
Dentre esses métodos, os ensaios envolvendo colorimetria são comuns para detecção de enzimas, devido a sensibilidade e operabilidade. Geralmente, para análise dos produtos coloridos da hidrólise de substratos emprega-se a espectrofotometria UV- vis para determinação quantitativa, em alguns casos é possível obter uma análise qualitativa via detecção visual (a olho nu) (SAKURADA, WATANABE & AKUTSU, 2020). Além disso, recentemente o smartphone tem sido utilizado como plataforma de detecção e quantificação da AP, as cores são registradas com o auxílio da função “câmera” e analisadas diretamente usando um software de processamento de imagem (LIU, HUANG & WU, 2020).

Duas estratégias bem usuais são amplamente empregadas, a primeira consiste na ação da fosfatase frente ao fenil fosfato, gerando fenol no meio, o qual é medido por espectrofotometria após reação com 4-AAP (4-aminoantipirina) e $K_3Fe(CN)_6$, gerando um cromóforo ($\lambda = 480$ nm), enquanto a segunda é baseada na desfosforilação da sonda colorimétrica p-nitrofosfato, gerando no meio reacional o p-nitrofenol ($\lambda = 410$ nm), de coloração amarelada (Tang et al., 2019). Alternativamente, trabalhos recentes como Wu et al., 2019 e Zhang et al., 2021, exploraram a geração de ácido ascórbico reduzido (AA_r) *in situ*, após ação da fosfatase frente ao ácido ascórbico 2-fosfato (AA_p).

De forma análoga, Hu et al. (2016) analisou a ação da fosfatase ácida e alcalina na desfosforilação do AA_P, levando a formação do AA_r, o qual reduziu Cu(II) a Cu(I), este último formando um complexo colorido com a batocuproína sulfonada ($\lambda = 484$ nm) proporcional a quantidade e atividade de enzima em solução. Similarmente, para detectar a fosfatase alcalina empregou-se a mesma lógica, contudo, variando o ligante que forma complexo colorido com Cu(I), neste caso, sendo usado a o-fenantrolina ($\lambda = 424$ nm, Hu et al, 2017) e o ácido bicinconínico ($\lambda = 562$ nm, He et al, 2018), enquanto que Hu et al. (2017) explorou a redução de Fe(III) a Fe(II) mediada pelo AA_r formado, para detecção fosfatase alcalina a partir da formação do complexo do íons ferrosos com o-fenantrolina ($\lambda = 535$ nm). Contudo estas estratégias estão sujeitas a interferência de cor da amostra e do pH do meio, uma vez que os ligantes são derivados de ácidos fracos, por exemplo.

Desta forma, objetivando superar estas limitações, neste trabalho empregou-se o AA_P como substrato para detecção da fosfatase ácida (AP) em amostras de sêmen, explorando a redução do Fe(III) a Fe(II) pelo AA_r gerado, entretanto, utilizando como sonda colorimétrica a formação do azul da Prússia ($\lambda = 710$ nm) em meio ácido a partir da reação com K₃Fe(CN)₆ (Fig. 2). Uma vez que o corante formado apresenta máximo de absorção na região do infravermelho próximo, interferências espectrais seriam minimizadas em decorrência da coloração da amostra, além disto, os reagentes para formação da sonda (exceto o AA_P) são simples e disponíveis na maioria dos laboratórios, facilitando a implementação do método.

Fig. 2. Esquema representativo da geração do AA_r a partir da ação da fosfatase ácida (AP) frente ao AA_p, e posterior reação do Fe(II) gerado formando o azul da Prússia. Sendo, AA_o = ácido ascórbico oxidado.



Fonte: Autora, 2023

2.8 Determinação de fosfatase ácida (sondas e kits)

Os reagentes (sondas) comercializados na forma de *kits* empregados normalmente em reações colorimétricas para detecção de AP, são o *p*-nitrofenil fosfato, 1-naftil fosfato, timolftaleína fosfato, e ensaio por fluorescente molecular com 4-metilumbeliferona fosfato (4-MUP) utilizados para ensaios clínicos e estudos *in vitro*. Contudo, o uso destes *kits* indica possíveis interferências espectrais em função dos constituintes das amostras a serem analisadas (ZHANG et al., 2021). A Tabela 2 indica as principais características dos testes citados.

Tabela 2. Ensaios comerciais para detecção de fosfatases.

Sonda / Substrato	Principais características	Reações
<i>p</i> -nitrofenil fosfato (pNPP)	É utilizado para analisar atividade de fosfatases alcalinas e ácidas. Quando a fosfatase e o PNPP reagem, forma-se um produto da reação <i>p</i> -nitrofenol de cor amarelo ($\lambda_{\max} = 405 \text{ nm}$), solúvel em água (QI et al., 2020).	
1-naftil fosfato	Este substrato hidrolisado pela AP a fosfato inorgânico e 1-naftol, o qual reage com o sal de diazônio, formando um corante azo de coloração roxa ($\lambda_{\max} = 320 \text{ nm}$) (CHEN et al., 2022).	
Timolftaleína fosfato	A adição de base inibe a ação enzimática e converte a timolftaleína (indicador ácido-base) liberada na sua forma aniônica (azul, $\lambda_{\max} = 598 \text{ nm}$) (ZHU et al., 2020).	
4-metilumbeliferona fosfato (4-MUP)	Amplamente utilizados para a detecção da atividade de fosfatases (ácidas e alcalinas) e glicosidase. O substrato fosfato de 4-metilumbeliferona (4-MUP) é convertido no produto fluorescente 4-metilumbeliferona (4-MU, $\lambda_{\text{em}} = 445\text{-}455 \text{ nm}$) (CHANG et al., 2023).	

Fonte: Autora, 2023

Apesar dos substratos de *p*-nitrofenil fosfato e 1-naftil fosfato serem amplamente empregados quanto aos testes colorimétricos, o substrato de timolftaleína monofosfato incorpora maior seletividade para a isoenzima prostática (ZHU et al., 2020). Uma desvantagem do substrato 4-MUP, é que a fluorescência máxima do produto da reação requer meio alcalino, uma vez que 4-MU possui $pK_a \approx 8$, além da necessidade do uso de cofatores, no caso, Zn(II) e Mg(II) (CHANG et al., 2023). O substrato ácido ascórbico 2-fosfato que será adicionado ao método apresenta uma alta sensibilidade e seletividade em testes colorimétricos e fluorescentes (RAN et al., 2021)

Os procedimentos dos *kits* podem ser realizados em temperatura ambiente (21°C) ou a 37°C (temperatura corpórea), com tempo estimado de 30 min para a obtenção do produto colorimétrico ou fluorescente. Em relação aos reagentes, a indicação de armazenamento indica refrigeração com a temperatura de 2 a 8°C em frasco bem vedado para evitar evaporação. A atividade enzimática é sensível ao efeito a temperatura e pH, necessitando de um sistema tampão no meio, exemplos acetato de sódio e citrato de sódio (NJAU, LUNAYO & ODOUR, 2021), ademais esta atividade pode ser parcialmente ou totalmente bloqueada pela ação dos inibidores, tal como, fluoreto, tungstato ou molibdato (LAU et al., 2020).

Normalmente, o *kit* contém uma amostra do substrato/sonda, tampão, reagente de cor e um padrão, as concentrações variam de acordo com o tipo de análise, bem como o volume dos reagentes, na maioria dos testes utilizam-se em μL . As informações relacionadas à biossegurança e toxicidade dos produtos leva em consideração os diagnósticos *in vitro* apresentando risco biológico, desta forma, é necessário o cuidado no manuseio dos materiais (ELABSCIENCE, 2023).

O custo de uma análise depende de muitos fatores ligados à natureza do processo analítico, neste parâmetro, os *kits* existentes no mercado variam de 4 a 8 reais/por unidade, enquanto o método colorimétrico a ser desenvolvido custará em média 1 real/por unidade. Apesar o método de análise colorimétrica ser amplamente utilizado para a detecção e quantificação de enzimas, o desenvolvimento de novas estratégias analíticas para a enzima de fosfatase ácida permite a que permitam determinações sensíveis e com reduzida ou ausência de interferência espectral devido a constituintes presentes nas amostras.

2.9 Importância do trabalho para a sociedade

O sêmen é o fluido corporal mais significativo na análise forense de casos de agressão sexual, em sua composição destaca-se a enzima de fosfatase ácida (AP). Atualmente, os *kits* comercialmente apresentam certas limitações em função da emissão basal de amostras mais complexas. Nesta perspectiva, o Estado de Alagoas, registrou um aumento de 7,8% no número de casos envolvendo abuso sexual contra criança ou adolescente, principalmente apontando que o agressor de alguma forma faz parte do universo de convivência da vítima (FBSP, 2022). Além disto, o passível de análises no Estado para este tipo de crime é da ordem de 3 mil amostras, enquanto no Brasil, são quase 200 mil amostras. Assim, a fim de atender a esta demanda, este projeto propõe elaborar um método colorimétrico para detecção de fosfatase ácida para aplicações forenses. O método a ser desenvolvido se baseia na formação de um sistema cromogênico responsável pela ativação da absorção espectral na região do visível, e também, alteração de cor da solução considerando a formação do azul da Prússia (PB) ($\lambda = 710 \text{ nm}$) pela mistura de íons de Fe(II) com $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, reagentes simples de fácil acesso e armazenamento. O *kit* a ser desenvolvido apresenta um baixo custo em relação aos existentes no mercado custando em média 1 real por análise. Dessa forma, a capacidade de formação de um cromóforo de coloração intensa azul-esverdeado auxiliará em análises de rotina em amostras armazenadas, na cena do crime ou na vítima, viabilizando um maior número de evidências para elucidações dos crimes sexuais.

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de metodologia analítica para determinar fosfatase ácida (AP) via método colorimétrico com o intuito de elaboração de sistema portátil (kits) visando aplicações forenses.

3.2 Objetivos Específicos

- (i) Otimizar as principais variáveis químicas e físicas para determinação da enzima fosfatase ácida em função da redução do Fe(III) a Fe(II), empregando a formação do azul da Prússia;
- (ii) Realizar validação estatística do método considerando as principais figuras de mérito a serem determinadas;
- (iii) Aplicar o método otimizado em amostras reais para detecção de fosfatase ácida em diferentes sistemas reais e simulados (solução, tecido, *swab* e papel cromatógrafo);
- (iv) Comparar os resultados do método proposto com sondas comerciais e outros fluídos biológicos (saliva, sangue e urina), bem como outros possíveis interferentes (lubrificantes, leite, suco de abacaxi, molho de tomate e clara de ovo);
- (v) Explorar uma dupla resposta do método considerando a presença de ácido ascórbico no sêmen.

4. EXPERIMENTAL

4.1 Preparo das soluções

Todos os reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico de pureza. No preparo das soluções aquosas e limpeza de vidrarias utilizou-se água ultrapura (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) obtidas a partir de purificador Mater System MS2000 (Gehaka, São Paulo, Brasil).

4.2 Soluções e procedimentos

Todas os reagentes empregados no preparo de soluções neste trabalho foram da Sigma-Aldrich ou Merck, sem necessidade de etapa de purificação prévia. Inicialmente, os principais parâmetros reacionais, como avaliação da concentração dos reagentes FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e HNO_3 foram otimizados empregando ácido ascórbico reduzido (AA_r) como o produto da reação com o tempo de incubação de 15 minutos. Para a avaliação de sistemas poliméricos, com o intuito de melhorar a estabilidade do produto de formação azul da Prússia, foram testados o polivinilpirrolidona (PVP, a 40 kDa) solubilizado em água e a quitosana em ácido acético 0,1 M, ambos os polímeros foram testados a 0,20% (m/v). Após a otimização, o PVP foi escolhido para ser adicionado no sistema utilizando 40 μL do polímero a 0,20% (m/v). Assim, considerando as condições de melhor performance analítica empregou-se o seguinte procedimento: 105 μL de ácido ascórbico 2-fosfato (AA_p) 0,75 mM a pH 5 (tampão acetato 100 mM) e volume variado de fosfatase ácida ou da amostra, aguardando-se 45 min. Em seguida, adicionou 340 μL de FeCl_3 a 150 μM e 680 μL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ a 1,5 mM, ambos solubilizados em HNO_3 0,45 M. Por fim, se adicionou água perfazendo um volume final de 2,0 mL, esperando um tempo de 30 min para ser analisado no espectrofotômetro. Após a redução do Fe(III) a Fe(II), reação com $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e formação do Azul da Prússia (*Prussian blue*, PB), $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, um coloide azul escuro ($\lambda = 710 \text{ nm}$). Eventualmente, quando necessário, para remoção do complexo azul adsorvido nos *eppendorfs* ou cubeta de vidro foi preparado uma solução contendo ácido oxálico 0,5% (m/v) em hidróxido de sódio 0,1 M, de acordo com a recomendações de Nóbrega & Lopes (1995).

4.3 Amostra real

As amostras reais de sêmen foram obtidas a partir de voluntários autodeclarados saudáveis (CAAE: 58121322.7.0000.5013), os quais foram devidamente informados sobre o objetivo do trabalho. A coleta das amostras foi realizada de forma individual e espontânea, em diferentes momentos do projeto, sendo armazenadas em um coletor estéril, transparente, e destinado a preservação e transporte de amostra biológica. Por fim, as amostras foram acondicionadas a 4°C para conservação.

4.4 Equipamentos utilizados

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro de varredura com feixe duplo modelo AJX 6100 (Micronal, Brazil) com cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. Para as medidas de pH utilizou-se um potenciômetro modelo PG 1800 (Gehaka, Brazil) com incerteza de $\pm 0,01$ acoplado a um eletrodo combinado de vidro. As massas dos padrões e reagentes foram medidas em duas balanças analíticas: (i) balança analítica eletrônica modelo AG 200 (Gehaka, Brasil) com precisão de 0,1 mg para medidas ≥ 10 mg e (ii) balança analítica modelo AUW 220D (Shimadzu, Brasil) com precisão de 0,01 mg (para massas < 10 mg).

4.5 Parâmetros estatísticos de dados

Para realização do tratamento estatístico dos dados empregou-se o programa Origin[®] 9.0 (OriginLab Corporation), os resultados obtidos foram expressos em termo de média \pm desvio padrão (SD), para análise em triplicata ($n = 3$). A avaliação estatística entre os sistemas analisados considerou o teste de ANOVA (Análise de Variância) (*one-way*), para um intervalo de confiança igual a 95%. Para todos os procedimentos foi considerado a curva analítica baseada na regressão linear, comparando a sensibilidade analítica, valor do branco analítico e o coeficiente de correlação linear de Pearson.

4.6 Procedimento para os sistemas alternativos

Para o teste em tecido (algodão), adicionou-se 50 μ L do sêmen em um pedaço do tecido de proporção 2 \times 2 cm, nas diluições 1:10 e 1:20 realizada nos *ependorfs* antes da aplicação no tecido, 50 μ L do AAP a 0,75 mM e 50 μ L tampão acetato pH 5 (100 mM), aguardando cerca de 10 minutos de incubação. No estudo com o *swab* utilizou 30 μ L de cada reagente com aplicação direta no cotonete estéril, com um intervalo aproximado de 5 minutos entre cada adição para a secagem do material. Além disso para determinação

de sêmen empregando o dispositivo analítico baseados em papel (PAD), foram adicionados 0,5 μL de cada reagente, permanecendo a mesma ordem dos reagentes respeitando a secagem homogênea a temperatura ambiente. Para todos os testes foram utilizados os reagentes de FeCl_3 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, nas concentrações de 10 mM e os resultados obtidos foram representados através de imagens no microscópio portátil digital modelo MP-800, observando a coloração final azul.

Em especial, o método proposto consiste na utilização do PAD produzido pela técnica de impressão em cera (CARRILHO, 2009), com o layout desenhado usando o software Corel Draw™ versão X8, impresso em papel cromatográfico, e em seguida, aquecido a 110°C por 2 min para derreter completamente a cera, gerando barreiras hidrofóbicas eficazes no substrato de papel. Por último, um lado do dispositivo de papel foi revestido com fita adesiva para evitar vazamento da amostra (TAVARES, 2021).

Além disso, foi realizado um estudo temporal na deposição da amostra seminal no tecido considerando o tempo de 2 meses, os pedaços de tecido de proporção 2×2 cm foram colocados sob uma bandeja e adicionou-se de 20 μL de sêmen em tecido branco e tecido estampado, os quais ficaram expostos a luz e umidade no ambiente do laboratório. Ao término do tempo, os tecidos selecionados foram recortados na margem da amostra, em seguida colocados em *ependorfs* separados contendo tampão de acetato pH 5 (100 mM) com o tempo de incubação de 10 minutos. Após esse procedimento, uma alíquota de 100 μL é retirada e acrescentou-se 105 μL do AA_P a 0,75 mM, 250 μL do tampão acetato pH 5 (100 mM) e aguardando o tempo de incubação de 45 min. Em seguida, adicionou 340 μL de FeCl_3 a 150 μM e 680 μL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ a 1,5 mM, ambos solubilizados em HNO_3 0,45 M. Por fim, se adicionou água perfazendo um volume final de 2,0 mL esperando um tempo de 30 min para análise quantitativa no espectrofotômetro ($\lambda = 710 \text{ nm}$).

4.7 Avaliação com a sonda comercial p-nitrofenil fosfato (pNPP) e adição do cofator MgCl_2

O substrato p-nitrofenil fosfato é amplamente utilizado em estudos para detecção colorimétrica de AP, como produto final p-nitrofenol de coloração amarela medido em 405 nm, este substrato serviu de comparação com o método a ser desenvolvido. Nesta condição utilizou-se 20 μL da sonda pNPP a 0,1 mM, preparado em tampão citrato a 90 mM (pH = 4,8) entrando em contato com a enzima de AP. Após um tempo de reação de

45 minutos a temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de NaOH a 1 M e foi medida pelo espectrofotômetro.

Ademais, outra comparação foi realizada com adição de 250 μL de MgCl_2 a 100 mM, substituindo o tampão na curva com AP. O MgCl_2 é considerado um cofator que tende a aumentar a afinidade da enzima pelo substrato ou estabilizar a conformação da enzima, dessa forma aumentando a sensibilidade do método.

4.8 Parâmetro para avaliação de (possíveis) interferentes

Após a otimização do método realizou-se uma avaliação da influência de diferentes materiais/sistemas encontrados na cena de crimes considerando os fluídos biológicos mais encontrados como sangue, saliva e urina provenientes do sexo masculino e feminino, bem como a relação com lubrificante, clara de ovo, molho de tomate, leite comercial e suco de abacaxi. Na análise do sangue, clara de ovo, molho de tomate e leite comercial foi necessário um preparo utilizando a centrífuga a 500 rpm durante o tempo de 2 minutos. Deste modo foram preparadas as soluções considerando a presença de AA_r nas diluições 5, 10 e 20 vezes; e AP nas diluições 250, 500, 1000 e 1500 vezes, na amostra de sêmen como referência do estudo.

4.9 Parâmetros para ensaio de recuperação

O ensaio de recuperação foi dividido em duas etapas. Inicialmente, considerando o processo de otimização com a variação da concentração de AA_r entre 5 a 40 μM , através de duas amostras de sêmen distintas a com a diluição de 1:10, na primeira amostra biológica a concentração de 5 μM equivale a amostra diluída (referência) e na segunda amostra a concentração de 15 μM equivale a referência, em ambas foram adicionados 10, 15 e 20 μM do AA_r para avaliação do nível de recuperação, %. A segunda etapa consiste na aplicação com a curva contendo a enzima de AP entre 0,25 a 3 UL^{-1} , novamente utilizando duas amostras de sêmen com diluição de 1:2000, e adição de 0,5; 1,0 e 1,5 UL^{-1} .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da concentração dos reagentes (FeCl₃ e K₃Fe(CN)₆)

O uso do azul da Prússia, ou PB pelo seu nome em inglês *Prussian Blue*, tem sido explorando em sistemas sensores variados (colorimétricos e eletroquímicos) para detecção ou simulação de diferentes enzimas (XUE et al., 2020). Além disto, a quantificação direta de AA_r tem sido reportada explorando a formação deste corante para determinação deste composto em produtos farmacêuticos (NÓBEGRA & LOPES, 1995) e suco de frutas (TEEPOO et al., 2012). Neste sentido, para o desenvolvimento do método visando a detecção de AP, inicialmente otimizou-se a melhor condição para determinação do AA_r que seria gerado após a desfosforilação do AAP. Assim, empregou-se o AA_r como analito, e foi variada a concentração de FeCl₃ e K₃Fe(CN)₆ visando a obtenção da máxima sensibilidade analítica.

A melhor estabilidade quanto a geração e detecção do corante azul da Prússia em solução é alcançada quando tem-se excesso de K₃Fe(CN)₆ em relação ao Fe(II), para evitar a ocorrência de precipitação (NÓBEGRA & LOPES, 1995; TEEPOO et al., 2012). Assim, manteve-se constante a proporção entre FeCl₃ e K₃Fe(CN)₆ em 1:5, contudo, foi alterada a concentração de cada composto (Tabela 3), neste ensaio.

Tabela 3. Avaliação da concentrações de FeCl₃ e K₃Fe(CN)₆ mantendo-se a proporção de 1:5 fixa entre os compostos e se empregando AA_r como analito (n = 3). Condições reacionais: todas as soluções foram preparadas em HNO₃ a 0,15 M e o tempo de reação total foi de 20 min. O número de pontos (n) em cada curva foi n ≥ 5.

Sistema	[FeCl ₃] (μM)	[K ₃ Fe(CN) ₆] (μM)	Faixa linear (μM)	A _{710 nm} = a × C _{AAr} + b (r)		
				a	b	r
1	25	125	10 - 75	7,94 ± 1,10 ^a	0,077 ± 0,046 ^a	0,9720
2	37,5	188	10 - 100	10,91 ± 0,29 ^b	0,022 ± 0,015 ^b	0,9993
3	50	250	10 - 75	16,65 ± 0,48 ^c	0,074 ± 0,020 ^c	0,9987
4	100	500	10 - 100	19,26 ± 0,93 ^d	0,048 ± 0,052 ^d	0,9953
5	150	750	5 - 50	33,86 ± 0,75 ^e	0,086 ± 0,021 ^e	0,9987
6	200	1000	10 - 75	29,96 ± 1,07 ^f	0,107 ± 0,045 ^f	0,9980

Letras iguais (comparação por coluna) indicam que não houve diferença estatística aplicando ANOVA (*one-way*) para o intervalo de 95% de confiança.

Fonte: Autora, 2023.

Apesar da diferença estatística apresentada entre os sistemas para o intervalo de 95% de confiança, a máxima sensibilidade do sistema visando a detecção de AA_r foi obtida quando empregou-se FeCl₃ a 150 μM e K₃Fe(CN)₆ a 750 μM (sistema 5, Tabela 3). Nesta condição conseguiu-se medir AA_r a partir de 5 μM em meio de HNO₃ 0,15 M,

o qual previne a oxidação prévia do AA_r, e auxilia na formação efetiva do azul da Prússia. A nível de comparação Teepoo et al., (2012) obteve a melhor resposta analítica empregando FeCl₃ a 1 mM e K₃Fe(CN)₆ a 5 mM, contudo, nestas condições o sistema foi cerca de 10 vezes menos sensível que o atual. Desta forma, as condições indicadas no sistema 5, foram mantidas para avaliações futuras.

Em seguida, se avaliou a o excesso de K₃Fe(CN)₆ no meio (Tabela 4), mantendo-se constante a concentração de FeCl₃ (150 μM) quanto a formação de azul Prússia na detecção do AA_r.

Tabela 4. Avaliação da concentrações de K₃Fe(CN)₆ mantendo-se constante de FeCl₃ (150 μM) e se empregando AA_r como analito (n = 3). Condições reacionais: todas as soluções foram preparadas em HNO₃ a 0,15 M e o tempo de reação total foi de 20 min. O número de pontos (n) em cada curva foi n ≥ 5.

Sistema	[FeCl ₃] (μM)	[K ₃ Fe(CN) ₆] (μM)	Faixa linear (μM)	$A_{710\text{ nm}} = a \times C_{\text{AA}_r} + b$ (r)		
				a	b	r
1	150	750	5 - 30	13,21 ± 0,50 ^a	0,038 ± 0,009 ^b	0,9963
2	150	1500	5 - 40	14,95 ± 1,09 ^a	0,032 ± 0,024 ^b	0,9941
3	150	2250	5 - 30	14,02 ± 0,54 ^a	0,045 ± 0,009 ^b	0,9962
4	150	3000	5 - 40	14,51 ± 0,70 ^a	0,048 ± 0,015 ^b	0,9929

Letras iguais (comparação por coluna) indicam que não houve diferença estatística aplicando ANOVA (*one-way*) para o intervalo de 95% de confiança.

Fonte: Autora, 2023.

Uma vez que os valores de sensibilidades, assim como, dos brancos analíticos não diferiram estatisticamente (95% de confiança), selecionou-se o sistema 2 (Tabela 4), pois a média da sensibilidade foi a maior, enquanto que a média do valor do branco a menor, garantindo assim, um excesso de 10 vezes do K₃Fe(CN)₆ em relação ao FeCl₃. Por fim, verificou-se que nesta condição a ordem de adição dos reagentes, oxidação do Fe(II) e K₃Fe(CN)₆ não altera a formação do complexo férrico hexacianoferrato(II), azul da Prússia. Sendo assim, o mecanismo proposto considera a redução de Fe(III) através do AA_r e a formação do PB quando o Fe(II) reage com K₃Fe(CN)₆.

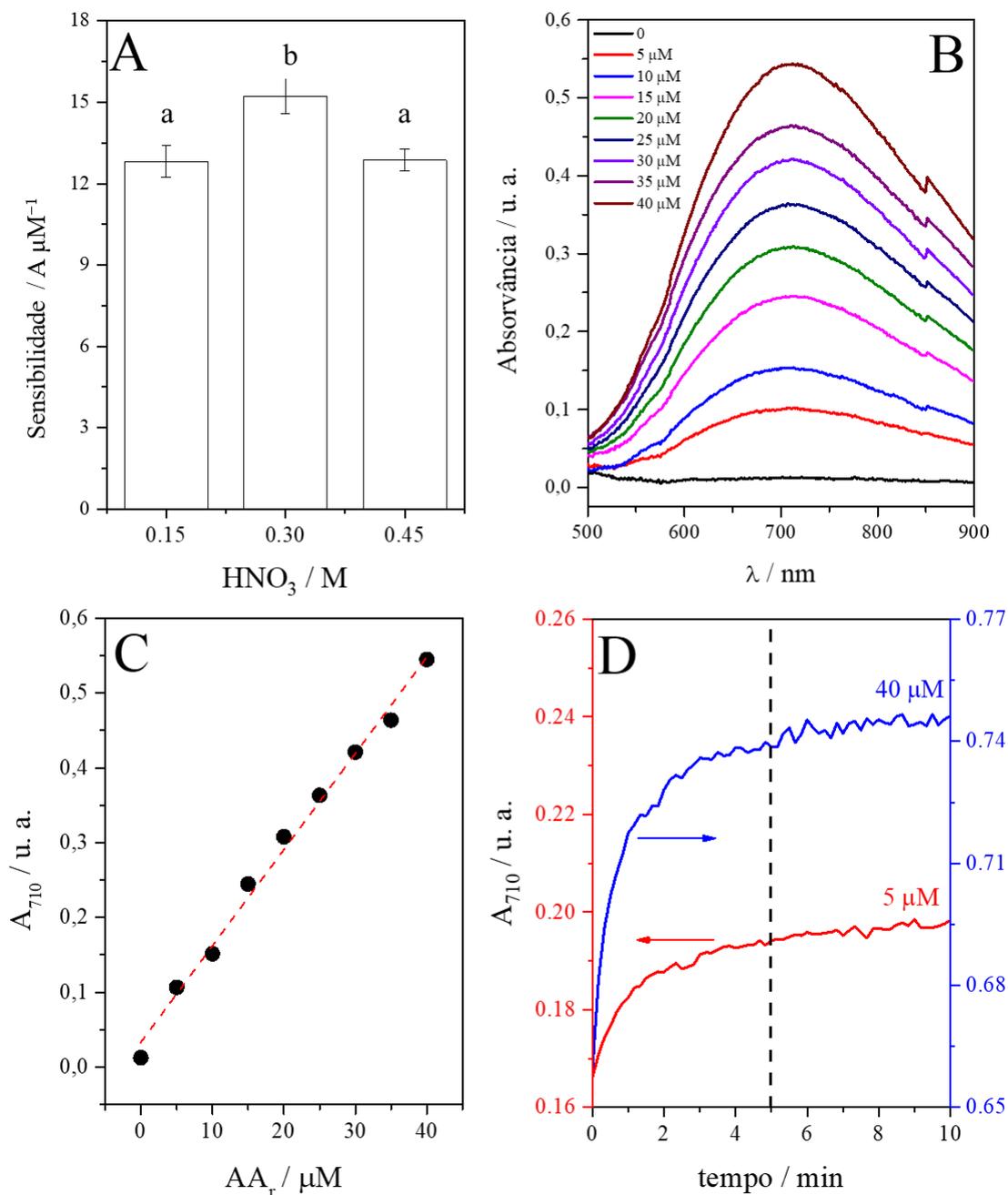
5.2 Avaliação da concentração do HNO₃

Nóbrega & Lopes (1995) reportaram que o aumento da concentração de HNO₃ no meio levou a redução da sensibilidade, enquanto que Teepoo et al. (2012) avaliaram o pH do meio (1,5 a 6,0), não observando influência desta variável na formação do azul da Prússia para detecção de AA_r. O método em desenvolvimento objetiva medir a atividade da AP, e esta reação ocorre preferencialmente em pH 5 - 6 (RAN et al., 2021), desta

forma, após a geração do AA_r no meio, o ácido HNO₃ deve estar em uma concentração suficiente para superar o efeito do tampão na reação enzimática e garantir a detectabilidade do AA_r no meio reacional. Portanto, a concentração de HNO₃ diluído foi avaliada de 0,15 a 0,45 M (Fig. 3A).

Dentre as concentrações de HNO₃ avaliadas, apesar da 0,30 M apresentar maior sensibilidade (para um nível de confiança de 95%) com variação máxima de 16%, selecionou-se para os estudos futuros a concentração de 0,45 M. Na condição de que esta condição garanta ácido HNO₃ suficiente para suplantar o efeito do tampão do sistema enzimático, e ainda propiciar condições para máxima sensibilidade visando a detecção de AA_r. Além disto, para efeito demonstrativo, são apresentados os espectros de absorção molecular para reação (Fig. 3B), assim como a curva analítica, a qual possui equação igual a $A_{710\text{ nm}} = 12,86 (\pm 0,40) \times C_{AA_r} + 0,033 (\pm 0,009)$, $r = 0,9965$ ($n = 9$) para o intervalo de concentração de 5 - 40 μM (Fig. 3C) e limite de detecção (LOD) estimado em 0,2 μM . Por fim, com base nos estudos cinéticos, nestas condições o tempo mínimo para medição dos sinais foi considerado de 5 min, independente do nível de concentração do AA_r (Fig. 3D).

Fig. 3. (A) Variação da sensibilidade analítica em função da concentração de HNO_3 , (B) Espectro de absorção molecular, (C) curva analítica para AA_r e (D) cinética de formação relacionado ao azul da Prússia empregando-se $[\text{HNO}_3] = 0,45 \text{ M}$. Condições reacionais: tempo de reação total foi de 20 min, $[\text{FeCl}_3] = 150 \mu\text{M}$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$ (proporção 1:10). O número de pontos (n) em cada curva foi $n \geq 8$. Para a concentração do HNO_3 (A) houve diferença estatística aplicando ANOVA (*one-way*) e teste de Tukey para o intervalo de 95% de confiança. No estudo cinético foram empregadas duas concentrações de AA_r , sendo 5 e 40 μM .



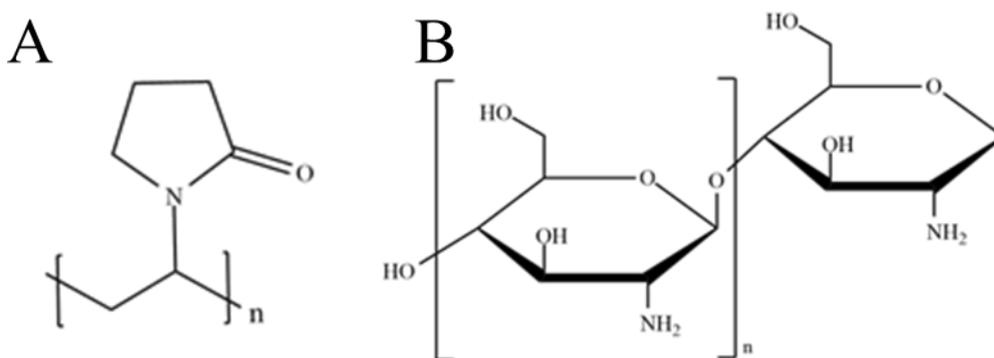
Na parte (A): Letras iguais indicam que não houve diferença estatística aplicando ANOVA (*one-way*) para o intervalo de 95% de confiança.

Fonte: Autora, 2023.

5.3 Avaliação da estabilidade do corante formado: uso de sistemas poliméricos

A estabilidade do corante azul da Prússia é limitada, uma vez que após a reação, um precipitado é formado após certo tempo. Desta forma, avaliou-se o emprego de sistemas poliméricos que poderiam estabilizar o coloide, como agentes protetores, evitando a precipitação. Considerando que os polímeros de coordenação desempenham papéis importantes no campo dos ímãs moleculares e trabalhos recentes como Li et al., (2022) e Oh et al., (2019), avaliou-se o uso do polivinilpirrolidona (PVP) e a quitosana, cujas as estruturas são representadas na Fig. 4 (A e B), em relação ao mecanismo proposto.

Fig. 4 (A). Estrutura química do polímero polivinilpirrolidona; **(B)** Estrutura química do polímero quitosana.



Fonte: Autora, 2023.

Na primeira condição, o PVP é um polímero sintético, amorfo, higroscópico, com capacidade de alterar a viscosidade em solução aquosa em função da massa molar do polímero (BUSQUETS & ESTELRICH, 2020). Além do PVP, avaliou-se também a quitosana, um amino polissacarídeo que possui propriedades (bio)adesivas, é biodegradável e possui compatibilidade com muitos sistemas biológicos, além de elevada viscosidade (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2019), dados (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação dos diferentes polímeros (0,2% m/v) na estabilização da cor e sensibilidade do método. Condições reacionais: as concentrações de FeCl₃ e K₃Fe(CN)₆ foram 150 μM e 1,5 mM, respectivamente (proporção 1:10), tempo de reação total foi de 20 min. O número de pontos (n) em cada curva foi n ≥ 9.

Sistema	$A_{710} = a \times C_{AAr} + b (r)$		
	a	b	r
PVP	14,73 ± 0,66 ^a	0,037 ± 0,015 ^b	0,9930
Quitosana	12,29 ± 0,51 ^b	0,023 ± 0,012 ^b	0,9940
Sem adição de polímero	9,33 ± 0,71 ^c	0,043 ± 0,017 ^b	0,9800

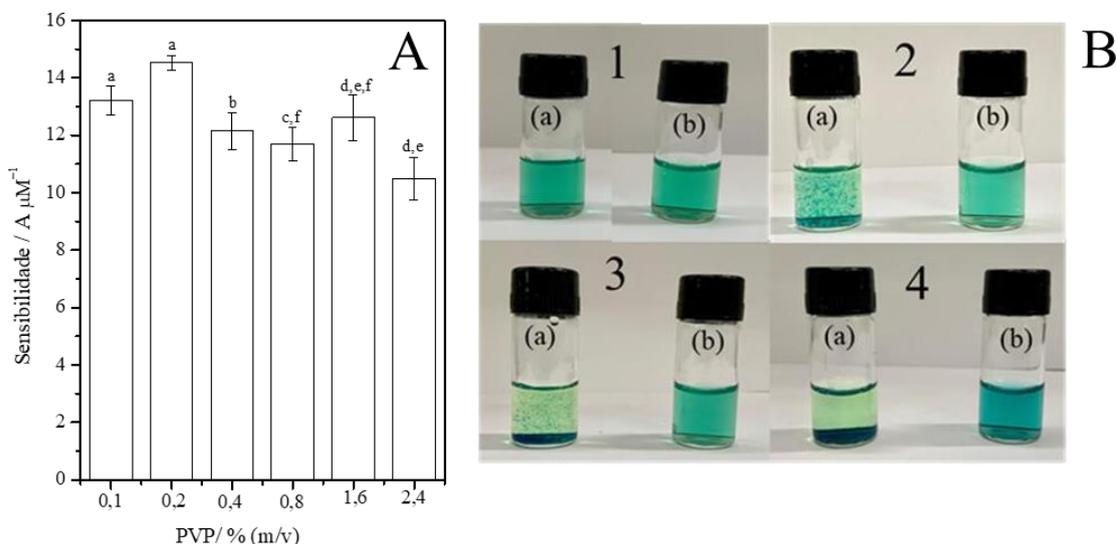
^aLetras iguais (comparação por coluna) indicam que não houve diferença estatística aplicando ANOVA (*one-way*) para o intervalo de 95% de confiança.

Fonte: Autora, 2023.

Os resultados indicam uma diferença estatística para os sistemas para um nível de 95% de confiança (Tabela 5). De acordo com María-Hormigos (2022), a quitosana representa um biopolímero policatiônico utilizado como rede reticulada nos estudos com micromotores de azul da Prússia devido à sua natureza química com presença de hidroxila reativa e grupo amino. Entretanto, a condição com o PVP apresentou o melhor desempenho, este polímero pode se coordenar com o ferro nos núcleos de PB através do grupo amida dentro do anel de pirrolidona para ser utilizado como agente protetor, aumentando a sensibilidade da solução quando comparado aos outros sistemas (QIN et al., 2020).

Desta forma, inicialmente o PVP foi selecionado para ser adicionado a reação visando a geração do corante azul da Prússia, uma vez que se observou aumento da sensibilidade (Tabela 5). Assim, uma segunda avaliação consistiu na concentração do PVP (Fig. 5A), assim como, o tempo de estabilização (Fig. 5B), considerando um possível aprisionamento do azul da Prússia formado na estrutura do polímero (HIREMATH, NUGURU & AGRAHARI, 2019). O PVP em solução, apresenta propriedades de umectação e forma facilmente películas, desta forma, a concentração deste polímero foi variada de 0,1 a 2,4% (m/v) (Fig. 4A), observou-se uma diferença estatística (ANOVA, *one-way* para um intervalo de confiança a 95%), na condição com a concentração de 0,2% (m/v). Esta condição, além da melhor sensibilidade e linearidade representada pela curva analítica $A_{710 \text{ nm}} = 14,53(\pm 0,25) \times AAr + 0,008(\pm 0,005)$, $r = 0,9989$ (n = 9), também foi eficiente na estabilização do coloide evitando a formação de precipitado (Fig. 5B).

Fig. 5. (A) Avaliação da concentração final de PVP na reação colorimétrica para geração do azul da Prússia. Condições reacionais: tempo de reação total foi de 20 min, $[\text{FeCl}_3] = 150 \mu\text{M}$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$ (proporção 1:10). O número de pontos (n) em cada curva foi $n \geq 9$. Nesta avaliação houve diferença estatística aplicando ANOVA (one-way) e teste de Tukey para o intervalo de 95% de confiança. **(B)** Avaliação temporal da precipitação do coloide considerando os frascos de vidro, sendo (a) ausência do polímero e (b) adição do polímero considerando (1) tempo zero, início da reação; (2) 2 h; (3) 4 h; (4) após 30 h de reação.



Na parte (A); Letras iguais indicam que não houve diferença estatística aplicando ANOVA (*one-way*) para o intervalo de 95% de confiança.

Fonte: Autora, 2023.

Na avaliação de estabilidade, é possível observar os primeiros indícios de formação de precipitado nos tempos iniciais (Fig. 5B), tornando-se mais evidente em maiores tempos. Após 30 h, o sistema sem polímero demonstra um corpo de fundo, enquanto o sistema que contém o PVP não apresenta alterações físicas. Portanto, a adição do PVP ao sistema reacional a concentração final de 0,2% (m/v) foi a condição selecionada para os experimentos futuros.

5.4 Avaliação do mix dos reagentes

Visando a simplificação do procedimento experimental, avaliou-se a utilização de uma mistura prévia dos reagentes (denominada de mix), o que no desenvolvimento de um *kit* torne o processo de portabilidade e aplicação no laboratório ou em campo facilitado. Desta forma, considerando os seguintes sistemas: (i) MIX 1: $\text{FeCl}_3 + \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e (ii) MIX 2: $\text{FeCl}_3 + \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{PVP}$, mantendo-se as concentrações otimizadas previamente para todos os reagentes em HNO_3 a 0,45 M. Cada um destes sistemas foi comparado a condição padrão onde todos os reagentes foram adicionados separadamente. Assim, foram obtidos os seguintes resultados baseados na sensibilidade da curva analítica

para AAr:

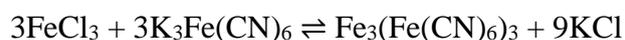
(1) Condição padrão: $A_{710\text{ nm}} = 14,64 (\pm 0,005) \times \text{AAr} + 0,302 (\pm 0,014)$, $r = 0,9962$;

(2) MIX 1: $A_{710\text{ nm}} = 15,67 (\pm 0,015) \times \text{AAr} - 0,165 (\pm 0,015)$, $r = 0,9961$;

(3) MIX 2: $A_{710\text{ nm}} = 16,39 (\pm 0,035) \times \text{AAr} + 0,208 (\pm 0,018)$, $r = 0,9988$;

Os resultados não apresentam diferença estatística para um nível de 95% de confiança aplicando o teste ANOVA (one-way) considerando $n \geq 6$, assim, considerando estes resultados se poderia aplicar o MIX (1 ou 2). Contudo, a reação entre FeCl_3 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ resulta em uma reação de dupla troca secundária com o produto $\text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, hexacianoferrato (III) de ferro branco (III), um precipitado branco, também conhecido em inglês como *Prussian White* (PW), conforme a equação abaixo (JUNIOR, 2020).

Equação 1. Formação do PW através dos reagentes FeCl_3 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

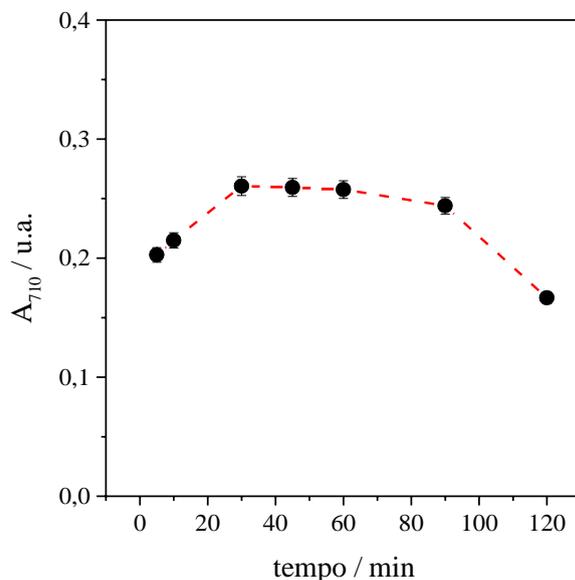


O azul da Prússia é um composto de valência mista que apresenta dois grupos de pares redox e propriedades semicondutoras em razão da deslocalização eletrônica entre os íons metálicos na estrutura. Desta forma, o PW pode ser formado também pelo processo de redução do PB, apresentando uma intensidade de absorção entre 580 e 650 nm diferentemente da absorção do PB em 710 nm (SOARES, 2019). Portanto, a adição do MIX (1 ou 2) forma uma espécie que pode causar interferência espectral com a formação do PB, bem como este sistema possui baixa estabilidade para aplicações em outros campos, assim, a hipótese da utilização do MIX é descartada.

5.5 Testes iniciais com a enzima de fosfatase ácida

Após a otimização da formação do azul da Prússia em meio ácido a partir da reação do ácido ascórbico reduzido (AA_r) com FeCl_3 e em sequência, a reação do $\text{Fe}(\text{II})$ gerado com o $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, foram iniciados os testes com o substrato ácido ascórbico 2-fosfato (AA_p) na presença da enzima de fosfatase ácida (AP). Inicialmente avaliou a influência do tempo reacional da desfosforilação do AA_p , para geração do AA_r , catalisada pela AP (Fig. 6).

Fig 6. Avaliação cinética em relação ao tempo de incubação entre AP (2 UL^{-1}) e substrato AA_P (1 mM) e tampão acetato de sódio (pH 5, 20 mM) ($n = 3$). Condições reacionais: tempo de incubação de 5, 10, 30, 60 e 90 min, $[\text{FeCl}_3] = 150 \text{ } \mu\text{M}$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$ (proporção 1:10).



Fonte: Autora, 2023.

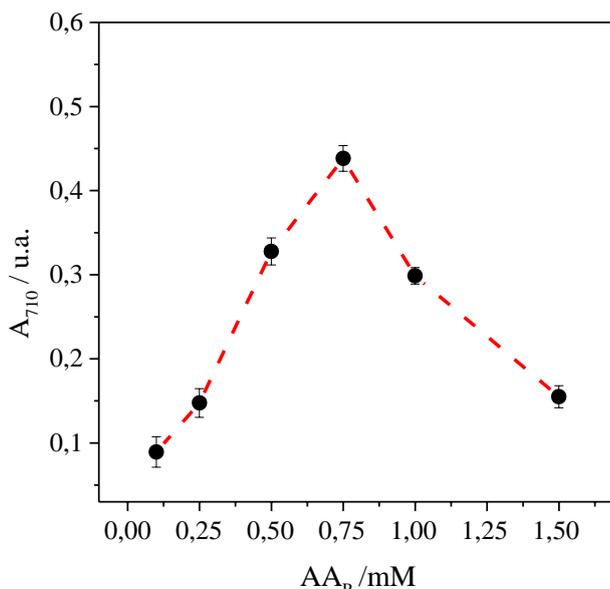
A cinética da catálise enzimática é influenciada diretamente pela ação do tempo. Conforme a figura a sensibilidade aumenta de forma constante nos primeiros 30 min, e após o tempo de 90 min decai, devido a desfosforilização do substrato para formar o AA_r . Os trabalhos da literatura como Ran et al., 2021 e Pan et al., 2021 consideram o tempo de incubação de 30 minutos suficiente para obter uma boa sensibilidade do sistema, no entanto, após a aplicação do teste ANOVA *one-way* e teste de Tukey não houve diferença estatística para um nível de 95% de confiança entre os tempos de 30, 45 e 60 minutos. Desta forma, o trabalho proposto optou aguardar o tempo de 45 minutos considerando o princípio de quanto mais tempo de incubação a enzima estiver em contato com o substrato, maior será a sensibilidade, enquanto houver substrato no sistema.

5.6 Avaliação da concentração do ácido ascórbico 2-fosfato

O ácido ascórbico 2-fosfato (AA_P) é um dos substratos específicos mais utilizados nos ensaios de determinação da enzima de fosfatase ácida e/ou alcalina, que pode ser hidrolisado e transformado em AA_r . Zhang et al., 2021 analisou uma estratégia baseada em um sensor colorimétrico para detecção de atividade de fosfatase ácida baseada em derivado de acridona considerando o AA_P a 4 mM, a faixa linear de AP foi de 0,05-2,5 UL^{-1} com $r = 0,9994$ e o limite de detecção (LOD) de 0,0415 UL^{-1} . Ademais, Yang et al., 2023 relata uma plataforma colorimétrica baseada em nanozima de átomo unido Fe-N/C

com determinação de ácido ascórbico e fosfatase ácida com limites de detecção de 0,092 μM e 0,048 UL^{-1} utilizando AA_P a 20 mM. Desta forma, foi realizada a avaliação da concentração do AA_P de 0,1 a 1,5 mM (Fig. 7) visando obter a melhor sensibilidade do método desenvolvido considerando o tempo de incubação de 45 minutos.

Fig. 7. Avaliação da concentração do AA_P frente ao sistema com a enzima AP (2 UL^{-1}) em tampão HAc/NaAc (pH 5, 20 mM). Condições reacionais: tempo de reação total de 45 min, $[\text{FeCl}_3] = 150 \mu\text{M}$, $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$, PVP = 0,2% (m/v) em HNO_3 0,45 M ($n = 3$).



Fonte: Autora, 2023.

Em comparação com Zhang et al., 2021 e Yang et al., 2023, os resultados obtidos indicam que a concentração de 0,75 mM, concentração cerca de 25 vezes menor, apresentou maior sinal analítico, conduzindo a uma condição de maior sensibilidade, e assim, foi selecionada para os experimentos futuros. Contudo, com o aumento da concentração do substrato se percebeu uma diminuição pronunciada no sinal analítico, uma vez que não é possível a máxima atividade entre a enzima e o substrato variando entre cada mecanismo (WANG et al., 2020).

5.7 (Re)avaliação da ordem dos reagentes

A formação do azul da Prússia pode ser realizada por duas etapas, a depender da espécie que venha a ser reduzida inicialmente ($\text{Fe}(\text{II})$ ou $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) pelo AA_r . Desta forma, considerando o sistema na presença de AA_P e da AP, este parâmetro foi avaliado a fim de verificar se poderia influenciar na sensibilidade do método.

Neste contexto, nas condições otimizadas previamente, duas ordens de adição dos reagentes (1 e 2) foram testadas após a reação entre substrato e enzima, neste caso: (1): AA_P + AP + **Fe(III)** + K₃Fe(CN)₆ + PVP e (2) AA_P + AP + **K₃Fe(CN)₆** + Fe(III) + PVP. A partir das curvas analítica da AP (0,5 - 5 U L⁻¹) obteve-se as seguintes equações em função de cada ordem de mistura:

$$(1) A_{710\text{ nm}} = 0,099 (\pm 0,005) \times C_{AP} - 0,013 (\pm 0,014); r = 0,99154 (n = 7);$$

$$(2) A_{710\text{ nm}} = 0,091 (\pm 0,005) \times C_{AP} - 0,016 (\pm 0,015); r = 0,9874 (n = 7);$$

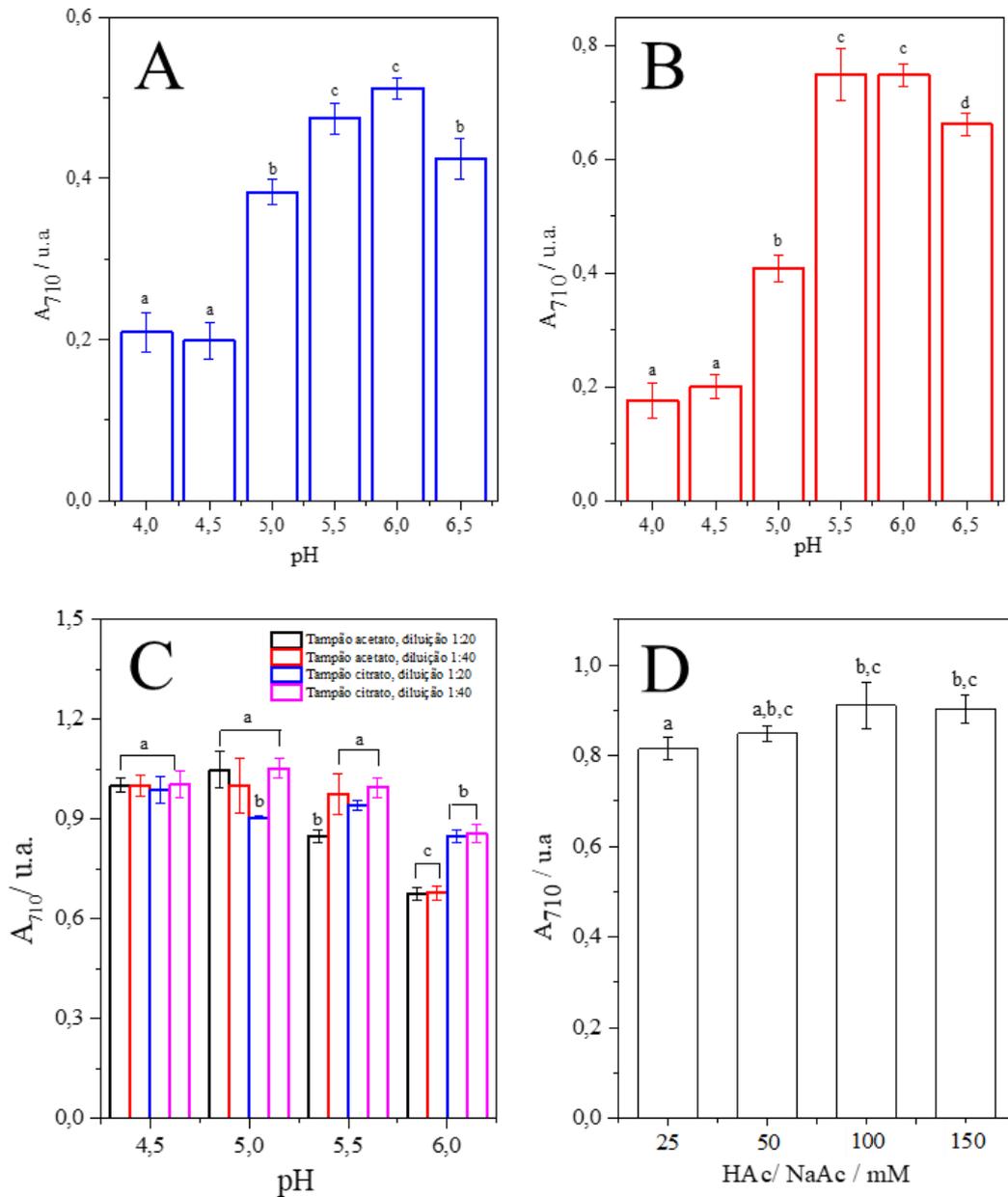
Os resultados obtidos não apresentaram diferença estatística para um nível de 95% de confiança para ANOVA (*one-way*), deste modo, manteve-se a ordem que estava sendo empregada inicialmente (ordem 1) para análises futuras. Em concordância com Teepoo et al., 2012, a condição 1, de forma geral, apresenta maior sensibilidade, menor valor do branco analítico e maior coeficiente de correlação linear de Pearson (*r*). Por fim, para maiores concentrações da AP, visualmente se percebeu transição de cor (amarelo → azul) em menor tempo.

5.8 Avaliação do sistema tampão e pH do meio reacional

Um fator importante para a atividade enzimática é o pH (potencial hidrogeniônico) do meio, pois cada enzima apresenta um pH ótimo, na qual a atividade é máxima. Para manter o pH do meio com mínima variação possível, utiliza-se uma solução-tampão, e uma vez que a fosfatase ácida atua preferencialmente em pH 4,0 - 6,5 (RAN et al., 2021), foram avaliados dois sistemas, (i) tampão acetato (pK_a = 4,75) e (ii) tampão citrato (pK_{a1} = 3,14, pK_{a2} = 4,77 e pK_{a3} = 6,39). Para detecção colorimétrica de AP, Zhang et al. 2021, utilizou 10 mM de tampão acetato (pH = 4,0), enquanto, Zheng et al., 2020 empregou 10 mM de tampão citrato (pH = 4,0). Estas soluções tampão garantem eficiência tamponante no intervalo de pH avaliado, baixo custo, e são amplamente aplicados em sistemas biológicos, indicando que são biocompatíveis.

Nota-se que a maior atividade da enzima foi observada entre pH 5,0 - 6,5 para tampão acetato (Fig. 8A) e de pH 5,5 - 6,5 para tampão citrato (Fig. 8B), com máxima atividade no intervalo de 5,5 a 6,5 em ambos os sistemas avaliados. Os constituintes de cada sistema tampão, possui capacidade de complexar as espécies de ferro (II e III), contudo, considerando os resultados obtidos de forma comparativa não houve influência. Além disto, os sinais analíticos empregando tampão citrato foram superiores aos obtidos com tampão acetato.

Fig. 8. (A) Avaliação do pH do meio de incubação do AAP e AP com tampão acetato (50 mM); (B) Avaliação do pH do meio de incubação do AAP e AP com tampão citrato (50 mM); (C) Avaliação do pH da amostra real de sêmen com diluição 1:10 e 1:20 no tampão acetato e citrato (50 mM) e (D) Avaliação da concentração do tampão acetato. Condições reacionais: tempo de reação total foi de 60 min, em triplicata ($n = 3$), AAP = 0,75 mM, $[\text{FeCl}_3] = 150 \mu\text{M}$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$ (proporção 1:10), $[\text{PVP}] = 0,20\%$ (m/v).



Nos gráficos A-D: Letras iguais indicam que não houve diferença estatística aplicando ANOVA (*one-way*) para o intervalo de 95% de confiança.

Fonte: Autora, 2023.

Nesta avaliação prévia, a fonte da enzima AP usada no processo de otimização foi de batata (69 kDa), e desta forma, apresenta similaridades e diferenças com a AP humana (55 kDa). Como o objetivo do trabalho é aplicação do método em sistemas reais, no sentido de detecção da AP em amostras biológicas, a influência do pH para cada sistema

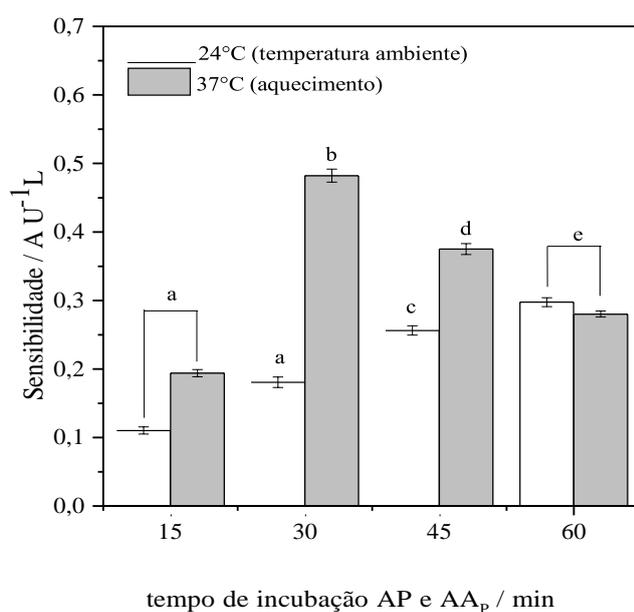
tampão foi avaliada em amostra real de sêmen diluída 20 e 40 vezes (Fig. 8C). Neste sistema, a máxima atividade foi observada em no intervalo de pH 4,5 a 5,0. Desta forma, o tampão acetato em pH 5 foi selecionado, uma vez que possui máxima eficiência tamponante próximo a esta condição de pH, é de fácil obtenção e baixo custo.

Após a seleção do sistema tampão e seu respectivo valor de pH, foi avaliado o efeito da concentração desta solução quanto à incubação do sistema (Fig. 8D). De forma geral, para as concentrações avaliadas apresentam diferença estatística aplicando ANOVA (*one-way*) para um nível de confiança a 95%. Contudo, a concentração do tampão acetato em 100 mM foi selecionada visando garantir maior eficiência tamponante, principalmente em processo de diluição de amostrais biológicas reais.

5.9 Avaliação do efeito da temperatura

Seguindo o comportamento do sistema, além do pH, a temperatura pode influenciar a atividade enzimática. De acordo com Zhang et al., 2021 , a temperatura detecção da AP é de 37°C com 30 minutos, de forma similar Yang et al., 2023 manteve a temperatura variando o tempo de incubação para 10 minutos. Desta maneira, a avaliação foi realizada a fim de verificar o efeito do tempo de incubação e a temperatura quanto a sensibilidade do sistema (Fig. 9).

Fig. 9 Avaliação do tempo de incubação entre AP, AA_p e tampão acetato a 100 mM e a temperatura do sistema considerando à ambiente (24°C) e a etapa de aquecimento em banho-maria (37°C). A faixa linear para temperatura ambiente foi de 0,25 – 3 UL⁻¹, enquanto em aquecimento de 0,25 – 1,5 UL⁻¹. Condições reacionais: AA_p = 0,75 mM, [HAc/NaAc] = 100 mM, [FeCl₃] = 150 μM e [K₃Fe(CN)₆] = 1,5 mM (proporção 1:10), [PVP] = 0,20 % (m/v).



Fonte: Autora, 2023.

Verificou-se que o sinal máximo de absorvância pode ser alcançado quando a temperatura da reação enzimática é mantida a 37 °C com o tempo de incubação de 30 minutos. Em temperaturas mais altas, a energia cinética da proteína na estrutura enzimática é amplificada, quebrando assim as ligações entre os aminoácidos ativos, levando à perda da atividade enzimática (AMBREEN, AZRA & AZIZ, 2020).

De acordo com a Fig. 9, o aumento da temperatura proporciona uma maior sensibilidade, aplicando o teste ANOVA (*one-way*) há diferença significativa entre os tempos. Entre as condições de temperatura ambiente, quanto maior o tempo de incubação consequentemente maior será a sensibilidade, assim, após o teste ANOVA (*one-way*) para um nível de confiança de 95% também apresenta diferença estatística entre os valores. Vale ressaltar, que o tempo de 30 minutos na temperatura ambiente é considerado referência em outros trabalhos como Lin et al., 2020 e Zhang et al., 2022, utilizando o mesmo substrato ácido ascórbico 2-fosfato.

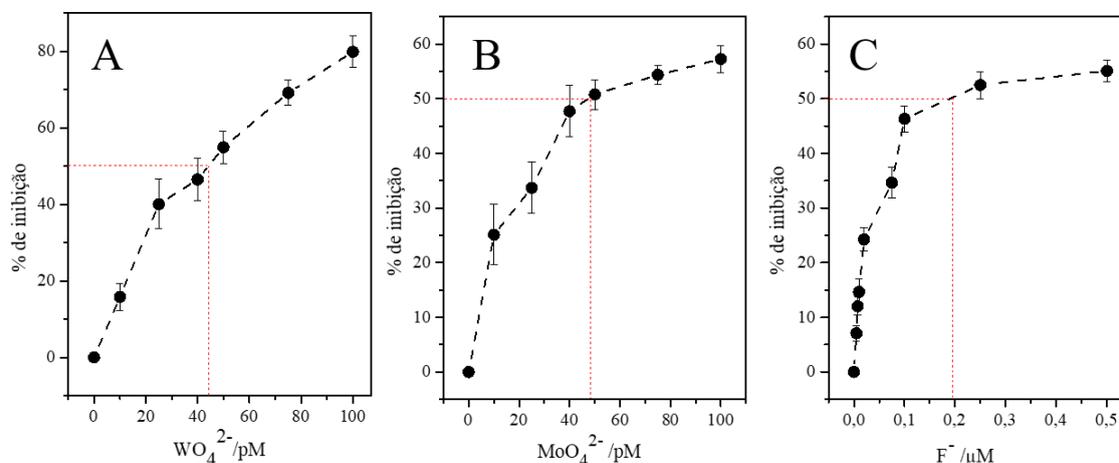
Assim, analisando os dados da figura e os parâmetros físico-químicos, o tempo de 45 minutos de incubação foi selecionado, uma vez que este tempo garante uma eficiência do sistema com uma diferença de ~13,8% em relação ao tempo de 60 minutos, tomando a temperatura ambiente para testes quantitativos e/ou qualitativos. Ademais, o aumento da temperatura indica uma aumento da sensibilidade, caso queira adicionar mais uma etapa no trabalho, o qual não é viável ao estudo uma vez que é pensado uma aplicação do *kit* no local do crime.

5.10 Avaliação dos inibidores

Os inibidores enzimáticos são as substâncias que formam ligações química com as enzimas, de modo a interferir na sua atividade catalítica, reduzindo a velocidade da reação das enzimas. A avaliação foi realizada utilizando três inibidores clássicos: tungstato, molibdato e fluoreto de sódio, estes inibidores se ligam ao mesmo local que o substrato e impedem a catálise enzimática (FEDER et al., 2023).

Para os inibidores de tungstato e molibdato (Fig. 10 A e B, respectivamente), a faixa linear é de 10 – 100 pM, levando em consideração a equação da reta temos como $IC_{50} = 47 \pm 2$ pM e $IC_{50} = 55 \pm 2$ pM, respectivamente. Similarmente, a adição do inibidor de fluoreto evita a formação de AP, o trabalho de Zhang et al., 2021 obteve um IC_{50} de 35,6 μ M, este trabalho apresenta $IC_{50} = 0,20 \pm 0,07$ μ M, considerando a faixa linear de 5,0 nM – 0,5 μ M de F⁻, Fig. 10 C.

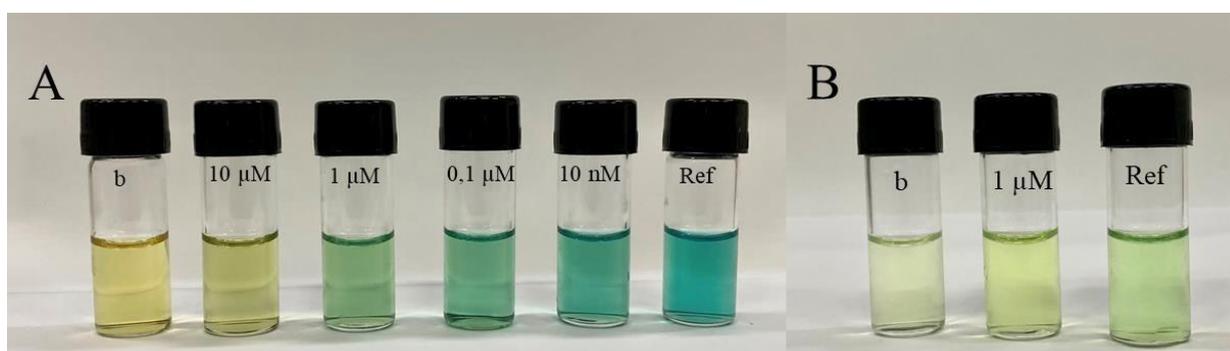
Fig. 10 (A). Avaliação do inibidor tungstato; **(B)** Avaliação do inibidor molibdato; **(C)** Avaliação do inibidor fluoreto de sódio; Todos em função do sistema com a enzima de fosfatase ácida. Condições reacionais: tempo de reação total foi de 75 min, $n \geq 6$, com $AA_p = 0,75$ mM, $[HAc/NaAc] = 100$ mM, $[FeCl_3] = 150$ μ M e $[K_3Fe(CN)_6] = 1,5$ mM (proporção 1:10), $[PVP] = 0,20$ % (m/v).



Fonte: Autora, 2023.

Quando a atividade de AP for inibida, a produção de ácido ascórbico diminui, resultando em um aumento de absorvância do sistema de detecção. A presença de inibidores na amostra encontrada na cena de um crime dificulta a identificação dos vestígios, a confirmação do fluido biológico bem como sua detecção. Dessa forma, o sêmen é um líquido viscoso e esbranquiçado, contendo em sua composição o ácido ascórbico e a enzima de fosfatase (AP). Assim, realizou-se uma avaliação do inibidor tungstato em amostra seminal diluída em 10 vezes, com a presença (Fig. 11A) e ausência do substrato ácido ascórbico 2-fosfato (AA_p) (Fig. 11B).

Fig. 11. Avaliação da concentração do inibidor tungstato em 40 μ L da amostra seminal diluída em 10 vezes utilizada como referência, em (b) ausência do analito, branco e as concentrações do WO_4^{2-} . **(A)** Na presença do substrato AA_p e **(B)** Na ausência do substrato AA_p . Condições reacionais: tempo de reação total foi de 75 min, com $AA_p = 0,75$ mM, $[HAc/NaAc] = 100$ mM, $[FeCl_3] = 150$ μ M e $[K_3Fe(CN)_6] = 1,5$ mM (proporção 1:10), $[PVP] = 0,20$ % (m/v).



Fonte: Autora, 2023.

No teste com a presença do substrato AA_P (Fig. 11A) é possível medir a quantidade da enzima existente na amostra biológica, considerando que o aumento da concentração do inibidor de tungstato diminui a formação do produto azul da Prússia. No entanto, a avaliação com a ausência do substrato (Fig. 11B) indica a presença do ácido ascórbico no sêmen percebendo a alteração da intensidade da formação do azul da Prússia. A ação do inibidor ocorre frente a enzima de AP retardando o progresso da reação, portanto, para reverter a inibição é necessário aumentar a concentração do substrato.

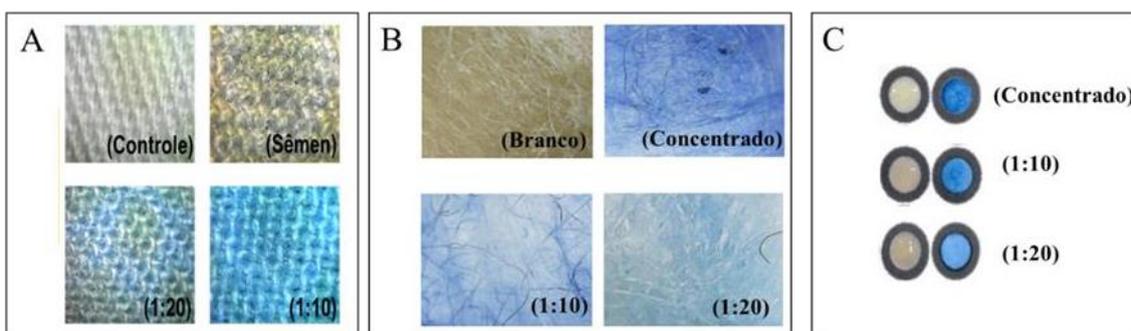
5.11 Uso de sistemas alternativos

Em casos de crimes sexuais, o sêmen é considerado um critério fundamental para confirmação do crime sexual, dessa forma, este estudo enfatiza a importância de sistemas alternativos para obtenção de vestígios nos corpos da vítima e do suspeito. Nesta perspectiva, segundo Beckwith, Murakami & Chapman (2018), os espermatozoides permanecem identificáveis por períodos de tempo em diferentes tipos de tecidos, em especial, o tecido de algodão retém mais fluído seminal do que o materiais como nylon, devido ao entrelaç dos fios.

Outro material que serve para coleta de material biológico é o *swab*, trata-se de um cotonete estéril com finalidade de identificar as amostras com meios líquidos ou de forma seca (WARRIER & KANCHAN, 2021). Ademais, o emprego de dispositivo analítico baseado em papel (PAD) consiste em usar um material acessível, versátil, portátil e de baixo custo para aplicação em sistemas microfluídicos, após a confecção de microzonas delimitados por uma barreira hidrofóbica, na qual a reação leva a alteração de alguma propriedade (como a cor, por exemplo) ocorre após adição de microlitros de reagentes e amostra (NAMWONG et al., 2018).

Como prova de conceito, para uma análise qualitativa, o método foi aplicado em uma amostra de sêmen real (CAAE: 58121322.7.0000.5013) considerando o estudo acerca da influência das superfícies do tecido (algodão), *swab* e dispositivo analítico baseado em papel (PAD) papel cromatográfico (Fig. 12 A-C). Os experimentos foram realizados de forma independentes, considerando a diluição de 10 e 20 vezes antes da aplicação nos sistemas e os resultados obtidos foram representados através de imagens no microscópio portátil digital modelo MP-800.

Fig. 12 (A) Avaliação qualitativa da amostra de sêmen humano (50 µL) em tecido de algodão, sendo (Controle) tecido não contaminado (antes da reação), (Sêmen) tecido contaminado, amostra de sêmen diluída em (1:20) e (1:10); (B) Avaliação qualitativa da amostra de sêmen humano (30 µL) no swab, considerando o (Branco) ausência do analito no teste, amostra não diluída (aplicação direta – concentrado) e as amostras com diluição de (1:20) e (1:10); (C) Avaliação qualitativa da amostra de sêmen humano (0,5 µL) em dispositivo analítico baseado em papel (PAD), considerando a coluna da esquerda como respectivos ensaios do branco analítico e a coluna da direita a variação da concentração da amostra, não diluída e com a diluição de (1:20) e (1:10). As imagens foram registradas pelo microscópio portátil digital modelo MP-800. Condições reacionais: [AA_P] = 0,75 mM, tampão acetato de sódio pH 5 (100 mM), [FeCl₃] e [K₃Fe(CN)₆] a 10 mM, e no ensaio com o PAD utilizou-se o polímero PVP a 0,20% (m/v).



Fonte: Autora, 2023.

Dando sequência, foi realizado um estudo temporal na deposição da amostra seminal no tecido algodão considerando o tempo de 2 meses com exposição a luz, ar e umidade afim de identificar a presença da enzima AP e do AA_r, Fig. 13A-D.

Fig 13. (A) Avaliação qualitativa da amostra de sêmen humano (20 µL) em tecido de algodão com a exposição de 2 meses; (B) Incubação dos tecidos em eppendorfs com tampão acetato de sódio 100 mM (pH = 5) por 10 minutos; (C) Análise qualitativa dos tecidos para detecção de fosfatase ácida; (D) Análise qualitativa dos tecidos para detecção do ácido ascórbico, onde (b) ausência do analito, (tb) tecido branco e (te) tecido estampado. Condições reacionais: [AA_P] = 0,75 mM, tampão acetato de sódio pH 5 (100 mM), [FeCl₃] a 150 µM, [K₃Fe(CN)₆] a 1,5 mM e PVP a 0,20% (m/v).



Fonte: Autora, 2023.

Portanto, é possível a determinação de enzima de AP via método colorimétrico após exposição de 2 meses do tecido auxiliando na elucidação criminal, contudo não foi possível a identificar de AA_r no tecido considerando que o analito foi oxidado devido as condições de exposição. Vale ressaltar, a importância de desenvolvimento de métodos colorimétricos sensíveis para determinação do sêmen e de outros fluidos biológicos, uma vez que a realização correta de todos os procedimentos desde a coleta até a análise dos

resultados certifica a confiabilidade dos dados e possibilita sua admissão nos julgamentos e identificação do possível agressor. Entre os sistemas alternativos avaliados o PAD é o mais promissor para o método, utilizando a menor quantidade de amostra e reagentes 0,5 μL , além disso é possível a análise qualitativa ou quantitativa utilizando um *scanner* e o tratamento de dados em um software.

5.12 Ensaios de recuperação

A detecção de AA_r e AP em amostras diluídas foi investigada usando um método de adição padrão, para validação da aplicação do método colorimétrico proposto. Conforme a tabela 6, as recuperações de duas amostras de soro humano variaram de 81 a 100 % com um RSD inferior a 4% para AA_r e na tabela 7, as recuperações oscilaram de 82 a 101% com um RSD inferior a 4% para AP. Deste modo, os resultados experimentais demonstraram que este método tem potencial para análise prática em amostras de sêmen para uma dupla determinação AA_r e AP.

Tabela 6. Aplicação do método colorimétrica para análise de amostra seminal enriquecida com diferentes quantidades de AA_r considerando a diluição de 10 vezes do sêmen ($n = 3$). Condições reacionais: tempo de reação total foi de 20 min, $[\text{FeCl}_3] = 150 \mu\text{M}$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$ (proporção 1:10), $[\text{PVP}] = 0,20 \%$ (m/v).

Amostras	AA_r (μM)		Recuperação (%)	RSD
	Valor adicionado	Valor encontrado		
1	0	$3,90 \pm 0,32$	-	-
	10	$13,90 \pm 2,44$	99,92	3,52
	15	$18,90 \pm 1,85$	96,58	3,90
	20	$23,90 \pm 2,25$	98,49	0,47
2	0	$3,27 \pm 0,35$	-	-
	10	$13,27 \pm 2,61$	88,82	2,68
	15	$18,27 \pm 1,95$	83,35	3,29
	20	$23,27 \pm 1,58$	81,54	0,39

Fonte: Autora, 2023.

Tabela 7. Aplicação do método colorimétrica para análise de amostra seminal enriquecida com diferentes quantidades de AP considerando a diluição de 2000 vezes do sêmen ($n = 3$). Condições reacionais: $\text{AA}_p = 0,75 \text{ mM}$, $[\text{HAc}/\text{NaAc}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{FeCl}_3] = 150 \mu\text{M}$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$ (proporção 1:10), $[\text{PVP}] = 0,20 \%$ (m/v), tempo de reação de 75 min.

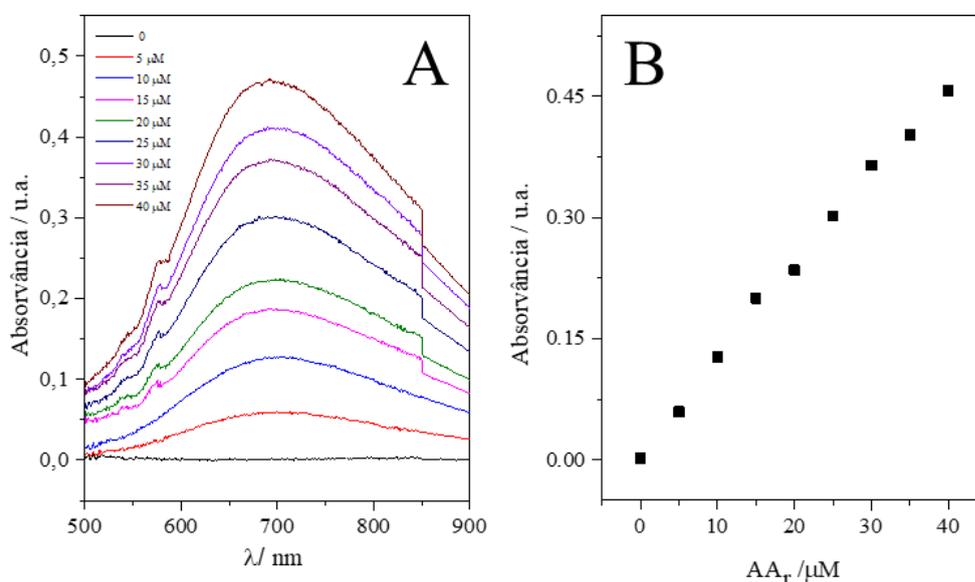
Amostras	AP (UL^{-1})		Recuperação (%)	RSD
	Valor adicionado	Valor encontrado		
1	0	$0,83 \pm 0,007$	-	-
	0,5	$1,33 \pm 0,340$	100,15	3,16
	1,0	$1,83 \pm 0,852$	88,21	0,57
	1,5	$2,33 \pm 1,540$	84,57	2,55
2	0	$0,98 \pm 0,016$	-	-
	0,5	$1,48 \pm 0,254$	100,57	2,47
	1,0	$1,98 \pm 0,971$	85,62	1,91
	1,5	$2,48 \pm 0,845$	81,82	0,41

Fonte: Autora, 2023.

5.13 Figuras de mérito

Após a otimização dos parâmetros analisados foram estabelecidas as figuras de mérito para determinação de ácido ascórbico e a enzima de fosfatase ácida, seja em solução e em PAD. Para a determinação do ácido ascórbico, os espectros de absorção molecular da reação, Fig. 14A e a curva analítica a qual possui equação igual a $A_{710\text{ nm}} = 11,41 (\pm 0,28) \times C_{AAr} + 0,010 (\pm 0,006)$, $r = 0,9978$ ($n = 9$) para o intervalo de concentração de 5 - 40 μM , Fig. 14B.

Fig. 14 Avaliação de figuras de mérito (A) Espectro de absorção molecular (B) Curva analítica para determinação de ácido ascórbico. O número de pontos (n) na curva foi $n \geq 9$. Condições reacionais: tempo de reação total foi de 20 min, $[\text{FeCl}_3] = 150 \mu\text{M}$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$ (proporção 1:10), $[\text{PVP}] = 0,20 \%$ (m/v).



Fonte: Autora, 2023.

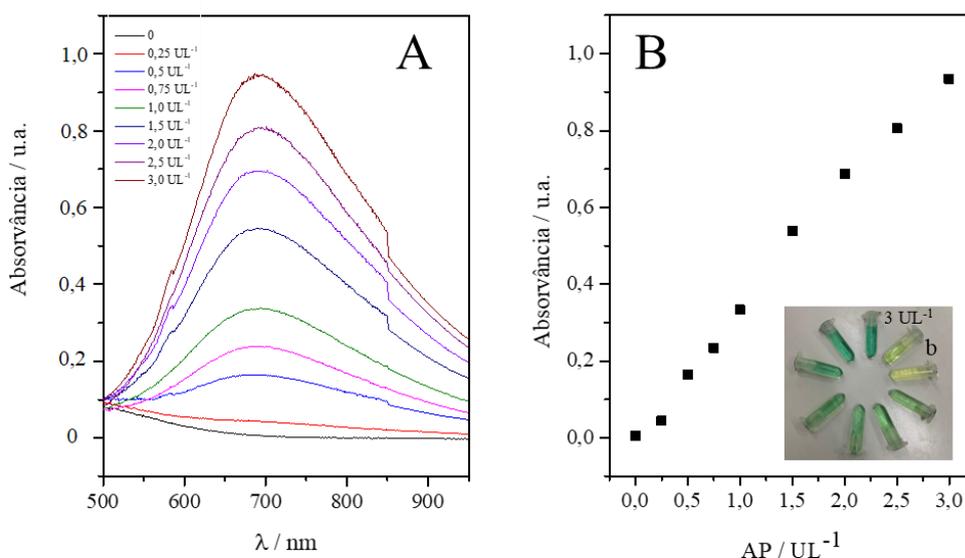
Os cálculos relativos aos limites de detecção (LOD) (3σ) e de quantificação (LOQ) (10σ) foram realizados de acordo com as seguintes equações, $\text{LOD} = 3 \times s_b/a_c$ e $\text{LOQ} = 10 \times s_b/a_c$, onde s_b equivale ao desvio padrão do branco analítico ($n = 10$), enquanto a_c corresponde ao coeficiente angular da curva analítica empregada, neste caso com o LOD em $0,29 \mu\text{M}$ e LOQ em $0,51 \mu\text{M}$. Em comparação com o trabalho de Darabdhara et al., 2017, considerando a faixa linear de 5 – 30 μM o LOD foi de $3,6 \mu\text{M}$ para detecção de ácido ascórbico utilizando nanoestruturas Cu-Ag/rGO.

Além disso, o desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a equação: $\text{RSD} = (s_p/x_p) \times 100$, onde s_p equivale ao desvio padrão referente a um

determinado padrão dentro da faixa linear e x_p corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ($n = 10$). Para o cálculo de RSD utiliza-se os valores de concentração nos extremos da curva de calibração visto que são as regiões com maior erro instrumental (MILLER; MILLER, 2005). Para a concentração de $10 \mu\text{M}$ o valor de RSD foi de 2,14% e a concentração de $30 \mu\text{M}$ foi 3,81%.

Para determinação da enzima de fosfatase ácida, a curva analítica para o método nas condições ótimas está representada na seguinte equação, $A_{710 \text{ nm}} = 0,325 (\pm 0,010) \times C_{AP} + 0,002 (\pm 0,017)$, com faixa linear de $0,25 - 3 \text{ UL}^{-1}$, $n = 9$, incluindo o branco, estão apresentados os espectros de absorção molecular na Fig. 15A e a curva analítica na Fig. 15B.

Fig. 15 Avaliação de figura de mérito (A) Espectro de absorção molecular (B) curva analítica para enzima de AP. O número de pontos (n) na curva foi $n \geq 9$. Condições reacionais: $\text{AA}_p = 0,75 \text{ mM}$, $[\text{HAc}/\text{NaAc}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{FeCl}_3] = 150 \mu\text{M}$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$ (proporção 1:10), $[\text{PVP}] = 0,20 \%$ (m/v).



Fonte: Autora, 2023.

Os cálculos relativos aos $\text{LOD} = 0,044 \text{ UL}^{-1}$ e $\text{LOQ} = 0,080 \text{ UL}^{-1}$, em comparação com outros trabalhos, tabela 8, o método proposto para detecção de atividade da fosfatase ácida exibiu um resultado satisfatório.

Tabela 8. Comparação dos métodos para determinação de fosfatase ácida

Métodos	LOD / UL ⁻¹	λ / nm	Tempo de reação	Referências
Eletroquímico	0,450	-	75 min	Bi et al., 2020
Fluorescente	0,005	Ex: 410 Em: 456-556	80 min	Li et al., 2019
Colorimétrico	0,530	625	40 min	Zheng et al., 2020
Colorimétrico	0,060	652	50 min	Jin et al., 2019
Colorimétrico	0,011	420	60 min	Lin et al., 2020
Colorimétrico	0,041	652	33 min	Zhang et al., 2021
Colorimétrico	0,056	652	30 min	Qiao et al., 2023
Nosso método	0,044	710	45 min	Este trabalho

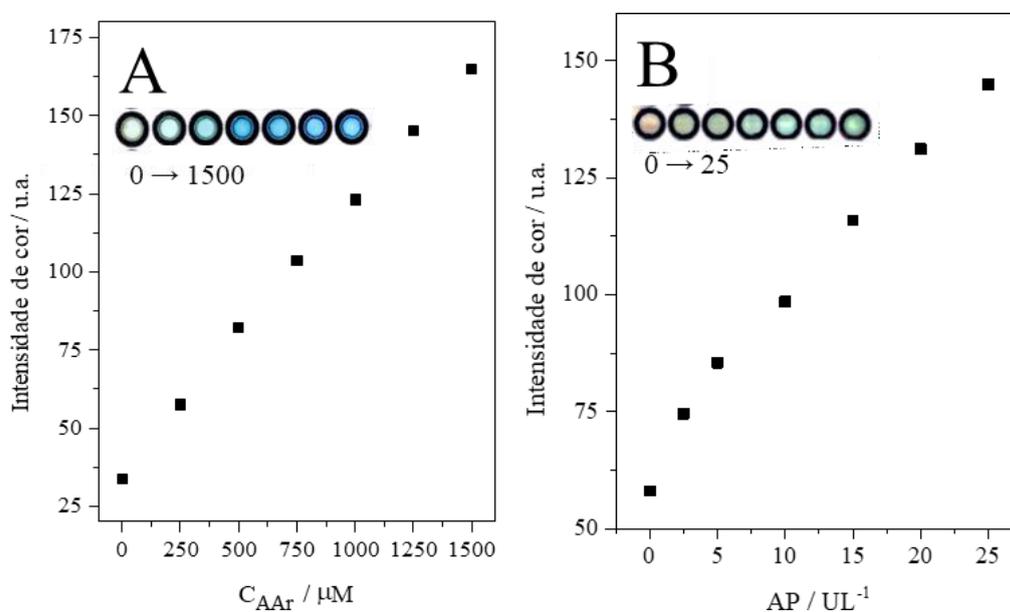
Fonte: Autora, 2023.

Embora alguns trabalhos tenham sido superiores ao método proposto, é possível identificar algumas limitações, por exemplo, no trabalho de Bi et al., 2020 a análise eletroquímica requer um pré tratamento do eletrodo e do sensor THP/MCH/AuE. De forma similar em Li et al., 2019, a detecção da AP é baseada no ajuste de fluorescência mediado por íons de pirofosfato do sistema NH₂ – MIL – 101/OPD/ H₂O₂ utilizando o aparelho de microscópio eletrônico de varredura. Os métodos colorimétricos envolvem a adição de nanoenzimas como MoO₃ em Lin et al., 2020, nanoaglomerados de AuPD em Zheng et al., 2020 e nanofios bimetálicos de PdPt em Jin et al., 2019. Além disso, os trabalhos apresentam certas limitações em função da absorção espectral, sendo passível a presença de possíveis interferentes para análises biológicas.

De forma geral, os resultados indicam que a metodologia proposta apresentou boa precisão para o sistema, pois a correlação linear (r) foi calculado visando avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação a tendência linear, sendo $r = 0,9965$. Além disso, o RSD foi calculado para a concentração de 0,75 U L⁻¹ o valor foi de 5,72%, enquanto para concentração de 2,5 U L⁻¹ igual a 5,95%. Paralelamente, a avaliação do ácido ascórbico em PAD, apresenta a equação em função da intensidade de cor, I.C. = $0,087 (\pm 0,001) \times C_{AAr} + 36,1 (\pm 1,4)$, $r = 0,9992$ ($n = 7$) com a faixa linear de 250 a 1500 μ M, (Fig. 16A). Apresentando como LOD = 48, 53 μ M, para o desvio padrão relativo de 3,05

a 1,05 %, respetivamente as concentrações de 500 e 1250 μM . Nesta perspectiva, a avaliação de AP em PAD, com a equação de I.C. = $3,32(\pm 0,16) \times C_{\text{AP}} + 64,40 (\pm 2,35)$, $r = 0,9936$ ($n = 7$) com o intervalo de 2,5 a 25 U L^{-1} (Fig. 16B). Em relação aos limites em função da intensidade de cor, indicam o LOD = 0,83 U L^{-1} e o RSD de 0,77 e 0,61% para as concentrações de 5 e 20 U L^{-1} , respetivamente.

Fig. 16 (A) Curva analítica para determinação de ácido ascórbico em PAD; **(B)** Curva analítica para determinação da enzima de fosfatase em PAD, em função da intensidade de cor utilizando o software Corel Photo Paint™ X7. O número de pontos (n) na curva foi $n \geq 7$. Condições reacionais: utilizando 0,5 μL de cada reagente, em (A) tempo de reação total foi de 20 min, $[\text{FeCl}_3]$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 5 \mu\text{M}$ e $[\text{PVP}] = 0,20 \%$ (m/v); (B) Não foi possível aplicação direta no PAD sendo necessário uma incubação no *ependorf* entre AP, AAP a 0,75 mM e tampão HAc/NaAc a 100 mM (pH = 5) por 5 minutos, em seguida a adição $[\text{FeCl}_3] = 150 \mu\text{M}$ e $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6] = 1,5 \text{ mM}$ (proporção 1:10), $[\text{PVP}] = 0,20 \%$ (m/v), com o tempo de reação total 25 min. Em ambos teste utilizou-se 0,5 μL de cada reagente.



Fonte: Autora, 2023

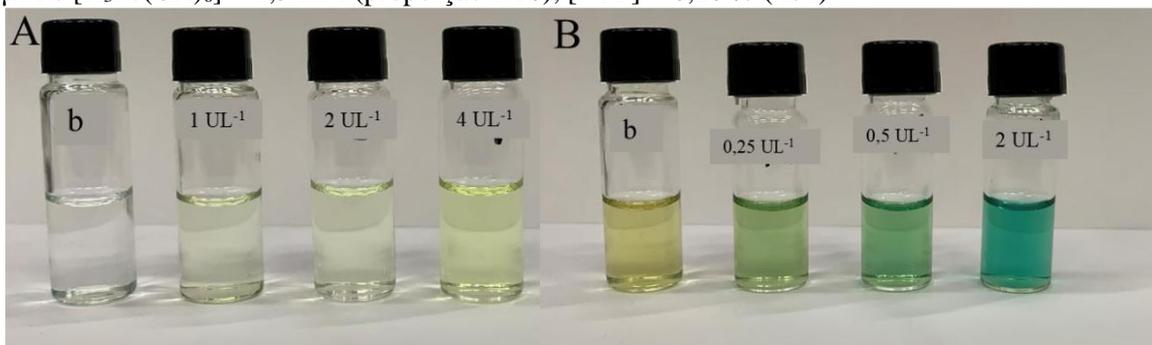
Os PAD com detecção colorimétrica são extremamente atrativos, baseados na alteração da cor após o processamento de uma reação química, e podem ser usados de forma rápida para alcançar respostas qualitativas ou quantitativas. As mudanças da intensidade de cor foram proporcionais ao aumento da concentração de AA_r e AP, além disso observa-se um aumento nos intervalos da faixa linear.

5.14 Avaliação comparativa com o substrato pNPP e adição do cofator MgCl₂

Na análise colorimétrica empregando a espectrofotometria de absorção molecular, o substrato cromogênico *p*-nitrofenil fosfato (pNPP) têm sido comumente utilizados para determinação da enzima AP, com o produto colorido de *p*-nitrofenol com absorvância em 405 nm (QI et al., 2020). Assim, o substrato pNPP foi aplicado para realizar um estudo comparativo para validar o método de detecção proposto. Além do substrato pNPP, verificou a presença de um cofator enzimático MgCl₂ que ao serem ligados à enzima de AP aumentam sua atividade. Estas moléculas estão frequentemente envolvidas na regulação alostérica de enzimas no controle do metabolismo (KAUR & GUPTA, 2019). Dessa forma, os cofatores podem aumentar a afinidade da enzima pelo substrato ou estabilizar a conformação da enzima.

Para determinação da fosfatase ácida, com o intervalo de 0,25 a 1,0 UL⁻¹, $n = 5$, a curva analítica padrão é representada na seguinte equação, $A_{710\text{ nm}} = 0,701 (\pm 0,027) \times C_{AP} + 0,006 (\pm 0,016)$, enquanto a equação com substrato pNPP, $A_{410\text{ nm}} = 0,672 (\pm 0,083) \times C_{AP} + 0,006 (\pm 0,051)$ com $r = 0,9977$ e $0,9877$, respectivamente, na Fig. 17A-B é possível observar uma análise qualitativa entre a sonda pNPP e o método proposto. Na Fig. 17 percebe-se a diferença de intensidade de cor com a variação da enzima de fosfatase através da detecção visual. Na curva com adição de MgCl₂, a equação $A_{710\text{ nm}} = 0,721 (\pm 0,092) \times C_{AP} + 0,009 (\pm 0,056)$ com $r = 0,9861$. Os resultados indicam que não houve diferença estatística para um nível de 95% de confiança aplicando o teste ANOVA *one-way* e Tukey, assim, o método em questão demonstra uma boa sensibilidade comparada com a sonda comercial de pNPP, ademais a etapa de incorporação do cofator MgCl₂ não é necessária para aumentar a atividade enzimática.

Fig. 17 (A) Determinação da enzima de AP utilizando o substrato pNPP; (B) Determinação da enzima de AP utilizando o substrato AA_p, método proposto, considerando uma faixa linear de 0,25 – 4,0 UL⁻¹. Condições reacionais (A) pNPP a 0,1 mM, tampão citrato a 90 mM (pH = 4,8) e NaOH a 1 M para parar a reação. (B) AA_p = 0,75 mM, [HAc/NaAc] = 100 mM, [FeCl₃] = 150 μM e [K₃Fe(CN)₆] = 1,5 mM (proporção 1:10), [PVP] = 0,20 % (m/v).

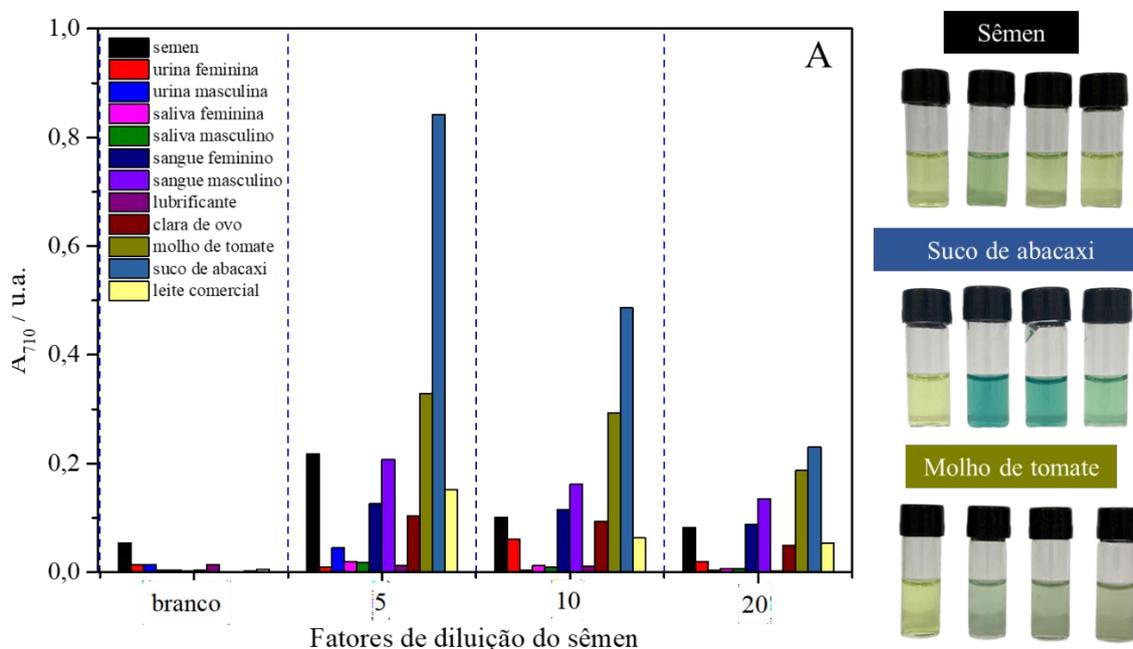


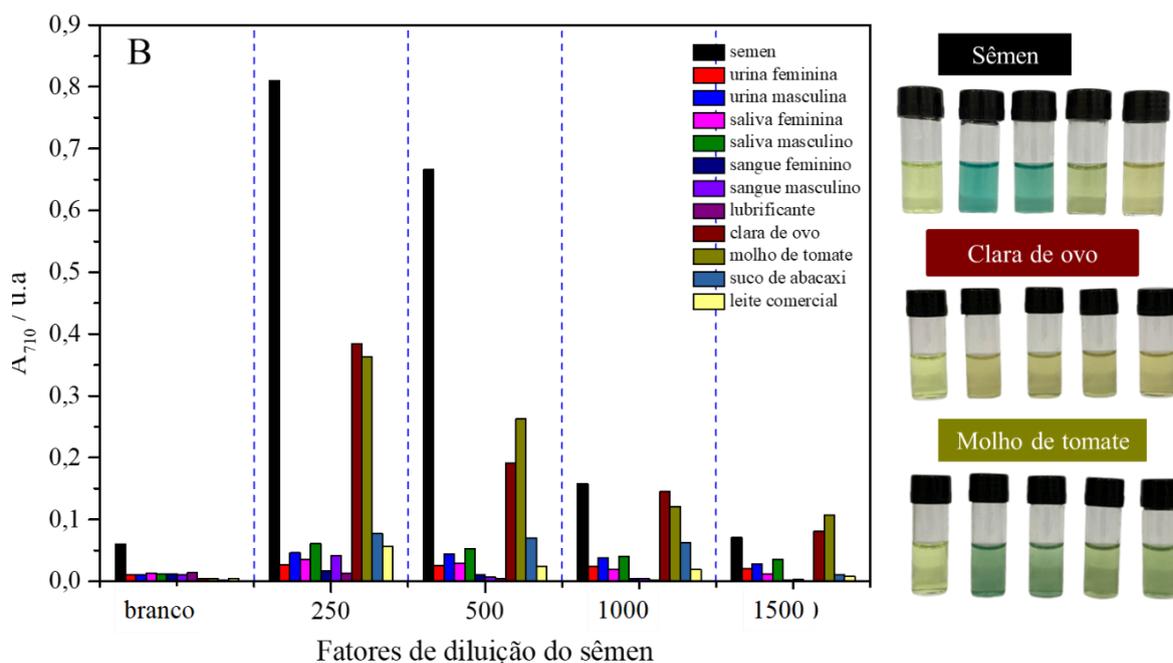
Fonte: Autora, 2023

5.15 Avaliação de (possíveis) interferentes

O sêmen humano apresenta em sua composição os aminoácidos livres, frutose, ácido ascórbico, enzimas, fosforilcolina, potássio e zinco. A enzima de fosfatase ácida é encontrada no fluido seminal em altas concentrações em comparação com outros fluidos corporais (GAMBLIN & MORGAN-SMITH, 2020). Neste sentido, foi realizado um estudo para avaliações de (possíveis) interferentes corporais e materiais para determinação de ácido ascórbico, Fig. 18A e fosfatase ácida, Fig. 18B considerando as amostras diluídas.

Fig. 18 (A) Determinação de ácido ascórbico com fator de diluição 5, 10 e 20 vezes; (B) Determinação de fosfatase ácida com fator de diluição de 250, 500, 1000 e 1500 vezes da amostra seminal de referência. Condições reacionais: $AA_p = 0,75$ mM, $[HAc/NaAc] = 100$ mM, $[FeCl_3] = 150$ μ M e $[K_3Fe(CN)_6] = 1,5$ mM (proporção 1:10), $[PVP] = 0,20$ % (m/v). Com o tempo de reação para AA_r de 20 minutos e para AP de 75 minutos.





Fonte: Autora, 2023

Como resultados da Fig. 18A, o AA_r é uma vitamina hidrossolúvel, sua absorção é realizada por meio da circulação sistêmica e seu excesso é excretado pela via urinária, isto explica os valores da urina, visto que o AA_r , de forma geral, não é armazenado no organismo (SOUSA et al., 2022). De forma natural, o tomate possui 1,7 mg de AA_r em 20g, e é facilmente oxidado por causa dos seus grupamentos hidroxilas (NASCIMENTO, 2022), e o abacaxi contém em média 9,4 mg de AA_r em 100 g, a quantidade de AA_r exerce uma função antioxidante agindo como proteção contra os radicais livres (SILVEIRA, 2022), assim, estes três sistemas atuam como interferentes para determinação de ácido ascórbico.

De maneira análoga na comparação com a enzima AP, o molho de tomate medido neste sistema representa a porcentagem de ácido ascórbico no meio. A clara do ovo é fonte concentrada de albumina, proteína de alto valor biológico, nesta reação de tiol ocorre a redução de Fe(III) a Fe(II), indicado o alto valor apresenta na Fig. 18B (ULRICH & JAKOB, 2019). Portanto, os materiais analisados não são considerados (possíveis) interferentes para determinação da enzima de fosfatase ácida, o que mostra a sensibilidade do método para detecção apenas na amostra biológica.

6. CONCLUSÃO

A partir dos vestígios encontrados no crime é possível identificar a existência de fluidos biológicos, a exemplo do sêmen, principal fluido relacionado aos crimes sexuais. A composição do fluido seminal indica uma matriz complexa, no qual destaca-se a enzima de fosfatase ácida, neste sentido, testes presuntivos e confirmatórios são realizados para auxiliar no reconhecimento do possível agressor.

Neste trabalho, o método proposto possibilitou a determinação de fosfatase ácida via espectroscopia de absorção molecular, empregando a reação de formação do azul da Prússia ($\lambda = 710 \text{ nm}$), após a realização das etapas experimentais os resultados indicam o tempo de reação de 75 minutos a temperatura ambiente. Nas condições otimizadas, a metodologia aplicada em substrato ácido ascórbico 2-fosfato, tampão acetato de sódio (pH 5,0), sugere a faixa linear de $0,25 - 3 \text{ UL}^{-1}$ em equivalente LOD de $0,044 \text{ UL}^{-1}$. Dentre os sistemas alternativos avaliados, o PAD apresentou vantagem pois para análise de AP necessita apenas $0,5 \mu\text{L}$ do fluido biológico. Considerando a presença de ácido ascórbico na amostra seminal foi realizado um estudo acerca das figuras de méritos em solução e em PAD com sensibilidade e intensidade de cor favoráveis ao método proposto.

Ademais, para validação do método investigou-se a comparação com a sonda comercial pNPP, adição do cofator enzimático MgCl_2 , ensaios de recuperação e interferentes atendendo a determinação da AA_r e da AP. Portanto, o método possui uma dupla resposta tanto para a enzima de fosfatase ácida quanto em ácido ascórbico em amostra de sêmen humano, com ação confirmatória, permitindo as vantagens de identificação e garantindo a portabilidade para aplicações em diferentes âmbitos.

7. PERSPECTIVAS

Abaixo são apresentadas algumas perspectivas futura para este trabalho:

- i) Explorar uma dupla resposta do sistema, uma vez que é possível a determinação o ácido ascórbico na amostra de sêmen;
- ii) Realizar o estudo de montagem do *kit* colorimétrico;
- iii) Escrita de patente do *kit* e do artigo, para comercialização nos órgãos especializados na investigação criminal.

REFERÊNCIAS

- AJAY SR, PRIYANKA V, HIREN V, PRIYANKA M. **Study on Acid Phosphatase Enzyme Activity in Semen Mixed with Various Body Fluids.** J Forensic Sci & Criminal Inves. 2019; 11(5): 555823. DOI: 10.19080/JFSCI.2018.11.555823.
- AMBREEN, S., AZRA, Y., & AZIZ, S. **Isolation and characterization of organophosphorus phosphatases from Bacillus thuringiensis MB497 capable of degrading Chlorpyrifos,** 2020, Triazophos and Dimethoate. *Heliyon*, 6(7).
- BARROS, Flávio Augusto Monteiro de. **Manual de direito penal: partes geral e especial.** 2. ed. rev., atual. e ampl. São Paulo: Editora JusPodivm, 2022.
- BASOLI, Lucas Pampana, et al. **"A RELEVÂNCIA DE TÉCNICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS COMO PROVA NO SISTEMA LEGAL VISANDO A ELUCIDAÇÃO DE CASOS DE CRIMES CONTRA A DIGNIDADE SEXUAL."** Biodiversidade 20.2 (2021).
- BASSET, P., BLANDIN, P., GRINI, A. ET AL. **A simplified protocol for the detection of blood, saliva, and semen from a single biological trace using immunochromatographic tests.** Forensic Sci Med Pathol 18, 141–148 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12024-021-00453-2>
- BECKWITH S., MURAKAMI, J. & CHAPMAN, B. **The persistence of semen on cotton fabric in various water environments,** Australian Journal of Forensic Sciences, 2018. DOI: 10.1080/00450618.2018.1484164
- BI, Q., F. QIU, R. YUAN, Y. XIANG, **In situ formation of G-quadruplex/hemin nanowires for sensitive and label-free electrochemical sensing of acid phosphatase,** Sens. Actuators B Chem. 330 (2020) 127272-129301. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129272>.
- BRASIL 2009c. **Lei n.º 12.015.** Brasília. [online]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Lei/L12015.htm#art3. Acessado em: 08 de fevereiro de 2023.
- BUSQUETS, M. A., & ESTELRICH, J. **Prussian blue nanoparticles: synthesis, surface modification, and biomedical applications.** 2020, *Drug Discovery Today*, 25(8), 1431-1443.
- BUTMEE, P., TUMCHARERN, G., SONGSIRIRITTHIGUL, C., DURAND, M. J., THOUAND, G., KERR, M., ... & SAMPHAO, A. **Enzymatic electrochemical biosensor for glyphosate detection based on acid phosphatase inhibition,** 2021. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 5859-5863.
- CARRILHO, E., MARTINEZ, A.W., WHITESIDES, G.M. **Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics,** Anal. Chem. 81 (2009) 7091–7095
- CASEY, T.; MISTEK, E.; HALÁMKOVÁ, L.; LEDNEV, I.K. **Raman Spectroscopy for Forensic Semen Identification: Method Validation vs. Environmental Interferences.** *Vib. Spectrosc.* 2020, 109, 103065.
- CHANG, Jiafu, et al. **"Direct and Specific Detection of Glyphosate Using a Phosphatase-like Nanozyme-Mediated Chemiluminescence Strategy."** 2023, *Analytical Chemistry*.

CHEN, Zi-Jian, et al. "Phosphate-triggered ratiometric fluoroimmunoassay based on nanobody-alkaline phosphatase fusion for sensitive detection of 1-naphthol for the exposure assessment of pesticide carbaryl." *Journal of Hazardous Materials* 424 (2022): 127411.

D'AMONE, L., MATZEU, G., & OMENETTO, F. G. **Stabilization of salivary biomarkers**, 2021. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(12), 5451-5473.

DAS, T., HARSHEY, A., NIGAM, K., YADAV, V. K., & SRIVASTAVA, A. **Analytical approaches for bloodstain aging by vibrational spectroscopy: Current trends and future perspectives**. 2020, *Microchemical Journal*, 158, 105278.

DARABDHARA, Gitashree, et al. **"Cu-Ag bimetallic nanoparticles on reduced graphene oxide nanosheets as peroxidase mimic for glucose and ascorbic acid detection."** *Sensors and Actuators B: Chemical* 238 (2017): 842-851.

DO VALLE FRAGOSO, Lúcia, et al. **"Luminol: Possíveis Interferentes no Estudo de Sangue Humano."** *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics* 10.2 (2021): 111-129. ELABSCIENCE, E-book, Disponível em: https://www.elabscience.com/p-acid_phosphatase_acp_activity_assay_kit-40598.html Acesso: 15 de junho de 2023.

FAGUNDES, Tereza Cristina Pereira Carvalho. **"EDUCAÇÃO SEXUAL."** *Revista Brasileira De Sexualidade Humana*, 2020, Vol.18 (2).

FBSP - FÓRUM BRASILEIRO DE SEGURANÇA PÚBLICA. 2022. **16º Anuário Brasileiro de Segurança Pública. São Paulo.** [online]. Disponível em: <http://www.forumseguranca.org.br>. Acessado em: 14 de janeiro de 2023.

FEDER, Daniel, et al. **"Optimization of an α -aminonaphthylmethylphosphonic acid inhibitor of purple acid phosphatase using rational structure-based design approaches."** *European Journal of Medicinal Chemistry* 254 (2023): 115383.

FERREIRA, Diego Lacerda. **Dos crimes contra a dignidade sexual: a valoração da palavra da vítima no crime de estupro e estupro de vulnerável. A valoração da palavra da vítima no crime de estupro e estupro de vulnerável.** 2021. Disponível em: <https://diegolac.jusbrasil.com.br/artigos/1170559396/dos-crimes-contr-a-dignidade-sexual-a-valoracao-da-palavra-da-vitima-no-crime-de-estupro-e-estupro-de-vulneravel>. Acesso em: 14 de junho de 2022.

FERREIRA, H.; COELHO, D.S.C; CERQUEIRA, D.; ALVES, P.; SEMENTE, M.. Elucidando a prevalência de estupro no Brasil a partir de diferentes bases de dados. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA 2023.

FERREIRA, W. A. **A relevância da prova pericial nainvestigação dos Crimes sexuais.** João Pessoa. 2019.

FRANCEZ et al. | **Revista Criminalística e Medicina Legal** – Belo Horizonte: Valor Editora | V.5 | 2020 | ISSN 2526-0596 36

GAMBLIN, A. P., & MORGAN-SMITH, R. K. **The characteristics of seminal fluid and the forensic**

tests available to identify it, 2020. Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science, 2(3), e1363.

GAN, X., QIU, F., JIANG, B., YUAN, R., & XIANG, Y. **Convenient and highly sensitive electrochemical biosensor for monitoring acid phosphatase activity**, 2021. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 332, 129483.

HIREMATH, P., NUGURU, K., & AGRAHARI, V. **Material attributes and their impact on wet granulation process performance**. In *Handbook of pharmaceutical wet granulation*, 2019 (pp. 263-315). Academic Press.

HU, Qiong, et al. **"Sensitive and selective colorimetric assay of alkaline phosphatase activity with Cu (II)-phenanthroline complex."** *Talanta* 163 (2017): 146-152.

HU, Qiong, et al. **"Turn-on colorimetric platform for dual activity detection of acid and alkaline phosphatase in human whole blood."** *Chemistry—An Asian Journal* 11.21 (2016): 3040-3045.

HU, Qiong; ZHOU, Baojing; DANG, Pengyun; LI Lianzhi; KONG, Jinming; ZHANG, Xueji. **Facile colorimetric assay of alkaline phosphatase activity using Fe(II)-phenanthroline repórter**. *Analytica Chimica Acta* 950 (2017) p.170-177.

JIN, L., SUN, Y., SHI, L., LI, C., SHEN, Y. **PdPt bimetallic nanowires with efficient oxidase mimic activity for the colorimetric detection of acid phosphatase in acidic media**, *J. Mater. Chem. B* 7 (2019) 4561-4567. <https://doi.org/10.1039/C9TB00730J>.

JUNIOR, Lindiomar Borges de Avila. **Chaveamento Resistivo em filmes finos de Azul da Prússia**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Física, Florianópolis, 2020.

KARADAYI, Sukriye et al. **Evaluation of the relationship between the detectability of seminal stains on laundered fabric and stain age**. *Medicine, Science and the Law*, v. 61, n. 3, p. 198-207, Feb. 2021.

KAUR, A., & GUPTA, S. **Comparative Analysis of The Effect of Salt and Sugar Stress on Acid Phosphatase Activity of Triticum Aestivum (Wheat), Cicer Arientinum (Chick Pea) and Vigna Radiata (Moong Bean)**. 2019, *Think India Journal*, 22(17), 656-678.

KIM, J. Y. et al. **Application of hematoxylin reagent for sperm cell separation in sexual crime evidence**. *Forensic Science International*, v. 307, p. 110114, Feb. 2020.

LAU, Janny, et al. **"Inhibition of acid phosphatase detection in mixed semen-blood training samples by anti-coagulants present in blood collection tubes."** *Canadian Society of Forensic Science Journal* 53.2 (2020): 71-82.

LI, S., HU, X., CHEN, Q., ZHANG, X., CHAI, H., HUANG, Y., **Introducing bifunctional metal-organic frameworks to the construction of a novel ratiometric fluorescence sensor for screening acid phosphatase activity**, *Biosens. Bioelectron.* 137 (2019) 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.05.010>.

LI, Yuqiong, et al. **"Nafion assisted preparation of prussian blue nanoparticles and its application in electrochemical analysis of L-ascorbic acid."** *Microchemical Journal* 177 (2022): 107278.

- LIN, Z., ZHANG, X. M., LIU, S. J., ZHENG, L. L., BU, Y. M., DENG, H. H., CHEN, R. T., PENG, H. P., LIN, X. H., CHEN, W. **Colorimetric acid phosphatase sensor based on MoO₃ nanozyme**, *Anal. Chim. Acta* 1105 (2020) 162-168, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.01.035>
- LIN, Zhen, et al. **"Colorimetric acid phosphatase sensor based on MoO₃ nanozyme."** *Analytica chimica acta* 1105 (2020): 162-168.
- LIU, B. W., HUANG, P. C., & WU, F. Y. **Smartphone colorimetric assay of acid phosphatase based on a controlled iodine-mediated etching of gold nanorods**, 2020 *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 8051-8059.
- LIU, H., HUANG, P.C., WU, F. Y., MA, L.H. **Colorimetric determination of acid phosphatase activity and inhibitor screening based on in situ polymerization of aniline catalyzed by gold nanoparticles**. 2021 *Microchim Acta* 188:155. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04799-w>.
- LIU, K.-L.; TSAI, L.-C.; LIN, Y.-C.; HUANG, N.-E.; YANG, L.-J.; SU, C.-W.; LEE, J.C.-I.; LINACRE, A.; HSIEH, H.-M. **Identification of Spermatozoa Using a Novel 3-Plex MSRE-PCR Assay for Forensic Examination of Sexual Assaults**. *Int. J. Leg. Med.* **2020**, *134*, 1991–2004
- LOPES JR, Aury. **Direito Processual Penal**. 17. ed. São Paulo: Saraiva, 2020. p. 409
- MARÍA-HORMIGOS, Roberto, et al. **"Prussian blue/chitosan micromotors with intrinsic enzyme-like activity for (bio)-sensing assays."** *Analytical Chemistry* 94.14 (2022): 5575-558
- MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5 ed. England: Pearson, 2005
- NAMWONG, P., JARUJAMRUS, P., AMATATONGCHAI, M., CHAIRAM S.. **Fabricating simple wax screen-printing paper-based analytical devices to demonstrate the concept of limiting reagent in acid-base reactions**, *J. Chem. Educ.* 95 (2018) 305–309.
- NASCIMENTO, Ivaniely Sampaio do. **Estudo quantitativo comparativo de ácido ascórbico em tomates convencionais e orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2022. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022
- NJAU, D., LUNAYO, A., & ODOUR, J. **A Substitute Presumptive Test for Screening of Semen using Sodium-p-Nitrophenyl Phosphate (NaPNPP)**, 2021
- NÓBREGA, Joaquim A.; LOPES, Gisele S. **Flow-injection spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical products with the Prussian Blue reaction**. *Talanta* 43 (1995), p. 971-976.
- NUCCI, Guilherme de Souza. **Curso de direito penal: parte especial arts. 213 a 361 do Código Penal**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Forense, 2022.
- OH, Hyeryeon, et al. **"Synergistic antioxidant activity of size controllable chitosan-templated Prussian blue nanoparticle."** *Nanomedicine* 14.19 (2019): 2567-2578.
- OLIVEIRA, I. A.; MACHADO, H. C. P.; LIMA, B. M. Y.; AQUINO, E. V. O.; DE FARIA, M. R. G. V. **"Violência Contra Crianças: Avaliação Das Características Epidemiológicas No Brasil E No Estado**

De Goiás." Revista Educação Em Saúde 9.1 (2021): 51-60.

OTTON, M. H., & NINGELISKI, A. de O. **Estupro de vulnerável: uma reflexão sobre a palavra da vítima e prova penal à luz da Lei 13431/2017**, 2022 Academia De Direito, 4, 465–489.

PAN, Tingting, et al. **"Turn-on fluorescence measurement of acid phosphatase activity through an aggregation-induced emission of thiolate-protected gold nanoclusters."** *Talanta* 227 (2021): 122197.

PANICKER, L. S., D'Silva, F., & Surve, S. S. **Effect of Ageing of Seminal Stains on Their Detection on Fabrics In Criminal Investigations**, 2022

QI, Wenjing, et al. **"Electrochemiluminescence resonance energy transfer immunoassay for alkaline phosphatase using p-nitrophenyl phosphate as substrate."** *Analytica Chimica Acta* 1097 (2020): 71-77.

QIAO, Xiaohong, et al. **"Sensitive acid phosphatase assay based on light-activated specific oxidase mimic activity."** *Talanta* 255 (2023): 124236.

QIN, Zhiguo, et al. **"Achieving ultrasmall Prussian blue nanoparticles as high-performance biomedical agents with multifunctions."** *ACS applied materials & interfaces* 12.51 (2020): 57382-57390.

QU, Z., LI, N., NA, W., & SU, X. **A novel fluorescence "turn off- on" nanosensor for sensitivity detection acid phosphatase and inhibitor based on glutathione-functionalized graphene quantum dots.** 2019 *Talanta*, 192, 61-68.

RAN, Fanpeng, et al. **"A fluorescent and colorimetric dual-channel sensor based on acid phosphatase-triggered blocking of internal filtration effect."** *Microchimica Acta* 188 (2021): 1-9.

RANGEL, Paulo. **Direito processual penal.** 28. ed. São Paulo: Atlas, 2020

RIGO, Eniffer Durão, et al. **"MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE SÊMEN NA APURAÇÃO DE CRIMES SEXUAIS"**, 2022

RODRIGUEZ, J.J.R.B., CALACAL, G.C., LAUDE, R.P. et al. **Integrating presumptive and confirmatory semen tests into DNA profiling of sexual assault evidence: a Philippine example.** *Egypt J Forensic Sci* 9, 45 (2019). <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0149-z>

SAKURADA, Koichi, WATANABE, Ken, and AKUTSU Tomoko. **"Current methods for body fluid identification related to sexual crime: focusing on saliva, semen, and vaginal fluid."** *Diagnostics* 10.9 (2020): 693.

SALA, D. **A perícia criminal: evidências, profissional perito e nulidade pericial—uma revisão literária.** *Revista Brasileira de Criminalística*, v. 7, n. 3, p. 28-31, Set. 2018.

SÁNCHEZ-MACHADO, Dalia I., et al. **"Chitosan."** *Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements.* Academic Press, 2019. 485-49

SERAFIM, Leticia, AND MENDES, Sabrina Monique. **"Poder e violência: a brutalidade no crime de estupro intrafamiliar a partir da interseccionalidade de gênero e classe."** E-BOOK: Mulheres e o direito: um chamado à real visibilidade volume 2. / organização Tomazoni, L.; Prata, M.; Abiko, Paula. 2 ed. Curitiba: Editora Sala de Aula Criminal, 2021. ePub

SESAU, Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas; Violência sexual, 2023. Disponível em: <https://www.saude.al.gov.br/violencia-sexual/> Acesso: 6 de fevereiro de 2023.

SIJEN, T., & HARBISON, S. **On the identification of body fluids and tissues: A crucial link in the investigation and solution of crime**, 2021 *Genes*, 12(11), 1728.

SILVA, Giovana Virginia Maria dos Reis; PASCHOALICK, Marília Bachi Comerlato. **Estupro de vulnerável: a relevância da palavra da vítima para fins de prova e condenação.** *Percurso Acadêmico*, Belo Horizonte, v. 10, n. 20, p. 99-115, 2020.

SILVEIRA, Vinícius Nascimento, et al. **"Determinação de Ácido Ascórbico em Sucos de Caixinha Longa Vida por Voltametria Cíclica Usando os Métodos dos Padrões Externos e da Adição de Padrão: Uma Proposta de Experimento para o Ensino de Química Analítica Instrumental."** *Revista Virtual de Química* 14.5 (2022).

SOARES, Pedro Henrique Trindade. **Preparação do nanocompósito entre óxido de grafeno e azul da prússia e aplicação na detecção de glicerol.** 2019. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

SOUSA, G. S. ., CAVALCANTE ELIZEU, M. J. ., RAMOS, B. C. Z. ., MOURA E LIMA, C. M. A. DE ., & MAYNARD, D. DA C. **Avaliação da relação entre a cor e degradação da vitamina C em suco de laranja.** *Conjecturas*, 22(9), 374–381, 2022.

TANG, Zhenwei, et al. **"Assays for alkaline phosphatase activity: Progress and prospects."** *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 113 (2019): 32-4

TANG, Zhenwei; CHEN, Haotian; HE, Hailun; MA, Changbei. **Assays for alkaline phosphatase activity: Progress and prospects.** *Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier, 2019. DOI: 10.1016/j.trac.2019.01.019

TAVARES, M.C., OLIVEIRA, K.A., DE FÁTIMA, Â., COLTRO, W.K. and SANTOS, J.C.C. **Paper-based analytical device with colorimetric detection for urease activity determination in soils and evaluation of potential inhibitors**, 2021. *Talanta*, 230, p.122301.

TEEPOO, S.; CHUMSAENG, P.; JONGJINAKOOL, K.; CHANTU and NOLYKAD, W. **A new simple and rapid colorimetric screening test for semi-qualitative analysis of vitamin C in fruit juices based on Prussian Blue.** *Journal of Applied Sciences*. 2012. DOI: 10.3923/jas.2012.568.574.

TRAJANO, Renata Kelly Nogueira, et al. **"Comparativo de casos de violência sexual contra criança e adolescente no período 2018-2020."** *Research, Society and Development* 10.1

(2021): e11710111384-e11710111384.

ULRICH, K., & JAKOB, U. **The role of thiols in antioxidant systems.** *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 14-27, 2019 .

WANG, Fangyuan; LI Yongxin; LI, Wenying; ZHANG, Qinfeng; CHEN, Jian; ZHOU, Huipeng and YU Cong. **A facile method for detection of alkaline phosphatase activity based on the turn-on fluorescence of resorufin.** *Anal. Methods*, 2014, 6, 6105. DOI: 10.1039/c4ay00634h.

WANG, Jing, et al. **"Label-free colorimetric detection of acid phosphatase and screening of its inhibitors based on biomimetic oxidase activity of MnO₂ nanosheets."** *ACS biomaterials science & engineering* 6.5 (2020): 3132-3138.

WARRIER, V., & KANCHAN, T. **Clothes and the evidences they carry: A perspective on its forensic examination,** 2021. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 43(3), 296-299.

WU, J.; WANG, X.; WANG, Q.; LOU, Z.; LI, S.; ZHU, Y.; QIN, L.; WEI, H. **Nanomaterials with Enzyme-Like Characteristics (Nanozymes) Next-Generation Artificial Enzymes (II).** *Chem. Soc. Rev.* 2019, 48, 1004–1076.

WU, Tengting, et al. **"Colorimetric detection of ascorbic acid and alkaline phosphatase activity based on the novel oxidase mimetic of Fe–Co bimetallic alloy encapsulated porous carbon nanocages."** *Talanta* 202 (2019): 354-361.

XU, Miao, et al. **"Competitive redox reaction of Au-NCs/MnO₂ nanocomposite: toward colorimetric and fluorometric detection of acid phosphatase as an indicator of soil cadmium contamination."** *Analytica Chimica Acta* 1096 (2020): 174-18

XUE, Xin, et al. **"Photothermal and colorimetric dual mode detection of nanomolar ferric ions in environmental sample based on in situ generation of prussian blue nanoparticles."** *Analytica Chimica Acta* 1105 (2020): 197-207.

YAN, X., XIA, C., CHEN, B., LI, Y. F., GAO, P. F., & HUANG, C. Z. **Enzyme activity triggered blocking of plasmon resonance energy transfer for highly selective detection of acid phosphatase,** 2019. *Analytical chemistry*, 92(2), 2130-2135.

YANG, DanDan, et al. **"Oxidase-like Fe–N/C single atom nanozyme enables sensitive detection of ascorbic acid and acid phosphatase."** *Analytica Chimica Acta* 1265 (2023): 341221.

ZHA, S.; WEI, X.; FANG, R.; WANG, Q.; LIN, H.; ZHANG, K.; ZHANG, H.; LIU, R.; LI, Z.; HUANG, P.; et al. **Estimation of the Age of Human Semen Stains by Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Preliminary Study.** *Forensic Sci. Res.* 2020, 5, 119–125.

ZHANG, Hongyi; JU, Qikai; PANG, Shude; WEI, Ningning; ZHANG, Yanru. **Recent progress offluorescent probes for the detection of alkaline phosphatase (ALP): A review.**

Dyes and Pigments, Volume 194, 2021, DOI:10.1016/j.dyepig.2021.109569.

ZHANG, Tao, et al. **"A colorimetric sensor for acid phosphatase activity detection based on acridone derivative as visible-light-stimulated oxidase mimic."** *Analytica Chimica Acta* 1155 (2021): 338357.

ZHANG, Tingting, et al. **"Biomimetic cascade nanoreactor with triple-enzyme mimetic activities for colorimetric detection of acid phosphatase."** *Chemical Engineering Journal* 437 (2022): 135267.

ZHENG, S. S., GU, HZ., YIN, D.Y., ZHANG, J. L., LI, W. FU, Y. **Biogenic synthesis of AuPd nanocluster as a peroxidase mimic and its application for colorimetric assay of acid phosphatase**, *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*, 589 (2020) 124444-124472. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124444>.

ZHENG, S., GU, H., YIN, D., ZHANG, J., LI, W., & FU, Y. **Biogenic synthesis of AuPd nanocluster as a peroxidase mimic and its application for colorimetric assay of acid phosphatase**, 2020. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 589, 124444.

ZHENG, Shanshan, et al. **"Biogenic synthesis of AuPd nanocluster as a peroxidase mimic and its application for colorimetric assay of acid phosphatase."** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 589 (2020): 124444

ZHU, Weiran, et al. **"A colorimetric biosensor for simultaneous ochratoxin A and aflatoxins B1 detection in agricultural products."** *Food chemistry* 319 (2020): 12654.