

# Identificação de Atividade Ácida Prostática em Manchas Contendo Materiais Biológicos e Alimentos Simuladas para a Análise Forense

José Ricardo dos Santos Vieira<sup>1</sup>, Alaine Albuquerque da Silva<sup>2</sup>, Bianca Tatiana Fonte Rodrigues<sup>2</sup>,  
Cécilia da Silva Alvarez<sup>2</sup>, Elissandra da Silva Rodrigues Alves<sup>2</sup>, Georgete Maria Moura Vieira<sup>3</sup>

1 - Professor do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA

2 - Concluintes do Curso de Farmácia do Centro Universitário do Pará – CESUPA

3 - Professora do Curso de Farmácia do Centro Universitário do Pará – CESUPA

## Resumo

A determinação qualitativa de atividade de fosfatase ácida prostática (FAP) tem sido utilizada há vários anos na identificação de esperma em material biológico ou manchas provenientes do local do crime de vítimas de provável agressão sexual. Para avaliar a sensibilidade do método de Roy modificado na determinação de atividade de FAP em análise forense, foram analisadas manchas feitas em papel de filtro a partir de material biológico e alimentos (esperma, sangue total, soro, saliva, secreção vaginal, fezes, urina, feijão, leite e café) para simular material proveniente de local de crime. Todas as manchas contendo material biológico mostraram resultados positivos com as manchas de esperma com os mais altos valores (~20.000x em relação às manchas com saliva com  $0,92 \pm 0,78$ UI/mL). Manchas de alimentos apresentaram resultados positivos ( $0,31 \pm 0,13$ UI/mL), o que indica que a atividade de FAP não é exclusiva de material biológico. A metodologia utilizada para simular manchas provenientes de local de crime em casos de estupro, utilizando o método modificado de Roy para determinar a atividade de FAP, mostrou-se adequada para análises forenses. Entretanto, resultados positivos não podem ser considerados definitivos, mas sugestivos da presença de esperma quando os resultados apresentarem-se milhares de vezes acima de um valor de corte de 1,7UI/mL.

**Palavras-chaves:** Fosfatase ácida prostática, análise forense

## Summary

### **Detection of phosphatase prostate acid in stains in with human biological material and food products to simulate forensic material**

Qualitative detection of phosphatase prostate acid (PPA) activity has been used for many years to identify seminal fluid in biological material or stains from clothes of alleged victims of sexual assaults. In order to investigate the sensibility of the modified Roy test for PPA activity determining, stains on filter paper made from human biological material and food products were used to simulate forensic material from crime scene investigation (sperm, whole blood, serum, saliva, vaginal secretion, feces, urine, food products beans, milk, and coffee). All biological material stains have shown PPA activity and stains of sperm have shown the highest PPA activity (~20,000 fold to stains with saliva which have shown  $0.92 \pm 0.78$ UI/mL PPA activity). Food stains have shown positive results ( $0.31 \pm 0.13$ UI/mL) that indicate the PPA activity is not exclusive of biological material. The methodology used to simulate stains from crime scene investigation in rape cases, using the Roy adapted method to detect PPA activity, was adequate to forensic analysis of sperm detection in stains. However, positive results cannot be judged as conclusive but only suggestive of seminal fluid presence when there are results thousands times higher than a cut off of 1.7UI/mL.

**Key words:** Phosphatase prostate acid, forensic investigation

## Introdução

A fosfatase ácida designa um grupo heterogêneo não específico de fosfatases que exibem pH ótimo entre 4,5 e 7,0 e catalizam a hidrólise de monoéster ortofosfórico produzindo um álcool e um grupo fosfato, e é amplamente distribuída nos tecidos humanos, além de animais, vegetais e alimentos em geral (1). No homem adulto, a próstata contribui com quase cerca de 50% da fosfatase ácida total, sendo o restante proveniente dos demais tecidos (ossos, fígado, baço, rins, eritrócitos e plaquetas) (2).

A fosfatase ácida prostática (FAP) (EC 3.1.3.2), por ser substância específica do homem e presente no sêmen, tem sido utilizada com muita frequência em análises forenses, pois com o crescente aumento da violência sexual é imprescindível adotar recursos científicos sensíveis, específicos e pouco dispendiosos para caracterização de violência sexual, tornando-se rotina sua pesquisa na secreção vaginal e anal, já que, havendo ejaculação, mesmo em indivíduos azoospermicos (patológicos ou vasectomizados) certamente haverá FAP, o que caracterizará, sem dúvida, a conjunção carnal ou o ato libidinoso (3). Entretanto, a especificidade e sensibilidade da FAP são questionáveis pela possibilidade de resultados falsos-positivos devido a interferentes presentes em outros

materiais biológicos e, até mesmo, em alimentos e outros componentes orgânicos (4, 5).

O método de Roy tem sido utilizado com sucesso para a quantificação de FAP sérica e na análise qualitativa em casos de violência sexual como alternativa do clássico teste de Berg desenvolvido na década de 1950 (1). Entretanto, seu uso ainda carece de padronização para a quantificação em análise forense, uma vez que o esperma possui mais de 1.000 vezes a concentração de FAP sérica e sua quantificação pode contribuir na caracterização de casos de violência sexual (4, 6, 7, 8).

Desta forma, este trabalho visa testar uma técnica de dosagem da FAP, por meio do método colorimétrico de Roy, em manchas simuladas com fluidos orgânicos e alimentos avaliando a possibilidade de resultados falsos-positivos ou falsos-negativos na dosagem de FAP em análises forenses.

## Metodologia

Foram utilizadas manchas de diversos materiais biológicos (esperma, sangue total, soro, saliva, fezes, urina e secreção vaginal) e alimentos (café, leite e feijão) para simular possíveis manchas encontradas no local de crimes relacionados com suposto atentado sexual.

As manchas foram obtidas pela adição de 50µL de cada material em papel de filtro qualitativo número 1.

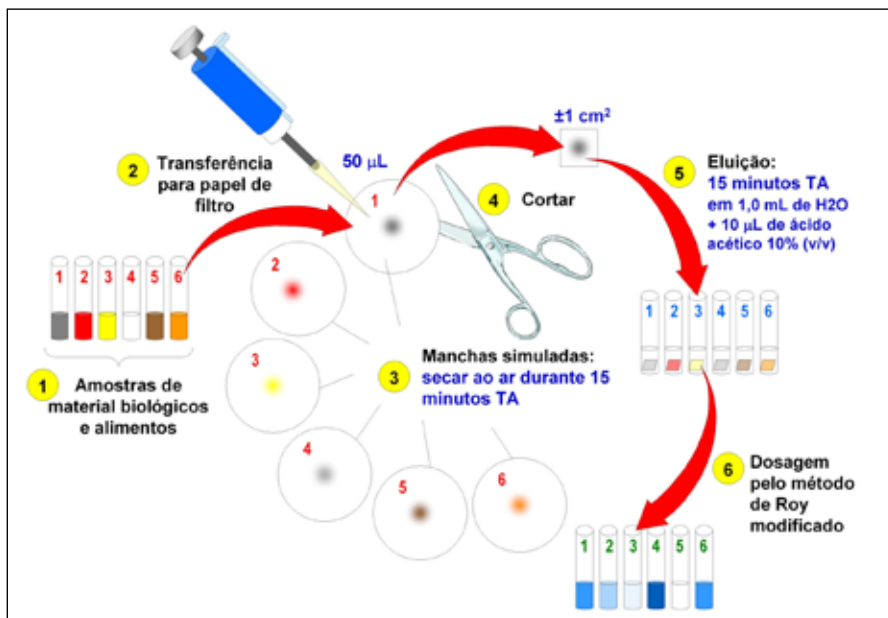
Uma amostra de 1cm<sup>2</sup> de papel de filtro contendo a amostra foi cortada após 15 minutos de secagem ao ar e colocado para eluir em 1,0mL de água destilada estabilizada com 10µL de ácido acético 10% (v/v) durante 15 minutos em temperatura ambiente.

Amostras sólidas (p.ex.: fezes, alimentos) foram previamente diluídas ( $\pm$  1g em 1mL de água) antes de serem adicionadas ao papel de filtro. As amostras de secreção vaginal foram coletadas com *swab* de algodão esterilizado e distendidas diretamente sobre o papel de filtro, mas também foram diluídas em 1,0mL de solução salina fisiológica (NaCl 0,85%) e depois adicionadas ao papel de filtro. A Figura 1 resume o processo metodológico para a simulação das manchas.

Os materiais biológicos foram provenientes do Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Ensino Superior do Pará (CESUPA) e os alimentos foram provenientes de preparo caseiro.

Para evitar a contaminação entre as amostras, foi realizada rigorosa limpeza do material envolvido na obtenção dos fragmentos de papel de filtro (pinça e tesoura) para evitar resultados falsamente positivos decorrentes da contaminação do material, principalmente por esperma.

A FAP foi dosada na solução eluída através do Método de Roy (9), conforme sugerido pelo fabricante do *kit* de dosagem (Labtest



**Figura 1.** Processo de simulação de manchas para dosagem de FAP pelo método de Roy adaptado

- Brasil) com modificações (Tabela 1). Para as manchas de esperma, além do esperma íntegro, diluiu-se a eluição a 1:10, 1:100 e 1:1000 em água destilada, com a finalidade de avaliar qual o volume ideal para a dosagem.

As absorbâncias do controle, teste e padrão foram determinadas em espectrofotômetro semi-auto-

mático Bioplus 2000 em comprimento de onda 578 nm, utilizando água destilada para calibrar o zero de absorbância. Uma correção de interferentes colorimétricos externos foi feita através da subtração do valor da absorbância do teste pela absorbância do controle, multiplicando-se esse valor pelo fator de correção determinado através da

dosagem do padrão, uma vez que a reação é linear segundo a Lei de Lambert-Beer.

Uma análise estatística dos valores foi realizada utilizando o programa Bioestat versão 4.0 (10). O cálculo das médias e desvios padrões dos valores de FAP nas amostras foi executado e um teste T paramétrico de aderência foi aplicado para avaliar a significância entre os valores observados e as médias esperadas. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## Resultados e discussão

A pesquisa qualitativa de FAP em manchas presentes em local de crime ou provenientes de peças íntimas de vítimas de ataque sexual é questionável na rotina de investigação forense, haja vista a possibilidade de resultados falsos-positivos observados em vários trabalhos da literatura (1, 3, 4, 5, 7, 8).

**Tabela 1.** Protocolo utilizado para a dosagem de fosfatase ácida pelo método de Roy modificado para a dosagem em manchas simuladas em papel de filtro

Reagentes	Controle	Teste	Padrão
Substrato de timolftaleína monofosfato	0,25mL	0,25mL	-
Água destilada ou deionizada	-	-	0,25mL
Padrão de timolftaleína	-	-	0,05mL
Incubar em banho-maria a 37°C durante 2 min.			
Amostra (eluição)	-	0,05mL	-
Misturar e incubar em banho-maria a 37°C exatamente por 30 minutos			
Reagente de cor	1,0mL	1,0mL	1,0mL
Amostra (eluição)	0,05mL	-	-

Adaptado do protocolo original disponível em <<http://www.centerlabrs.com.br>>

A metodologia utilizada no presente trabalho para obter material para análise após eluição de mancha em água destilada mostrou-se eficaz na detecção de atividade de FAP em todas as amostras analisadas (Tabela 2).

Os valores de atividade de FAP obtidos em manchas de esperma integral, diluído 1:10 e 1:100 ultrapassaram a linearidade de leitura espectrofotométrica sugerida pelo fabricante do *kit* de dosagem (>0,800). Desta forma, somente as amostras cuja eluição foi diluída a 1:100 forneceram leitura dentro dos limites de linearidade de  $19,34 \pm 13,25 \times 10^3$  UI/mL. Esses resultados corroboram o trabalho de Mendes *et al*(6), que demonstraram que a dosagem de FAP no esperma deve ser precedida de diluição na ordem mínima de 1:1000 para situar as absorbâncias dentro da faixa de linearidade do método.

Como a presença de esperma é a prova final de que houve ataque sexual, os resultados obtidos demonstram que a necessidade de diluição do eluído na ordem de 1.000 vezes para se obter absorbância <0,800 sugere fortemente que a mancha analisada esteja contaminada com esperma e isso deve ser informado no laudo.

As dosagens de FAP em manchas contendo esperma apresentam valores significativamente aumentados em relação às demais manchas analisadas no presente trabalho (mais de 20.000X,  $p < 0,00001$ ).

**Tabela 2.** Atividade de fosfatase ácida prostática em manchas simuladas contendo amostras biológicas e de alimentos identificada por meio do método de Roy modificado

<b>Manchas</b>	<b>FAP (UI/mL)<sup>o</sup></b>
<i>Manchas de material biológico</i>	
Esperma (integral)	Sem leitura*
Esperma (1:10)	Sem leitura*
Esperma (1:100)	Sem leitura*
Esperma (1:1000)	19,34 (13,25) x 10 <sup>3</sup>
Sangue Total	0,29 (0,47)
Soro	0,10 (0,11)
Saliva	0,92 (0,78)
Fezes	0,44 (0,59)
Urina	0,21 (0,29)
Secreção vaginal	0,50 (0,50)
<i>Manchas de alimentos</i>	
Feijão	0,32 (0,27)
Leite	0,18 (0,30)
Café	0,44 (0,61)

<sup>o</sup> Média ( $\pm$  desvio padrão)

\* Valores de absorbância acima da linearidade do método (>0,800)

Este resultado apóia o uso do método de Roy como de alta sensibilidade na dosagem de FAP em manchas em local de crime.

A presença de atividade de FAP em quase todas as manchas contendo material biológico e em manchas de alimento indica que a simples detecção qualitativa de FAP em manchas não é fator conclusivo da presença de esperma, resultados que apóiam os achados de Hooft & van der Voorde (4) que observaram a presença de atividade de FAP em até 3,3% dos alimentos investigados.

Esta observação é particularmente importante na análise de manchas de secreção vaginal que revelaram valores na ordem de  $0,50 \pm 0,5$  UI/mL e que, apesar de estarem muito abaixo dos níveis observados nas manchas de esperma, podem ser fatores de falsa interpretação na análise de material genital em casos de suspeita de estupro. Entretanto, uma atividade na ordem de milhares de vezes aumentada em relação aos demais materiais biológicos é um indicativo da presença de esperma, uma vez

que somente este material biológico apresentou tal nível de atividade de FAP no presente estudo.


Levando-se em consideração que as manchas encontradas em local de crime não possuem um padrão específico de formação, resultados positivos na pesquisa de atividade de FAP não podem ser conclusivos da presença de esperma. Contudo, a detecção de atividade de FAP aumentada em milhares vezes em relação a um valor de corte teórico de 1,7UI/mL (correspondente à atividade máxima detectada em manchas de saliva) pode ser considerada como "sugestiva da presença de esperma na mancha investigada" em análise forense. Em contrapartida, o achado de resultados negativos é

conclusivo da ausência de esperma na mancha investigada.

A detecção de atividade de FAP nas amostras de alimentos (média  $0,31 \pm 0,13$ UI/mL) que, teoricamente, não deveriam demonstrar essa atividade, indica que o método possui limitação na presença de interferentes que possam gerar resultado falso positivos, uma vez as médias de FAP nessas amostras variou significativamente ( $p < 0,027$ ) de um valor nulo esperado na análise.

Em uma análise de manchas provenientes de atividade humana diária (Vieira GMM *et al*, 2006, dados não publicados), foi detectado que água sanitária também apresenta atividade de FAP ( $0,11 \pm 0,17$ UI/l), indicando que outros produtos podem gerar resultados

falsos-positivos em manchas encontradas em local de crime relacionados a possível ataque sexual.

Certamente, a identificação de espermatozoides continua sendo o "padrão-ouro" na confirmação de ataque sexual, porém os resultados deste trabalho reforçam a necessidade de expandir a análise de manchas utilizando material proveniente de cena de crime, onde esta metodologia proposta poderá ser avaliada e comparada com outros métodos para ser validada como eficaz na identificação de esperma em manchas. 

#### Correspondência para:

José Ricardo dos Santos Vieira  
jrvieira@ufpa.br

## Referências Bibliográficas

1. Schiff AF. Follow-Up on the Berg Acid Phosphatase Test. *Am J Forensic Med and Pathol*, 19(1): 67-68, 1998.
2. Motta VT. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações*. 4ª ed. São Paulo, Robe, 2003.
3. Graves HC, Sensabaugh GF & Blake ET. Postcoital detection of a male-specific semen protein. Application to the investigation of rape. *N Engl J Med* 312(6): 338-43, 1985.
4. Hooft PJ, van de Voorde HP. Interference of body products, food and products from daily life with the modified zinc test and the acid phosphatase test. *Forensic Sci Int*. 10;66 (3):187-96, 1994.
5. Allery JP, Telmon N, Blanc A, Mieusset R & Rougé D. Rapid detection of sperm: comparison of two methods. *J Clin Forensic Med* 10: 5-7, 2003.
6. Mendes MAM, Aguiar JRP & Vieira JRS. Padronização da Técnica de dosagem da fosfatase ácida prostática no esperma. Trabalho de Conclusão de Curso, CESUPA, 1997.
7. Collins KA & Bennett AT. Persistence of Spermatozoa and Prostatic Acid Phosphatase in Specimens From Deceased Individuals During Varied Postmortem Intervals. *Am J of Forensic Med and Pathol* 22(3): 228-232, 2001.
8. Hooft PJ & van de Voorde HP. Bayesian Evaluation of the Modified Zinc Test and the Acid Phosphatase Spot Test for Forensic Semen Investigation. *Am J Forensic Med and Pathol*, 18(1): 45-49, 1997.
9. Centerlab Website: disponível em <<http://www.centerlabrs.com.br>>. Último acesso em 15 de março de 2007.
10. Ayres M, Ayres-JR M, Ayres DL, Santos AAS. Bioestat 4.0. Aplicações estatísticas na área de ciências biomédicas. Disponível em <<http://www.mamiraua.org.br> 2005> (Acesso em 30 de março de 2007).