



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELOÍSA NEVES ALMEIDA PIMENTEL

**TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO PROSTÁTICO
ESPECÍFICO (PSA)**

Recife
2020

ELOÍSA NEVES ALMEIDA PIMENTEL

**TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO PROSTÁTICO
ESPECÍFICO (PSA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosa Amália Fireman Dutra.

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Pimentel, Eloísa Neves Almeida

Técnicas diagnósticas para detecção do antígeno prostático específico (PSA) /
Eloísa Neves Almeida Pimentel – 2023.

62 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Rosa Amália Fireman Dutra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
Recife, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. Genética forense 2. Crime sexual 3. Diagnóstico I. Dutra, Rosa
Amália Fireman (orient.) II. Título

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -245

ELOÍSA NEVES ALMEIDA PIMENTEL

**TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO PROSTÁTICO
ESPECÍFICO (PSA)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 11/12/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosa Amália Fireman Dutra - (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos Vinícius Foguel (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Erika Ketlem Gomes Trindade (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico aos meus pais Joseilton e Elisonete, a minha avó Evanda (*in memoriam*), as minhas irmãs Duda, Bel, Bela e Isa, a minha madastra Andréa, por todo incentivo, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e iluminado meu caminho para que eu alcançasse mais um objetivo em minha vida e pela força para superar os obstáculos encontrados nesta caminhada.

À professora e orientadora Rosa Dutra, pela confiança, orientação e dedicação dispensados desde o início da minha carreira científica, quando ainda aluna de iniciação científica.

Aos meus colegas de laboratório, aos amigos do IGFEF, com os quais foram divididos os últimos anos de aprendizado, pela contribuição de acrescentar conhecimentos a este trabalho e pelos momentos de descontração e apoio.

Aos professores e funcionários do PPGCB, que contribuíram para minha formação científica e aprendizado durante o mestrado.

Aos meus amigos de mestrado, que contribuíram para o meu aprendizado e pelos momentos de descontração.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

A minha avó Evanda (*in memoriam*), que sempre foi minha maior admiradora e incentivadora, sem medir esforços para ver minha realização e sucesso profissional.

Aos meus pais, minhas irmãs, meus parentes e amigos, que próximos ou distantes acreditaram nos meus esforços e com palavras, orações e pequenos gestos mostraram seu carinho e apoio em todos os momentos.

A minha grande amiga Carolina Matos, que me acompanha desde a iniciação científica onde foi minha coorientadora, que me ensinou muito além da ciência, me ensinou sobre vida, ser humano e amor genuíno.

A minha prima e amiga Natália Costa, um grande exemplo e incentivo para nunca me deixar entrar na zona de conforto, a sempre buscar novos desafios e novas conquistas.

“Sua história é o que você tem, o que sempre terá.
É algo para se orgulhar.”
Michele Obama

RESUMO

O antígeno prostático específico (PSA) é uma protease glicoproteica, produzida na glândula prostática, sendo posteriormente secretada no lúmen prostático. No fluido seminal encontra-se a maior parte do PSA produzido, sendo apenas uma pequena fração liberada para a circulação sanguínea. Desde sua descoberta em 1979, o PSA se tornou o biomarcador padrão ouro para diagnóstico e monitoramento de doenças prostáticas e devido a sua alta especificidade pelo tecido prostático se tornou um marcador valioso na área forense para identificação de fluidos seminais em evidências criminais. Na medicina diagnóstica a presença do PSA é confirmada através de métodos analíticos quantitativos como ELISA ou radioimensaio e por testes qualitativos como o imunocromatográfico. Apesar de representarem técnicas de alta sensibilidade e especificidade, os métodos quantitativos apresentam custos elevados e não são realizados em tempo real ou em tempo rápido de resposta. De forma que não se adequam a rotina e a necessidade dos laboratórios de biologia forense e da perícia criminal em local de crime, isso porque se faz necessário, principalmente no local de crime, um teste rápido e portátil. Nessa dissertação, foi realizada uma revisão bibliográfica das diferentes técnicas diagnósticas disponíveis e em desenvolvimento para detecção de PSA. Os resultados mostraram diferentes técnicas na construção de imunoensaios utilizando testes de tira lateral, novas tecnologias em ELISA, imunossensores e aptassensores, desenvolvendo testes rápidos, sensíveis e específicos para detecção de PSA. O desenvolvimento desses dispositivos e posterior comercialização forneceria um exame de baixo custo e com possibilidade abrangencial mundial.

Palavras-chave: PSA; biossensor; crime sexual; biologia forense; genética forense.

ABSTRACT

The Prostate specific antigen (PSA) is a glycoprotein protease, produced in the prostate gland, which is subsequently secreted into the prostate lumen. Most of the PSA produced is found in the seminal fluid, with only a small fraction released into the bloodstream. Since its discovery in 1979, PSA has become the gold standard biomarker for diagnosis and monitoring of prostatic diseases and due to its high specificity for prostate tissue it has become a valuable marker in the forensic area for identifying seminal fluids in criminal evidence. In diagnostic medicine, the presence of PSA is confirmed by quantitative analytical methods such as ELISA or radioimmunoassay and by qualitative tests such as the immunochromatographic. Despite representing techniques of high sensitivity and specificity, quantitative methods have high costs and are not carried out in real time or in quick response time. So these tests don't fit the routine and the need for forensic biology labs and forensics expertise at a crime scene, this because it is necessary, mainly at the crime scene, a quick and portable test. In this dissertation, a bibliographic review of the different diagnostic techniques available and under development for detection of PSA was carried out. The results showed different techniques in the construction of immunoassays using lateral flow assays, new technologies in ELISA, immunosensors and aptasensors, developing rapid, sensitive and specific tests for PSA detection. The development of these devices and subsequent commercialization would provide a low-cost test with a worldwide scope.

Keywords: PSA; biosensor; sexual assault; forensic biology; forensic genetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição das vítimas de crime sexual no Brasil.....	17
Figura 2.	Distribuição dos crimes de estupro de acordo com a faixa etária e sexo das vítimas.....	17
Figura 3.	Representação da síntese de PSA pelas células prostáticas.....	19
Figura 4.	Representação esquemática de um biossensor.....	21
Figura 5.	Ilustração de um imunossensor.....	25
Figura 6.	Ilustração esquemática de um anticorpo.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Arcórbico
AuNP	<i>Gold nanoparticle</i>
BERA	Bioelectric recognition assay
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
CV	<i>Cyclic voltammetry</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPV	<i>Diferencial pulse voltammetry</i>
ECLIA	<i>Electrochemiluminescence assay</i>
EIS	<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACEPE	Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco
FET	Field-effect transistor
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
HRP	Horseradish Peroxidase
IDT	Interdigital transducer
IFA	Immunofluorescence assay
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LFIA	<i>Lateral flow immunoassay</i>
MQD	Magnetic quantum-dot
MIME	<i>Membrane engineering</i>
MIP	<i>Molecularly imprinted polymer</i>
MNP	<i>Magnetic nanoparticle</i>
NIP	<i>Nonimprinted polymer</i>
NPsCuO	Copper oxide nanoparticles
PBS	Phosphate buffered saline
PCa	Prostate cancer
POCT	<i>Point of care test</i>
PSA	<i>Prostatic-specific antigen</i>
QD	Quantum-dots
rGO	Reduced graphene oxide

SAM	Self-assembled layers
SPR	Surface plasmon resonance
TBP	Toluidine blue polymer
THI	Thionine

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
3	METODOLOGIA.....	29
4	RESULTADOS.....	31
	Artigo - Analytical methods for Prostate specific antigen based on biosensors: A Review.....	
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXO A – Normas para publicação no periódico <i>Journal of the Electrochemical Society</i>.....	62

1 INTRODUÇÃO

A violência sexual apresenta-se como uma violação da intimidade, da integridade física e dos direitos humanos, sendo também considerada um problema de saúde pública. Uma pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) apontou para a prevalência de violência cometida por parceiro íntimo contra a mulher variando de 6% no Japão a 58,6% na Etiópia. No Brasil, o cenário mostra que existe um predomínio desse tipo penal contra crianças e adolescentes, majoritariamente do sexo feminino (MORENO *et al.*, 2006; BLACK *et al.*, 2014; DELZIOVO *et al.*, 2017).

A violência interpessoal é um problema generalizado de saúde pública mundial, associada com inúmeras consequências sanitárias, sociais e econômicas (MURPHY *et al.*, 2019). O crime sexual é uma violação dos direitos humanos básicos e um grande problema de saúde pública (OMS, 2014), é um fenômeno generalizado, afetando diferentes segmentos da população (PEZZOLI *et al.*, 2019), e causando diversos impactos na vida das vítimas (DWORKIN *et al.*, 2017). Dados estatísticos mostram que aproximadamente 36% das mulheres e 17% dos homens experimentam algum tipo de violência sexual ao longo da vida, incluindo comportamentos criminosos não consensuais, consumados ou tentados, como penetração oral, vaginal ou anal, toques não desejados e atos sexuais obtidos por coerção ou incapacitação (SMITH; SKINNER, 2017).

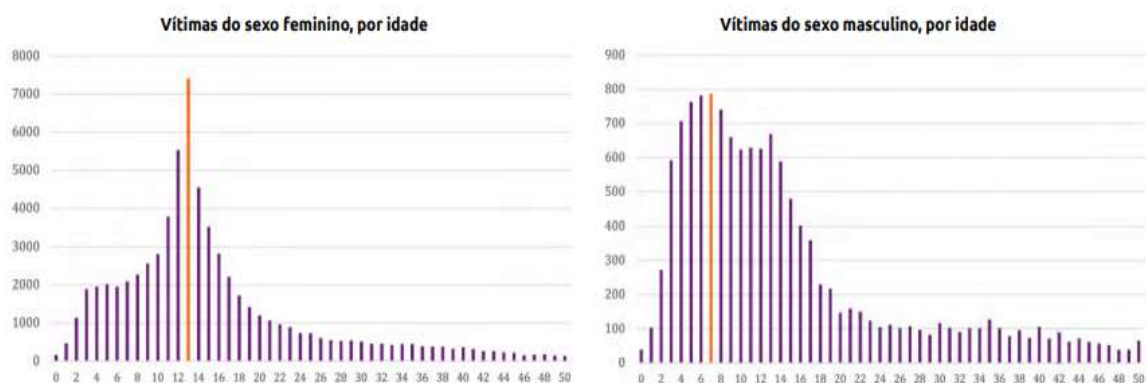
A violência sexual está relacionada a diferentes resultados psicológicos negativos, como choque, medo e ansiedade, afetando diretamente a atividade diária das vítimas. Entre 17% e 65% das vítimas mulheres desenvolvem estresse pós traumático e entre 73% a 82% desenvolvem transtornos de ansiedade, além disso estas vítimas apresentam 13 vezes mais chances de provocar atentados suicidas do que pessoas que nunca sofreram este tipo de trauma (BROOKER; DURMAZ, 2015; YUEN *et al.*, 2019).

Avaliando o perfil das vítimas, dados estatísticos do Fórum Brasileiro de Segurança Pública (FBSP) mostram que majoritariamente trata-se de mulheres (81,8% do total de casos). Consoante com outras pesquisas da área, o principal grupo de vitimização são meninas muito jovens: 26,8% tinham no máximo 9 anos; e

quando considerado o estupro de vulnerável, 53,6% das vítimas tinham no máximo 13 anos (Figura 1 e 2). Ampliando a análise até 17 anos foi observado que 71,8% de todos os registros de estupro se enquadravam nesta faixa etária (FBSP, 2019). Em 2018 o Brasil registrou ao menos 32 mil casos de abuso sexual contra crianças e adolescentes, o maior índice de notificações já registrado pelo Ministério da Saúde (MPPR, 2020). Esta caracterização das vítimas de estupro trouxe um aspecto duplamente grave, o primeiro diz respeito à vulnerabilidade das crianças e adolescentes (71,8% dos casos), sendo que mais de 10% destas apresentavam alguma deficiência de ordem mental ou física; o outro dado inquietante refere-se a 36,2% das vítimas possuírem um histórico de estupros anteriores, e dentre as pessoas que apresentavam alguma deficiência, esse índice aumentou para 42,4% (FBSP, 2019). Em relação ao vínculo com o abusador, 75,9% das vítimas possuem algum tipo de vínculo com o agressor, entre parentes, companheiros, amigos e outros, resultado que se aproxima ao de pesquisas de vitimização já produzidas. Esse dado mostra a proximidade entre o agressor e a vítima, o que revela a gravidade do problema de violência doméstica no país (SINAN, 2014; FBSP, 2019).

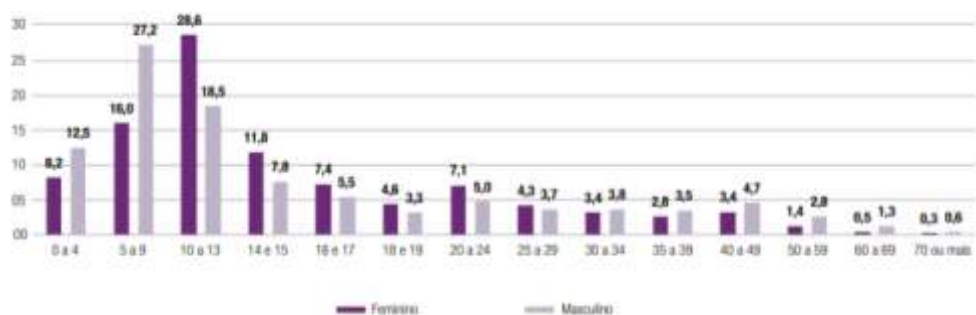
Os índices revelados FBSP demonstram um aumento de aproximadamente 46% nos números de ocorrências policiais registradas referentes a estupro entre 2009 e 2016 (Tabela 1), o que representa apenas 7,5% do real quantitativo dos crimes perpetrados, uma vez que este valor real é subnotificado (FBSP, 2019). Isso porque os abusadores, em sua maioria, possuem livre acesso ao ambiente doméstico das vítimas, além disso, a vítima sente medo, vergonha ou incapacidade para denunciar sozinha.

Figura 1: Número de casos de estupro registrados no Brasil de acordo com a faixa etária e sexo (2018).



Fonte: Adaptado de Microdados do FBSP 2019.

Figura 2. Distribuição dos crimes de estupro de acordo com a faixa etária e sexo das vítimas.



Fonte: Adaptado de Microdados do FBSP 2019.

Tabela 1: Números absolutos de estupros registrados no Brasil.

Estupro	2009			2016		
	Números absolutos	População	Taxa/100 mil habitantes	Números absolutos	População	Taxa/100 mil habitantes
Brasil	33.912	193.543.969	18	49.497	206.081.432	24

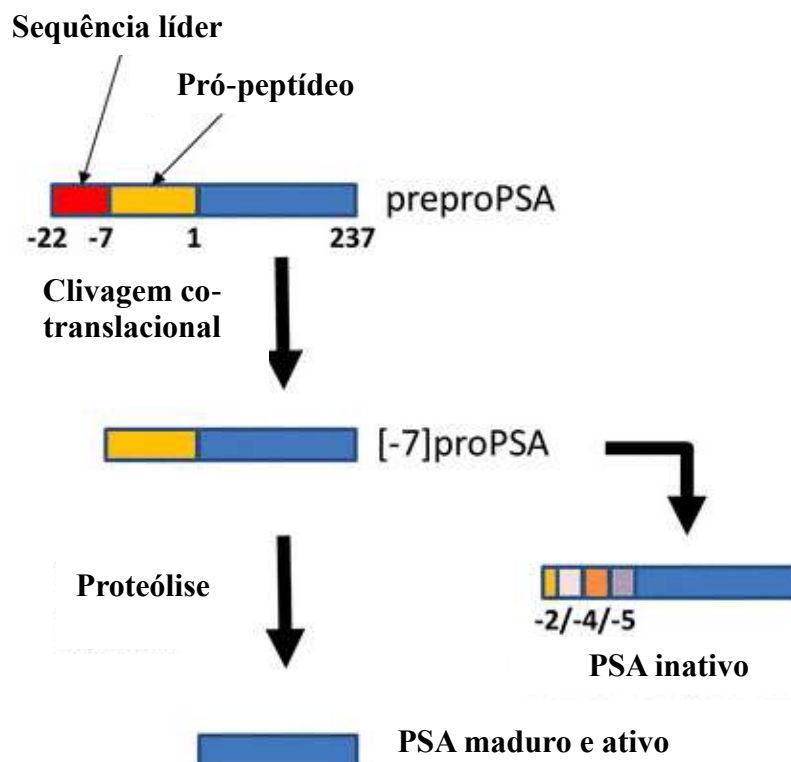
Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados do FBSP 2019 .

A prova material do crime sexual é a detecção do material masculino, o sêmen, nas cavidades oral, anal ou vaginal ou demais partes do corpo da vítima, bem como em peças de roupas ou objetos relacionados à prática delituosa, como preservativos, indumentos e peças íntimas (SUTTIPASIT; WONGWITTAYAPANICH, 2018). A presença do sêmen é confirmada através de testes imunocromatográficos para detecção qualitativa do Antígeno Prostático Específico (PSA, do inglês *prostate specific antigen*) e pela pesquisa de espermatozoides em lâminas através da Microscopia Ótica (MO) (SUTTIPASIT; WONGWITTAYAPANICH, 2018).

O antígeno prostático específico (PSA, do inglês *prostatic specific antigen*) é uma glicoproteína (de 30 a 33 kDa) de cadeia única com atividade de protease do tipo quimotripsina, pertencente à família das calicreínas. Produzido pela glândula prostática e secretada no líquido seminal, o PSA desempenha a função de degradação de proteínas de alto peso molecular (seminogelina I e II), que conduz à liquefação do sêmen, atuando de forma a impedir sua coagulação, mantendo a fluidez e possibilitando que os espermatozoides se movimentem e fecundem o óvulo, por exemplo (HEIDENREICH *et al.*, 2014; GHORBANI *et al.*, 2019). No fluido seminal encontra-se a maior parte do PSA produzido, sendo apenas uma pequena fração liberada para circulação sanguínea (ROOBOL; CARLSSON, 2013; ALBERTS *et al.*, 2015)

O gene que codifica esta proteína, o calicreína humana 3, fica localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q). Sendo traduzido inicialmente na forma de pré-pro-poli-peptídeo, com uma sequência líder de 17 aminoácidos, que é clivada e removida na via secretória, produzindo então um precursor enzimático inativo o próPSA (Figura 3). Quando este pró-peptídeo é secretado no lúmen prostático, sofre clivagem por outras duas calicreínas, que se torna rapidamente ativado para PSA (CLEMENTS *et al.*, 2001; SILVA, 2015; HATAKEYAMA *et al.*, 2017).

Figura 3: Representação da síntese de PSA pelas células prostáticas.



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

Além de sua aplicação forense, o PSA também é rotineiramente utilizado no diagnóstico e monitoramento de doenças, como o câncer de próstata, e outras doenças prostáticas como hiperplasia e prostatites (BITNER, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2015; SUTTIPASIT; WONGWITTAYAPANICH, 2018). Desde sua descoberta em 1979 por Wang e colaboradores o PSA se tornou o biomarcador padrão ouro para triagem, diagnóstico e monitoramento terapêutico do câncer de próstata e um parâmetro clínico de rotina para o manejo da hiperplasia benigna e distúrbios inflamatórios da próstata (RAUSCH *et al.*, 2016).

Devido a sua alta especificidade pelo tecido prostático, o PSA se tornou um marcador valioso, já testado e validado pela comunidade forense, para a identificação de fluido seminal em evidências criminais deixadas por indivíduos do sexo masculino (SUTTIPASIT; WONGWITTAYAPANICH, 2018).

Na medicina diagnóstica a presença do PSA é confirmada através de métodos analíticos quantitativos como o *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), o radioimunoensaio e o imunoensaio de quimioluminescência, e métodos qualitativos como o teste imunocromatográfico (GHORBANI et al., 2019). Apesar de representarem técnicas de alta sensibilidade e especificidade, os métodos quantitativos apresentam custos elevados e não são realizados em tempo real ou em tempo rápido de resposta.

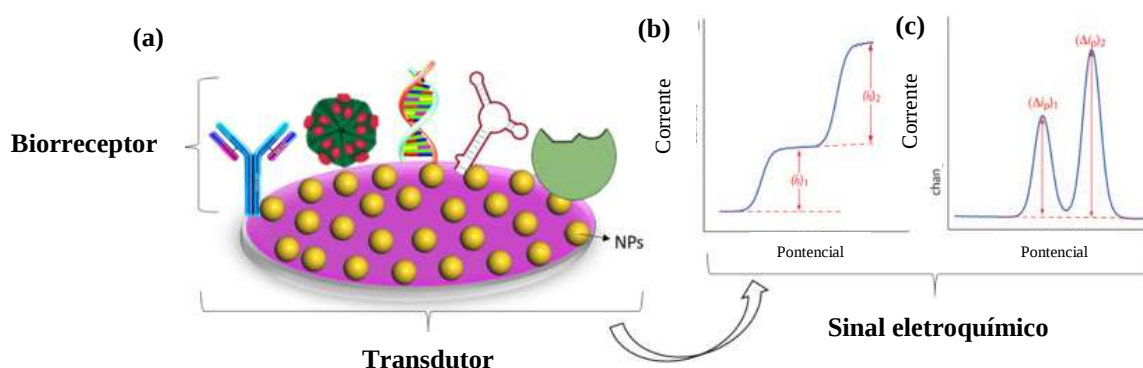
Tratando do método qualitativo, este que é utilizado nos testes de triagem de biologia forense, sua aplicação se dá a partir da utilização de testes imunocromatográficos rápidos, conhecidos como teste de tira lateral (ULUDAG et al., 2016). Em contrapartida, a baixa sensibilidade do teste imunocromatográfico (4 ng/mL) amplamente utilizado nos laboratórios de biologia forense, bem como a impossibilidade de pesquisa de espermatozoides através da microscopia óptica em vestígios encontrados em locais de crime (como vestes e objetos) e quando se tratando de indivíduos azoospermicos ou vasectomizados (MARTÍNEZ et al., 2015), nos quais há ausência de espermatozoides no líquido seminal, faz com que seja necessário, então, o desenvolvimento de uma metodologia que tenha maior sensibilidade que os testes imunocromatográficos comercializados (HOCHMEISTER et al, 1999; SAWAYA; ROLIM, 2004; PAULINO et al., 2017).

Os sistemas de teste point-of-care (POCT) baseados em biossensores para um teste rápido e confiável no consultório do médico já foram introduzidos para várias condições médicas. Para a avaliação de diabetes ou inflamação aguda, que quantificam a glicose (PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2017) a proteína C reativa (SYAL 2014; BROUWER, VAN PELT, 2015) e a hemoglobina glicada (SANCHEZ-MORA et al., 2011; KNAEBEL et al., 2013) têm mostrado resultados de teste confiáveis. De forma que o desenvolvimento de uma tecnologia POC para detecção de PSA possibilitaria a realização de exames e obtenção de resultado em tempo real ou com tempo curto de resposta.

Um biossensor é um dispositivo que detecta reações biológicas ou químicas, gerando sinais correspondentes à concentração do analito na reação (BHALLA, 2016). São pequenos dispositivos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento, ligados a um sistema de detecção, transdução e

amplificação do sinal gerado na reação com o analito alvo (Figura 4). Para a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry), biossensores são dispositivos analíticos integrados capazes de fornecer informação específica, quantitativa ou semi-quantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico imobilizado à superfície sensora do transdutor. Este, por sua vez, identifica e converte o sinal da reação de bioafinidade/bioquímica em um sinal analiticamente útil e mensurável através de um sistema de detecção específico (FERREIRA *et al.*, 2009; KIMMEL *et al.*, 2012; MONOSIK, 2012; ANUSHA *et al.*, 2019).

Figura 4. (a) Representação esquemática de um biossensor, demonstrando sua composição e os tipos de biorreceptores utilizados para detecção do analito alvo; (b) sinal eletroquímico gerado na superfície sensora e (c) mudança de corrente elétrica após a reação de bioafinidade entre o biorreceptor e a molécula alvo.



Fonte: Adaptado de KHAN *et al.*, 2020.

Um biossensor é composto por três unidades básicas (NEETHIRAJAN; RAGAVAN; CHAND, 2018):

- Biorreceptor: que compreende o elemento de biorreconhecimento à molécula alvo. Podendo ser composto por DNA (ácido desoxirribonucleico, do inglês deoxyribonucleic), anticorpo, enzima, proteína, aptâmero, etc.
- Transdutor: é um elemento que converte uma energia em outra. Converte o sinal físico-químico ou biológico, que ocorre no reconhecimento molecular entre o biorreceptor e o analito, em um sinal mensurável proporcional a interação analito-biorreceptor.

- Detector: amplifica e analisa os sinais oriundos do transdutor. Os sinais são exibidos na forma óptica (colorimétrica, fluorescência, quimioluminescência e ressonância plasmônica de superfície) ou elétrica (voltametria, impedância e capacitância), por exemplo.

Os primórdios do que viria a ser um biossensor remota do período de 1906-1922 com o desenvolvimento de um eletrodo para medições de pH em soluções, realizado por Hughes (HUGHES, 1922). Em 1962, Clark e Lyons demonstraram o primeiro biossensor para detecção de glicose através da catálise pela glicose oxidase (GOx), no qual a GOx foi aprisionada em um eletrodo de platina usando uma membrana seletiva ao íon de Oxigênio. A redução na concentração do oxigênio dissolvido foi detectada pelo eletrodo e mostrou ser proporcional à concentração de glicose na amostra (MONOSIK 2012; F. DE OLIVEIRA; PEREIRA, 2016; LAI et al., 2016; OLIVEIRA, 2017). A tecnologia deste trabalho foi transferida e desenvolvida pela Yellow Springs Instrument Company, que em 1975 lançou no mercado o primeiro biossensor comercial de glicose (YELLOW SPRINGS INSTRUMENT COMPANY, 2012).

Notou-se então que sistemas eletroquímicos poderiam ser criados para uma variedade de outros analitos clinicamente importantes através da ligação de enzimas em sistemas eletródicos apropriados. Guilbault e Montalvo, em 1969, descreveram o primeiro biossensor potenciométrico a detectar uréia (GUIBAULT; MONTALVO, 1969). Em seu trabalho, Rechhnitz em 1977, ao desenvolver um eletrodo capaz de detectar seletivamente arginina, utilizou o termo “sensor bioseletivo”, que tão logo passou a ser chamado biossensor, sendo até hoje utilizado para descrever sistemas que utilizam um elemento biológico como receptor e um transdutor físico-químico para detectar a reação de bioafinidade ou catalítica (RECHNITZ, 1977).

Atualmente, pesquisas em biossensores vêm sendo realizadas para aplicá-los no diagnóstico biomédico, bem como a uma ampla gama de outras áreas, como no monitoramento ambiental, controle de alimentos, avaliação de medicamentos e aplicação forense. As exigências analíticas atuais têm exigido o desenvolvimento de dispositivos biossensores mais acurados, com capacidade de realizar análises de modo mais rápido, prático e econômico, além de medidas à beira do leito (POC do inglês – “*point-of-care*”) (MONOŠÍK et al., 2012; CHOI, 2020).

Nos últimos anos, a indústria de diagnóstico tem desenvolvido biossensores POC voltados para diferentes áreas; na área da saúde, principalmente no controle da glicemia, esses dispositivos têm recebido especial atenção (SABU, *et al.*, 2019). Hoje o mercado de biossensores POC cresce cerca de 16% ao ano. Estudos econômicos projetam um mercado global com aplicação em diversas áreas, desde a medicina diagnóstica até às ciências forenses. Sua utilização traz inúmeras vantagens, como alta sensibilidade, uma vez que os biorreceptores possuem alta afinidade pela molécula alvo; alta seletividade; além de apresentarem menor custo quando comparados a outros métodos e técnicas de análise automatizadas, tais como enzima-imunoensaio, ensaio por eletroquimioluminescência, reação da cadeia de polimerase e eletroforese (PORFÍRIO; GIAROLA; PEREIRA, 2016). Estes dispositivos apresentam tempo reduzido de resposta, o que possibilita sua aplicação no monitoramento e detecção em tempo real da presença ou atividade de algum analito, que permite a redução dos custos de cada ensaio, sensibilidade e especificidade. Essas características fazem com que essa tecnologia seja bastante atrativa para aplicação (ANTIOCHIA, 2020).

Nos biossensores, diversos são os métodos que podem ser empregados para a transdução do sinal biológico que ocorre na superfície transdutora, dependendo do tipo de energia envolvida na reação entre o biorreceptor e o analito. Dentre eles: ópticos, térmicos, piezelétricos e eletroquímicos (GENG *et al.*, 2017).

Os biossensores que se utilizam da transdução óptica se baseiam na detecção de mudanças de absorção de radiação eletromagnética na região do visível/infravermelho entre os reagentes e os produtos da reação ou na medição da emissão de luz por um processo luminescente. Utilizam-se de sensores que detectam absorbância, reflectância, fluorescência, quimioluminescência, ondas evanescentes ou bioluminescência (SHIN *et al.*, 2019). Biossensores ópticos mais sofisticados empregam fibra óptica, podendo ser usados para converter quantidades físicas, como pressão, temperatura e taxa de fluxo em quantidades mensuráveis com um sistema de dispositivo complexo baseado em guia de onda de transmissão óptica; as fibras ópticas convencionais são usadas para muitas aplicações diferentes que vão desde imagens de biomateriais ao monitoramento de tóxicos ambientais (LEE *et al.*, 2020).

Por sua vez, os biossensores de transdução térmica ou calorimétrica medem a variação de temperatura, detectam substratos baseado no calor envolvido nas reações bioquímicas entre o analito e o biorreceptor, normalmente uma enzima (OLIVEIRA, 2017; BARI, REIS, NESTOROVA, 2018).

Os transdutores piezoelétricos utilizam-se de materiais com propriedades piezoelétricas que permitem identificar alterações de massa. O efeito piezelétrico é um fenômeno físico que se refere à capacidade de um material produzir tensão quando submetido ao estresse mecânico. O sensor é excitado pela voltagem alternada dada na superfície por dois eletrodos. A tensão alternada causa oscilações mecânicas do cristal e a frequência das oscilações é medida quando o cristal é colocado no circuito de oscilação. O analito ou qualquer outra massa ligada à superfície do cristal resulta em alteração da frequência de oscilação. O decaimento na frequência é proporcional à massa ligada ao cristal (GENG *et al.*, 2017; POHANKA 2018).

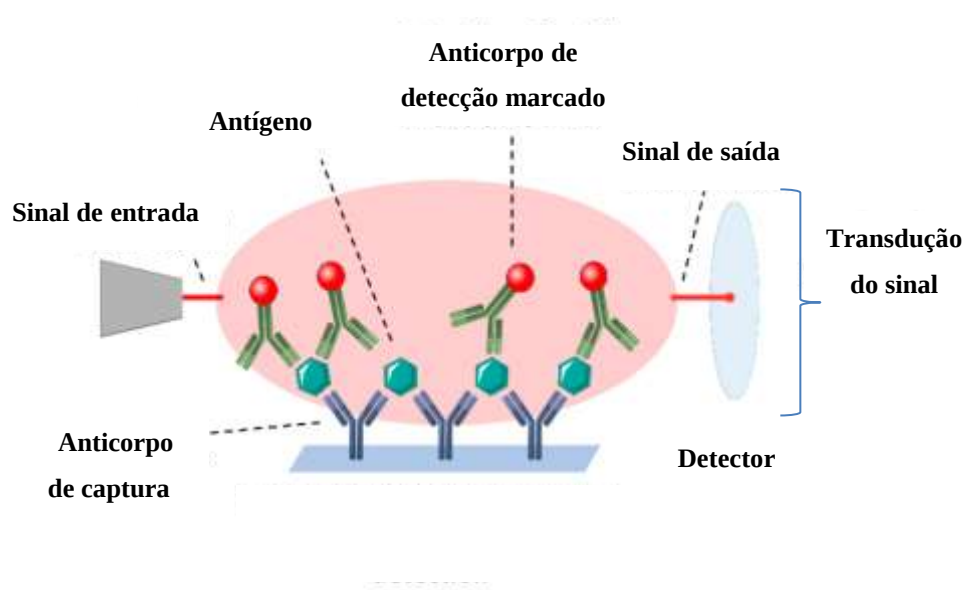
Os biossensores de transdução eletroquímica caracterizam-se pela capacidade de converter o sinal da interação bioquímica em um sinal elétrico utilizando eletrodos com o elemento de reconhecimento biológico imobilizado, onde elétrons são gerados ou dissipados na superfície do transdutor, produzindo um sinal eletrônico proporcional à concentração do analito (TURNER, 2013; VASILESCU, 2016). Como as medidas destas propriedades são facilmente acessíveis experimentalmente, as técnicas eletroanalíticas são adequadamente utilizadas na quantificação de espécies de interesse nas mais diversas áreas. Os biossensores de transdução eletroquímica vêm sendo os mais frequentemente utilizados devido à diversidade de materiais e de técnicas que podem ser aplicadas e que colaboram para alta seletividade e sensibilidade desses sensores, além de oferecem algumas vantagens, como baixo custo, simples design e pequena dimensão (AHMET; AHLATCIOĞLU; İPEK, 2012, OLIVEIRA, 2017, SILVA 2015; ANUSHA *et al.*, 2019).

Tratando-se dos biossensores eletroquímicos, a depender das técnicas utilizadas, podem ser classificados como potenciométricos, condutimétricos, impedimétricos e amperométricos. Os potenciométricos medem a diferença de potencial ou acúmulo de carga no eletrodo de trabalho em comparação com o eletrodo de referência em condições de corrente elétrica constante. Os condutimétricos que analisam a condutância ou resistência do eletrólito, variando de

acordo com a produção de íons/elétrons das reações eletroquímicas, a concentração de carga (condutividade) é obtida através de medições da resistência da solução entre dois eletrodos (XU; WANG; LI, 2017; SILVA, 2015; OLIVEIRA, 2017). Os sensores impedimétricos, por sua vez, atuam medindo a impedância do sistema na imobilização de biocamadas na superfície do eletrodo. Por fim, os biossensores amperométricos que se baseiam na mensuração da corrente elétrica resultante do processo de oxidação ou redução de uma espécie eletroativa presente na célula eletroquímica; de forma que um transdutor amperométrico é usado para estudar a transferência de carga entre as interfaces das fases, em meio a os eletrodos separados por um eletrólito numa célula eletroquímica (HAMMOND *et al.*, 2016).

Dentre os tipos de biossensores quanto aos biorreceptores, são destacados os imunossensores que são alvos deste trabalho e são baseados em reações de imunoensaio, na ligação entre anticorpo e antígeno (Figura 5), no qual um destes é imobilizado sobre a superfície sensora como elemento de biorreconhecimento, ligando-se especificamente ao antígeno ou anticorpo correspondente, neste caso ao “analito” alvo (YOU-MING SHEN; GUANG-YU SHEN; ZHANG, 2018).

Figura 5. Ilustração de um imunossensor com ensaio em sanduíche, o qual possui um anticorpo de captura e um anticorpo de detecção marcado, fazendo-se necessário a utilização de um substrato para quantificação do sinal gerado.

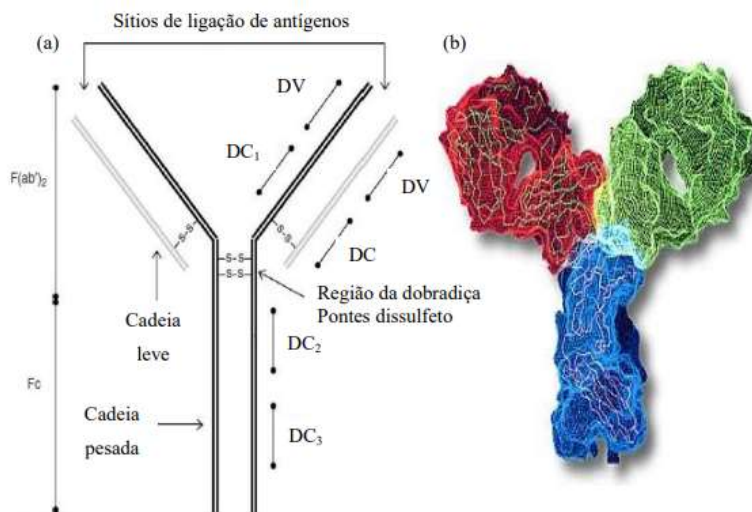


Fonte: Adaptado de LARA; PEREZ-POTTI, 2018.

Os anticorpos são uma família de glicoproteínas conhecidas como imunoglobulinas (Ig), que são produzidos como parte da resposta imune humoral adaptativa a um antígeno. Cada molécula de imunoglobulina é constituída por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas por pontes dissulfeto (Figura 6). Existem cinco tipos de cadeias pesadas denominadas α , γ , δ , ϵ e μ , que definem as classes de imunoglobulina IgA, IgG, IgD, IgE e IgM. As cadeias leves são de dois tipos, kappa (κ) e lambda (λ). A especificidade de ligação ao antígeno é definida pela porção variável (Fab) da molécula, constituída pela união das regiões variáveis das cadeias leve e pesada da imunoglobulina (JÚNIOR *et al.*, 2010; DAY *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2019).

A classe IgG é a mais abundante no soro sendo por isso a mais utilizada nas técnicas analíticas devido à resposta tardia e a disponibilidade que pode variar até 80% entre as imunoglobulinas (VAN DE BOVENKAMP *et al.*, 2016). Na figura 6, uma representação esquemática da IgG, uma molécula em forma de “Y”, formada por duas cadeias leves (com peso de cerca de 25 kDa) e duas cadeias pesadas (pesando aproximadamente 50 kDa). A cadeia leve é formada por um domínio constante e um domínio variável, já a cadeia pesada é formada por um domínio constante e três domínios variáveis. De forma que essas moléculas podem ser divididas em duas regiões, a região de não ligação ao antígeno, denominada Fc, e a região de ligação ao antígeno, denominada Fab. Enquanto a fração Fab é rica em grupamentos amina e é responsável pela interação antígeno anticorpo, a porção Fc é rica em grupamentos carboxílicos, sendo utilizada para possibilitar que a imobilização dos anticorpos na superfície sensora seja realizada de maneira orientada, permitindo que os sítios de ligação aos antígenos fiquem livres (JÚNIOR *et al.*, 2010; DAY *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2019).

Figura 6. a) Ilustração esquemática de um anticorpo, onde DV = domínio variável, DC = domínio constante, Fab = fragmento de ligação ao antígeno e Fc = fração de não ligação ao antígeno; (b) estrutura tridimensional do anticorpo.



Fonte: Adaptada de ZHANG; JU; WANG, 2008;

Apesar de grandes avanços terem sido alcançados no desenvolvimento de imunossensores, utilizando-se de diferentes tipos de transdução, eles ainda apresentam-se como uma tecnologia incipiente que necessita de incessantes pesquisas para se estabelecer competitivamente no mercado de métodos analíticos POC. Devido à grande importância da detecção do PSA nas análises forenses de modo rápido e prático, esta dissertação discute os métodos de detecção de PSA usualmente empregados, bem como os principais avanços no campo de diagnóstico por biossensores; construindo uma revisão com as diferentes técnicas desenvolvidas e em desenvolvimento, partindo dos tipos de testes mais simples, como o teste de tira lateral, aos biossensores com tecnologias mais avançadas, robustas e sensíveis, possibilitando, então, a discussão quanto ao limite de detecção e sensibilidade da técnica da empregada.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Realizar um estudo de revisão que possibilite fornecer uma visão geral das técnicas diagnósticas atualmente empregadas para detecção de PSA e das técnicas em desenvolvimento, empregando o método de revisão sistemática através da utilização das bases de dados eletrônica PubMed/Medilne e Science Direct (Elsevier).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os métodos quanto ao seu limite de detecção, curva linear de resposta, tecnologia empregada e tipo de ensaio realizado. Por fim, avaliar a contribuição dos biossensores para medicina diagnóstica e áreas afins.

3 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi empregado o método de revisão sistemática. A revisão sistemática da literatura é um estudo secundário, que tem por objetivo reunir estudos semelhantes (projetos primários) avaliando-os criticamente em sua metodologia e reunindo-os numa análise estatística quando isto é possível.

Projetamos o protocolo de pesquisa de acordo com o manual Cochrane. Essa dissertação consistirá em uma busca nas seguintes bases de dados bibliográfica eletrônica: PubMed/Medline e Science Direct (Elsevier). A estratégia de busca incluirá os termos MeSH (sigla inglesa para Medical Subject Headings), que são os descritores ou palavras-chave que a base de dados utiliza para indexar o artigo (descritos na tabela 2), e também dos entre termos, que seriam os termos relacionados aos MeSH terms. Não há restrição de ano de publicação e idioma, para que sejam analisadas as técnicas empregadas desde o início da utilização do PSA como marcador. Inicialmente foi realizada uma pesquisa no Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas (PROSPERO), não sendo encontrado nenhum protocolo de revisão sistemática relacionado ao tema de técnicas e métodos diagnósticos disponíveis para detecção de PSA.

Tabela 2: Descrição dos termos MeSH e entre termos utilizados para construção da revisão.

Termo MeSH	Entre termo
Antígeno prostático específico	
Sistemas Point-of-Care	
Técnicas em biossensores	Eletrodos Biossensor
Cromatografia	Imunocromatografia
Diagnóstico	

Fonte: Elaborada pela autora

Como critério de inclusão, serão abordados estudos referentes a técnicas já aplicadas e bem definidas na prática laboratorial e novos estudos desenvolvidos para o mesmo fim. Tendo como objetivo analisar o que os novos ensaios trazem de vantagem para a medicina e áreas afins, bem como a inovação trazida quando

comparadas com as tecnologias já estabelecidas. Serão excluídos os artigos de revisão e os que se referirem a outros marcadores que não sejam o PSA.

4 RESULTADOS

ARTIGO - Analytical methods for Prostate specific antigen based on biosensors: A Review

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of the Electrochemical Society

Classificação: Qualis A1



**Analytical methods for Prostate specific antigen based on
biosensors: A Review**

Eloísa Neves Almeida Pimentel, *Rosa Fireman Dutra

*¹Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife,
Brazil.*

**Corresponding Author:*

Rosa Fireman Dutra

E-mail: rosa.dutra@ufpe.br

ABSTRACT

Prostate-Specific antigen (PSA) is a glycoprotein produced in the prostate gland and subsequently secreted in the seminal fluid, which performs the function of liquefaction of semen owing to its protease activity of the chymotrypsin. Due to its high specificity for prostate tissue, PSA has become a gold standard biomarker for diagnosis and monitoring of some prostatic diseases and for semen in criminal samples involving rape in the forensic laboratories. Laboratorial tests, such as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Electrochemiluminescence assay (ECLIA), immunofluorescence assay (IFA) have been used and are gold standard methods, however they are not practical as point-of-care tests (POCT) and require a highly sophisticated equipments and personel skilled, implying in a high cost. In the case of POCT, in forensic biology laboratories for PSA screening, lateral flow tests are used, which are immunochromatographic tests. This type of test is widely used, however it is a qualitative test and presents sensitivity when compared to the gold standard technique, which is the ELISA. In view of the need for a rapid, low-cost and high-sensitivity test, biosensors appear. These are analytical devices that produce a quantitative response as a function of concentrations of analyte. In recent years, application of nanomaterials to the biosensors has contributed for development of more sensitive and stable sensor platforms allowing the detection of target analytes, including the PSA. Herein, methods of electrochemical and optical detection of PSA were reviewed, as well application of different nanomaterials in sensor platforms.

Keywords: *PSA; biosensor; rape victims; sexual crime; nanomaterials.*

1. Introduction

In 1979, WANG and colleagues purified a 33 kDa glycoprotein, naming as prostatic-specific antigen [1]. Prostate-specific antigen (PSA) is an androgen-regulated serine protease found in semen. It is produced in prostate and secreted into the prostate lumen, with a small fraction secreted in bloodstream [2]. Due to its high specificity for prostate tissue, the PSA have been widely used in investigation of sexual crime cases. The material evidence of the crime being the presence of semen in the victim's body (whether in the vaginal, anal, oral cavity or other parts of the body) or in objects related to the criminal practice, such as, for example, condoms and underwear [3]. Confirmation of semen corroborates the victim's allegations and provides biological material to identify a genetic profile of the aggressor, this because the detection of PSA serves as an initial screening test to determine the presence or absence of male material in the respective sample [4].

DNA testing is still expensive, so in forensic laboratories the screening test is done initially and only afterwards is molecular analysis performed to identify the semen. Screening tests commonly involve microscopic visualization of sperm or assays to detect the presence of seminal markers such as acid phosphatase (AP) or PSA [5]. When sperm is detected in the traces, it materializes sexual contact and confirmation of ejaculation, being irrefutable proof of the presence of semen [6]. The sperm visualization still presents false negative results, which doesn't mean the absence of non-sperm material from the aggressor in the sample. The absence of sperm may be due to the time lag between crime and the collection of material, as well as the fact that criminals are oligospermic or azoospermic [7], therefore, in this situation, the detection of PSA is of great importance. The PSA is extracted by maceration of the samples including tissue and others, and measured in liquid form [8, 9]. Immunochromatographic assays, such as lateral flow, are used by forensic laboratories to perform simple and rapid analyzes of body fluids and detect the presence of PSA. A lateral flow that uses monoclonal antibodies specific for human PSA to detect the presence of semen.

Considering the importance of PSA in criminal cases, several analytical methods for PSA have been developed and are commercially available, supplying quantitative, semi-quantitative and qualitative responses. Regarding the portability, point-of-care tests (POCT) based on immunochromatography assay is a qualitative

methods show that it is possible to have results in qualitative result for presence of PSA in biological samples in real time [10]. In forensic biology, a positive or negative result of PSA is already satisfactory, since it indicates the presence of material of male origin in the sample [11]. POCT supplying semi-quantitative responses for PSA have been developed [12]. Gold standard quantitative methods are the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the Chemiluminescence immunoassay [13, 14, 15]. These analytical devices present results with high sensitivity, but are time-consuming and depend on the use of sophisticated equipments. Due to their sensitivity, ease of operation, short or real-time response time and compatibility with miniaturization, biosensors have attracted considerable attention for PSA detection on the last decade [16]. So this review discusses and summarizes recent advances in PSA detection techniques, including lateral flow tests, ELISA, immunosensors and aptasensors. These tests will be evaluated according to the technology and the analytical method used, evaluating the detection limits and the linear response curve.

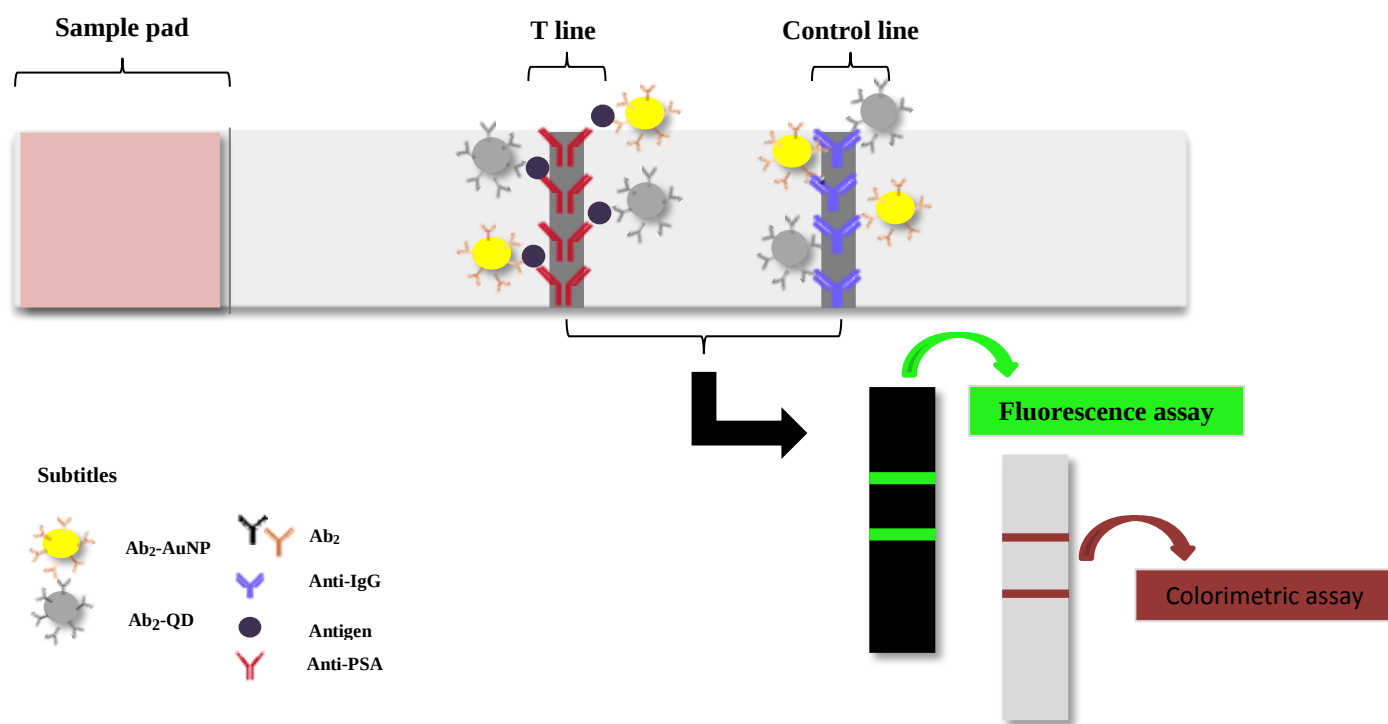
2. Conventional assays

In small laboratories and forensic biology laboratories, the detection of PSA is performed through an immunochromatographic test, a qualitative test. This is based on a combination of antibodies to metallic nanoparticles, or other visible material [17]. Using the principle of immunochromatography and the practicality of the lateral flow, a quantitative test was developed [18], PSAwatch, associated with a reader, BioScan. The PSAwatch consists of a lateral flow, where the anti-PSA antibody is immobilized and a second antibody immobilized on the test line (Figure 1). BioScan was used to read the intensity of the test line. This intensity is compared with the calibration information specific to the batch of cassettes in use and algorithms in the BioScan reader convert the line intensity into a PSA concentration.

ELISA is a solid phase test carried out conventionally and which detects target biomolecules (antigens, antibodies, hormones, proteins, etc.), for this detection antibodies labeled with an enzyme are used, making it necessary to use a substrate to reveal the reaction of bioaffinity between the target and the antibody [19]. However, there still remain some disadvantages about classical ELISA assays, including the complicated and time-consuming implementation procedure, the use of enzyme-labeled, fluorescent or chemiluminescent antibodies, and the bulky

measurement instrument. Therefore, numerous attempts have been made to improve the conventional immunoassay. As an alternative technique, Deng and colleagues proposed a test for PSA detection based on ELISA, which uses copper oxide nanoparticles (CuONPs) as signal markers [20]. The method is based on Cu^{2+} -catalyzed oxidation of ascorbic acid (AA) by O_2 to depress the formation of colored gold nanoparticles (AuNPs). In the presence of the target, antibodies labeled with CuONPs were captured by sandwich-type immunoreaction. To replace the classic enzyme labels, nanomaterials as signal reporters have attracted tremendous attention in the development of immunoassays. Since each nanolabel contains a large number of detectable atoms, being very promising for the construction of highly sensitive immunoassays. CuO nanoparticles have been used recently for immunosensor signal probes because of its low cost and good stability advantages.

Figure1. Lateral flow assay illustration, showing the possibilities of using antibody labeling with different nanoparticles, such as AuNPs and QD. Demonstrating the possibility of developing a colorimetric [18] or fluorescent [22] detection system.



3. New approaches in PSA detection

Considering the tests already available for the detection of PSA and its diagnostic importance, new tests have been developed aiming at increasing sensitivity and specificity, lowering costs, enabling coverage even in the most remote areas of the world, to make the diagnosis accessible to the entire population [11].

In addition to the new lateral flow and ELISA tests described earlier, other techniques have been developed. An example of this is the development of a portable device, the MCFphone [21], consisting of a sandwich immunoassay, using colorimetric or fluorescent detection to quantify the analyte. The MCFphone consists of an integrated smartphone with a magnifying glass, a simple light source (LED light for colorimetry and a UV black light for fluorescence), and a miniaturized immunoassay platform, the Microcapillary Film (MCF). The excellent transparency and flat geometry of the fluoropolymer MCF allowed the quantification of PSA with precision using enzymatic amplification and a chromogenic substrate. The detection

limit was improved in whole blood samples with the use of a fluorescence substrate. This is because the fluoropolymer MCF has special optical properties, such as a high degree of transparency, which favors immunoassays. Since optical detection is based on simple and economical technologies, such as a smartphone, requires specific optical properties of the test platform to be able to use small changes in the intensity of the transmitted light to quantify the analyte.

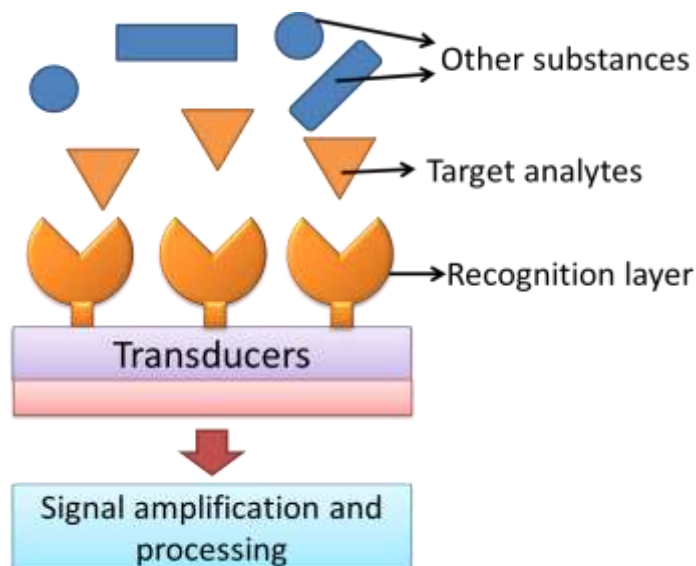
Also using a smartphone as a detection system, a lateral flow immunoassay (LFIA) based on quantum dots (QDs) was developed for detection of free PSA (f-PSA) and PSA conjugated to alpha-antichymotrypsin (c-PSA), this is because psa can be present in plasma in a free form or associated with proteins [22] (Figure 1). Recently, magnetic QD (MQDs), a composite nanomaterial with distinct magnetic and fluorescent properties, have been employed as alternative probes in LFIA to improve sensitivity for complex biological matrix analytes [23, 24, 25]. MQDs produce a substantially improved fluorescence signal, besides, antibody-conjugated MQDs can recognize immunologically, through magnetically separate and enrich analytes in complex samples under an external magnetic field. To make the lateral flow immunoassay, nitrocellulose was used as a support and monoclonal antibody as a solid phase to capture the PSA. For detection of PSA-f and PSA-c, the antigens were incubated with the MQDs and subsequently magnetic separation was performed. To obtain the immunoassay result, the lateral flow were excited under an ultraviolet light source and the fluorescence images were captured and analyzed using the two-color fluorescent lateral flow reader created internally with the smartphone.

In addition to the tests described previously, biosensors have received prominence in the most diverse diagnostic areas. Biosensors are analytical devices incorporating a biological sensing element (Figure 2). They take advantage of biology's exquisite sensitivity and specificity in conjunction with physico-chemical transducers to provide complex bioanalytical measurements in simple, easy-to-use formats [26].

These devices have reduced response time, which allows their application in monitoring and real-time detection of the presence or activity of some analyte, and the possibility of reuse, which allows the reduction of the costs of each test, sensitivity and specificity. These characteristics make this technology very attractive for diagnostic applications [25]. The biosensor used for immunoassays is known as

an immunosensor (Figure 3). This device is based on immunological reaction that occurs when there is antigen-antibody recognition [27].

Figure 2. Representation of the elements that form a biosensor. Composed of a transducer, a recognition layer and a system capable of recognizing and transforming the bioaffinity reaction into a signal.



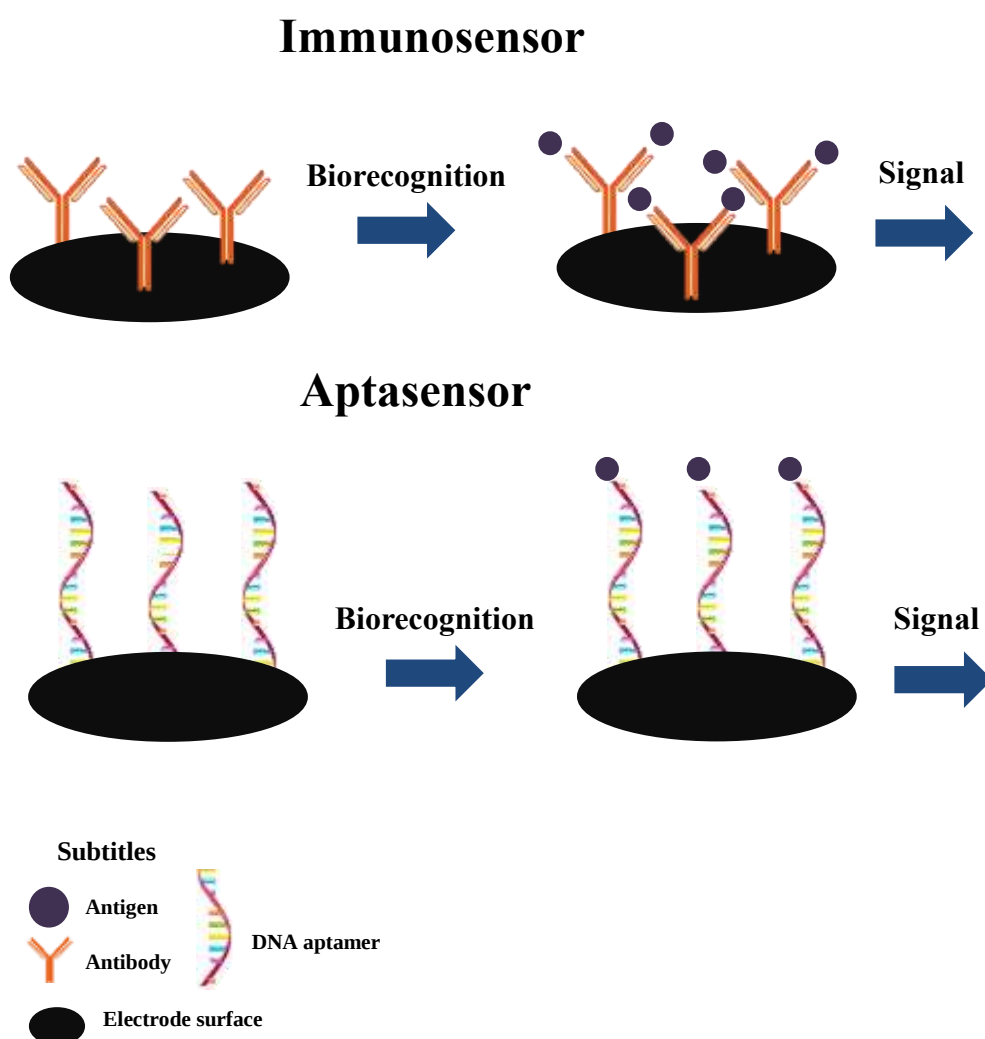
3.1 Immunossensors

For immunosensors development, several systems can be used for the transduction of the biological signal that occurs on the surface of the transducer, such as optical, acoustic, calorimetric, piezoelectric and electrochemical, for example [28]. So that the electrochemical transducers are the most attractive and prevalent in bioanalysis, due to the diversity of transducer techniques and materials that collaborate for high selectivity and sensitivity of these sensors; ease of construction and measurement; portability and possibility of miniaturization [29, 30]. Electrochemical biosensors are characterized by the ability to convert the biological interaction signal into an electrical signal using electrodes with the immobilized biological recognition element [31].

In immunosensors the PSA detection can be based on the sandwich assay, direct or indirect capture assay (Figure 4). In sandwich assay the target analyte is sandwiched between two recognition elements, the capture antibody and the detection antibody, it is necessary to use enzymatic substrates or some nanomaterial to transduce the bioaffinity reaction on the sensor surface. Contrariwise, in the direct

capture assay, a single biorecognition element is used, with an interaction between the PSA and the receiver being the only event necessary to modify the electrochemical signal on the transducer surface, a label-free immunoassay [2, 32].

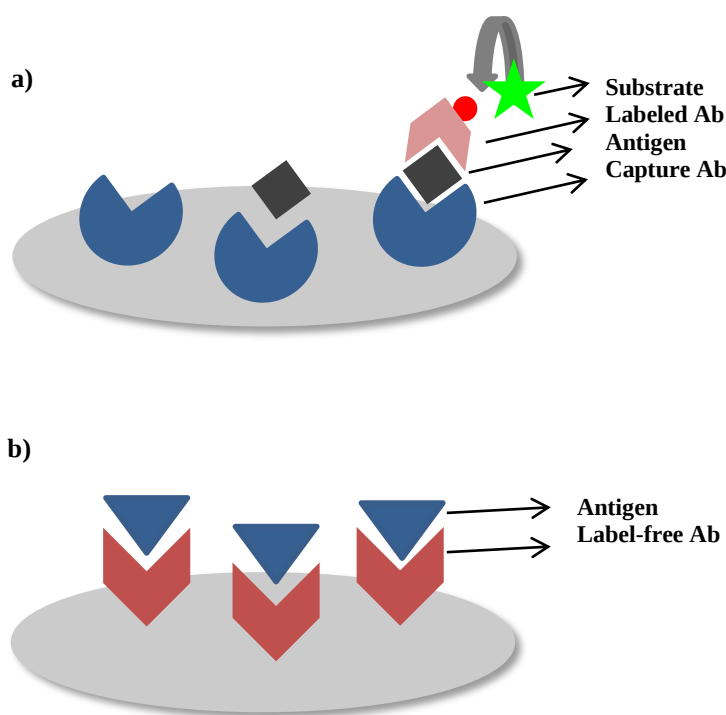
Figure 3. Among the biosensors, the immunosensor is composed of the immunological recognition unit and the target analyte (antigen); and the aptasensor composed of a DNA fragment as a bioreceptor for a specific molecule.



Using well-established and reproducible commercial electrodes, an integrated and automated “lab-on-a-chip” detection platform was developed for disease biomarkers detection [33]. An integrated and fully automated electrochemical amperometric biosensor was designed, based on the MiSens biosensor device prototype (MiSens™). The MiSens device would be controlled wirelessly using a tablet with the MiCont™ software [34]. Sandwich immunoassay was used for

analytical detection, using capture antibody and detection antibody labeled with AuNPs and HRP, lastly, the enzyme-substrate was made available on the surface to obtain the response signal of the bioaffinity reaction.

Figure 4. immunoassays illustration, showing the main differences between antigen detection techniques. In the direct capture assay that occurs with the antigen-antibody interaction, unlike the sandwich assay, which requires the use of two types of antibodies, one of which is marked, and later addition of substrate to reveal the reaction.



Regarding electrochemical immunosensors, an impedance-based sensor using interdigital transducer (IDT) with molybdenum disulfide (MoS_2) as an electrically active detection layer was developed to detect PSA [34]. The sensors were fabricated using all printing approaches. The MoS_2 thin film was deposited using Electrohydrodynamic Atomization (EHDA) on top of an interdigitated transducer (IDT) electrode fabricated by reverse offset printing. The biosensor was developed using the field-effect transistor (FET) technology, associated with a Smartphone detection system, in which a calibration curve was built using samples with known concentrations and recording the corresponding impedance. The sensor showed promising performance in terms of stability, specificity, repeatability, sensitivity and detection limit.

In the case of versatile biosensors, a sensor platform was developed for two transducer technologies: optics and electrochemistry. This biosensor has been described for PSA detection using magnetic nanoparticles (MNPs) [35]. The methodology used was based on a modified gold electrode with functionalized MNPs linked to a specific peptide substrate for PSA. The functioning of the biosensor when recognizing its target analyte was based on proteolysis on the sensor surface, causing the MNP-peptide complex to detach from the platform. An external magnetic field would then attract the cleaved MPN-peptide fractions away from the platform, changing their properties, which could be interpreted by electrochemical impedimetric spectroscopy and surface plasmon resonance (SPR) or by the visible color change (colorimetric biosensor).

More recently, molecular identification technology using membrane engineering (MIME) and bioelectric recognition assay (BERA) has been employed to develop an innovative system for the detection of PSA [36]. BERA in combination with MIME technology is a method based on changing the potential of the cell membrane (with specific antibody) when it interacts with the target antigen. This combined approach offers ultra-fast (Table 1) detection capability (3-5 min) and very high sensitivity. For the manufacture of the biosensor, the Vero cell line was cultured and, according to the protocol, the cells were modified through the electro insertion of the anti-PSA antibody in its membrane. Regarding the detection system, an eight-channel potentiostat and DropSens commercial electrodes were used, consisting of a strip with eight pairs of electrodes. At the same time that this platform was being built, a second biosensor to serve as a comparison was also developed. So that after due experimentation, it was observed that the cell-based biosensor signal tends to decrease as the PSA concentration increases, while the immunosensor signal follows a reverse pattern. When the two methods were compared, the new cell-based biosensor performed better than the immunosensor in terms of statistically significant sensitivity and resolution in positive samples containing PSA $<4 \text{ ng mL}^{-1}$.

Another technology in the development of biosensors has been employed, this time a sensor based on molecularly imprinted polymer (MIP) [37]. For this, the blue toluidine polymer (TBP) was used as an artificial receptor for monitoring PSA. To form the MIP, the gold electrode initially went through an electropolymerization process with toluidine blue in the presence of PSA. Then it went through an electropolymerization process (cyclic voltammetry for 60 cycles) with toluidine blue

(in PBS) in the presence of PSA to form the MIP. The electrochemical characterization of the platform was carried out using the techniques of cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. The MIP bioreceptor's ability to recognize proteins has been studied by some electrochemical techniques. The binding affinity of the MIP system was considered to be considerably higher than that of the nonimprinted polymer (NIP) system.

3.2 Aptasensor

Also concerning the biosensors, it is important to highlight the aptasensors. Aptamers are small oligonucleotides that bind to specific target molecules. The development of an aptasensor based on microfluidic paper [38] for electrochemical detection of PSA, compensates for the low sensitivity problems associated with sensors based on field-effect transistors, offering a large surface area for detection. Besides, it still solves the commercialization problem, since the manufacturing techniques used are all printed, cheap, simple, highly accurate, and compatible with mass production. The paper device was manufactured with wax printing to generate hydrophobic and hydrophilic layers for the construction of the microfluidic channel, followed by the printing of the three electrodes including work, counter, and a reference electrode. Gold nanoparticles (AuNPs), reduced graphene oxide (rOG), and thionine (THI) were synthesized and characterized, being used to modify the surface of the working electrodes for the immobilization of the DNA aptamer probe. Thionine as an electrochemical mediator to transduce biological recognition between DNA aptamer and PSA and the excellent conductivity of AuNPs, and rOG also play a significant role in electron transfer, leading to sensitive detection for PSA.

4. Electrochemical Readout Methods for PSA Detection

Electrochemical biosensors are characterized by the ability to convert signal from biological interaction to an electrical signal, using electrodes with the biological recognition element immobilized on its surface, in which electrons are generated or dissipated on the surface of the transducer, producing an electronic signal proportional to the concentration of the analyte [39, 40].

The most common electrochemical techniques employed in PSA sensing for point-of-care platforms include chronoamperometry (CA) [41, 42], cyclic voltammetry (CV) [43, 44], differential pulse voltammetry (DPV) [45], square-wave voltammetry (SWV) [46] and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) [44]

Voltammetry is an electrochemical technique where the qualitative and quantitative information of a chemical species is obtained from the recording of current-potential curves, made during the electrolysis of this species in an electrochemical cell. The potential is applied between the working electrode and the reference electrode in the form of a sweep, that is, varying it at a constant speed as a function of time. The potential and the resulting current are registered simultaneously. The current vs potential curve obtained is called a voltamogram. It can be cyclic voltammetry, square wave or differential pulse, for example [45].

Varying the work potential in CV, the contribution of the capacitive current becomes significant, not distinguishable from the faradaic reaction current, at high speeds, which makes the analysis unfeasible. Thus, the introduction of voltammetric techniques of square wave and differential pulse in the electroanalytical area aims to minimize the influence of capacitive currents in voltammetric systems based on faradaic current measurement [46, 47].

The sensitivity of the technical DPV is comparable to that coming from the SWV. The biggest advantage of SWV is the speed of data acquisition. Frequencies from 1 to 100 square wave cycles per second allow the use of extremely fast potential scanning speeds. While in DPV the scanning speed varies from 1 to 10 mV s⁻¹, in SWV this speed varies from 100 to 1000 mV s⁻¹, this decreases the analysis time from about 3 to 5 minutes to a few seconds (3 to 10s) without loss of peak resolution [48].

Electrochemical impedance spectroscopy is a technique known to be quite sensitive to changes that occur at the electrode/solution interface. Impedance, in general, is the measure of a resistance. It is observed that the phenomena that occur at the interface are interpreted by means of electrical elements, such as: resistors and capacitors. The EIS is based on the application of a small sinusoidal potential disturbance at a given frequency and recording the corresponding current variation [49, 50]

Chronoamperometry is an analytical method in which the magnitude of the electrical signal (current) is measured as a function of time. Consists of monitoring

the current flowing through the working electrode as a function of time at a fixed potential at which the redox reaction of the substrate under study will occur [51].

Among the electrochemical techniques, CV and EIS are the most suitable for the characterization of biosensing platforms, as they allow to follow the stages of modification of the electrode surface according to the electrical parameters (current density, capacitance, resistance, for example) [52].

5. Evaluating of analytical methods

The detection methods presented are based on immunochromatography, ELISA, and biosensors. Table 1 shows the different methods according to their linear response and detection limit, and the tests are classified as direct capture assay or sandwich assay. In the sandwich method, two antibodies are used, a detection primary and secondary labeling, and an enzymatic substrate is also required to reveal the enzymatic action, except when working using QDs, because the samples were excited under an ultraviolet light source and the fluorescence images were captured and analyzed using the two-color fluorescent lateral flow reader created internally with the smartphone. Although selective, this method implies high operating costs, including increased sample processing steps. Direct tests have the advantage of reducing the processing steps and consequently reducing operating costs [53].

Among sandwich immunoassays, the test with the lowest detection limit, corresponding to 1 pg mL^{-1} , was based on electrochemical impedance spectroscopy. This can be explained by the fundamental role of MNPs in signal intensification, because when hot spots occur, they are regions where the electromagnetic field is more intense by coupling the excitation modes of the plasmons of MNPs, leading to high intensity detections of molecules located at the site [54]. The success and satisfactory performance of this sensor can also be attributed to the electrochemical technique used, this because this method allows the system to be disturbed with the use of small potential values, making it possible to investigate phenomena close to the equilibrium state. In addition, this technique makes it possible to identify electrochemical effects through the various parameters obtained with impedance diagrams, separation of the effects of solution resistance and polarization resistance. Great sensitivity was also observed in the new ELISA, with a detection limit of 0.01 ng mL^{-1} , that in addition to achieving satisfactory LOD when using nanomaterials

instead of labeled enzyme, it also corrects one of the main limitations of the technique, which is the long duration of the procedure. The immunochromatographic method associated with the PSAWatch, among the sandwich immunoassay, was the one with the lowest sensitivity, with a detection limit of $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$. The PSA values obtained by PSAWatch were compared with laboratory values, using tests with linear range of $0.003\text{--}0.03 \mu\text{g L}^{-1}$. The PSAwatch does not reach at this range, which in clinical practice is only used after radical prostatectomy. PSAwatch, therefore, should not be used to monitor patients after radical prostatectomy. The sensitivity of the PSAwatch test should, however, be sufficient for forensic application, as well as for most PSA clinical indications.

In contrast, the lateral flow immunoassay, which presented similar technology, showed a good detection limit of 0.008 ng mL^{-1} for f-PSA and 0.061 ng mL^{-1} for c-PSA. This can be justified by the use of MQDs, since this nanomaterial can be used to increase the sensitivity for analytes in a complex biological matrix [23, 24, 25]. In addition, MQDs conjugated with specific antibodies can recognize immunologically, magnetically separate and enrich the analytes in complex samples under an external magnetic field [22]. Studies and applications of QDs reveal them to be effective as new luminescent probes for diagnostic purposes. Successful targeting of the particle to target a particular type of biomolecule includes the ability to target specific tissues and cells. They also have several advantages over organic markers, because in addition to being highly luminescent, they don't undergo photodegradation, have a wide range of wavelengths for excitation, symmetrical fluorescence peaks and emission (fluorescence) at wavelengths adjustable by the particle size [56, 57].

Regarding sandwich immunoassays, the methodology developed using the MCFphone was able to detect and quantify PSA within the dynamic range of 0.9 to 60 ng mL^{-1} of PSA in 13 min, using colorimetric detection and within 0.08 ng mL^{-1} to 60 ng mL^{-1} PSA, using fluorescence detection of whole blood samples. While the conventional ELISA based on microtiter plate, high sensitivity is achieved using long incubation times and long test times, kinetic studies on the MCF platform have shown that it is possible to achieve high sensitivity with short incubation times. Similar studies with a microfluidic device incorporating smartphone colorimetric detection reported a detection limit of 3.2 ng mL^{-1} in 30 min of testing [58], therefore, a sensitivity 3.5 times lower for twice the testing time in compared to MCFphone.

Already among electrochemical biosensors with direct assays, the methodology that used DNA aptamer and differential pulse voltammetry as a detection method for PSA detection, presented the best LOD with a value of 10 pg mL⁻¹. The paper device was manufactured with wax printing, and the nanocomposites were synthesized and characterized, being used to modify the surface of the working electrodes for the immobilization of the DNA aptamer probe. Thionine as an electrochemical mediator to transduce biological recognition between DNA aptamer and PSA, and the excellent conductivity of AuNPs and rOG also play a significant role in electron transfer, leading to sensitive detection for PSA, capable of detecting PSA as low as 10 pg mL⁻¹, with a linear range of 0.05 to 200 ng mL⁻¹. The choice of electrochemical technique is able to interfere in the final result of quantification, techniques like CV are rarely used to quantify the analyte, because by varying the potential in the working electrode, the capacitive current contribution becomes significant, undistinguishable from the reaction faradic current, which makes the analysis unfeasible. So that DPV circumvents this deficiency, because it minimizes the capacitive current contribution in the obtained signal, and presents greater sensitivity. Due to the detection advantages presented in comparison to direct current techniques, VPD is one of the most used techniques [59, 60, 61].

Regarding devices developed using smartphones or other electronic devices as detection mechanisms, they are integrated with a high performance digital camera and computational processing power that allows the miniaturization of the optical reading device for point of care diagnostic applications. Devices such as the MCFphone and the biochip previously presented and which presented 0.08 ng mL⁻¹ and 0.2 ng mL⁻¹, respectively. The use of electronic devices coupled with biosensors can represent an advance to internationalize the device, since everywhere in the world there is access to smartphones, for example. A technology that is easy to handle and widely circulated, in which a detection method that could be used directly at a crime scene to identify semen would be inserted. What would facilitate the screening in the forensic genetics laboratories, already indicating the presence of male material in the sample, not requiring a new exam in the forensic biology laboratory and reducing steps to release the DNA test with the aggressor's profile.

Table 1. Summary of the recent work on PSA detection categorized based on the detection mechanism: (a) sandwich assay and (b) direct detection assay; LOD and linear range.

Assay componentes	Method of detection	Linear range	LOD	Reference
a) Sandwich assay				
Ab ₁ , Ab ₂ , Fluoropoymere, streptavidin-HRP, OPD, FDP	Colorimetric/ fluorescence	0.9 to 0.60 ng mL ⁻¹ / 0.08 to 0.60 ng mL ⁻¹	0.08 ng mL ⁻¹	21
Ab ₁ , Ab ₂ , MNPs, PSA specific peptide substrate	Electrochemical impedimetric spectroscopy/ SPR	100 pg mL ⁻¹ to 1 µg mL ⁻¹	1 pg mL ⁻¹	35
Ab ₁ , Ab ₂ , AuNPs, anti-PSA	Immunochromatography	0,5 to 25 µg L ⁻¹	0.5 µg L ⁻¹	18
CuONPs, AA, AuNPs, HRP	ELISA sandwich	0.05 ng mL ⁻¹ to 10 ng mL ⁻¹	0.01 ng mL ⁻¹	20
Ab ₁ , Ab ₂ , Ab ₃ , MQDs, UV light	Lateral flow imunoassay	0.01 to 100 ng mL ⁻¹	0.008 ng mL ⁻¹ (f-PSA) / 0.061 ng mL ⁻¹ (c-PSA)	22
Ab ₁ , Ab ₂ , AuNPs, HRP, TMD-H ₂ O ₂	Amperometry		0.2 ng mL ⁻¹	33
b) Direct capture assay				
AuNPs, THI, DNA aptamero	Diferencial pulse voltametry	0.05 to 200 ng mL ⁻¹	10 pg mL ⁻¹	38
Ab, VERO cells	Cronoamperometry	1 to 10 ng mL ⁻¹	1.72 ng mL ⁻¹	36
Ab, MIP, cysteamine, glutaraldehyde, KNO ₃ , TB	Cyclic voltametry / Diferencial pulse voltametry	0.001 to 60 µg L ⁻¹	0.001 µg L ⁻¹	37
Ab, MoS ₂	Impedance	1 ng mL ⁻¹ a 800 ng mL ⁻¹	0.1 ng mL ⁻¹	34

6. Conclusions and Future Directions

The gold standard test for PSA detection is the ELISA, but in routine criminal investigations it isn't an applicable test. The laboratories don't have the required technologies, in addition to proving to be an expensive test with a long period of execution, so that it would not meet the demand of forensic biology laboratories. Furthermore, the ELISA would also not be applicable to the crime scene, as a portable test with rapid results is necessary. Unfortunately, lateral flow tests don't show great sensitivity and show some false negative results.

In recent years, there have been enormous research efforts to improve the sensitivity, specificity, and limit of detection of PSA. From the operating principles previously categorized, conventional sandwich assays, whether ELISA or the like, although widely studied and used, depending on several steps and a large number of reagents. An alternative to this is the direct approach, where a single capture event leads to signal generation using, for example, the concepts of electrochemistry. Since electrochemistry offers the advantage of a quick test, relatively low cost, and, often, portability. In the tests described, detection limits were reached as low as 10 pg mL^{-1} using differential pulse voltammetry and 1.72 ng mL^{-1} with chronoamperometry, which would meet the diagnostic needs. In recent years, there have been enormous research efforts to improve the sensitivity, specificity, and limit of detection of PSA. From the operating principles previously categorized, conventional sandwich assays, whether ELISA or the like, although widely studied and used, depending on several steps and a large number of reagents. An alternative to this is the direct approach, where a single capture event leads to signal generation using, for example, the concepts of electrochemistry. Since electrochemistry offers the advantage of a quick test, relatively low cost, and, often, portability.

Nanotechnology imposed many analytical characteristics on biosensors, improving their performance. This is of great advantage because it works with complex samples, with various types of organic and inorganic compounds, as it doesn't work with controlled samples, such as, for example, serum samples used in the laboratory diagnosis for which the test was developed. Adding to the development of the biosensor and its advantages to the detection system using

portable electronic devices, such as smartphones, there would already be a greater step towards the development of a POCT with the possibility of new perspectives, since these devices can be operated in remote areas, helping several communities in worldwide. It can be used by forensics experts at a crime scene, and also at the scene to confirm the presence of male material, contributing to the rapid progress of the investigation and possible indictment of suspects. This would also make it easier to perform the DNA test, as it is a comparative test, it would be possible to compare the questioned sample collected at a crime scene that obtained a male profile with the profile of the possible aggressor. Being able to exonerate or convict the accused suspect.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support provided by the Pernambuco State Foundation for the Support of Science and Technology (FACEPE), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES).

References

1. Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P., & Chu, T. M. (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology*, 17(2), 159–163.
2. Traynor, S. M., Pandey, R., Maclachlan, R., Hosseini, A., Didar, T. F., Li, F., & Soleymani, L. (2020). Review—Recent Advances in Electrochemical Detection of Prostate Specific Antigen (PSA) in Clinically-Relevant Samples. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(3), 037551.
3. Suttipasit, P., & Wongwittayapanich, S. (2018). Detection of prostate specific antigen and semenogelin in specimens from female rape victims. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 54, 102–108.
4. Magalhães, T., Dinis-Oliveira, R. J., Silva, B., Corte-Real, F., & Nuno Vieira, D. (2015). Biological Evidence Management for DNA Analysis in Cases of Sexual Assault. *The Scientific World Journal*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/365674>
5. Old, J., Schweers, B. A., Boonlayangoor, P. W., Fischer, B., Miller, K. W. P., & Reich, K. (2012). Developmental validation of RSIDTM-Semen: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of human semen. *Journal of Forensic Sciences*, 57(2), 489–499. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01968.x>
6. Peonim, V., Worasuwanarak, W., Sujirachato, K., Teerakamchai, S., Srisont, S., Udnoon, J., & Chudoung, U. (2013). Comparison between prostate specific

- antigen and acid phosphatase for detection of semen in vaginal swabs from raped women. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(6), 578–581. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2013.06.009>
7. Martínez, P., Santiago, B., Alcalá, B., & Atienza, I. (2015). Semen searching when sperm is absent. *Science & Justice*, 55(2), 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2015.01.008>
 8. Feine, I., Gafny, R., & Pinkas, I. (2017). Combination of prostate-specific antigen detection and micro-Raman spectroscopy for confirmatory semen detection. *Forensic Science International*, 270, 241–247.
 9. Schmidt, S., Franke, M., Lehmann, J., Loch, T., Stöckle, M., & Weichert-Jacobsen, K. (2001). Prostate-specific antigen in female urine: a prospective study involving 217 women. *Urology*, 57(4), 717–720.
 10. Rausch, S., Hennenlotter, J., Wiesenreiter, J., Hohneder, A., Heinkele, J., Schwentner, C., Stenzl, A., & Todenhöfer, T. (2016). Assessment of a new point-of-care system for detection of prostate specific antigen. *BMC Urology*, 16(1).
 11. Wu, J., Fu, Z., Yan, F., & Ju, H. (2007). Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(7), 679–688.
 12. Drain, P. K., Hyle, E. P., Noubary, F., Freedberg, K. A., Wilson, D., Bishai, W. R., Rodriguez, W., & Bassett, I. V. (2014). Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(3), 239–249.
 13. Virkler, K., & Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1–3), 1–17.
 14. Ji, S., Lee, M., & Kim, D. (2018). Detection of early stage prostate cancer by using a simple carbon nanotube@paper biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 345–350.
 15. Tchetgen, M.-B., Song, J. T., Strawderman, M., Jacobsen, S. J., & Oesterling, J. E. (1996). Ejaculation increases the serum prostate-specific antigen concentration. *Urology*, 47(4), 511–516.
 16. Yuan, J. J. J., Coplen, D. E., Petros, J. A., Figenshau, R. S., Ratliff, T. L., Smith, D. S., & Catalona, W. J. (1992). Effects of Rectal Examination, Prostatic Massage, Ultrasonography and Needle Biopsy on Serum Prostate Specific Antigen Levels. *Journal of Urology*, 147(3 Part 2), 810–814.
 17. Ghorbani, F., Abbaszadeh, H., Dolatabadi, J. E. N., Aghebati-Maleki, L., & Yousefi, M. (2019). Application of various optical and electrochemical aptasensors for detection of human prostate specific antigen: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 142(April).
 18. Laux, D. L., & Barnhart, J. P. (2011). Validation of the Seratec® SeraQuant™ for the Quantitation of Prostate-Specific Antigen Levels on Immunochromatographic Membranes. *Journal of Forensic Sciences*, 56(6), 1574–1579. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01893.x>
 19. Uludag, Y., Narter, F., Sağlam, E., Köktürk, G., Gök, M. Y., Akgün, M., Barut, S., & Budak, S. (2016). An integrated lab-on-a-chip-based electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of cancer biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(27), 7775–7783.
 20. Chang, Y., Wang, M., Wang, L., & Xia, N. (2018). Recent Progress in Electrochemical Biosensors for Detection of Prostate-Specific Antigen. *International Journal of Electrochemical Science*, 4071–4084.

21. Di Nardo, F., Baggiani, C., Giovannoli, C., Spano, G., & Anfossi, L. (2017). Multicolor immunochromatographic strip test based on gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B1 and fumonisins. *Microchimica Acta*, 184(5), 1295–1304.
22. Karim, O., Rao, A., Emberton, M., Cochrane, D., Partridge, M., Edwards, P., Walker, I., & Davidson, I. (2007). Point-of-care PSA testing: An evaluation of PSAwatch. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 10(3), 270–273.
23. Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>.
24. Deng, D., Hao, Y., Xue, J., Liu, X., Xu, X., & Liu, L. (2019). A colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay with CuO nanoparticles as signal labels based on the growth of gold nanoparticles in situ. *Nanomaterials*, 9(1).
25. Barbosa, A. I., Gehlot, P., Sidapra, K., Edwards, A. D., & Reis, N. M. (2015). Portable smartphone quantitation of prostate specific antigen (PSA) in a fluoropolymer microfluidic device. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 5–14.
26. Rong, Z., Bai, Z., Li, J., Tang, H., Shen, T., Wang, Q., Wang, C., Xiao, R., & Wang, S. (2019). Dual-color magnetic-quantum dot nanobeads as versatile fluorescent probes in test strip for simultaneous point-of-care detection of free and complexed prostate-specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 145(September), 111719.
27. Guo, J., Chen, S., Guo, J., & Ma, X. (2021). Nanomaterial Labels in Lateral Flow Immunoassays for Point-of-Care-Testing. *Journal of Materials Science & Technology*, 60, 90–104.
28. Hu, X., Wan, J., Peng, X., Zhao, H., Shi, D., Mai, L., Yang, H., Zhao, Y., & Yang, X. (2019). Colorimetric lateral flow immunoassay detection platform based on the photothermal effect of gold nanocages with high sensitivity, specificity, and accuracy. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 7695–7705.
29. Huang, Z., Xiong, Z., Chen, Y., Hu, S., & Lai, W. (2019). Sensitive and Matrix-Tolerant Lateral Flow Immunoassay Based on Fluorescent Magnetic Nanobeads for the Detection of Clenbuterol in Swine Urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(10), 3028–3036.
30. Newman, J. D., & Turner, A. P. F. (2005). Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2435–2453.
31. Ou, C., Yuan, R., Chai, Y., Tang, M., Chai, R., & He, X. (2007). A novel amperometric immunosensor based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles–multi-walled carbon nanotubes–thionine multilayer films on polyelectrolyte surface. *Analytica Chimica Acta*, 603(2), 205–213.
32. Perumal, V., & Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(1), 1–15.
33. Brett, C. M. A., & Oliveira-Brett, A. M. (2011). Electrochemical sensing in solution—origins, applications and future perspectives. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 15(7–8), 1487–1494.
34. Anusha, J. R., Kim, B. C., Yu, K. H., & Raj, C. J. (2019). Electrochemical biosensing of mosquito-borne viral disease, dengue: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 142(March), 111511.
35. Turner, A. P. F. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184.

36. Zhang, C., Zhang, S., Jia, Y., Li, Y., Wang, P., Liu, Q., Xu, Z., Li, X., & Dong, Y. (2019). Sandwich-type electrochemical immunosensor for sensitive detection of CEA based on the enhanced effects of Ag NPs/CS spaced Hemin/rGO. *Biosensors and Bioelectronics*, 126, 785–791.
37. Uludag, Y., Narter, F., Sağlam, E., Köktürk, G., Gök, M. Y., Akgün, M., Barut, S., & Budak, S. (2016). An integrated lab-on-a-chip-based electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of cancer biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(27), 7775–7783.
38. Sajid, M., Osman, A., Siddiqui, G. U., Kim, H. B., Kim, S. W., Ko, J. B., Lim, Y. K., & Choi, K. H. (2017). All-printed highly sensitive 2D MoS₂ based multi-reagent immunosensor for smartphone based point-of-care diagnosis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
39. Turner, A. P. F. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184. <https://doi.org/10.1039/c3cs35528d>
40. Vasilescu, A., & Marty, J.-L. (2016). Electrochemical aptasensors for the assessment of food quality and safety. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.024>
41. Chen, X., Zhou, G., Song, P., Wang, J., Gao, J., Lu, J., Fan, C., & Zuo, X. (2014). Ultrasensitive Electrochemical Detection of Prostate-Specific Antigen by Using Antibodies Anchored on a DNA Nanostructural Scaffold. *Analytical Chemistry*, 86(15), 7337–7342. <https://doi.org/10.1021/ac500054x>
42. Vural, T., Yaman, Y. T., Ozturk, S., Abaci, S., & Denkbaz, E. B. (2018). Electrochemical immunoassay for detection of prostate specific antigen based on peptide nanotube-gold nanoparticle-polyaniline immobilized pencil graphite electrode. *Journal of Colloid and Interface Science*, 510, 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.09.079>
43. Kavosi, B., Salimi, A., Hallaj, R., & Amani, K. (2014). A highly sensitive prostate-specific antigen immunosensor based on gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded on MWCNTS/chitosan/ionic liquid nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.08.012>
44. Dong, Y.-X., Cao, J.-T., Liu, Y.-M., & Ma, S.-H. (2017). A novel immunosensing platform for highly sensitive prostate specific antigen detection based on dual-quenching of photocurrent from CdSe sensitized TiO₂ electrode by gold nanoparticles decorated polydopamine nanospheres. *Biosensors and Bioelectronics*, 91, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.043>
45. Aleixo, L. M. (2018). Voltametria: conceitos e técnicas. *Revista Chemkeys*, 3, 1–21. <https://doi.org/10.20396/chemkeys.v0i3.9609>
46. Barker, G. C., & Jenkins, I. L. (1952). Square-wave polarography. *The Analyst*, 77(920), 685. <https://doi.org/10.1039/an9527700685>
47. Barker, G. C., & Gardner, A. W. (1960). Pulse polarography. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 173(1), 79–83. <https://doi.org/10.1007/BF00448718>
48. Pacheco, W. F., Semaan, F. S., Almeida, V. G. K., Ritta, A. G. S. L., & Aucélio, R. Q. (2013). Voltammetry: A Brief Review About Concepts. *Revista Virtual de Química*, 5(4). <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>
49. Damos, F. S., Mendes, R. K., & Kubota, L. T. (2004). Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. *Química Nova*, 27(6), 970–979. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600023>

50. Prodromidis, M. I. (2010). Impedimetric immunosensors—A review. *Electrochimica Acta*, 55(14), 4227–4233. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.01.081>
51. Hoffmann da Rocha, A. A., Pires, E. B., Nectoux, A. da S., Dias, S. L. P., Lima, É. C., Radtke, C., & Kubota, L. T. (2013). Preparation and electrochemical behavior of the CA/TiO₂/Sb₂O₅ composite electrode modified with p-benzoquinone. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 690, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.11.019>
52. Silva, T. R., & Vieira, I. C. (2016). A biosensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) and decorated with laccase for determination of dopamine. *The Analyst*, 141(1), 216–224. <https://doi.org/10.1039/C5AN01784J>
53. Barman, S. C., Hossain, M. F., Yoon, H., & Park, J. Y. (2018). Trimetallic PdAuPt nanocomposites platform on -COOH terminated reduced graphene oxide for highly sensitive CEA and PSA biomarkers detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.045>
54. Tang, Z., Fu, Y., & Ma, Z. (2017). Bovine serum albumin as an effective sensitivity enhancer for peptide-based amperometric biosensor for ultrasensitive detection of prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 94, 394–399. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.030>
55. Suaifan, G., & Zourob, M. (2017). Rapid Detection of Prostate Specific Antigen Biomarker Using Magnetic-Nanoparticles. *Procedia Technology*, 27, 122–125.
56. Mavrikou, S., Moschopoulou, G., Zafeirakis, A., Kalogeropoulou, K., Giannakos, G., Skevis, A., & Kintzios, S. (2018). An ultra-rapid biosensory point-of-care (POC) assay for prostate-specific antigen (PSA) detection in human serum. *Sensors (Switzerland)*, 18(11).
57. Abbasy, L., Mohammadzadeh, A., Hasanzadeh, M., & Razmi, N. (2020). Development of a reliable bioanalytical method based on prostate specific antigen trapping on the cavity of molecular imprinted polymer towards sensing of PSA using binding affinity of PSA-MIP receptor: A novel biosensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 188(xxxx), 113447.
58. Wei, Z., Zhang, J., Zhang, A., Wang, Y., & Cai, X. (2017). Electrochemical detecting lung cancer-associated antigen based on graphene-gold nanocomposite. *Molecules*, 22(3), 1–9. <https://doi.org/10.3390/molecules22030392>
59. Gopinath, S. C. B., Tang, T.-H., Citartan, M., Chen, Y., & Lakshmipriya, T. (2014). Current aspects in immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 57, 292–302.
60. Gopinath, S. C. B., Tang, T.-H., Citartan, M., Chen, Y., & Lakshmipriya, T. (2014). Current aspects in immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 57, 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.029>
61. Adel Ahmed, H., & Azzazy, H. M. E. (2013). Power-free chip enzyme immunoassay for detection of prostate specific antigen (PSA) in serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 478–484.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente dissertação foi elaborado um artigo de revisão que buscou trazer as técnicas disponíveis atualmente para detecção de PSA, sendo possível relatar diferentes metodologias e seus resultados na detecção do antígeno. De forma que foi possível avaliar a sensibilidade de técnicas já utilizadas na rotina laboratorial, bem como das técnicas em desenvolvimento. Evidenciando as grandes vantagens obtidas ao se desenvolver um biossensor, seja no quesito custo ou especificidade e sensibilidade. Sendo possível também demonstrar a utilização muito frequente de dispositivos eletrônicos como sistema de detecção em biossensores, uma alternativa muito útil e atual, uma vez que são dispositivos de ampla circulação e amplo alcance no mercado.

Somando a isso, um dispositivo diagnóstico “*point of care*” para detecção de biomarcadores permite que sejam realizadas análises “*in loco*” no local de crime. Portanto, reduzindo a demanda de exames de triagem no laboratório de biologia forense e possibilitando a análise genética direta. O desenvolvimento de um biossensor para detecção de PSA oferecerá uma grande possibilidade de criar um teste rápido, de baixo custo e altamente sensível com possibilidade de resposta em tempo real, que atenderia a demanda da perícia criminal em local de crime de natureza sexual.

6 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, A. R.; SCHOOTS, I. G.; ROOBOL, M. J. Prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: Past and future. **International Journal of Urology**, v. 22, n. 6, p. 524–532, jun. 2015.
- ALTINTAS, Z.; TOTHILL, I. Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 188, p. 988–998, nov. 2013.
- ANTIOCHIA, R. Nanobiosensors as new diagnostic tools for SARS, MERS and COVID-19: from past to perspectives. *Microchimica Acta*, v. 187, n. 12, p. 639, 5 dez. 2020.
- ANUSHA, J. R. et al. Electrochemical biosensing of mosquito-borne viral disease, dengue: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 142, n. March, p. 111511, 2019.
- BARI, S. M. I.; REIS, L. G.; NESTOROVA, G. G. Calorimetric sandwich-type immunosensor for quantification of TNF- α . *Biosensors and Bioelectronics*, v. 126, p. 82–87, fev. 2019.
- BITNER, S. E. False Positives Observed on the Seratec ® PSA SemiQuant Cassette Test with Condom Lubricants. *Journal of Forensic Sciences*, v. 57, n. 6, p. 1545–1548, nov. 2012.
- BHALLA, N. et al. Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, v. 60, n. 1, p. 1–8, 2016.
- BROOKER, C.; DURMAZ, E. Mental health, sexual violence and the work of Sexual Assault Referral centres (SARCs) in England. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, v. 31, p. 47–51, abr. 2015.
- BROUWER, N.; VAN PELT, J. Validation and evaluation of eight commercially available point of care CRP methods. *Clinica Chimica Acta*, v. 439, p. 195–201, jan. 2015.
- CHOI, J. R. Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, 27 maio 2020.
- CLEMENTS, J. et al. The Expanded Human Kallikrein (KLK) Gene Family: Genomic Organisation, Tissue-Specific Expression and Potential Functions. *Biological Chemistry*, v. 382, n. 1, 6 jan. 2001.

- DWORKIN, E. R. et al. Sexual assault victimization and psychopathology: A review and meta-analysis. *Clinical Psychology Review*, v. 56, p. 65–81, ago. 2017.
- F. DE OLIVEIRA, A. E.; PEREIRA, A. C. Biosensor and Food Industry - Review. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 5, p. 1311–1333, 2016.
- F. O. PORFÍRIO, F.; GIAROLA, J. DE F.; PEREIRA, A. C. Biosensor and Beverages - Review. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 5, p. 1366–1391, 2016.
- FERLAY, J.; PARKIN, D. M.; STELIAROVA-FOUCHER, E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*, v. 46, n. 4, p. 765–781, mar. 2010.
- FERREIRA, G. N. M.; DA-SILVA, A.-C.; TOMÉ, B. Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. *Trends in Biotechnology*, v. 27, n. 12, p. 689–697, dez. 2009.
- GHORBANI, F. et al. Application of various optical and electrochemical aptasensors for detection of human prostate specific antigen: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 142, p. 111484, out. 2019.
- GENG, Z. et al. Recent Progress in Optical Biosensors Based on Smartphone Platforms. *Sensors (Basel, Switzerland)*, v. 17, n. 11, 25 out. 2017.
- GLOBOCAN 2018. Graph Production: IARC. Disponível on-line em: <<http://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em 01 de julho de 2020.
- Grand View Research 2018. Prostate Cancer Diagnostics Market Analysis Report by Type (Preliminary Tests, Confirmatory Tests), by Region (North America, APAC, Europe, MEA, Latin America), And Segment Forecasts, 2018–2025. Disponível on-line em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/prostate-cancer-diagnostics-market>>. Acesso em 01 de julho de 2020.
- GUILBAULT, G. G.; MONTALVO, J. G. Urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society*, v. 91, n. 8, p. 2164–2165, abr. 1969.
- HAMMOND, J. L. et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in Biochemistry*, v. 60, n. 1, p. 69–80, 30 jun. 2016.

- HATAKEYAMA, S. et al. Recent progress and perspectives on prostate cancer biomarkers. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 2, p. 214–221, 11 abr. 2017.
- HEIDENREICH, A. et al. Eau Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology*, v. 65, n. 2, p. 467–479, fev. 2014.
- HOCHMEISTER, M. N. et al. Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Membrane Test Assays for the Forensic Identification of Seminal Fluid. *Journal of Forensic Sciences*, v. 44, n. 5, p. 12042J, 1 set. 1999.
- HUGHES, W. S. THE POTENTIAL DIFFERENCE BETWEEN GLASS AND ELECTROLYTES IN CONTACT WITH THE GLASS. *Journal of the American Chemical Society*, v. 44, n. 12, p. 2860–2867, dez. 1922.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 93 p.
- KHAN, M. Z. H. et al. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 166, p. 112431, out. 2020.
- KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 2, p. 685–707, 17 jan. 2012.
- KNAEBEL, J.; IRVIN, B. R.; XIE, C. Z. Accuracy and Clinical Utility of a Point-of-Care HbA1c , Testing Device. *Postgraduate Medicine*, v. 125, n. 3, p. 91–98, 13 maio 2013.
- KOYUN, A.; AHLATCOLU, E.; KOCA, Y. Biosensors and their principles. A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones; InTech: Rijeka, Croatia, 2012.
- LAI, J. et al. Polyaniline-based glucose biosensor: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 782, p. 138–153, dez. 2016.
- LARA, S.; PEREZ-POTTI, A. Applications of Nanomaterials for Immunosensing. *Biosensors*, v. 8, n. 4, p. 104, 1 nov. 2018.
- LEE, S. et al. Fiber-Optic Localized Surface Plasmon Resonance Sensors Based on Nanomaterials. *Sensors (Basel, Switzerland)*, v. 21, n. 3, 26 jan. 2020.
- MARTÍNEZ, P. et al. Semen searching when sperm is absent. *Science and Justice*, v. 55, n. 2, p. 118–123, 2015.

- MURPHY, W. F. Investigating the incidence of sexual assault in martial arts coaching using media reports. *Digital Investigation*, v. 30, p. 90–93, set. 2019.
- OLIVEIRA, N. C. L. Desenvolvimento de biossensores para as ciências forenses. 2017. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde) - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- OSMA, J.; STOYTCHIEVA, M. Biosensors: Recent Advances and mathematical Challenges. *OmniaScience*, 2014.
- PAULINO, R. D. M.; CONCEIÇÃO, T. DA S.; DECANINE, D. Análise de laudos periciais correspondentes a vítimas de estupro em Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Criminalística*, v. 6, n. 2, p. 38–42, 8 jul. 2017.
- PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; OLIVEIRA, R. H. F. Portable point-of-care device as alternative tool for monitoring blood glucose in lambari *Astyanax altiparanae*: stress and sex-specific effects. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 43, n. 4, p. 557–568, 19 dez. 2017.
- PEZZOLI, P. et al. Genetic Vulnerability to Experiencing Child Maltreatment. *Frontiers in Genetics*, v. 10, 17 set. 2019.
- POHANKA, M. Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. *Materials*, v. 11, n. 3, p. 448, 19 mar. 2018.
- PRADO, M. R. M. DO et al. Câncer de Próstata – Uma revisão sobre o seu rastreamento e diagnóstico/Prostate Cancer – A review of its screening and diagnosis. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 3, n. 5, p. 13954–13962, 2020.
- RAUSCH, S. et al. Assessment of a new point-of-care system for detection of prostate specific antigen. *BMC Urology*, v. 16, n. 1, 2016.
- RECHNITZ, G. A. et al. A bio-selective membrane electrode prepared with living bacterial cells. *Analytica Chimica Acta*, v. 94, n. 2, p. 357–365, dez. 1977.
- ROOBOL, M. J.; CARLSSON, S. V. Risk stratification in prostate cancer screening. *Nature Reviews Urology*, v. 10, n. 1, p. 38–48, 18 jan. 2013.
- SABU, C. et al. Advanced biosensors for glucose and insulin. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 141, p. 111201, set. 2019.

- SÁNCHEZ-MORA, C. et al. Evaluation of two HbA1c point-of-care analyzers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 49, n. 4, 1 jan. 2011.
- SAWAYA, M. C. T.; ROLIM, M. R. S. ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS: APLICAÇÃO FORENSE. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 2, 31 dez. 2004.
- SHEN, Y.; SHEN, G.; ZHANG, Y. Voltammetric immunoassay for α -fetoprotein by using a gold nanoparticle/dendrimer conjugate and a ferrocene derived ionic liquid. *Microchimica Acta*, v. 185, n. 7, p. 346, 30 jul. 2018.
- SHIN, J. et al. Bioresorbable optical sensor systems for monitoring of intracranial pressure and temperature. *Science advances*, v. 5, n. 7, p. eaaw1899, 2019.
- SILVA, P. M. S. Caracterização do padrão de glicosilação do antígeno prostático humano (PSA) em soro humano pela lectina cramoll 1,4 utilizando um biossensor eletroquímico baseado em nanotubo de carbono. 2015. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SMITH, O.; SKINNER, T. How Rape Myths Are Used and Challenged in Rape and Sexual Assault Trials. *Social & Legal Studies*, v. 26, n. 4, p. 441–466, 10 ago. 2017.
- SUTTIPASIT, P.; WONGWITTAYAPANICH, S. Detection of prostate specific antigen and semenogelin in specimens from female rape victims. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, v. 54, p. 102–108, fev. 2018.
- SYAL, K. Point of care testing for measurement of white blood cell count and C-reactive protein levels in blood. *Clinica Chimica Acta*, v. 437, p. 218, nov. 2014.
- ULUDAG, Y. et al. An integrated lab-on-a-chip-based electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of cancer biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 408, n. 27, p. 7775–7783, 2016.
- VAN DE BOVENKAMP, F. S. et al. The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *The Journal of Immunology*, v. 196, n. 4, p. 1435–1441, 15 fev. 2016.
- VASILESCU, A.; MARTY, J.-L. Electrochemical aptasensors for the assessment of food quality and safety. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 79, p. 60–70, maio 2016.

WANG, M. C. et al. Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology*, v. 17, n. 2, p. 159–63, set. 1979.

XU, M.; WANG, R.; LI, Y. Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta*, v. 162, p. 511–522, jan. 2017.

YELLOW SPRINGS INSTRUMENT COMPANY. Technology and environmental monitoring. Disponível em: <<https://www.ysi.com/>>. Acesso em: 02 de setembro de 2020.

YUEN, B.; BILLINGS, J.; MORANT, N. Talking to Others About Sexual Assault: A Narrative Analysis of Survivors' Journeys. *Journal of Interpersonal Violence*, p. 088626051986165, 9 jul. 2019.

ANEXOS

Anexo A – Normas para publicação no periódico *Journal of the Electrochemical Society*

Classificação: Qualis A1



ECS Research Manuscript Template

The Research Article Manuscript Template begins on page 3 of this document. To use this Template, you should first delete the text on the first two pages such that the first line of the Template is the first line of your new document, then type the appropriate text into each section as you go. This will result in the sections of text being automatically formatted as per the Template Styles. Alternatively, you can delete all of the text from this file and enter your manuscript text, then apply the Styles as needed from the Word/Format/Style palette available in the file. **Please note** that that use of the Section Headings marked "Required" is mandatory. If you wish to use section subheadings, a Style is available in the Template.

Paper Preparation

General Text Requirements:

All Manuscripts must be prepared in Single-column format.

References, tables, figures, and figure captions must be placed AFTER the body of the paper.

Equations must be entered as TEXT only, not image files.

Supplemental Material intended for publication must be cited within the body of the manuscript.

Improperly formatted manuscript files will be returned to the author for correction before the paper is sent out for review.

Figure Requirements: Submission of separate figure files is encouraged but not required. When submitting individual figure files, please be sure to follow these guidelines:

Individual figure files, one file per COMPLETE figure.

Saved in EPS or TIFF formats is possible.

Sized at one-column width (3.25 inches) wherever possible.

300 dpi resolution. (Higher resolution files will not improve figure quality but will take longer to load.)

DO NOT submit Tables as figure files. All Tables must be included in the Article File.

General Presentation: Organization and clarity are essential elements of successful publications. Identify the subject matter in the title with words useful for indexing. Present any necessary background information and commentary in an order that leads naturally to future prospects. Identify and justify any assumptions that are made. Define unusual technical terms and all abbreviations or acronyms at their first use. Once an acronym has been defined, use it in place of the full-length term. Edit and proofread the manuscript carefully before submission.

SI units should be used whenever possible. The ACS Style Guide can be used as a reference on grammar, units, and formatting.

Mathematical equations should be written on a single line, if possible, using parentheses, brackets, negative exponents, and the like. Do not use artwork for equations.

Highlights, reviewer suggestions, Table of Contents images, and graphical abstracts should not be included in your manuscript file. Please add the highlights to your cover letter and upload TOC images and graphical abstracts as supplemental material.

References: References must be listed at the end of the paper in the order they are cited in the text. Use each author's first and middle initials and last name; do not use et al. in a reference. CAS abbreviations for journal titles must be used. For full reference formatting instructions and examples, please see the Author Instructions available on the ECSxPress site available at <http://ecsjournals.msubmit.net>

Supplemental Material: Supplemental material should not be included in your manuscript. All supplemental material should be uploaded as a separate document. Please see the author instructions for additional information regarding supplemental material. <https://ecsjournals.msubmit.net>

If you have any questions about proper formatting of a Research Article manuscript for submission, please contact us at publications@electrochem.org for assistance.