

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Martin Šteković

7031/PT

**Papirnati galvanski članak za primjenu u
mikrofluidici na papiru**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Damir Iveković

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za opću i anorganski kemiju i elektroanalizu

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Papirnati galvanski članak za primjenu u mikrofluidici na papiru

Martin Šteković, 0058206445

Sažetak

U radu je prikazana izvedba papirnato galvanskog članka prikladnog za uporabu u papirnatim mikrofluidičkim analitičkim napravama. Izrađeni galvanski članak sastojao se od grafitne katode izrađene crtanjem po papiru mekom grafitnom olovkom i aluminijske anode izrađene od samoljepljive aluminijske folije. Rad članka temeljio se na oksidaciji aluminijske anode i redukciji ABTS radikala, *in situ* generiranog u članku, oksidacijom ABTS-a s vodikovim peroksidom u prisutnosti željezova(II) ftalocijanina kao katalizatora. Sve komponente potrebne za rad konstruiranog galvanskog članka, uključujući i vodikov peroksid u formi urea peroksida, unaprijed su pohranjene u članku u obliku krutina pa je za pokretanje članka dovoljno u njega dodati mali volumen vode. Pri optimalnim uvjetima, konstruirani galvanski članak u stanju je davati struju od približno 0,1 mA, uz napon od 1 V, tijekom perioda od otprilike 30 minuta, što ga čini prikladnim za napajanje potencijalnih papirnatih mikrofluidičkih analitičkih naprava s integriranim elektroničkim sklopovima za obradu signala i prikaz rezultata mjerenja.

Ključne riječi: mikrofluidika na papiru, ABTS, galvanski članak na papiru

Rad sadrži: 28 stranica, 11 slika, 36 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

Datum obrane: rujan 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food technology

Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for basic chemistry, analytical chemistry and electroanalysis

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food technology

Paper-based galvanic cell for application in paper microfluidics

Martin Šteković, 0058206445

Abstract:

In this work, a paper-based galvanic cell suitable for application in microfluidic paper-based analytical devices is described. The galvanic cell comprises of a graphite cathode fabricated by drawing on the paper with a soft graphite pencil and an aluminium anode, fabricated from self-adhesive aluminium foil. Operational mode of the cell was based on the oxidation of the aluminium anode and the reduction of the ABTS radical, generated *in situ*, inside the cell, by oxidizing ABTS with hydrogen peroxide in the presence of iron(II) phthalocyanine as a catalyst. All of the components required for the operation of the constructed galvanic cell, including hydrogen peroxide in the form of urea peroxide, were stored in advance inside the cell in the form of powdered solid, so the operation of the galvanic cell can be initiated simply by adding a small volume of water into the cell. Under optimal conditions, the constructed galvanic cell produced an electric current of approximately 0.1 mA and a voltage of 1 V, during a period of around 30 minutes, which makes it suitable for powering of microfluidic paper-based analytical devices with integrated electronic circuits for signal processing and displaying measurement results.

Keywords: microfluidics on paper, ABTS, galvanic cell on paper

Thesis contains: 28 pages, 11 pictures, 36 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Supervisor: dr. sc. Damir Iveković, assoc. prof.

Defence date: September 2018.

Sadržaj

Uvod	1
1. Teorijski dio	2
1.1. Mikrofluidika u analitici.....	2
1.2. ABTS i njegova primjena u analitici.....	8
1.3. Mimetici peroksidaze.....	9
1.4. Mikrofluidički galvanski članci na papiru.....	12
2. Materijali i metode	15
2.1. Kemikalije	15
2.2. Materijali za izradu galvanskog članka na papiru.....	15
2.3. Mjerni uređaji.....	15
2.4. Određivanje kinetike oksidacije ABTS-a vodikovim peroksidom, katalizirane željezovim(II) ftalocijaninom.....	16
3. Rezultati i rasprava	17
3.1. Princip rada i dizajn papirnatog galvanskog članka.....	17
3.2. Utjecaj pH na brzinu oksidacije ABTS-a vodikovim peroksidom uz željezov(II) ftalocijanin kao katalizator.....	18
3.3. Izrada i testiranje konstruiranog galvanskog članka.....	20
4. Zaključak.....	25
5. Literatura.....	26

Uvod

Mikrofluidičke platforme posljednjih su 20-ak godina bile predmetom brojnih istraživanja te su tako svoju primjenu pronašle u raznim granama znanosti, poput npr. kemije, biologije i medicine. Prednosti upotrebe mikrofluidičkih platformi povezane su s njihovim smanjenim dimenzijama i uključuju smanjenu količinu potrebnog materijala za izradu pojedinih uređaja, manju potrebnu količinu reagensa te posljedično i smanjenu cijenu provođenja pojedinačnih analiza.

U sklopu razvoja analitičkih mikrofluidičkih uređaja, pojavljuju se papirnati mikrofluidički analitički uređaji (μ PADs), koji su zbog dostupnosti, niske cijene i ekološke prihvatljivosti papira kao supstrata osobito prikladni za provođenje jeftinih i brzih analiza u područjima s ograničenim pristupom struji, reagensima i educiranom osoblju. Značajna prednost papira kao platforme za mikrofluidičke uređaje je svojstvo kapilarnog protjecanja tekućina kroz poroznu, celuloznu strukturu, što eliminira potrebu za upotrebom pumpi, inače nužnih za ostvarivanje protoka tekućine. Također, prednosti papira su i njegova relativno velika specifična površina i savitljivost. Recentni razvoj tehnologija koje omogućuju izradu elektroničkih elemenata na papiru printanjem pomoću električno vodljivih i poluvodičkih tinti otvara put razvoju u potpunosti integriranih papirnatih mikrofluidičkih platformi, koje će na sebi sadržavati integrirane sve elemente potrebne za provođenje analize, obradu signala i njihov prikaz te prikladan izvor električne struje.

U ovom radu razvijen je galvanski članak na papiru, u kojem anodu čini samoljepljiva aluminijska folija, a katodu grafitna elektroda, nacrtana na papiru mekom grafitnom olovkom. Kao oksidans koji se reducira na grafitnoj katodi korišten je ABTS radikal-kation, generiran *in situ* na papiru, oksidacijom ABTS-a s H_2O_2 . S obzirom da je navedena reakcija pri uobičajenim uvjetima vrlo spora, ubrzana je primjenom katalizatora, željezova(II) ftalocijanina, poznatog mimetika peroksidaze. Vodikov peroksid korišten za oksidaciju ABTS-a prethodno je uskladišten na papiru u obliku krutine, adukta uree i H_2O_2 , čime je postignuto da razvijeni galvanski članak počinje davati električnu struju jednostavnim dodatkom malog volumena vode. Optimalni uvjeti rada članka utvrđeni su mjerenjem kinetike oksidacije ABTS-a vodikovim peroksidom uz željezov(II) ftalocijanin kao katalizator. Uporabljivost razvijenog papirnato galvanskog članka istražena je mjerenjem potencijala članka te vremenske stabilnosti električne struje generirane pri konstantnom opterećenju članka.

1. Teorijski dio

1.1. Mikrofluidika u analitici

Naziv *mikrofluidika* odnosi se na tehnologiju sustava kojima se manipulira malim volumenima tekućina, koristeći pritom kanale širine nekoliko desetaka do nekoliko stotina mikrometara. Svi mikrofluidički analitički sustavi u pravilu se mogu promatrati kao da su sastavljeni od nekoliko zasebnih funkcionalnih jedinica: jedinice za uvođenje uzoraka i reagensa (najčešće u tekućem stanju), jedinice za osiguravanje protoka tekućine, jedinice za miješanje uzorka i reagensa te jedinice za detekciju [1].

1.1.1. Prednosti mikrofluidike pred klasičnim fluidičkim tehnikama

Prednosti primjene mikrofluidičkih naprava u analitici su višestruke. Manje dimenzije sustava podrazumijevaju manju potrebnu količinu uzoraka i reagenasa, njihovu brzu separaciju i detekciju analita uz visoku rezoluciju i osjetljivost. Sve navedeno pridonosi smanjenju cijene pojedinačnih analiza. Osim minijaturizacije, značajne prednosti proizlaze i iz specifičnih svojstava koje tekućine ispoljavaju u kanalima malih, mikrometarskih dimenzija. Kao primjer jednog od tih svojstava može se navesti elektroosmotski protok (EOF), specifična vrsta protoka koja se javlja kad se na krajeve mikrokanala, čije su stijenke nabijene uslijed prisustva nabijenih površinskih skupina i koji je ispunjen tekućinom koja sadrži ione, narine električno polje. Ova karakteristika omogućuje razdvajanje ionskih vrsta vrlo visoke rezolucije te je tako našla svoju primjenu u elektroforetskom razdvajanju molekula DNA [1].

1.1.2. Fizikalne karakteristike tekućina u mikrofluidičkim sustavima

Fizikalna svojstva tekućina koje se kreću mikrometarskim kanalima, koji su dio uobičajenih mikrofluidičkih naprava, u pojedinim se aspektima fundamentalno razlikuju od onih svojstava tekućina koje putuju kroz veće kanale. Jedno od tih svojstava je gore naveden EOF [1].

Kao najveću od navedenih razlika može se navesti izostanak turbulentnog toka u odnosu na makroskopske tekućine. Zatim, s obzirom da je kod miješanja u makroskopskim tekućinama inercija važnija od viskoznosti, na većim skalama se tekućine miješaju konvektivno. Kod mikroskopskih kanala vrijedi obratno pravilo te se zato dvije tekućine u kanalu ne miješaju

konvektivno, već teku laminarno jedna uz drugu, miješajući se pritom difuzijom molekula duž dodirne površine tekućina.

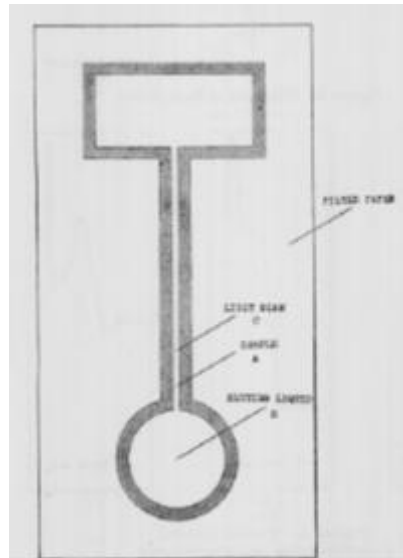
1.1.3. Primjena mikrofluidičkih naprava u analitici

Mikrofluidika polako nalazi svoju primjenu u sve više različitih područja analitike. U području biologije mikrofluidička je analiza osobito praktična zbog dimenzija stanica, koje su kompatibilne s dimenzijama kanala u mikrofluidičkim sustavima. Osim dimenzija, biološke stanice su u mnogim aspektima kompatibilne s polidimetilsiloksanom (PDMS), jednim od najčešćih materijala za izradu mikrofluidičkih naprava [1]. PDMS je, kao materijal za izradu mikrofluidičkih naprava za primjenu u biološkim istraživanjima, prikladan zbog svoje odlične optičke transparentnosti, niske toksičnosti te zbog visoke permeabilnosti za molekularni kisik i ugljikov dioksid. Značajna primjena mikrofluidike očekuje se i u kliničkoj dijagnostici, gdje je naročito prikladna za brza testiranja u hitnim situacijama ili brze terenske analize, detekciju patogena i sl. Zbog svoje niske cijene i jednostavnosti uporabe, primjena mikrofluidičkih analitičkih naprava očekuje se i ekologiji, u terenskim mjerenjima zagađivala i praćenju stanja okoliša. Naposljetku, razvoj tehnologija za masovnu proizvodnju jeftinih mikrofluidičkih platformi za jednokratnu uporabu te napredak u dizajnu analitičkih mikrofluidičkih sustava za čije korištenje nije potrebna nikakva edukacija korisnika otvara put k uporabi mikrofluidičkih analitičkih naprava u svakodnevnom životu, primjerice za detekciju alergena, praćenje zdravstvenog statusa i sl.

1.1.4. Mikrofluidika na papiru

Prva primjena mikrofluidike na papiru vezuje se uz istraživanje iz 1949. godine, u kojem je opisana metoda razdvajanja smjese različitih pigmenata u uskim kanalima koji su na papiru bili definirani (omeđeni) parafinom kao hidrofobnom barijerom (slika 1). Za detekciju pigmenata primijenjen je monokromator, koji je odašiljao zraku monokromatske svjetlosti na fotomultiplikator kroz zadanu zonu na površini papira, spojen s pisačem koji je bilježio transmitanciju u ovisnosti o vremenu. Na taj način je postignuta identifikacija različitih pigmenata, koji su prolazili kroz zadanu zonu u parafinskom kanalu [2].

Ta pionirska primjena papirnate mikrofluidike prošla je nezapaženo pa je sljedećih 55 godina područje razvoja papirnatih mikrofluidičkih naprava bilo u potpunosti zapostavljeno.



Slika 1. Prvi primjer papirnate mikrofluidičke platforme za razdvajanje pigmenata unutar kanalića definiranog parafinskom hidrofobnom barijerom. Preuzeto i prilagođeno iz [2].

Godine 2004. osmišljen je POCKET (sastavljeno od eng. „portable“ i „cost-effective“), integrirani pristup minijaturiziranim imunološkim pretragama, potaknut previsokom cijenom klasičnih mikrofluidičkih uređaja za istu namjenu. POCKET je dizajniran imajući pritom na umu potrebe zemalja u razvoju za jeftinim, brzim i preciznim imunološkim pretragama poput ELISA-e (enzyme-linked immunosorbent assay), koje ne zahtijevaju pristup struji ili visokostručno osoblje [3].

Naspram mikrofluidičkih platformi proizvedenih korištenjem PDMS-a, koje su često preskupe i prekomplikirane za široku upotrebu, papir je jeftin i lako dostupan materijal, na kojem se pokretanje tekućina ostvaruje kapilarnim efektom kroz pore papira (bez potrebe za pumpama) te ima visok omjer površine i volumena, što je osobito korisno za analize gdje se reagensi vežu za površinu. Također, papir je zbog svoje bijele boje osobito prikladan za kolorimetrijske analize te se nakon upotrebe može jednostavno ekološki zbrinuti [4].

1.1.5. Metode izrade mikrofluidičkih papirnatih analitičkih naprava

Pri osmišljavanju mikrofluidičke papirnate analitičke naprave, ključan je odabir metode ograničavanja i usmjerenja toka tekućine na papiru. U dosadašnjoj literaturi opisano je desetak tehnika izrade: fotolitografija, nanošenje analognim crtačem, graviranje tintom,

tretman plazmom, izrezivanje papira, printanje voskom, printanje tintom, fleksotisak, sitotisak i tretman laserom. Glavna je ideja navedenih tehnologija (osim kod izrezivanja papira) stvaranje kanala za kapilarno protjecanje tekućine definiranjem hidrofobnih barijera na hidrofilnoj papirnatj podlozi [5]. Za potrebe razvoja i testiranja novih papirnatih mikrofluidičkih naprava te maloserijsku proizvodnju prototipa najprikladnijom metodom pokazala se tehnologija printanja voskom.

1.1.6. Printanje voskom

Godine 2009. opisana je nova metoda izrade mikrofluidičkog uređaja na papiru kao supstratu. U ovoj metodi specijalizirani printer, koji umjesto uobičajene tinte koristi rastopljeni, obojeni vosak, printa uzorke voska na površini papira. Nakon printanja, toplinskim se tretmanom uzrokuje taljenje voska i njegovo prodiranje u celuloznu strukturu papira. Ovim se procesom stvaraju hidrofobne barijere koje definiraju kanale duž kojih dolazi do kapilarnog protjecanja tekućine [6].

Prodiranje rastopljenog voska u celuloznu strukturu papira opisuje se Washburnovom jednadžbom za kapilarno protjecanje u poroznim materijalima:

$$L = (\gamma Dt / 4\eta)^{1/2}$$

u kojoj L predstavlja udaljenost koju tekućina viskoznosti η i površinske napetosti γ pređe prodiranjem u porozni materijal, prosječnog promjera pora D , u vremenu t .

Širina hidrofobne barijere se u vezu sa širinom isprintane linije dovodi izrazom:

$$W_B = W_P + 2L$$

u kojoj je W_B širina barijere, W_P širina isprintane linije, a L udaljenost koju vosak pređe od ruba isprintane linije u smjeru okomitom na liniju.

Širina kanala definiranog s dvije hidrofobne barijere računa se po jednadžbi:

$$W_C = W_G - 2L$$

u kojoj je W_C širina hidrofobnog kanala, a W_G prostor između dvije isprintane linije.

1.1.7. 1D i 2D protjecanje i miješanje tekućina u kanalima na papiru

Jednodimenzionalno protjecanje tekućine kroz papirnati kanal čiji su rubovi definirani hidrofobnim stijenkama može se opisati gore navedenom Washburnovom jednadžbom. Površinska napetost tekućine služi kao pokretačka sila koja tjera tekućinu sve dalje po papiru. Protjecanje tekućine se pritom usporava uslijed viskoznosti, koja je proporcionalna s brzinom preko koeficijenta $8\gamma L/D^2$, koji se povećava s povećanjem fronte tekućine u kanalu. Povećanjem širine kanala dolazi do smanjenja brzine protjecanja, budući da fronta tekućine sve više mora putovati u smjeru okomitom na smjer kanala [7].

Protjecanje tekućine kroz kanal u već navlaženom papiru opisuje se Darcyjevim zakonom:

$$Q = -\frac{\kappa WH}{\mu L} \Delta P$$

u kojem Q predstavlja volumni protok, κ permeabilnost papira za tekućinu, WH površinu kanala, a ΔP smanjenje tlaka po jedinici duljine L .

Miješanje tekućina duž kanala na papiru ostvaruje se difuzijom između dvaju paralelnih laminarnih tokova dviju različitih tekućina. Difuzija u poroznom mediju (kao što je to papir) opisuje se Stokes-Einsteinovom jednadžbom [8,9]:

$$D_{\infty} = \frac{kT}{6\pi\eta r_s}$$

gdje D_{∞} predstavlja koeficijent difuzije otopljene tvari u beskonačno razrijeđenoj tekućini, k Boltzmannovu konstantu, T apsolutnu temperaturu, η viskoznost tekućine, a r_s polumjer molekula (iona) otopljene tvari. Kada je kretanje otopljene tvari ograničeno porama, njezin difuzijski koeficijent je smanjen utjecajem dvaju faktora: steričkim utjecajem u blizini zidova pora te povećanim hidrodinamičkim otporom kretanju otopljene tvari. Za nenabijenu, čvrstu i sferičnu otopljenu tvar, koeficijent difuzije može se izraziti omjerom polumjera otopljene tvari i pora:

$$\lambda = \frac{r_s}{r_p}$$

gdje je r_s polumjer otopljene tvari, a r_p polumjer pore [9].

1.1.8. Metode detekcije u mikrofluidici na papiru

U mikrofluidici na papiru najčešće se primjenjuju sljedeće četiri metode za detekciju analita: kolorimetrijska detekcija, elektrokemijska detekcija, kemiluminescencijska detekcija (CL) i elektrokemiluminescencijska detekcija (ECL).

Kod kolorimetrijske detekcije, enzimskom ili kemijskom reakcijom postiže se promjena boje na papiru. U najvećem broju slučajeva, detekcija i kvantifikacija se može provesti golim okom, s obzirom da je promjena boje takva da dokazuje ili opovrgava prisutnost analita u uzorku [5].

Elektrokemijska detekcija, za razliku od kolorimetrijske detekcije, ima veću osjetljivost te je manje podložna utjecaju osvjetljenja, kao i utjecaju interferencije uzrokovane interferentima u različitim uzorcima.

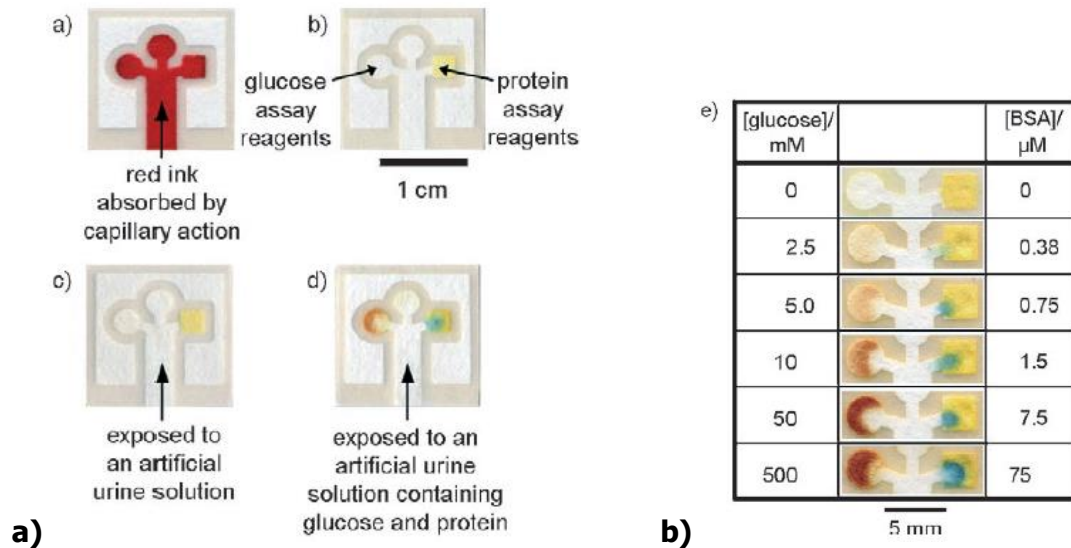
U većini radova vezanih za detekciju analita u mikrofluidici na papiru navode se kolorimetrijske metode detekcije. CL i ECL su dvije optičke metode detekcije koje ne ovise o okolnom osvjetljenju zbog toga što se provode u mraku. Međutim, u mikrofluidici na papiru ove dvije metode ograničene su isključivo na laboratorijsku primjenu zbog potrebe za osjetljivim fotodetektorima.

1.1.9. Analitičke primjene mikrofluidike na papiru

Prvi mikrofluidički analitički uređaj na papiru (μ PAD, prema eng. *Microfluidic Paper-based Analytical Device*) bio je uređaj za analizu koncentracije glukoze i proteina u mokraći iz 2007. godine (slika 2). U ovom uređaju nanoseni uzorak mokraće putovao je središnjim kanalom do područja grananja u dvije zone, u kojima su prethodno nanoseni i osušeni reagensi za glukozu i proteine. U tim zonama dolazi do razvijanja obojenja reakcijama glukoze i proteina s njihovim pripadajućim reagensima, iz čijih se intenziteta zatim donosi gruba procjena o koncentraciji glukoze i proteina u mokraći. Ukupno trajanje analize, potrebno za sušenje i potpuno razvijanje boje bilo je 10-11 minuta [10].

Osim primjene u biomedicini, μ PAD-ovi našli su velik broj primjena u ekologiji i prehrambenoj tehnologiji [11]. Primjerice, u radu iz 2013. opisana je metoda detekcije *Salmonella typhimurium* uz pomoć antitijela vezanih na polistirenske nanočestice. Detekcija i kvantifikacija se vršila mjerenjem raspršenja svjetlosti uzrokovanog prisutnošću

odgovarajućeg antigena iz bakterije. Osjetljivost metode bila je na nivou jedne bakterijske stanice, a vrijeme analize bilo je manje od jedne minute [12].



Slika 2. Uređaj za analizu koncentracije glukoze i proteina u mokraći. Na slici pod a) prikazano je djelovanje mikrofluidičkog uređaja, a na slici pod b) razine obojenja pri različitim koncentracijama glukoze, odnosno proteina. Preuzeto i prilagođeno iz [10].

1.2. ABTS i njegova primjena u analitici

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) je spoj čijom se oksidacijom dobiva snažno obojen kationski radikal, plavo-zeleni kromogen koji pokazuje karakteristične apsorpcijske maksimume pri valnim duljinama 645, 734 i 815 nm [13]. ABTS radikal se u većini slučajeva generira izravno kemijski, reakcijom ABTS-a s nekim oksidansom (npr. kalijev persulfat, manganov dioksid, ABAP (2,2'-azobis (2-metilpropionamidin)dihidroklorid)) ili kataliziranom oksidacijom ABTS-a s vodikovim peroksidom, uz katalizator peroksidazu, hemoglobin ili metmioglobin [14]. Dobiveni ABTS radikal je stabilan dulji period vremena pri sniženoj temperaturi, a njegova stabilnost tijekom analiza može varirati ovisno o pH, temperaturi, kao i o samom omjeru ABTS-a i njegovog radikala.

ELISA (skraćeno od enzyme-linked immunosorbent assay) testovi su skupina biokemijskih testova, u kojima se enzimskom reakcijom antitijela i antigena stvara obojenje koje dokazuje prisutnost neke supstance (najčešće antigena) u tekućem ili namočenom uzorku. ABTS u

ovim analizama služi kao supstrat, koji se enzimskom reakcijom pretvara u svoj obojeni radikal. Koncentracija promatrane supstance se zatim određuje mjerenjem apsorpcije pri odgovarajućoj valnoj duljini [15].

ABTS svoju primjenu često nalazi u metodama detekcije i kvantifikacije antioksidanasa u različitim uzorcima u područjima medicine, prehrambene industrije i agronomije. Razlog za to je činjenica da se njegovom oksidacijom dobiva snažno obojen kationski radikal, čija se dekoloracija uslijed prisutnosti antioksidansa može dovesti u izravnu vezu s koncentracijom antioksidansa u analiziranom uzorku. Miller i sur. su 1993. opisali metodu kvantifikacije antioksidativnog kapaciteta u tjelesnim tekućinama novorođenčadi, u kojoj se ABTS kationski radikal generira u reakciji s H_2O_2 , kataliziranoj peroksidazom, pri čemu se mjeri apsorpcija, odnosno njezino smanjenje u prisutnosti raznih antioksidanasa u uzorcima [13]. U radu se također uvodi jedinica antioksidativne aktivnosti, TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), koja se definira kao koncentracija (u mmol/L) *Troloxa* (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ska kiselina) koja pokazuje isti antioksidativni kapacitet kao 1.0 mmol/L promatrane tvari. Na taj način TEAC predstavlja standard pomoću kojeg se međusobno mogu usporediti antioksidativne aktivnosti različitih antioksidansa [16]. Ova je metoda u često bila primjenjivana pri izradi metoda detekcije antioksidanasa u protočno-injekcijskim analizama, najčešće također temeljenih na mjerenju smanjenja apsorpcije ABTS radikala.

1.3. Mimetici peroksidaze

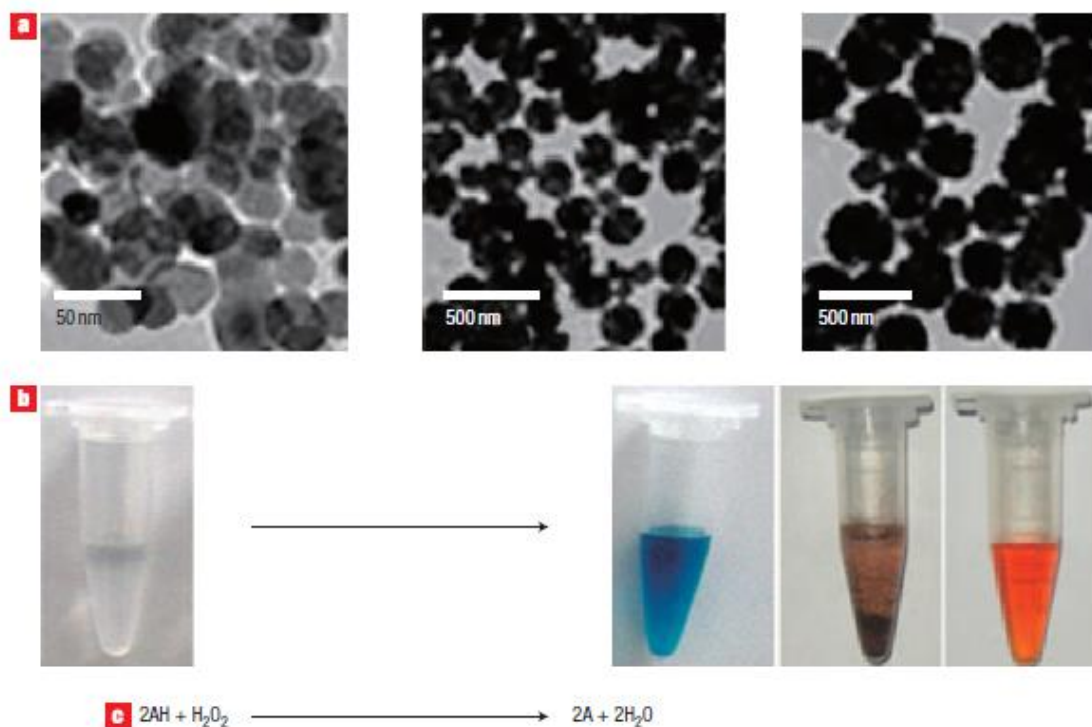
Velik dio kemijskih i bioloških procesa unutar žive stanice koristi enzime kako bi se omogućilo odvijanje tih procesa zadovoljavajućom brzinom. Izolirani enzimi, zbog svoje selektivnosti i efikasnosti, našli su primjenu u raznim područjima ljudske djelatnosti, poput medicine, te kemijske i prehrambene industrije. Međutim, uporaba enzima povezana je i s određenim nedostacima: osjetljivošću enzima na okolišne čimbenike (pH, temperatura), mogućnošću razgradnje enzima proteazama te visokom cijenom enzima [17]. Zbog toga se intenzivno istražuju tzv. mimetici enzima, male molekule koje građom podsjećaju na građu aktivnog centra enzima te pokazuju katalitičku aktivnost sličnu enzimu, no jeftinije su i lakše za pripravu.

Oksidaciju ABTS-a pomoću vodikovog peroksida nužno je provoditi uz katalizator, kako bi se reakcija odvijala primjerenom brzinom. Idealni katalizator za tu reakciju je enzim peroksidaza, koji se klasično u tu svrhu koristi u testovima za određivanje antioksidacijske

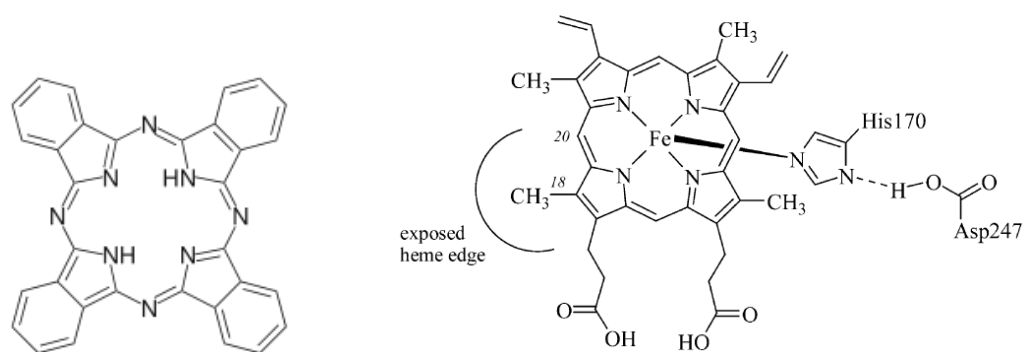
aktivnosti ili pri ELISA testovima. Međutim, uporaba peroksidaze u mikrofluidici na papiru povezana je s nekoliko poteškoća. pored visoke cijene enzima, najveća poteškoća leži u potrebi za imobilizacijom peroksidaze u celuloznu strukturu papira, što najčešće dovodi do značajnog smanjenja katalitičke aktivnosti enzima uslijed denaturacije [18].

U znanstvenoj literaturi pojavljuje se velik broj istraživanja u području mimetika peroksidaze. Među tim istraživanjima prevladavaju ona u kojima se navodi korištenje nanostrukture sačinjenih od oksida prijelaznih metala kao obećavajućih peroksidaznih mimetika [19]. Među njima vrijedi spomenuti nekoliko primjera, počevši od Fe_3O_4 , čije nanočestice pokazuju peroksidazno djelovanje (slika 3), što ne čudi ako uzmemo u obzir da $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ioni u otopini imaju poznato katalitičko djelovanje prema raspadu vodikovog peroksida (Fentonov reagens). Ove nanočestice pri jednakoj koncentraciji kao i enzim (ovisno o veličini samih nanočestica) pokazuju 40 puta veću aktivnost od peroksidaze, uz veći afinitet prema tetrametilbenzidinu i manji afinitet prema vodikovom peroksidu kao supstratima [20]. Od ostalih metalnih oksida vrijedi spomenuti V_2O_5 nanostrukture, Co_3O_4 , CuO i ZnFe_2O_4 nanočestice [21-24]. Često se nanočestice kao mimetici peroksidaze koriste tek nakon odgovarajuće površinske modifikacije, primjerice nanočestice $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, površinski modificirane s berlinskim modrilom (željezov(III) heksacijanoferat), nanočestice Fe_3O_4 površinski modificirane amidosulfonskom kiselinom [25, 26] ili nanočestice srebra stabilizirane polimerom hitosanom [27].

Kao katalizator te kao mimetik peroksidaze u reakciji oksidacije ABTS-a može poslužiti i željezov(II) ftalocijanin (slika 4). Još 70-tih godina 20. stoljeća zamjećeno je da metalni ftalocijanini mogu poslužiti kao sredstva za redukciju kisika, a nešto kasnije da također mogu poslužiti kao učinkoviti mimetici peroksidaza [28, 29]. Razlog za to jasan je usporedbom strukture hema, aktivnog centra peroksidaze, sa strukturom ftalocijanina (slika 4). Hem je građen od atoma željeza pentakoordiniranog s porfirinom kao tetradentatnim ligandom i sa samim proteinom preko jedne koordinirane veze s aminokiselinskim ostatkom [30]. Usporedbe radi, struktura metalnih ftalocijanina sastoji se od metalnog iona (najčešće željezo, nikal ili kobalt) tetrakoordiniranog s porfirinskom skupinom (Slika 4). Uzevši u obzir njihovu sličnost u strukturi, očekivano je i da mehanizmi djelovanja metalnih ftalocijanina i hema izgledaju slično.



Slika 3. Elektronska mikrografija nanočestica Fe₃O₄, koje efikasno kataliziraju oksidaciju tetrametilbenzidina i ABTS-a s vodikovim peroksidom, mehanizmom sličnim mehanizmu peroksidaze. Preuzeto i prilagođeno iz [20].



Slika 4. Struktura ftalocijanina (lijevo) i hema izoenzima peroksidaze C (desno).
Preuzeto i prilagođeno iz [30] i [31].

Prva reakcija u katalitičkom ciklusu jest reakcija između H₂O₂ i iona Fe³⁺ unutar hem skupine, u kojoj se, preko Fe(III)-hidroperoksidnog kompleksa kao međuprodukta, stvara tzv. *spoj I*, koji se sastoji od oksiferilnog centra (sa željezom u oksidacijskom stanju +4) i porfirinskog

kationa. *Spoj I* prilično je jak oksidans te može oksidirati niz organskih i anorganskih supstrata, uključujući i ABTS, primajući pritom dva elektrona [30].

1.4. Mikrofluidički galvanski članci na papiru

1.4.1. Galvanski članci

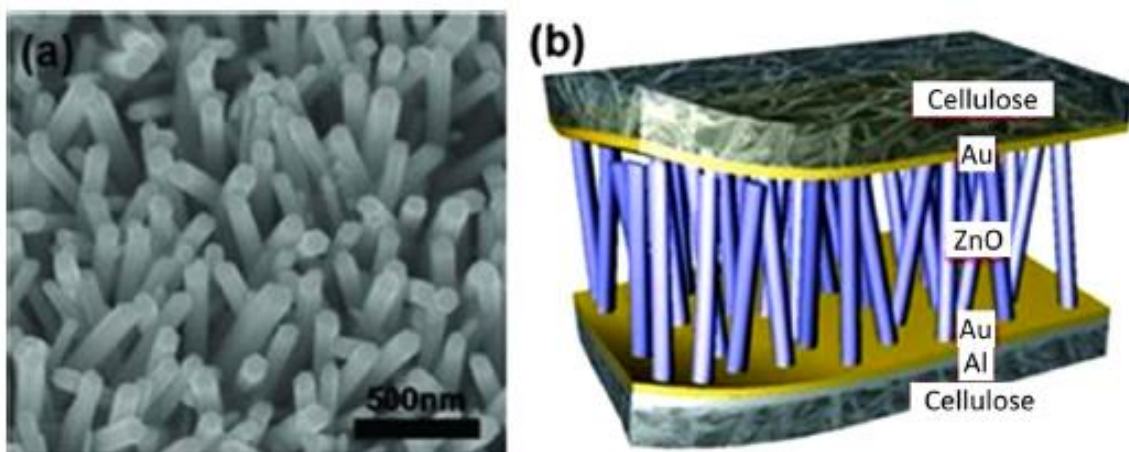
Galvanski članci su izvori električne struje kod kojih se električna struja proizvodi na račun redoks-reakcije koja se spontano odvija u članku: oksidacija na anodi i redukcija na katodi. Danas su u primjeni dvije vrste galvanskih članaka. Jedna vrsta su baterije, kod kojih su tvari koje se oksidiraju na anodi i reduciraju na katodi sadržane u bateriji (pa nakon što se potroše, baterija prestaje davati struju, nakon čega se baca, ili se, u slučaju "punjivih", akumulatorskih baterija, tvari mogu regenerirati pomoću vanjskog električnog izvora). Druga vrsta su tzv. gorivni članci, kod kojih postoji kontinuirana doprema (iz vanjskog spremnika ili okoline) tvari koje se oksidiraju i reduciraju, pa takvi članci električnu struju mogu davati kontinuirano.

1.4.2. Izvedbe galvanskih članaka u papirnatim mikrofluidici

Razvojem mikrofluidičkih analitičkih platformi namijenjenih za jednokratnu uporabu pojavila se potreba za razvojem jeftinih i jednostavnih izvora električne energije, kojim bi se te platforme mogle napajati (npr. radi detekcije analita, prikaza rezultata i sl.), a koji se nakon uporabe mogu baciti zajedno s mikrofluidičkom platformom, pa stoga trebaju biti ekološki prihvatljivi. Ta potreba posebno je izražena u posljednje vrijeme zbog naglog razvoja printane elektronike, koja omogućuje da se jednostavnim i jeftinim metodama printanja (npr. tintnim ink-jet pisačima) na papiru izrade osnovni elektronički sklopovi [32]. S obzirom da ti sklopovi troše vrlo malu količinu struje, razvojem galvanskih članaka koji se lako mogu integrirati na papirnatu mikrofluidičku platformu otvara se put izradi u potpunosti integriranih papirnatih mikrofluidičkih analitičkih platformi, koje na sebi imaju integriranu analitičku napravu, elektroniku za obradu mjernog signala i izvor napajanja.

Baterije i uređaji za pohranu energije na papiru obuhvaćaju elektrokemijske baterije, biogorivne članke, Li-ionske baterije, superkondenzatore i nanogeneratore. Biogorivni članci su bioelektrokemijski uređaji koji pretvaraju biokemijsku energiju u električnu energiju

koristeći biokatalizatore, a dva najvažnija tipa ovih uređaja su mikrobnii članci i enzimski biogorivni članci. Ciniciato i sur. su izradili biokatode za primjenu u enzimskim biogorivnim člancima, koristeći bilirubin oksidazu kao katalizator za redukciju kisika i postigli najvišu gustoću struje od $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, koja je pod naponom od 300 mV bila stabilna tijekom 12 h [33]. Litij-ionske baterije rade na bazi prenošenja litijevih iona između anode i katode preko elektrolita koji provodi ione, a njihova izrada s papirom kao supstratom istražuje se zbog nekih svojstava papira poput npr. velike specifične površine i savitljivosti [32]. Leijonmarck i sur. su proizveli grafit/ LiFePO_4 bateriju, koristeći nanovlaknasti papir kao podlogu za nanošenje elektroda [34]. Superkondenzatori su uređaji za pohranu energije, po izvedbi slični klasičnim baterijama, no superiorniji s obzirom na brzinu punjenja i pražnjenja, gustoću snage, sigurnost i utjecaj na okoliš. Papir se pokazao kao zadovoljavajuć supstrat za izradu superkondenzatora zbog svojih mehaničkih svojstava [32]. Zhang i sur. su proizveli čvrste i fleksibilne superkondenzatore na papiru, pritom za izradu koristeći ugljikove nanocjevčice i mikrovlaknastu celulozu (MFC) kao materijale za izradu elektrodnih pločica, polietilen oksid i LiCl kao čvrste elektrolite i MFC kao kosturni materijal [35]. Nanogeneratori su uređaji koji pretvaraju mehaničku energiju u električnu, a papir može pritom služiti kao supstrat za njihovu izradu [32]. Kim i sur. su koristili piezoelektrični sloj ZnO nanocjevčica na celuloznoj podlozi te su postigli gustoću struje od $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ i izlazni napon od 75 mV [36].



Slika 5. Papirnati piezoelektrični nanogenerator. Pod a) su prikazane ZnO nanocjevčice na celuloznoj podlozi, a pod b) shematski prikaz integriranog nanogeneratora. Preuzeto i prilagođeno iz [36].

S obzirom da je klasične varijante baterija relativno teško (ili skupo) izvesti na papiru, obično se pribjegava izvedbi koja više podsjeća na gorivne članke: papir se koristi kao medij za dopremu reaktanata na katodu i anodu, na kojima se prikladnom redoks-reakcijom reaktanata generira električna struja. Osnovni problemi koje u razvoju galvanskih članaka na papiru treba riješiti su:

- 1) Ekološka prihvatljivost (tj. ne smiju sadržavati ili proizvoditi kemikalije štetne za okoliš), jer su platforme namijenjene jednokratnoj uporabi i nakon mjerenja se bacaju.
- 2) Mala cijena (tj. ne smiju koristiti skupe kemikalije, elektrode i katalizatore), jer se time zadovoljava osnovna pretpostavka papirnatih mikrofluidičkih platforma – niska cijena.
- 3) Kompatibilnost s osnovnom komponentom mikrofluidičke platforme – papirom (tj. ne smiju reagirati s celulozom).
- 4) Mogućnost skladištenja na papiru, čime se postiže jednostavnost uporabe mikrofluidičke platforme, jer su sve kemikalije koje galvanski članak treba za svoj rad već sadržane na platformi. Pritom bi idealno bilo da se galvanski članak aktivira samo dodatkom vode, u kojoj će se tvari pohranjene na papiru otopiti. Međutim, da bi to bilo izvedivo, tvari koje se troše u galvanskom članku trebaju preferirano biti u čvrstom stanju i trebaju biti stabilne tijekom skladištenja.
- 5) Galvanski članak treba biti u stanju producirati dovoljnu snagu za pokretanje integrirane elektronike i treba biti stabilan (tj. dovoljno vremena, koliko traje mjerenje, davati stabilnu struju i napon).

Od navedenih zahtjeva, najproblematičniji su zahtjevi za niskom cijenom i mogućnošću skladištenja na papiru, te zahtjev za dostatnom snagom izvora. Naime, da bi davali dovoljno snage, izvori u formi gorivnih članaka trebaju katalizatore, koji su uglavnom temeljeni na plemenitim metalima i stoga skupi. To je posebice izraženo ako se kao oksidans na katodi koristi kisik iz zraka, koji je lako dostupan i besplatan, no za čiju je redukciju do H_2O potreban katalizator na bazi platine. Također, broj tvari koje se mogu lako (tj. uz mali prenapon) oksidirati na anodi galvanskog članka, a koje se mogu trajno skladištiti na papiru je relativno ograničen. Zbog toga se najčešće te tvari u galvanski članak dodaju izvana, što komplicira korištenje mikrofluidičke platforme. Vezano uz dostatnu snagu električnog izvora, to podrazumijeva da su elektrokemijske reakcije na katodi i anodi galvanskog članka brze, što dodatno sužava izbor tvari prikladnih za primjenu u galvanskim člancima na papiru.

2. Materijali i metode

2.1. Kemikalije

Amonijeva sol 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) nabavljena je od Sigmee i imala je čistoću od 98 %. Željezov(II) ftalocijanin nabavljen je od Kodaka i bio je deklarirane čistoće od 95 %. Sve ostale kemikalije korištene u radu bile su *p.a.* čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja.

Za pripremu otopina vodikova peroksida korištena je vodena otopina H₂O₂ masenog udjela $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 30\%$. Otopine vodikova peroksida pripremane su neposredno nakon uporabe.

Za podešavanje pH reakcijskih smjesa korišten je McIlvaineov pufer, priređen dodavanjem određenog volumena vodene otopine Na₂HPO₄, koncentracije $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$, u 50 cm³ vodene otopine limunske kiseline, koncentracije $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, do postizanja željenog pH.

2.2. Materijali za izradu galvanskog članka na papiru

Kao podloga za izradu galvanskog članka korišten je kvalitativni filterski papir Whatman Grade I (Whatman, USA). Za izradu elektroda na papiru korištena je samoljepljiva ambalažna aluminijska folija debljine 10 μm, korištena kao anoda, te meka grafitna olovka (tvrdoće 6B), kojom je grafitna katoda načinjena crtanjem po papiru. Kao separator između katode i anode korišten je spomenuti filterski papir, koji je na elektrode na rubovima zalijepljen trakicama dvostrukoljepljive folije (Tessa, Njemačka). Kontakti s elektrodama galvanskog članka načinjeni su srebrnom vodljivom tintom (MicroChem, Njemačka).

2.3. Mjerni uređaji

Za elektrokemijska mjerenja, korištena je ćelija troelektrodnog tipa, s platinskom pomoćnom elektrodom i Hg|Hg₂Cl₂|3.5M KCl referentnom elektrodom ($E = 0,252 \text{ V}$ prema standardnoj vodikovoj elektrodi pri 25 °C). Kao radna elektroda korištena je rotirajuća grafitna disk-elektroda promjera 7 mm, priključena na rotator Beckman R-6000. Pri mjerenjima je korišten potenciostat/galvanostat Voltalab 50 (Radiometer Analytical, Francuska).

2.4. Određivanje kinetike oksidacije ABTS-a vodikovim peroksidom, katalizirane željezovim(II) ftalocijaninom

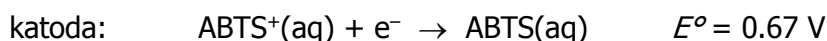
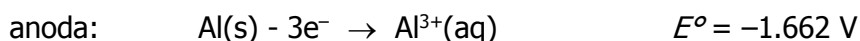
Kinetika oksidacije ABTS-a vodikovim peroksidom uz željezov(II) ftalocijanin kao katalizator određivana je kronopotenciometrijski, mjerenjem porasta struje redukcije nastalog ABTS-radikala. Mjerenja su izvedena u elektrokemijskoj ćeliji koja je sadržavala 10 mL otopine ABTS-a, koncentracije $c(\text{ABTS}) = 2 \text{ mmol/dm}^3$, u McIlvaineovom puferu, podešenom na vrijednost pH od 2,2; 3,0; 4,0 ili 5,0. U sve reakcijske smjese u ćeliji dodano je 100 μL suspenzije željezova(II) ftalocijanina u etanolu, priređene suspendiranjem 20 mg Fe-ftalocijanina u 1 mL bezvodnog etanola te (u slučaju istraživanja utjecaja uree na kinetiku reakcije) i 10 μL vodene otopine uree, čija je koncentracija iznosila 0,25; 0,50 ili 0,75 mol/dm^3 . Kako bi se u mjernoj ćeliji osigurali reproducibilni hidrodinamički uvjeti, mjerenje je izvedeno koristeći rotirajuću grafitnu disk-elektrodu, čija je brzina rotacije iznosila 1500 o/min.

Prije početka mjerenja, radna je elektroda polarizirana na radni potencijal od 200 mV radi stabilizacije osnovne struje. Nakon što se osnovna struja stabilizirala, reakcija u ćeliji inicirana je dodatkom 10 μL vodene otopine H_2O_2 , koncentracije $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,25 \text{ mmol/dm}^3$, te je bilježena struja redukcije nastalog ABTS-radikala tijekom prvih 15 minuta reakcije.

3. Rezultati i rasprava

3.1. Princip rada i dizajn papirnatog galvanskog članka

Papirnatu galvanski članak konstruiran u ovom radu zamišljen je da se sastoji od anode, izrađene od ambalažne samoljepljive aluminijske folije zalijepljene na filterski papir i od grafitne katode napravljene crtanjem po papiru mekom grafitnom olovkom. Anodna reakcija u zamišljenom članku bila bi oksidacija (otapanje) samog materijala anode, aluminijske, dok bi katodna reakcija bila redukcija ABTS radikala, kako to prikazuju jednadžbe:



Takav dizajn galvanskog članka odabran je zbog kompatibilnosti s papirnatim mikrofluidičkim analitičkim platformama, koje kao osnovu za mikrofluidički transport uzorka i reagensa koriste upravo filterski papir, na kojem se, kreiranjem hidrofobnih barijera, izvode elementi potrebni za provođenje analize. Odabranim dizajnom rješava se većina problema povezanih s izvedbom izvora električne struje prikladnih za integraciju s mikrofluidičkim platformama, navedenih u poglavlju 2.4.2. Kao tvar koja se u članku oksidira funkcionira sam materijal anode - samoljepljiva aluminijska folija. Ona je vrlo jeftina i lako dostupna jer se proizvodi u velikim količinama kao ambalažni i izolacijski materijal te se lako integrira s papirom (zalijepi se na papir). Također, anoda izrađena od aluminijske folije ekološki je prihvatljiv izbor jer aluminij nije štetan za okoliš. Kao oksidans koji se reducira na katodi zamišljenog galvanskog članka odlučilo se koristiti ABTS radikal kation. Razlozi takvog odabira bili su dvojaki. ABTS radikal kation lako se može producirati *in-situ*, u samom galvanskom članku, oksidacijom ABTS-a s prikladnim oksidansom, pri čemu se ABTS u članku može pohraniti u obliku krutine, ili se otopinom ABTS-a može impregnirati papir i osušiti. U oba slučaja, skladištenje ABTS-a do uporabe mikrofluidičke platforme ne predstavlja problem jer je ABTS u čvrstom stanju stabilan na zraku. Galvanski članak se aktivira (dovodi u stanje da daje električnu struju) jednostavnim dodavanjem vode u članak.

Da bi zamišljeni članak bio uporabljiv, od izuzetne je važnosti pravilan izbor oksidansa, koji će ABTS prevesti u ABTS radikal. Oksidans treba zadovoljiti nekoliko zahtjeva: treba brzo reagirati s ABTS-om (kako bi galvanski članak, nakon dodavanja vode, bio brzo spreman za uporabu), treba biti jeftin, ekološki prihvatljiv i ne smije interferirati s reakcijama na katodi i anodi te time umanjivati efikasnost članka. Kao logičan odabir koji udovoljava većini

navedenih zahtjeva nametnuo se vodikov peroksid, no da bi se on uspješno primijenio, trebalo je riješiti dva problema: kako tekući uskladištiti H_2O_2 na papiru te kako ubrzati reakciju između ABTS-a i H_2O_2 ?

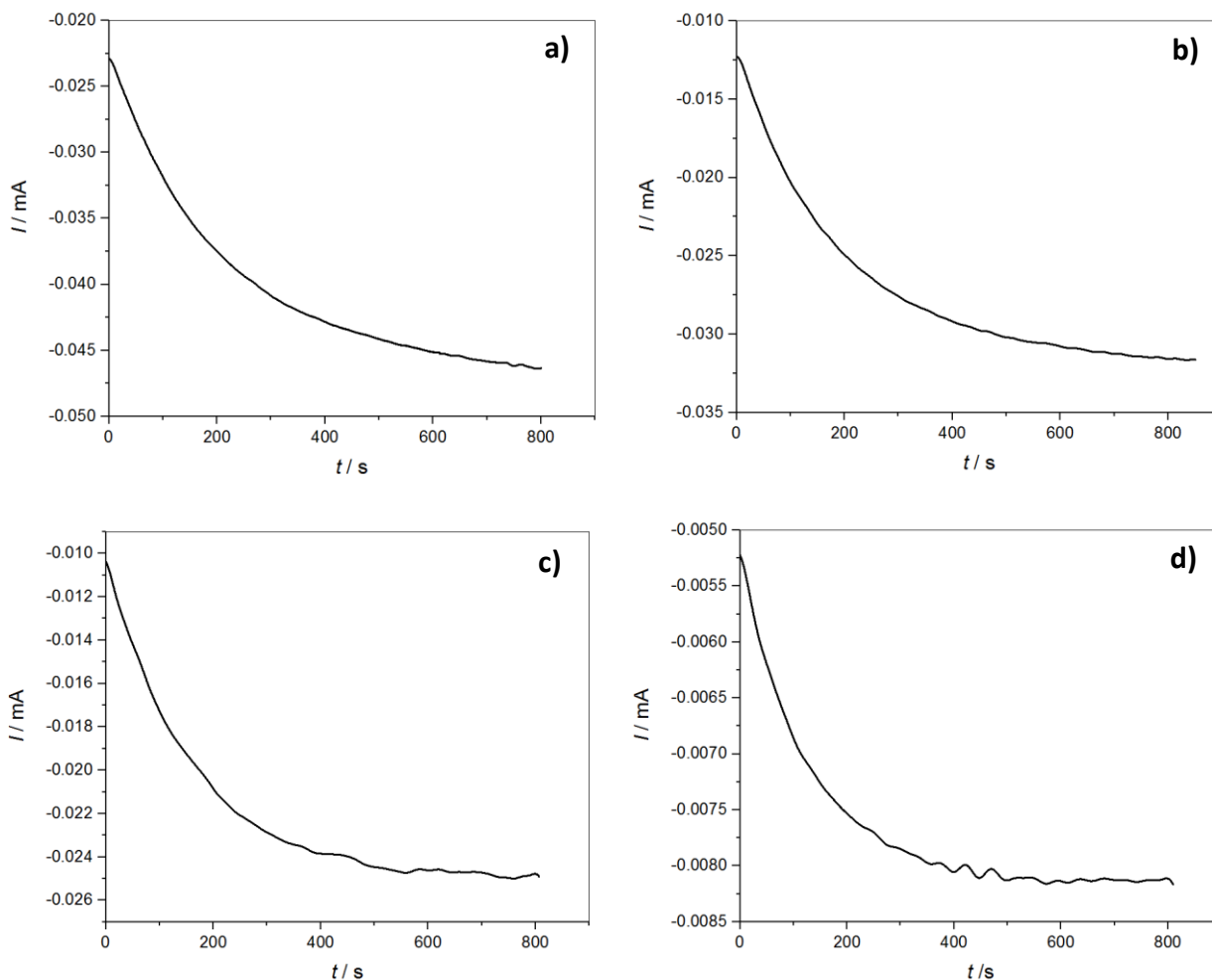
Rješenje prvog problema pronađeno je u korištenju adukta H_2O_2 i uree (urea peroksid ili perkarbamid, $H_2NCONH_2 \cdot H_2O_2$), koji je slabo reaktivna krutina stabilna na sobnoj temperaturi te se može skladištiti dugo vremena, bez opasnosti od raspada. Lako je topljiva u vodi, pri čemu se iz nje oslobađa H_2O_2 . Urea je neškodljiva za okoliš (koristi se kao organsko umjetno gnojivo). Vodikov peroksid je također bezopasan jer se u tekućem stanju i pod utjecajem svjetlosti i onečišćenja vrlo brzo raspada na vodu i molekularni kisik.

Rješenje drugog problema leži u uporabi katalizatora koji ubrzava reakciju između ABTS-a i H_2O_2 . Uobičajeno korišten katalizator za tu svrhu je enzim peroksidaza, no ovdje se to željelo izbjeći radi relativno visoke cijene enzima te problema povezanih s njegovim dugotrajnim skladištenjem na papiru. Zbog toga je odlučeno koristiti neki od mimetika peroksidaze te istražiti je li on primjenjiv za uporabu u zamišljenom galvanskom članku. Kao mimetik peroksidaze odabran je željezov ftalocijanin. On je vrlo stabilan, jeftin i lako dostupan jer se dobiva iz sirovina koje se koriste za proizvodnju sintetskih bojila za tekstil.

Na kraju treba spomenuti kako je odabirom ABTS radikala kao tvari koja se reducira u galvanskom članku pojednostavljen i odabir materijala katode, na kojoj se generirani ABTS radikal reducira, s obzirom da je redukcija ABTS radikala brza na elektrodama od grafita. To je omogućilo da se kao katoda koristi grafitna elektroda načinjena crtanjem po papiru mekom grafitnom olovkom. Budući da je promatrana elektrokemijska reakcija brza, osigurano je i da konstruirani galvanski članak daje primjerenu snagu.

3.2. Utjecaj pH na brzinu oksidacije ABTS-a vodikovim peroksidom uz željezov(II) ftalocijanin kao katalizator

Kako bi se odredili reakcijski uvjeti pri kojima je reakcija oksidacije ABTS-a s H_2O_2 u prisutnosti željezova ftalocijanina zadovoljavajuće, u radu su provedena odgovarajuća mjerenja brzine oksidacije ABTS-a. Također, istraženo je utječe li prisutnost uree na brzinu opisane reakcije. Mjerenja su provedena kronoamperometrijski, praćenjem porasta struje redukcije nastalog ABTS radikala u vremenu, pri vrijednostima pH od 2,2, 3,0, 4,0 i 5,0. Dobivene kronoamperometrijske krivulje prikazane su na slici 6.

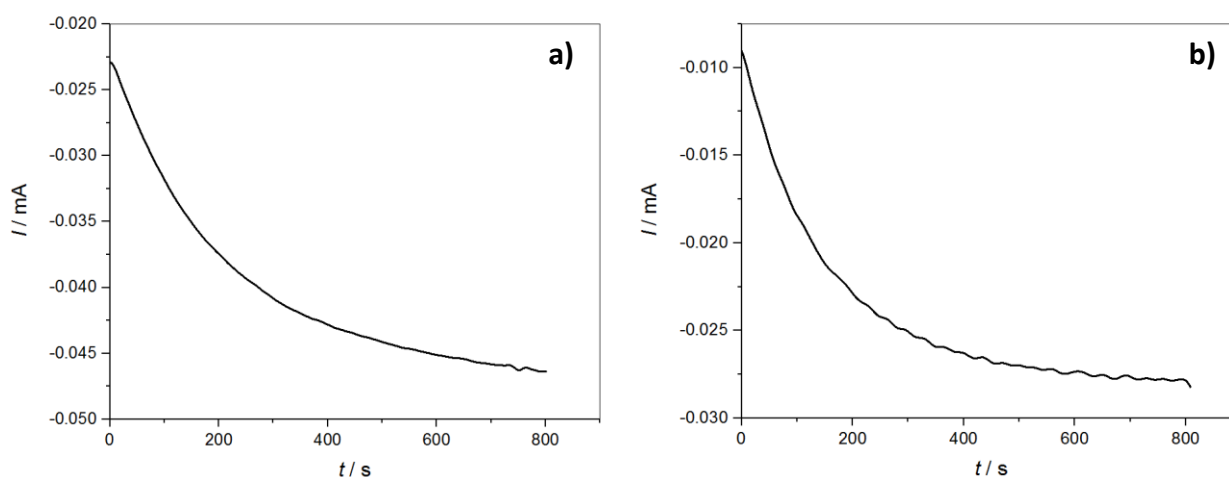


Slika 6. Kronoamperometrijske krivulje redukcije ABTS radikala nastalog tijekom oksidacije 2 mM ABTS-a vodikovim peroksidom, katalizirane željezovim(II) ftalocijaninom, pri pH a) 2,2, b) 3,0, c) 4,0 i d) 5,0.

S obzirom da je struja redukcije nastalog ABTS radikala proporcionalna njegovoj koncentraciji u otopini, iz podataka prikazanih na slici 6 vidljivo je da se maksimalna koncentracija ABTS radikala dobiva pri vrijednosti pH od 2,2, pri kojem reduksijska struja nakon 10 min reakcije doseže vrijednost od otprilike 45 μ A. Za usporedbu, pri vrijednosti pH od 3,0 reduksijska struja nakon 10 minuta reakcije postiže vrijednost od svega 31 μ A, pri pH 4,0 vrijednost od 24,5 μ A, a pri pH 5,0 vrijednost od samo 8,2 μ A. Stoga je kao poželjna vrijednost pH za rad galvanskog članka odabran pH od 2,2.

S obzirom da je vodikov peroksid u konstruiranom galvanskom članku uskladišten u obliku adukta s ureom, provedeni su i eksperimenti kojima je cilj bio utvrditi utječe li prisutnost uree na brzinu reakcije H_2O_2 s ABTS-om. Prethodno opisana mjerenja ponovljena su u

prisutnosti 15-45 mg/mL uree, u inače identičnim uvjetima. Ustanovljeno je da prisutnost uree ne utječe ne brzinu oksidacije ABTS-a, kako to ilustriraju kronoamperometrijske krivulje prikazane na slici 7, na kojima je iz usporedbe s podacima prikazanim na slici 6 vidljivo da se uz prisutnost uree i bez uree u reakcijskoj smjesi u jednakom vremenskom intervalu postižu identične vrijednosti struje redukcije ABTS radikala. To upućuje na zaključak da urea ne utječe na reakciju oksidacije ABTS-a sa H_2O_2 .



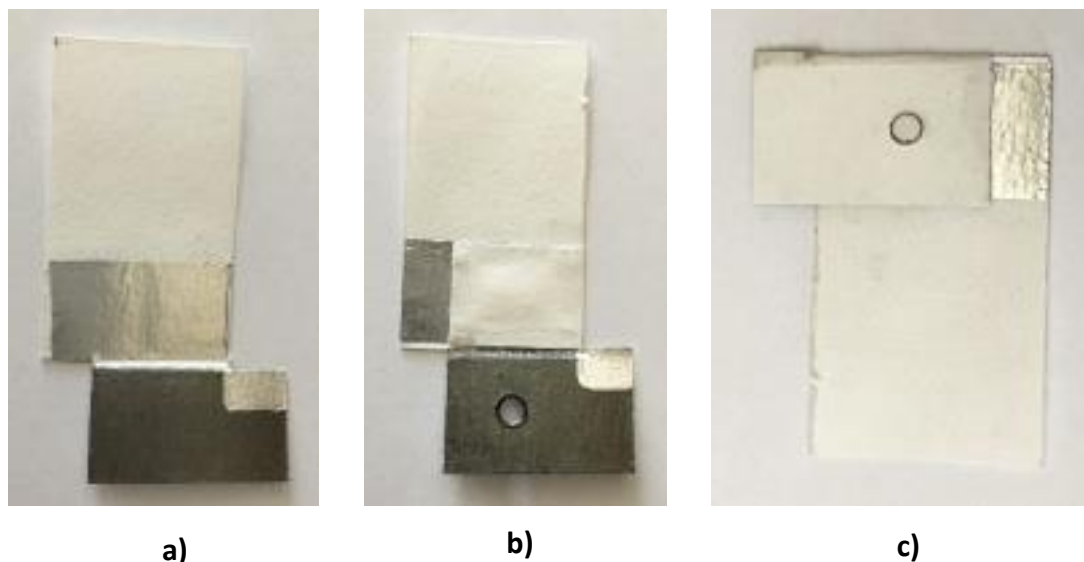
Slika 7. Kronoamperometrijske krivulje redukcije ABTS radikala nastalog tijekom oksidacije 2 mM ABTS-a vodikovim peroksidom, katalizirane željezovim(II) ftalocijaninom, u prisutnosti 15 mg/mL uree, pri pH a) 2,2 i b) 4,0.

3.3. Izrada i testiranje konstruiranog galvanskog članka

Na temelju istraživanja opisanih u prethodnom poglavlju zaključeno je da je za rad osmišljenog galvanskog članka potreban pH od otprilike 2 kako bi se reakcija oksidacije ABTS-a s vodikovim peroksidom u prisutnosti željezova ftalocijanina kao katalizatora odvijala primjerenom brzinom te kako bi se njome dobila maksimalna koncentracija ABTS radikala. To je nametnulo potrebu da se u smjesu komponenata potrebnu za rad galvanskog članka doda i kiselina, čije će prisustvo osigurati kiselost reakcijske smjese u članku. S obzirom na osnovnu zamisao da se sve komponente potrebne za rad galvanskog članka integriraju u konstrukciju članka u obliku krutina, kao kiselina je odabrana limunska kiselina. Limunska kiselina je krutina lako topljiva u vodi, neškodljiva je i ekološki prihvatljiva te je dovoljno jaka kiselina ($pK_{a,1} = 3,13$) da u dovoljno visokoj koncentraciji osigura pH reakcijskog medija od otprilike 2. Stoga je priređena smjesa od 10 mg limunske kiseline, 5 mg ABTS, 5 mg NaCl i

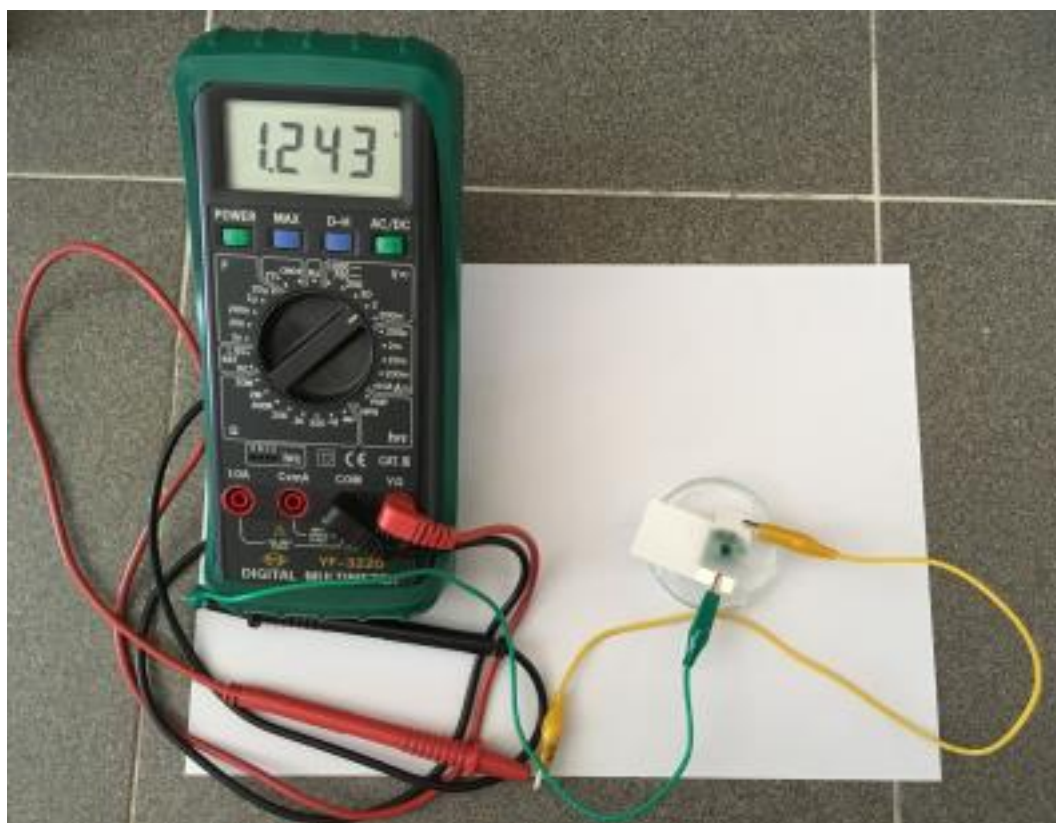
0,5 mg željezova ftalocijanina i homogenizirana u tarioniku. Tom je smjesom punjen katodni odjeljak konstruiranog galvanskog članka, dok je za punjenje anodnog odjeljka korištena smjesa priređena homogenizacijom 10 mg limunske kiseline, 1 mg urea peroksida i 5 mg NaCl. U obje smjese NaCl je dodan radi povećanja ionske vodljivosti.

Galvanski članak konstruiran je na način da je na filterskom papiru, koji je s donje strane bio laminiran polietilenskom folijom, nacrtana grafitna katoda dimenzija 15 x 25 mm, te do nje zalijepljena aluminijska folija kao anoda, također dimenzija 15 x 25 mm (slika 8.a). Na površinu aluminijske anode nanešeno je 2 mg prethodno opisane smjese limunske kiseline, urea-peroksida i NaCl te je preko katode zalijepljen filterski papir, pomoću dvostruko ljepljive trake koja se nalazila na rubovima papira (slika 8.b). Na analogan je način na grafitnu katodu, na kojoj je prethodno izbušena centralna rupa promjera 3 mm, nanešeno 2 mg smjese limunske kiseline, ABTS, željezova ftalocijanina i NaCl te također zaštićeno pokrovom od filterskog papira. Elektrode su preklopljene jedna preko druge i trajno zalijepljene dvostruko ljepljivom folijom (slika 8.c). Tako priređen članak spreman je za uporabu, pri čemu se članak stavlja u pogon dodatkom 100 μ L vode kroz otvor izbušen na grafitnoj katodi, vidljiv na slikama 8.b i 8.c.



Slika 8. Izgled konstruiranog galvanskog članka na papiru sa a) izrađenim elektrodama, b) deponiranom katodnom smjesom i papirnatim separatorom na aluminijskoj katodi te c) u potpunosti sklopljen članak.

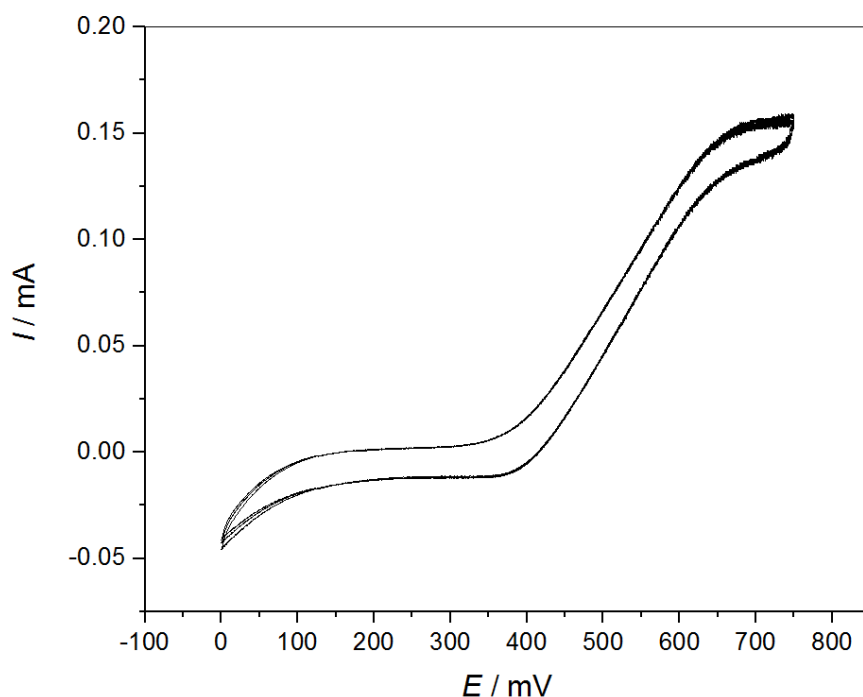
Testiranjem konstruiranog papirnato galvanskog članka (slika 9.) ustanovljeno je da maksimalni napon članka (tj. potencijal članka u uvjetima otvorenog kruga) iznosi između 1,10 i 1,25 V. U uvjetima opterećenja, ostvarenima spajanjem polova članka pomoću otpornika od 10 k Ω s ampermetrom u seriji, ustanovljeno je da struja članka raste tijekom prvih 10 minuta nakon pokretanja rada članka dodavanjem vode, te se zatim stabilizira na vrijednosti od otprilike 100 μ A tijekom sljedećih 30 minuta, nakon kojeg vremena počinje opadati. Drugim riječima, konstruirani članak u stanju je davati struju od približno 0,1 mA, uz napon od 1 V, tijekom perioda od otprilike 30 minuta. Ostvarene strujno-naponske performanse članka dostatne su za napajanje jednostavnijih elektroničkih sklopova izrađenih od suvremenih elektroničkih komponenata namijenjenih izradi uređaja s vrlo niskom potrošnjom energije (tzv. *MicroPower* komponente). S obzirom da se na većini papirnatih mikrofluidičkih analitičkih naprava mjerenje odvija u vremenu kraćem od 30 minuta, konstruirani članak svojom vremenskom stabilnošću također zadovoljava zahtjeve uporabe u papirnatim mikrofluidici.



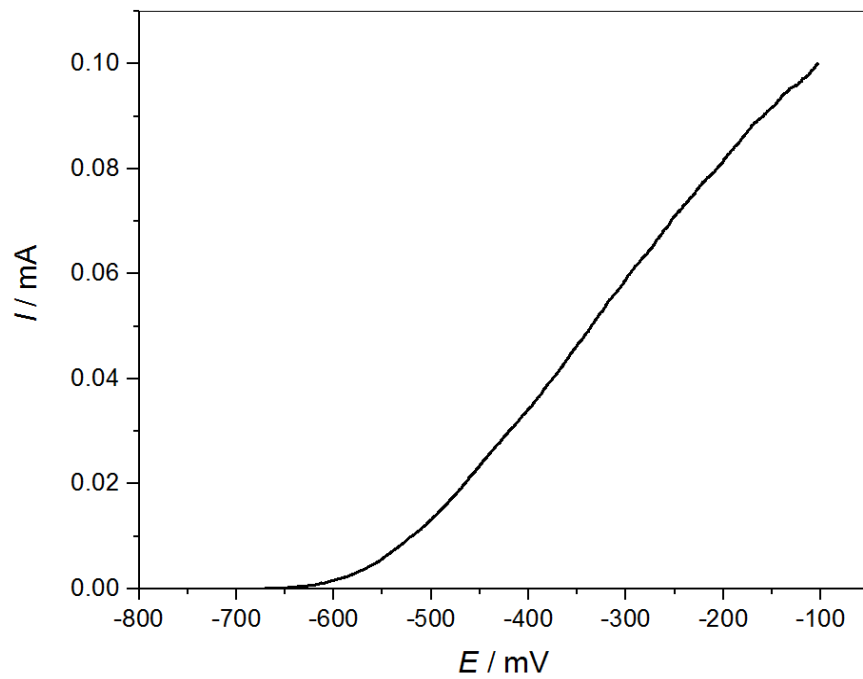
Slika 9. Konstruirani papirnati galvanski članak u pogonu. Jasno se uočava zelena boja ABTS radikala generiranog *in situ*, nakon dodavanja malog volumena vode u članak.

Izmjerene performanse članka dobro se slažu s očekivanima. Naime, voltametrijskim mjerenjima provedenima s ciljem određivanja formalnih potencijala redoks-parova $\text{ABTS}^{\bullet+}/\text{ABTS}$ te Al^{3+}/Al u mediju kakav je korišten kao elektrolit u konstruiranom papirnatom galvanskom članku pokazala su da formalni potencijal redoks-pare $\text{ABTS}^{\bullet+}/\text{ABTS}$ iznosi 0,523 V, a redoks-pare Al^{3+}/Al -0,630 V, kako je to vidljivo iz voltamograma prikazanih na slikama 10 i 11.

Maksimalni napon galvanskog članka u danim uvjetima jednak je razlici formalnih potencijala katode i anode, što u konkretnom slučaju iznosi $0,523 \text{ V} + 0,630 \text{ V} = 1,153 \text{ V}$. Izmjereni maksimalni napon članka od otprilike 1,10 do 1,25 V u dobrom je slaganju s tom teorijskom vrijednošću.



Slika 10. Hidrodinamički voltamogram 2 mM ABTS-a snimljen na rotirajućoj grafitnoj elektrodi u mediju koji je sadržavao 0,25 mol/L NaCl i 0,1 mol/L limunske kiseline.



Slika 11. Voltamogram snimljen tijekom anodne polarizacije aluminijske folije u mediju koji je sadržavao 0,25 mol/L NaCl i 0,1 mol/L limunske kiseline.

4. Zaključak

Istraživanja provedena u ovom radu pokazala su da se s uspjehom može izraditi papirnati galvanski članak s katodom od grafita i anodom od aluminijske anode, čiji se rad temelji na oksidaciji aluminijske anode i redukciji ABTS radikala generiranog *in situ* u članku, oksidacijom ABTS-a s vodikovim peroksidom u prisutnosti željezova ftalocijanina kao katalizatora.

Utvrđeno je da se spomenuta reakcija oksidacije ABTS-a vodikovim peroksidom efikasno ubrzava u prisutnosti željezova(II) ftalocijanina kao katalizatora pri vrijednostima pH manjima od 3.

Korištenjem urea peroksida kao čvrstog izvora vodikova peroksida te limunske kiseline za podešavanje kiselosti elektrolita, sve komponente potrebne za rad konstruiranog galvanskog članka (H_2O_2 , ABTS, ionski elektrolit i kiselina) moguće je pohraniti na papiru u obliku krutina, čime se omogućuje dugotrajno skladištenje članka prije uporabe. Papirnati galvanski članak u pogon se stavlja dodatkom malog volumena vode te pune performanse postiže u roku od 10 minuta.

Izrađeni papirnati galvanski članak u stanju je davati struju od približno 0,1 mA, uz napon od 1 V, tijekom perioda od otprilike 30 minuta, što ga čini prikladnim za napajanje potencijalnih papirnatih mikrofluidičkih analitičkih naprava s integriranim elektroničkim sklopovima za obradu signala i prikaz rezultata mjerenja. Pored toga, izrađeni papirnati galvanski članak je jeftin, jednostavan za izradu i prikladan za masovnu proizvodnju te se lako može integrirati u bilo koju papirnatu mikrofluidičku napravu. S obzirom da ne sadrži toksične i za okoliš štetne kemikalije, ekološki je prihvatljiv i lako se nakon uporabe može zbrinuti.

5. Literatura

1. Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368-373.
2. R. H. Müller and D. L. Clegg (1949). Automatic paper chromatography. *Analytical Chemistry* 21 (9), 1123-1125
3. Sia, S. K., Linder, V., Parviz, B. A., Siegel, A., & Whitesides, G. M. (2004). An Integrated Approach to a Portable and Low-Cost Immunoassay for Resource-Poor Settings. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(4), 498-502.
4. Martinez, A. W. (2011). Microfluidic paper-based analytical devices: From POCKET to paper-based ELISA. *Bioanalysis*, 3(23), 2589-2592.
5. Li, X., Ballerini, D. R., & Shen, W. (2012). A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. *Biomicrofluidics*, 6(1), 011301.
6. Carrilho, E., Martinez, A. W., & Whitesides, G. M. (2009). Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 81(16), 7091-7095.
7. Fu, E., Ramsey, S. A., Kauffman, P., Lutz, B., & Yager, P. (2010). Transport in two-dimensional paper networks. *Microfluidics and Nanofluidics*, 10(1), 29-35.
8. Osborn, J. L., Lutz, B., Fu, E., Kauffman, P., Stevens, D. Y., & Yager, P. (2010). Microfluidics without pumps: Reinventing the T-sensor and H-filter in paper networks. *Lab on a Chip*, 10(20), 2659.
9. Davidson, M. G., & Deen, W. M. (1988). Hindered diffusion of water-soluble macromolecules in membranes. *Macromolecules*, 21(12), 3474-3481.
10. Martinez, A., Phillips, S., Butte, M., & Whitesides, G. (2007). Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie*, 119(8), 1340-1342.
11. Cate, D. M., Adkins, J. A., Mettakoonpitak, J., & Henry, C. S. (2014). Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry*, 87(1), 19-41.
12. Park, T. S., Li, W., Mccracken, K. E., & Yoon, J. (2013). Smartphone quantifies Salmonella from paper microfluidics. *Lab on a Chip*, 13(24), 4832.
13. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407-412.
14. Erel, O. (2003). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*.

15. Espina, V., Woodhouse, E. C., Wulfkuhle, J., Asmussen, H. D., Petricoin, E. F., & Liotta, L. A. (2004). Protein microarray detection strategies: Focus on direct detection technologies. *Journal of Immunological Methods*, *290*(1-2), 121-133.
16. Niederländer, H. A., Beek, T. A., Bartasiute, A., & Koleva, I. I. (2008). Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1210*(2), 121-134.
17. Nelson, D.L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed.; W. H. Freeman & Co Ltd.: New York, 2005; Chapter 6
18. Secundo, F. (2013). Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chemical Society Reviews*, *42*(15), 6250.
19. Wei, H., & Wang, E. (2013). ChemInform Abstract: Nanomaterials with Enzyme-Like Characteristics (Nanozymes): Next-Generation Artificial Enzymes. *ChemInform*, *44*(38).
20. Gao, L., Zhuang, J., Nie, L., Zhang, J., Zhang, Y., Gu, N., . . . Yan, X. (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, *2*(9), 577-583.
21. André, R., Natálio, F., Humanes, M., Leppin, J., Heinze, K., Wever, R., . . . Tremel, W. (2010). V2O5 Nanowires with an Intrinsic Peroxidase-Like Activity. *Advanced Functional Materials*, *21*(3), 501-509.
22. Mu, J., Wang, Y., Zhao, M., & Zhang, L. (2012). Intrinsic peroxidase-like activity and catalase-like activity of Co3O4 nanoparticles. *Chemical Communications*, *48*(19), 2540.
23. Chen, W., Chen, J., Liu, A., Wang, L., Li, G., & Lin, X. (2011). Peroxidase-Like Activity of Cupric Oxide Nanoparticle. *ChemCatChem*, *3*(7), 1151-1154.
24. Su, L., Feng, J., Zhou, X., Ren, C., Li, H., & Chen, X. (2012). Colorimetric Detection of Urine Glucose Based ZnFe2O4 Magnetic Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, *84*(13), 5753-5758.
25. Zhang, X., Gong, S., Zhang, Y., Yang, T., Wang, C., & Gu, N. (2010). Prussian blue modified iron oxide magnetic nanoparticles and their high peroxidase-like activity. *Journal of Materials Chemistry*, *20*(24), 5110.
26. Kassaei, M., Masrouji, H., & Movahedi, F. (2011). Sulfamic acid-functionalized magnetic Fe3O4 nanoparticles as an efficient and reusable catalyst for one-pot synthesis of α -amino nitriles in water. *Applied Catalysis A: General*, *395*(1-2), 28-33.
27. Jiang, H., Chen, Z., Cao, H., & Huang, Y. (2012). Peroxidase-like activity of chitosan stabilized silver nanoparticles for visual and colorimetric detection of glucose. *The Analyst*, *137*(23), 5560.
28. Kazarinov, V. (1979). Some specific features of the metalloporphyrin/electrolyte interface and the kinetics of oxygen electroreduction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *100*(1), 225-232.

29. Chen, Q., Li, D., Zhu, Q., Zheng, H., & Xu, J. (1999). Application of iron-tetrasulfonatophthalocyanine as a new mimetic peroxidase in the determination of hydrogen peroxide with p-hydroxyphenylpropionic acid as a substrate. *Analytica Chimica Acta*, *381*(2-3), 175-182.
30. Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, *65*(3), 249-259.
31. Zagal, J. H. (1992). Metallophthalocyanines as catalysts in electrochemical reactions. *Coordination Chemistry Reviews*, *119*, 89-136..
32. Nguyen, T. H., Fraiwan, A., & Choi, S. (2014). Paper-based batteries: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, *54*, 640-649.
33. Ciniciato, G. P., Lau, C., Cochrane, A., Sibbett, S. S., Gonzalez, E. R., & Atanassov, P. (2012). Development of paper based electrodes: From air-breathing to paintable enzymatic cathodes. *Electrochimica Acta*, *82*, 208-213.
34. Leijonmarck, S., Cornell, A., Lindbergh, G., & Wågberg, L. (2013). Single-paper flexible Li-ion battery cells through a paper-making process based on nano-fibrillated cellulose. *Journal of Materials Chemistry A*, *1*(15), 4671.
35. Zhang, X., Lin, Z., Chen, B., Sharma, S., Wong, C., Zhang, W., & Deng, Y. (2013). Solid-state, flexible, high strength paper-based supercapacitors. *Journal of Materials Chemistry A*, *1*(19), 5835.
36. Kim, K., Lee, K. Y., Seo, J., Kumar, B., & Kim, S. (2011). Paper-Based Piezoelectric Nanogenerators with High Thermal Stability. *Small*, *7*(18), 2577-2580.

