

Papirnati mikrofluidički senzori

Pakušić, Doris

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:188579>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Doris Pakušić

7124/ BT

Papirnati mikrofluidički senzori

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

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

Zagreb, srpanj 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za Kemiju i biokemiju
Laboratorij za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Papirnatih mikrofluidički senzori

Doris Pakušić, 0058207372

Sažetak: Papirnatih mikrofluidički senzori predstavljaju inovativnu tehnologiju za manipulaciju malih volumena uzoraka i detekciju različitih vrsta analita. Cilj je takve tehnologije pružiti jeftine, bio-razgradive, lako prenosive uređaje, neovisne o skupoj instrumentaciji, a kojima će moći rukovati i neobučano osoblje. Cilj je ovog rada staviti papirnatih mikrofluidičke senzore u širi kontekst mikrofluidičkih uređaja, dati pregled prednosti i mana takve tehnologije, opisati najčešće korištene metode izrade papirnatih mikrofluidičkih uređaja kao i metode detekcije analita. Velik je dio rada posvećen bitnoj skupini takvih senzora, papirnatim mikrofluidičkim biosenzorima te njihovoj podskupini, papirnatim mikrofluidičkim enzimskim biosenzorima. Rad također obrađuje područja primjene te nove tehnologije i zapreke koje bi ona trebala prevladati kako bi iz laboratorija prešla u komercijalnu upotrebu.

Ključne riječi: mikrofluidika, senzori, detekcija, biosenzori, imobilizacija

Rad sadrži: 33 stranice, 8 slika, 40 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: 1. srpanj 2020

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 Biochemistry
Laboratory for general and inorganic chemistry and electroanalysis

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Paper microfluidic sensors

Doris Pakušić, 0058207372

Abstract: Paper based microfluidic sensors represent an inovative technology for handling small volumes of samples and analysis of different types of analytes. The goal of this technology is to provide devices that are inexpensive, biodegradable, portable, independent of expensive equipment and that can be handled by untrained personnel. The aim of this thesis is to place paper microfluidic sensors in the wider context of microfluidic devices, discuss their advantages and disadvanatges, describe the methods for their production as well as the methods for analyte detection. A considerable part of the thesis is dedicated to an important group of such sensors, paper microfluidic biosensors and their subgroup, paper microfluidic enzyme biosensors. The thesis also focuses on highlighting new technologies in the field of paper microfluidics as well as on the obstacles this technology needs to surpass in order to step out of the laboratory and becomes widely used.

Keywords: microfluidics, sensors, detection, biosensors, immobilization

Thesis contains: 33 pages, 8 figures , 40 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: Izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

Defence date: 1st of July 2020

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	1
2.1. Mikrofluidika i mikrofluidički uređaji.....	1
2.1.1. Fizikalne veličine bitne za opisivanje mikrofluidičkog toka	2
2.2. Papir kao supstrat za izradu mikrofluidičkih uređaja	3
2.2.1. Metode izrade papirnatih mikrofluidičkih uređaja	4
2.2.2. Priprema i nanošenje uzorka i reagensa na papirnati mikrofluidički uređaj	7
2.2.3. Metode detekcije kod papirnatih mikrofluidičkih uređaja	7
2.3. Papirnatih mikrofluidički biosenzori	9
2.3.1. Imobilizacija enzima na papirnatih mikrofluidičkih uređaja.....	9
2.4. Područja primjene papirnatih mikrofluidičkih uređaja	10
4. POPIS LITERATURE.....	13

1. UVOD

Papirnati mikrofluidički analitički uređaji, takozvani μ PADs razvijeni su radi pojednostavljenja postojećih analitičkih metoda, a cilj je takve tehnologije minimizacija potrebnih količina uzoraka, kemijskih reagensa, kao i redukcija potrebne infrastrukture prilikom medicinske dijagnostike. Navedeni uređaji ne zahtjevaju skoro nikakvu dodatnu, vanjsku infrastrukturu, iz razloga što je za tok tekućine na papiru potrebna samo kapilarna sila, a ne vanjska sila (Xia i sur., 2016; Martinez i sur. 2010). Glavna je zadaća takve tehnologije pružiti jeftine, bio-razgradive, prenosive dijagnostičke uređaje i posljedično razvitak *point-of-care* testova (testiranje na mjestu gdje se pacijentu pruža skrb), koji bi omogućili detekciju bolesti, kontrolu namirnica i različitih ekoloških parametara u nelaboratorijskim uvjetima (Yetisen i sur., 2013). Limitiran broj educiranih zdravstvenih djelatnika, medicinskih ustanova, financijski problemi koji onemogućuju nabavu adekvatne dijagnostičke opreme, problemi su sa kojima se suočavaju zemlje u razvoju, stoga bi dostupnost i komercijalizacija takvih testova značili i spašavanje brojnih ljudskih života (Xia i sur., 2016; Martinez i sur. 2010). Cilj je ovog rada staviti papirnate mikrofluidičke uređaje u širi kontekst mikrofluidičkih uređaja, dati pregled njihovih prednosti i mana, objasniti osnovne principe rada, te navesti i objasniti metode detekcije na kojima se zasniva rad takvih uređaja. Nadalje, veliki dio rada biti će posvećen papirnatim mikrofluidičkim enzimskim biosenzorima te problematici imobilizacije enzima na nosač od celuloze, u cilju biokemijske detekcije analita. Obzirom da papirnati mikrofluidički uređaji imaju obećavajuću dijagnostičku i analitičku ulogu u budućnost, u radu će biti riječ o potencijalnim područjima primjene takvih uređaja.

2. TEORIJSKI DIO

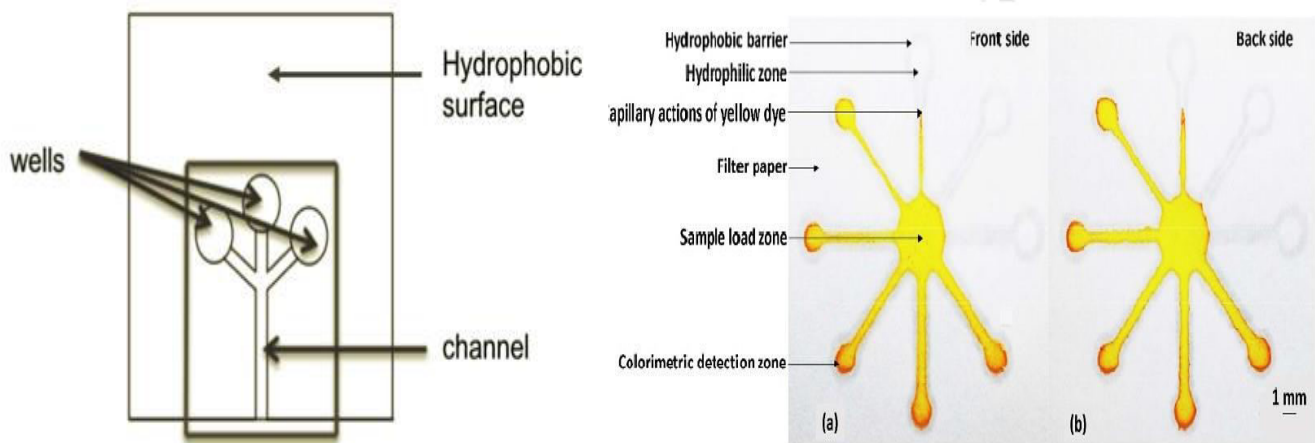
2.1. Mikrofluidika i mikrofluidički uređaji

Mikrofluidika je znanost koja se bavi proučavanjem i manipulacijom strujanja fluida u mikrolitarskim volumenskim područjima. Kako bi se stvorili uvjeti koji omogućuju korištenje tako malih volumena uzoraka i analita, na različitim se supstratima/platformama, kao što su: PDMS, silikon, papir, staklo, različitim tehnikama o kojima će riječ biti kasnije, kreiraju kanali i strukture hidrofobnih rubova, a veličina kanala varira od 10-100 μ m (Whitesides, 2006). Kanali služe za kontrolu toka i transport fluida. Na istu su platformu na kojoj se nalaze kanali često integrirani i elementi za detekciju, no kod nekih je uređaja ipak potrebna i vanjska infrastruktura kako bi se detektirao određeni analit (Prakash i sur., 2012). Uređaji takvih karakteristika nazivaju se mikrofluidički uređaji. Pojava kemijskog i biološkog oružja nakon hladnog rata, nagli razvitak molekularne biologije i genomike potaknuli su na razvitak mikrofluidičkih uređaja, jer oni sa velikom osjetljivošću mogu detektirati male volumene uzoraka. U svojem začetku, glavna je primjena spomenutih uređaja bila u analitici, ali danas se koriste i za različite kemijske sinteze. Mikrofluidički uređaji moraju stoga imati nekoliko osnovnih dijelova: dio za aplikaciju uzorka i reagensa, strukture koje omogućuju pokretanje fluida kroz uređaj te miješanje analita i reagensa (Slika 1.) i strukture za detekciju i purifikaciju (u slučaju da se radi o sintezi proizvoda) produkta (Whitesides, 2006). Korištenje izrazito malih količina reagensa i uzoraka (10^{-9} do 10^{-18} L), niski troškovi, mogućnost postizanja vrlo precizne detekcije i separacije, sa velikom rezolucijom i osjetljivošću, samo su neke od prednosti mikrofluidičkih uređaja u odnosu na klasične kemijske senzore. Mikrofluidika i mikrofluidički uređaji u teoriji imaju više prednosti nego inače, stoga se danas intenzivno istražuju te se teži razviti što jeftinijih i jednostavnijih uređaja, koji će objedinjavati karakteristike bio-razgradivosti, lake prenosivosti, niske cijene produkcije i detekcije. Nadalje, nekoliko koraka dijeli takve uređaje od komercijalizacije-visoka cijena njihove proizvodnje te nemogućnost da needucirano osoblje (osobe koje nisu molekularni biolozi, fizičari, doktori) u nelaboratorijskim uvjetima može rukovati takvim uređajima te samostalno interpretirati rezultate analize. Nažalost, najviše svjetskih zdravstvenih problema dolazi iz zemalja u razvoju, stoga bi u zemljama, u kojima nema puno educiranih zdravstvenih djelatnika, dostupnost takvih uređaja primjerice omogućila laku detekciju infektivnih bolesti, adekvatno tretiranje pacijenta i posljedično spašavanje brojnih života. Papir se kao materijal već dugo upotrebljava u analitici, a

neki od najkorištenijih papirnatih dijagnostičkih i analitičkih uređaja su primjerice: lakmus papir za mjerenje bazičnosti i kiselosti otopina, test za trudnoću, trakice za analizu urina (kiselost, sadržaj albumina i šećera u urinu). Takvi se testovi nazivaju: lateral flow test strips (Liu i sur., 2014). Radi se o trakicama od papira na koji su imobilizirani reagensi, a kada se na takvu trakicu kapne uzorak, najčešće dolazi do imunološke reakcije i promjene boje papira. Za očitavanje rezultata potrebno je par minuta. Rukovanje i očitavanje rezultata su kod spomenutih uređajima vrlo jednostavni, stoga nije neobično da je papir u vrijeme kada je mikrofluidika kao znanost dosegla određen stupanj razvoja, uočen kao idealna platforma za izradu nove generacije analitičkih uređaja- papirnatih mikrofluidičkih senzora. Papirnatih mikrofluidički senzori za razliku od običnih papirnatih trakica za dijagnostiku i analizu, omogućuju analizu više uzoraka u isto vrijeme (Whitesides, 2006).

Transport se fluida kroz mikrofluidičke kanale može ostvariti na *pasivan* i *aktivan* način. Pasivan način koristi karakteristike nosača, dok se u slučaju papira, pasivno pokretanje fluida ostvaruje difuzijom ili površinskom napetošću, a aktivno se pokretanje fluida ostvaruje centrifugalnom silom, elektrokinetičkim pumpama ili tlačnim pumpama (Fiorini i Chiu, 2005). Tok fluida na papirnatim supstratima ne ovisi samo o geometriji kanala, već i o različitim karakteristikama celuloznog materijala- vrsti, duljini, promjeru, orijentaciji i broju vlakana po jedinici volumena (gustoći vlakana) te o njihovoj sposobnosti bubrenja. Danas se još uvijek istražuje utjecaj tih veličina na tok fluida kroz kanale (Chanon i sur., 2019).

Proučavajući tok fluida na mikrometarskoj skali, uočeno je da za gibanje fluida kroz kanale mikrometarskih dimenzija vrijede drugačije zakonitosti nego za fluide koji struje kroz makroskopske kanale. Veći omjer površine i volumena, sile difuzije, otpor strujanja fluida, laminarni tok, te površinska napetost, bitne su karakteristike mikrofluidičkih sustava (Beebe i sur., 2002). Neke od veličina koje treba uzeti u obzir prilikom proučavanja zakonitosti mikrolitarskog svijeta, te toka fluida po papirnatom mediju, dane su i opisane u nastavku teksta.



a)

b)

Slika 1. a) Skica papirnatom mikrofluidičkom uređaju (Mendez i sur., 2019) (b) Papirnati mikrofluidički senzor za kolorimetrijsku detekciju toksičnih iona. Slika može dobro poslužiti kao shema općenite građe papirnatih mikrofluidičkih uređaja (Li i sur., 2016).

2.1.1. Fizikalne veličine bitne za opisivanje mikrofluidičkog toka

Reynoldsov je broj bezdimenzijska veličina koja opisuje režim strujanja fluida, a općenita je podjela režima strujanja na laminaran, prijelazan i turbulentan. Kod laminarnog toka fluida, brzina strujanja fluida u vremenu točno je definirana funkcija, te ne dolazi do miješanja dva fluida koji teku jedan pored drugoga, no može doći do difuzije među rubnim dijelovima fluida (Beebe i sur., 2002). U makroskopskom svijetu fluida, sile inercije igraju bitniju ulogu od sila viskoznosti, dok je situacija u mikrofluidičkim sustavima drugačija. Reynoldsov broj stoga predstavlja odnos inercijskih i viskoznih sila nekog sustava. (Whitesides, 2006.), a kada je Reynoldsov broj manji od 2300, radi se o laminarnom strujanju. Laminaran je tok bitno okarakterizirati u kontekstu mikrofluidike iz razloga što je tok fluida kroz mikrokanale skoro uvijek laminaran. Kaotično je gibanje čestica fluida, kao i vrijednost Reynoldsovog broja iznad 2300, karakteristika turbulentnog strujanja. Pri takvom strujanju nije moguće točno određivanje pozicije čestice toka fluida u vremenskom interval (Beebe i sur., 2002).

Reynoldsov je broj moguće izračunati pomoću jednostavne formule (Beebe i sur., 2002), pri čemu ρ označava gustoću fluida, V karakterističnu brzinu strujanja fluida kroz kanale, a D_t je hidraulički promjer fluida (Beebe i sur., 2002).

$$\Re = \frac{\rho \cdot V \cdot D_t}{\mu} \quad (1)$$

Bitno je također okarakterizirati i proces difuzije koji dolazi do izražaja na mikroskali. Čestice se Brownovim gibanjem raspoređuju u određenom volumenu, sve dok koncentracija čestica u svakom dijelu volumena ne bude jednaka. Prvi i drugi Fickov zakon opisuju osnovne pojave kod procesa difuzije. Prvi Fickov zakon (2) daje ovisnost toka čestice N , o gradijentu koncentracije $\frac{dc}{dx}$ i koeficijentu difuzije D . Koeficijent difuzije ovisi o vrsti čestice koja se giba i mediju u kojem se difuzija događa. Drugi Fickov zakon (3) daje ovisnost promjene koncentracije u vremenu, o drugoj derivaciji koncentracije po koordinati u smjeru koje se odvija process difuzije (hrvatska enciklopedija, n.p.).

$$N = -D \cdot \frac{dc}{dx} \quad (2)$$

$$\frac{dc}{dt} = D \cdot \frac{d^2c}{dx^2} \quad (3)$$

Otpor fluida, viskoznost i kapilarna sila, veličine su koje također dolaze do izražaja u sustavima mikroskopske veličine. Beebe i sur. (2002) u svom radu navode dvije jednadžbe koje su bitne za matematičko opisivanje otpora koji kanal pruža fluidu tijekom toka. Prva jednadžba (4) koristi se za izračunavanje otpora koji kanal oblika valjka (najtipičniji oblik kanala) pruža fluidu, a druga (5) za izračunavanje protok fluida kroz mikrolanale.

$$R = \frac{8 \cdot \mu \cdot L}{\pi \cdot r^4} \quad (4)$$

$$Q = \frac{\Delta P}{R} \quad (5)$$

U prvoj jednadžbi za otpor, μ predstavlja viskoznost fluida, L duljinu kanala, a r promjer kanala; u drugoj jednadžbi za protok, Q predstavlja protok fluida, ΔP pad tlaka tijekom prolaska kroz kanal, a R otpor kanala. Nadalje, Beebe i sur. (2002) dali su dobar primjer koji ukazuje na važnost omjera površine i volumena u mikrofluidičkim kanalima. Kao primjer, Petijeva zdjelica promjera 35 mm, do pola prekrivena vodom (2,5 ml), ima omjer površine i volumena $4,2 \text{ cm}^{-1}$, dok mikrokanal 50 μm visine, 50 μm širine, 30 mm dužine, 75 nL volumena ima omjer površine i volumena 800 cm^{-1} . Površinska napetost također dolazi do izražaja u mikrofluidičkim sustavima, a ona je po definiciji sila koja je potrebna da se poveća površina tekućine i ubraja se u sile kohezije. Sile se kohezije javljaju između istovrsnih molekula, tj. u ovom slučaju, molekula fluida koji struje kroz mikrofluidičke kanale. Sa druge strane, sile adhezije javljaju se između molekula fluida i celuloznih vlakana papira. Kada se na papir kapne tekući uzorak, sile adhezije dominiraju nad silama kohezije, te kapilarna sila dolazi do izražaja. Spomenuti je fenomen zajedno sa razlikom tlaka između namočenog dijela papira i suhog dijela papira, pokretačka sila za neprekidan protok tekućine (Beebe i sur., 2002). Viskoznost fluida u nekom trenutku tijekom prolaska fluida kroz kanale, počinje predstavljati otpor kapilarnoj sili, pritom smanjujući brzinu kojom fluid teče kroz kanale. Lucas-Washburnova jednadžba prikazuje odnos duljine puta $l(t)$ kojeg fluid prođe, u vremena t (s). Γ u jednadžbi predstavlja međufaznu napetost (N m^{-1}), r je kapilarni radijus (m), Θ je kut kontakta fluida i papira, a μ je viskoznost fluida (N s m^{-1}). Dana jednakost (5) vrijedi u slučaju da je struktura papira kemijski homogena, da su utjecaji gravitacije zanemarivi te da se širina kanala ne mijenja (Chanon i sur., 2019).

$$l(t) = \sqrt{\frac{\Gamma \cdot r \cdot t \cdot \cos\theta}{2 \cdot \mu}} \quad (6)$$

2.2. Papir kao supstrat za izradu mikrofluidičkih uređaja

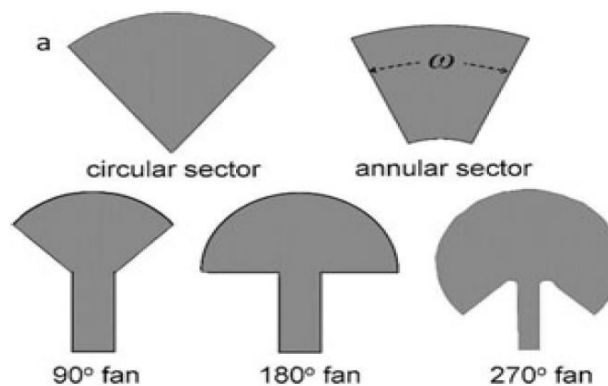
Danas su razvijeni različiti uređaji i testovi za brzu i efikasnu dijagnostiku, no zbog visoke cijene proizvodnje, kompleksnosti samih uređaja, ovisnosti o laboratorijskim uvjetima i detekcije koja zahtjeva educirano osoblje, nisu pogodni za korištenje u zemljama u razvoju. Rana je dijagnostika izrazito bitna, kako u prevenciji raznih bolesti, sprječavanju širenja infektivnih bolesti tako i u detekciju kontaminanata u

vodi ili hrani. Iz navedenih se razloga puno nade polaže u papir, kao supstrat za izradu mikrofluidičkih biosenzora. Papirnati mikrofluidički uređaji naravno neće zamijeniti sve *point-of-care* testove, ali će biti dobra alternativa onda kada konvencionalni testovi ne mogu zadovoljiti uvjete (Land i sur., 2019). Većina konvencionalnih testova dolazi pojedinačno zapakirana u plastičnu i aluminijsku ambalažu, radi mehaničke zaštite i očuvanja vlažnosti. Uz sam dijagnostički uređaj, u pakiranju dolaze i različiti reagensi sa svojim ambalažama. Svake se godine u Africi upotrijebi samo sto milijuna tako pakiranih testova za HIV i malariju, a takav se otpad adekvatno ne zbrinjava, te predstavlja ekološki problem. Papir je hidrofilan, porozan, jeftin (jednostvni μ PAD mogu se izraditi za manje \$0.01), biološki lako razgradiv materijal (Martinez i sur., 2010), dobrih mehaničkih svojstava-fleksibilan, tanak i lagan, kemijski i biološki inertan, te iz tog razloga predstavlja idealnu platformu za fabrikaciju mikrofluidičkih kanala i imobilizaciju reagensa (Akyazi i sur., 2017). Njegova porozna i nitasta struktura omogućuju nekoliko pogodnosti: kretanje fluida po papiru ostvaruje se bez upotrebe vanjskih sila, papir ima veliku sposobnost apsorpcije tekućine, koja se može iskoristiti za skladištenje reagensa u njegovoj strukturi, permeabilan je za zrak, čime je riješen problem zadržavanja zraka u njegovoj strukturi, ima veliki omjer površine i volumena te je pogodan za imobilizaciju veće količine reagensa, dok njegova filamentozna struktura omogućuje filtraciju uzorka (Akyazi i sur., 2017). Određeni papirnati mikrofluidički uređaji ipak zahtijevaju vanjski izvor energije, koji bi omogućilo napajanje nekih komponenti uređaja, stoga se danas istražuju različite baterije (fluidičke baterije) ili solarne ćelije, koje se mogu isprintati na papir (Thom i sur., 2012). Fluidičke baterije mogu generirati dovoljno struje za napajanje UV LED lampe koja je potrebna kod fluorescencijske detekcije, te generirati dovoljno struje i za elektrokemijsku detekciju, a o metodama detekcije kod papirnatih mikrofluidičkih uređaja će biti riječ kasnije u radu. Intenzivno se istražuje i printanje drugih struktura na papir, kao što su antene, elektrode, ventili i sklopke. Sve bi navedene pozitivne strane tehnologije na papiru omogućile da se papirnati mikrofluidički uređaji proizvode u siromašnim zemljama, umjesto da se testovi uvoze iz zapadnih zemalja (Land i sur., 2019). Bitno je napomenuti da je filter papir pogodniji za izradu mikrofluidičkih uređaja od običnog papira, iz razloga što običan papir slabije apsorbira vodu, te se prije upotrebe treba oksidirati u kisikovoj plazmi ili tretirati surfaktantima kako bi se omogućio neometani tok fluida (Lu i sur., 2009).

Značajna je mana papirnatih mikrofluidički uređaja, posljedica izotropnosti papira (Li i sur., 2010). Spomenuta karakteristika papira onemogućuje potpunu kontrolu toka fluida kroz mikrofluidičke kanale i predstavlja prepreku na putu prema komercijalizaciji takvih uređaja (Akyazi i sur., 2017). Mnogi znanstvenici danas streme razvitku jednostavnijih metoda za manipulaciju strujanja fluida kroz kanale na

papiru obzirom da prethodno razvijene metode spomenute u radu od Akyazi i sur.(2017) nisu dovoljno ekonomične za komercijalizaciju takvih uređaja u siromašnim zemljama. Chanon i sur.(2019) daju pregled nekoliko aktualnih metoda za kontroliranje toka fluida, među kojima se jedna zbog svoje jednostavnosti posebno ističe. Riječ je o kontroli toka, manipulacijom geometrije kanala (Slika 2.). Stabiliziran tok fluida tada opisuje Darcyeva jednadžba (7) u kojoj Q predstavlja volumetrijski tok fluida (ms^{-1}), κ permeabilnost papira (m^2), A je površina poprečnog presjeka papira na kojem se nalaze kanali (m^2), ΔP je razlika tlaka (Nm^{-2}) po dužini kanala L (m). Dana jednakost vrijedi u slučaju da je kinetička energija sustava zanemarivo mala, da celulozna vlakna imaju kružni presjek, te u slučaju da su kanalići na papiru ravni, a ne zavijeni. Bitno je imati na umu da dana jednadžba opisuje idealni tok fluida, koji je u realnim uvjetima drugačiji. Navedena jednadžba međutim može poslužiti kao dobra aproksimaciju realnog sistema (Chanon i sur., 2019).

$$Q = \frac{-\kappa \cdot A \cdot \Delta P}{\mu \cdot L} \quad (7)$$



Slika 2. Prikaz različitih geometrijskih oblika kanala, kojima se može postići stabilan tok fluida (Chanon i sur., 2019).

2.2.1. Metode izrade papirnatih mikrofluidičkih uređaja

Papirnatih mikrofluidičkih uređaja mogu se proizvesti 2D (Fu i sur., 2010) i 3D metodama (Martinez i sur., 2010), a odabir metode ovisi o željenoj kompleksnosti uređaja i njegovoj budućoj dijagnostičkoj aplikaciji (Xia i sur., 2016). Zbog ograničenog volumena rada, u nastavku teksta biti će riječ samo o 2D metodama izrade papirnatih mikrofluidičkih uređaja. Općenito, u procesima izrade papirnatih mikrofluidičkih uređaja, na papir se nanosi hidrofobna tvar/hidrofobni reagens. Pomoću hidrofobnog se reagensa na papiru mogu izraditi različite forme, ali se iapk najčešće izrađuju forme kanalića. U slučaju izrade kanalića na papiru, "linije" su hidrofobnog reagensa međusobno paralelne, a između "linija" se nalazi papir, tj. hidrofilna regija. Tako, na papir nanešena hidrofobna tvar predstavlja barijeru i definira tok hidrofilne otopine/analita (Martinez i sur.,2010). Pokrenuta primarno kapilarnom silom, otpina analita kreće se između dvije hidrofobne linije koje formiraju kanal ili određenu strukturu (Xia i sur., 2016). Kao što je već prije spomenuti, papirnatih mikrofluidičkih uređaja za razliku od običnih *lateral flow strip* testova, omogućuju analizu više uzoraka u isto vrijeme.

Kod metoda izrade hidrofobnih regija na papiru, između hidrofobnog reagensa i papira može i ne mora doći do kemijske reakcije, stoga se metode *hidrofobiziranja* papira dijele u tri podkategorije. Pore na papiru mogu se fizički blokirati foto-osjetljivim lakom, hidrofobni se reagens može adsorbirati na površinu papira (vosak, polistiren, komercijalna tinta) ili se celulozne niti papira mogu kemijski modifikirati (Li i sur., 2012). U kemijskoj reakciji hidrofobnog reagensa (na primjer: alkil keten dimer ili alkenil keten dimer-AKD) sa celulozom, najčešće dolazi do reakcije esterifikacije između reaktivnih funkcionalnih grupa reagensa sa $-OH$ skupinama celuloze, čime dugački hidrofobi lanci AKD-a daju celuloznim vlaknima hidrofoban karakter (Li i sur., 2010). Xia i sur. (2016) navode osam tehnika za izradu hidrofoobnih kanala na papiru: (1) printanje voskom u masnom tisku (2) tintni pisač (inkjet printer), (3) fotolitografija, (4) fleksografski tisak, (5) tretman plazmom, (6) tretman laserom,(7) mokro jetkanje, (8) sitotisak voskom.

Printanje voskom u masnom tisku

Printanje voskom je jednostavna, brza, ekološki prihvatljiva metoda (nema korištenja organskih ostapala i ostalih reagensa) koja zahtjeva samo nekoliko koraka za provođenje. Iz razloga što su obje sirovine, vosak i papir, jeftine, postupak je vrlo ekonomičan (Lu i sur., 2010). Potencijalne mane takve metode kreiranja hidrofobnih kanala na papiru dolaze do izražaja prilikom duljeg skladištenja voska na

sobnoj temperaturi. Vosak se vremenom može otopiti te može doći do promjene širine/visine hidrofobnih kanala na papiru, a difuzija voska u uzorak može promijeniti kemijska svojstva uzorka (Yetisen i sur., 2013). Lu i sur. (2009) navode tri tehnike za stvaranje hidrofobnih regija na papiru pomoću voska: (1) pomoću olovke sa voskom (voštane bojica), (2) *inkjet* printerom nakon kojeg slijedi prekrivanje nastalog uzorka voštanim bojama (3) direktnim printanjem pomoću printera s voskom.

Pomoću olovke od voska kreira se željeni uzorak na obje strane filter papira; papir se potom stavi u sušionik na otprilike 150 °C, na 5 min. Vosak će se na toj temperaturi otopiti te će penetrirati papir, zahvaljujući poroznoj strukturi papira, pritom stvarajući hidrofobne kanale. Cijeli je postupak gotov za 5-10 min (Lu i sur., 2009). Druga metoda koristi tintni pisača (*inkjet* printer). Na računalu se prvo dizajnira željeni uzorak te se uzorak na papir isprinta pomoću printera (HP LaserJet 1000 series). Preko uzorka se zatim sa obje strane papira, još jednom prođe voštanom bojicom. Finalno se papir sa uzorkom stavi u pećnicu, na 150°C, kako bi se vosak otopio i penetrirao kroz papir. Opisana je metoda skuplja za provedbu od prve spomenute metode, ali je pogodna za reprodukciju kompliciranijih uzoraka na papiru. Treća metoda koristi printer s voskom (Primjer printera: FUJI XEROX Phaser 8560DN, Japan; printer resolution: 2400 dpi x 2400 dpi), kako bi reproducirala željeni uzorak na filter papir. U tom se postupku ne koristi voštana bojica nakon printanja uzorka printerom. Papir se nakon printanja stavi u pećnicu, kako bi se vosak otopio i penetrirao kroz papir. Što je temperatura u pećnici viša, vosak će u kraćem vremenu penetrirati kroz papir, a bitno je i pripaziti da temperatura ne bude preniska, jer u tom slučaju neće doći do penetracije voska. Temperatura na kojoj dolazi do topljenja i penetracije voska, ovisi o vrsti voska upotrijebljenog u postupku. Papir sa hidrofobnim kanalima od voska, spreman je za upotrebu nakon što se vosak ohladi. Ta je metoda izrazito efikasna (jedan takav printer u 1 min isprinta 30 A4 stranica sa određenim uzorkom), jednostavna i relativno jeftina (najveći trošak predstavlja sam uređaj, te je iz toga razloga atraktivna za proizvodnju *point of care* testova (Lu i sur., 2009).

Tintni pisač(Inkjet printer)

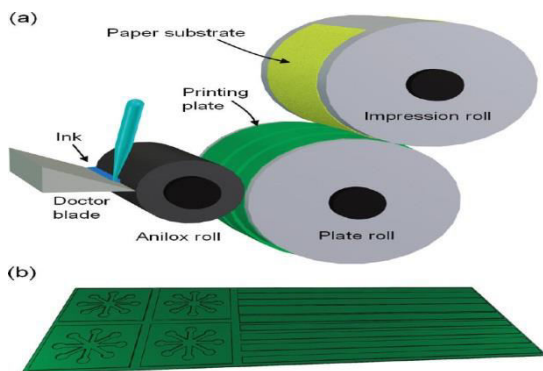
Takav način printanja omogućuje precizno pozicioniranje biomolekula i indikatorskih reagenasa u mikrofluidičke kanale (Xia i sur., 2016). Za razliku od prijašnjih metoda, printanje se provodi na papiru od čiste celuloze, a pomoću silikonskih smola i *inkjet* printera, kreiraju se hidrofobne barijere na papiru. Velika prednost *inkjet* printanja jest što koriste silikonske smole koje surfaktanti ne mogu razgraditi, za razliku od voska, koji je podložan razgradnji. Ta je karakteristika *inkjet* printera bitna, obzirom da se surfaktanti često koriste u biološkim testovima (Rajendra i sur., 2014).

Fotolitografija

Površina se papira prvo tretira fotorezistom, te se potom izloži djelovanju UV svjetla, kroz masku koja na sebi ima određeni uzorak. Oblik uzorka određuje oblik hidrofobnih kanala na papiru. Kada se maska ukloni, dobiju se željeni oblici kanala na papiru. Fotolitografija koristi svjetlost, kako bi prenijela željeni uzorak sa fotomaske na fotoosjetljivi, kemijski fotorezist na papiru. Navedena metoda zahtjeva skupu opremu, veliki broj koraka za provedbu stoga nije pogodna za proizvodnju velike količine papirnatih mikrofluidičkih uređaja (Akyazi i sur., 2018).

Fleksografski tisak

U ovoj se metodi izrade hidrofobnih struktura na papira, fleksografskim tiskom (Slika 3.) na papir aplicira polistiren, koji tvori hidrofobne barijere, koje djelomično ili potpuno penetriraju kroz debljinu papira. Pomoću te metode, moguće je kreirati izrazito uske kanale što je pogodno, jer se smanjuje količina korištenih reagensa (Olkonnen i sur., 2010).



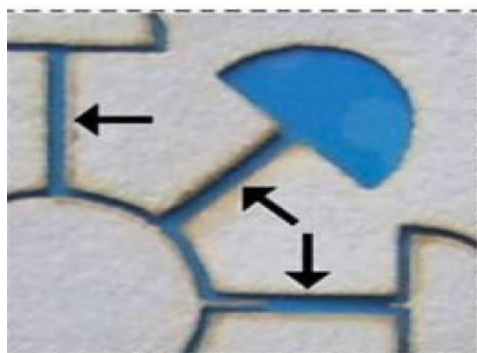
Slika 3. (a) Shematski prikaz fleksografskog tiska. (b) Uzorci na ploči definiraju oblik hidrofobnih kanala na papiru (Olkonnen i sur., 2010).

Tretman plazmom

U ovoj se metodi papir prvo sillanizira sa oktadecil-triklorsilanom (OTC) te cijela njegova površina postaje hidrofobna. Maska određenog uzorka, koji definira oblik i položaj kanala, pozicionira se iznad papira, te se OTC-papir tretira plazmom. Regije OTC-papira koje su izložene djelovanju plazme, postaju hidrofilne (kanali), jer se hidrofobni OTC djelovanjem plazme degradira (Yan i sur., 2014 navedeno u Xia i sur., 2016).

Tretman laserom

Kod tretmana papira laserom, u cilju izrade hidrofobnih kanala, u programu na računalu izradi se uzorak koji se potom laserom izreže na papiru. Toplina koju laser proizvede izgorit će papir, te će nastati udubljeni hidrofилni kanali (Slika 4.). Metoda je vrlo jednostavna jer ima praktički samo jednu operaciju. Tijekom postupka, bitno je optimirati jačinu struje i brzinu kojom laser radi, kako bi se dobili kanali iz kojih tekućina neće difundirati na ostatak površine papira (Nie i sur., 2013).



Slika 4. Mikrostruktura na papiru, dobivena laserskim postupkom. Strukture na koje pokazuju strelice su udubljenja u papiru nakon laserskog tretmana (Nie i sur., 2013).

Mokro jetkanje

Takav postupak izrade hidrofobnih kanala na papiru ima dva koraka. Površina papira prvo se tretira trimetoksi (oktadecil) silanom, te postaje hidrofobna. Maska određenog uzorka natopi se vodenom otopinom NaOH-a i 30 %-tnog glicerola. Maska se položi na hidrofoban papir, te navedeni reagensi na maski otope/nagrizu trimetoksi (oktadecil) silan. Dijelovi na kojima se nalazi maska zatim postaju hidrofилni, dok dijelovi na kojima nije bila maska postaju hidrofobni. Hidrofилni kanali i detekcijske zone definirane su hidrofobnim barijerama (Xia i sur., 2016).

Sitotisak voskom

U ovoj se metodi kreiranja hidrofилnih kanala, na papir položi ploča/uzorak sa prorezima te se na nju položi vosak. Papir sa pločom i voskom stavi se na zagrijanu površinu, a vosak se otopi te prolazi kroz proreze, na taj način definira hidrofobne kanale na papiru. Ovaj je postupak vrlo jednostavan jer ne zahtjeva kompliciranu infrastrukturu, UV svjetlo ili organska otapala, te iz tog razloga idealan za proizvodnju μ PADs-a u slabo razvijenim zemljama (Xia i sur., 2016).

2.2.2. Priprema i nanošenje uzorka i reagensa na papirnati mikrofluidički uređaj

Većina se uzoraka prije nanošenja na papir mora pravilno prirediti, jer bi određene tvari u uzorku mogle interferirati tijekom mjerenja. Za precizno su provođenje analize izrazito bitni vrijeme od uzimanja do aplikacije uzorka te volumen uzetog uzorka. Kod analize krvi, filter papir na kojem se nalaze kanalići, *in-situ* može služiti kao filtarsko sredstvo koje odvaja krvnu plazmu od eritrocita. Većina bioloških uzoraka je nažalost kompleksnija od uzoraka krvi te zahtjevaju odvajanje specifičnih biomarkera od ostalih komponenti uzorka. Primjerice, imunomagnetska se separacija koja koristi magnet na koji kovalentno može biti vezan antigeni, specifičan za određeni biomarker, može koristiti za izdvajanje određenih biomarkera ili koncentriranje uzorka. Reagensi koji će reagirati sa uzorkom, različitim se tehnikama skladište na papiru. Na primjer, reagens se može skladištiti na papiru, te se aktivirati rehidracijom papira. Takav je način skladištenja reagensa pogodan samo za one reagense koji su stabilni na suhom papiru. Uzorak se potom aplicira na hidrofilni dio kanala, a najčešće se koriste pipete sa jednokratnim nastavkom. Danas se istražuju ekološki prihvatljivije i jednostavnije metode za nanošenje uzorka na papir (Land i sur., 2019).

2.2.3. Metode detekcije kod papirnatih mikrofluidičkih uređaja

Detekcija koja ne zahtjeva kompliciranu opremu, infrastrukturu, educirano osoblje te omogućuje da uređaj bude lako prenosiv, malen, danas predstavlja veliki izazov, stoga mnogi istraživači iz područja mikrofluidike streme razvitku metoda detekcije spomenutih karakteristika. U nastavku teksta, biti će nabrojane najkorištenije metode detekcije, te opisane njihove najbitnije karakteristike (Akyazi i sur., 2018). Kolorimetrijska detekcija, elektrokemijska detekcija, fluorescencija, kemiluminiscencija (CL), elektrokemiluminiscencija (ECL) te fotoelektrokemijska detekcija (Xia i sur., 2016) neke su od najkorištenijih metoda detekcije. Danas su razvijeni različiti hidrofobni materijali (tinte) osjetljivi na promjene temperaturu i tlaka, što omogućuje jednostavnu i jeftinu integraciju senzora na papirnati supstrat (Land i sur., 2019).

Kolorimetrijska detekcija

Papir je izvrstan medij za kolorimetrijsku detekciju, jer bijela boja papira omogućuje dobar kontrast u slučaju da u enzimskoj ili kemijskoj reakciji dolazi do promjene boje (Martinez i sur.,2010). Osoba koja očitava rezultat, može potvrditi postojanje ili nedostatak određenog spoja u uzorku ili prema intenzitetu obojenja može pretpostaviti o kojoj koncentraciji detektiranog spoja se radi, obzirom da je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji analita u uzorku. Takva detekcija je stoga semi-kuantitativna (Cate i sur, 2014), a mana je kolorimetrijske detekcije nemogućnost potpuno preciznog očitavanja rezultata zbog nehomogene distribucije boje na papiru (Slika 5.). Metoda se lako može kvantificirati, izradom baždarnog dijagrama, korištenjem ručnog čitača sa bojama ili mobilnog telefona. Kolorimetrijska detekcija je najusvojenija metoda detekcije kod $\mu PADS$ -a isključivo zato jer ne zahtjeva dodatnu operemu za izvedbu (Yetisen i sur., 2013). Iz navedenih razloga postoji i veliki broj aplikacija kolorimetrijske detekcije, kao na primjer: u detekciji glukoze pomoću imobiliziranih enzima glukoza oksidaze i oksidaze iz hrena, detekciji proteina i DNA-biomarkera (Cate i sur., 2014) te detekciji aktivnih farmakoloških supstanci u lijekovima protiv tuberkuloze (Weaver i sur., 2013).

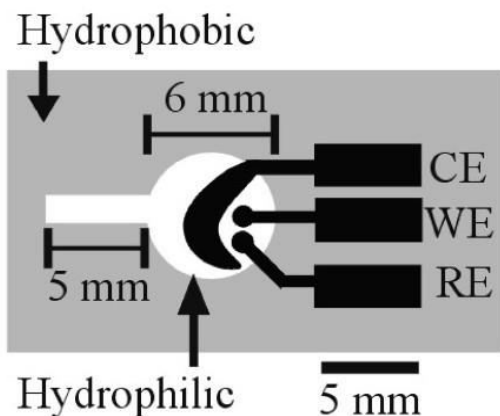


Slika 5. Intenzitet crvene boje slabiji je na krajevima kanala (Bruzewicz i sur., 2008)

Elektrokemijska detekcija

Papirnatih analitičkih uređaja sa elektrokemijskom detekcijom, $ePADs$ -i, pružaju stabilniju detekciju od ostalih metoda detekcije kao i signal koji se može lako kvantificirati, stoga se integriranje elektroda na papirnatim mikrofluidičkim uređajima sve intenzivnije proučava. Elektrokemijske analitičke tehnike koje koristi elektrokemijska detekcija su sljedeće: amperometrija, potenciometrija, voltometrija, elektrokemijska impedancija i mjerenje električnog kapaciteta. Elektrokemijska detekcija najčešće se provodi pomoću sistema od tri elektrode-radne, referentne i pomoćne. Ugljik i plemeniti metali najčešći su materijali za izradu radnih elektroda, a elektrode izrađene od ugljika su za razliku od metalnih, jeftine su i jednostavne za izradu te pogodne za korištenje u velikom broju vodenih otopina elektrolita. Elektrode od ugljika se

mogu raznim tehnikama aplicirati na površinu papira (fotolitografija, laser), međutim, najjednostavnije i najekonomičnije je korištenje obične grafitne olovke za iscrtavanje željenog uzorka na papiru (Yang i sur., 2016). U ranim fazama elektrokemijske detekcije, detektirali su se analiti kao: glukoza, laktat (Dungchai i sur., 2009), tumorski marker (Ge i sur., 2012), itd. Za razliku od kolorimetrijske detekcije, elektrokemijska je detekcija preciznija te omogućuje detekciju koncentracija analita u nanometarskom području, brzi odziv mjernog instrumenta i neovisnost o ambijentalnom svjetlu. Mana je ove metode detekcije kod *point-of-care* dijagnostike u situacijama sa limitiranim resursima, potreba za vanjskim mjernim uređajem. Danas su razvijeni *hibridni senzori* koji objedinjuju dvije metode detekcije analita (Yetisen i sur., 2013). Primjerice, elektrokemijska i kolorimetrijska detekcija, integrirane su na jedan uređaj u cilju detekcije Au(III) i Fe(III) u otpadnim vodama raznih industrija (Apilux i sur., 2010). Takva je metoda detekcije pogodna, jer u navedenom primjeru, Fe(III) interferira prilikom elektrokemijske detekcije Au(III), stoga je uvođenje još jedne metode detekcije, logičan korak. Mana je hibridnih senzora, potreba za nekoliko vanjskih uređaja za interpretaciju rezultata, čime se kompleksnost takvih μ PADs-a povećava i posljedično smanjuje mogućnost korištenja u uvjetima smanjene količine resura (Yetisen i sur., 2013).



Slika 6. Općenita shema elektroda integriranih na papirni mikrofluidički uređaj. *WE* predstavlja radnu elektrodu, *RE* referentnu elektrodu, a *CE* mjernu elektrodu (Dungchai i sur., 2009).

Kemiluminiscencijska i elektrokemiluminiscencijska detekcija

Kod kemiluminiscencijske detekcije, kemijska reakcija generira ekscitiranu molekulu (intermedijer reakcije) te posljedično nastaju produkti reakcije i svjetlost, dok se kod elektrokemiluminiscencije, događa elektrokemijska reakcija koja izaziva luminiscenciju. Obje metode su pogodnije od fluorescencijske detekcije, jer ne zahtijevaju vanjski izvor svjetla, već samo digitalnu kameru ili *smartphone* za detekciju

emitiranog svjetla (Yang i sur., 2016). Kemiluminiscencijska detekcija danas je uz kolorimetrijsku detekciju jedna od najkorištenijih metoda detekcije u području mikrofluidike te se upotrebljava u mnogim analitičkim područjima - na primjer: u detekciji kortizola u slini u kojoj se kortizol nalazi u jako malim koncentracijama uz dosegnutu detekciju od 0,4 ng/ml; u ranom otkrivanju raka dojke, detekcijom polimorfizma 10 pojedinačnih nukleotida (Galaziou i sur., 2019 navedeno u Calabretta i sur., 2020). Prednost elektrokemiluminiscencijske nad kemiluminiscencijskom detekcijom je mogućnost očitavanja rezultata bez upotrebe fotodetektora. Kada elektrokemijskom reakcijom dobiven intermedijer uđe u egzergonu reakciju, ulazi u elektronski ekscitirano stanje. Prilikom povratka u osnovno energetska stanje, emitira se svjetlost. Za takvu vrstu detekcije analita, potrebne su elektrode na nosaču (papir), povezanost uređaja za izvor slabe struje, uvjeti bez svjetla za očitavanje rezultata, itd. Obzirom da je uređaj sa takvom vrstom detekcije, ovisan o velikom broju vanjskih čimbenika, ne zadovoljava postavljene karakteristike idealnih $\mu PADS$ -a (Yetisen i sur., 2013).

Fluorescencijska detekcija

Fluorescencijska se detekcija bazira na emisiji svjetla od strane određenog spoja koji je primarno apsorbirao neku vrstu elektromagnetskog zračenja, stoga senzori koji rade na principu fluorescencijske detekcije mjere intenzitet emitiranog svjetla (Akyazi i sur., 2018). Komercijalno dostupni papiri koji bi mogli služiti kao supstrat za papirnate mikrofluidičke uređaje često sadrže aditive koji i sami fluoresciraju te interferiraju tijekom mjerenja emisije svjetla (Yang i sur., 2017).

2.3. Papirnati mikrofluidički biosenzori

Biosenzori su analitički uređaji sa širokim područjem primjene, a za razliku od ostalih analitičkih uređaja, biosenzori imaju biološki element (antitijelo, enzim, mikroorganizam, stanica ili segment DNA) koji se nalazi u transduktoru (pretvarač) ili je u kontaktu sa transduktorom. Tijekom reakcije u kojoj sudjeluju analit i biološki element, dolazi do promjene kemijskih, mehaničkih ili električkih svojstava osjetljivih elemenata, a transduktori tu interakciju pretvaraju u mjerni signal (najčešće električni signal). Prema mehanizmu reakcije koja stvara signal koji će potom biti detektiran jednom od već opisanih metoda detekcije, testovi mogu biti kategorizirani kao imunološki, biokemijski i molekularni (Xia i sur., 2016). U samim počecima razvitaka biosenzora, u slučaju da se radilo o analizi uzorka u kojem se nalaze različite molekule i/ili kemijski spojevi, na temelju se mjernog signala nije mogla dobiti informacija o vrstama molekula u uzorku. Danas postoje biosenzori koji objedinjuju obje karakteristike- kvantitativnu i

kvalitativnu detekciju molekula uzorka (Prakash i sur, 2011). Papirnati mikrofluidički biosenzori imaju iste građevne elemente kao i već opisani mikrofluidički uređaji (hidrofobne regije, hidrofilne kanale, dio za nanošenje uzorka, itd.), a imaju i dodatan biološki element koji može biti integriran u bilo koji dio kanalića. Kolorimetrijska je detekcija analita najjednostavnija metoda detekcije, stoga i najadekvatnija za korištenje u područjima limitiranih resursa i laboratorijske opreme. Za očitavanje je rezultata potreban primjerice samo smartphone sa *Adobe Photoshop* aplikacijom. Sa druge strane, elektrokemijska je detekcija puno preciznija i selektivnija metoda detekcije, no zahtjeva skupe uređaje za očitavanje signala. Iz navedenog se razloga danas istražuju metode za jeftiniju integraciju elektrokemijske detekcije sa papirnatim mikrofluidičkim biosenzorima (Zhao i sur., 2013). U nastavku teksta biti će ukratko opisani neki biosenzori, u cilju lakše vizualizacije njihovog principa rada. Papirnati mikrofluidički biosenzor u radu od Zhao i sur. (2013), za simultano određivanje glukoze, laktata i mokraćne kiseline u uzorku krvi, može dobro ilustrirati princip rada spomenutih uređaja. Na papir su isprintane: hidrofobne strukture koje definiraju kanale, tri elektrode (referentna, mjerna i pomoćna) i srebrne žiće, koje su spojene sa elektrodama, a čine vezu između mikrofluidičkog biosenzora i uređaja za očitavanje rezultata (potenciostat). Potenciostat kojeg je istraživački tim prilagodio eksperimentu, primjer je relativno jeftinog i prenosivog uređaja, koji se lako može integrirati sa μ PAD-om. Enzimi katalizatori reakcija (glukoza oksidaza, laktat oksidaza i urikaza) i reagensi potrebni za odvijanje oksido-redukcijskih reakcija, netom su prije priređeni i dodani u zonu detekcije. Kada je uzorak kapnut na kanalić, enzimi su oksidirali supstrate, a određeni ionski produkti reakcije, kvantificirani su kronoamperometrijski. Sljedeći primjer biosenzora je papirnati mikrofluidički biosenzor na kojem su imobilizirane određene sekvence molekule DNA. Na kromatografskom su papiru tehnikom: printanje voskom u masnom tisku, izrađene hidrofobne strukture koje definiraju kanale, a papir je kemijski modificiran kako bi se na njega mogla imobilizirati određena sekvenca oligonukleotida. U slučaju prisutnosti sekvence od interesa u uzorku, nakon što se uzorak aplicira u zonu za detekciju, ta će sekvenca hibridizirati sa imobiliziranim oligonukleotidom na papiru. Dodatak koloidnih nanočestica zlata (AuNP) i otopine natrijevog klorida, omogućuje "vizualizaciju" reakcije te posljedično i kolorimetrijsku detekciju. U prisutstvu DNA sekvence od interesa, dolazi do promjene boje na papiru, a u odsutnosti, boja papira ostaje crvena. Treći primjer koji dobro ilustrira princip rada papirnatih mikrofluidičkih biosenzora jest senzor u kojem imunološka reakcija producira mjerni signal. Površina je papira kemijski modificirana citosanom (polisaharid) kako bi se na papir kovalentno mogla vezati antitijela. Papirnati je uređaj koncipiran na principu imunotesta ELISA. U slučaju prisutnosti antigena od interesa u uzorku, antigen će se vezati na imobilizirano antitijelo. Dodatkom

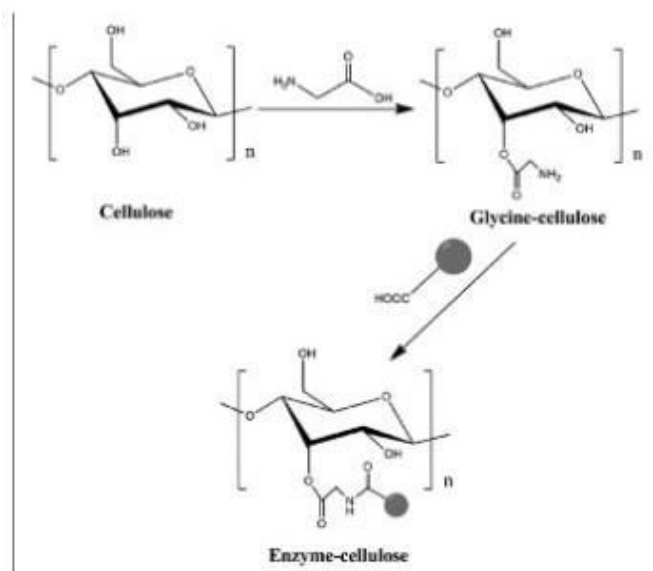
enzima koji će se vezati na antigen, supstrata za taj enzim, najčešće dolazi do kolorne reakcije (Xia i sur., 2016).

2.3.1. Imobilizacija enzima na papirnate mikrofluidičke uređaje

Veliki je broj papirnatih mikrofluidičkih senzora koji su dizajnirani za upotrebu u područjima limitiranih resursa, baziran na enzimskim reakcijama. Izbor je adekvatne metode imobilizacije stoga bitan, kako bi senzor što dulje bio stabilan, posebno u uvjetima visoke temperature, koje su prisutne kod transporta ili skladištenja (Nery i Kubota, 2016). U uvjetima limitirane količine resursa, vlažnim i mokrim uvjetima, teško je kontrolirati stabilnost imobiliziranih enzima i antitijela kod *point-of-care* i *on-site* dijagnostike i analize te se razvijaju metode za stabilizaciju imobiliziranih proteina, koje ne uključuju dodatne reagense koje treba skladištiti (Ramachandran i sur., 2014). Papir je idealan supstrat za imobilizaciju enzima, jer je inertan, stabilan, jeftin te biokompatibilan sa enzimom. Građen je od celuloze, hidrofobno-hidrofilnog polimera, kemijski inertnog u fiziološkim uvjetima, a ima brojne hidroksilne grupe na površini koje mogu reagirati sa enzimima (Liu i sur., 2016). Postoje različite metode imobilizacije enzima na celulozu, a generalna je podjela metoda na kovalentne i fizikalne metode, temeljena na vrsti kemijske veze između enzima i celuloze. Kovalentne metode podrazumijevaju kovalentno vezanje enzima na nosač ili međusobno unakrsno povezivanje enzima kovalentnim vezama, dok fizikalne metode podrazumijevaju adsorpciju enzima na površinu nosača, molekulskim i elektrostatskim silama, vezanje u gel i mikroinkapsuliranje. Kod fizikalnih metoda imobilizacije enzima, enzim se može adsorbirati na površinu papira, bez dodatka drugih reagensa, adsorbirati na papir modificiran sa BSA (*bovine serum albumin*), papir sa slojem kolagena ili na papir sa slojem polivinil alkohola, enzimi se mogu vezati/imobilizirati (okluzija enzima u mrežu polimera) u gelove od dekstrana, škroba, citosana, PVA-a, amonijevog alginata i CMC-a. Pripremljene kuglice gela sa enzimima nakon sušenja poprimaju plosnati oblik te se polože na površinu papira (Nery i Kubota, 2016). Kod kovalentnih metoda imobilizacije enzima, dolazi do kemijske reakcije između enzima (aminokiselinski ostaci enzima) i celuloze. Kao što je već spomenuto, površina celuloze ima puno $-OH$ funkcijskih grupa, ali one stvaraju slabe interakcije sa enzimima. Iz tog razloga površinu papira treba kemijski modificirati (oksidacija, esterifikacija, itd.) kako bi se "dovele" grupe koje mogu stvarati jake kovalentne interakcije sa aminokiselinskim ostacima enzima. Esterifikacijom celuloze pomoću glicina, karboksilna skupina glicina reagira sa hidroksilnim grupama celuloze. Na taj su način na celulozu dovedene amino skupine, koje zatim mogu reagirati sa karboksilnim

skupinama enzima (Slika 7.). Sljedeća metoda "dovođenja" grupa na celulozu je oksidacija hidroksilnih grupa celuloze u cilju nastanka aldehidnih ili karboksilnih skupina koje mogu reagirati sa amino skupinama enzima. Oksidacija perjodatom je najkorištenija metoda za oksidaciju celuloze. Na celulozu se mogu "dovesti" i epoksi skupine, koje mogu reagirati sa amino skupinama enzima. U tu se svrhu može koristiti epoksi-kloropropan, koji reagira sa hidroksilnim skupinama celuloze (Liu i sur., 2016). Danas postoje i genetički modificirani enzimi kojima su dodane domene koje direktno stupaju u interakciju sa celulozom ili hemicelulozom. Takvi su enzimi međutim skupi te nepogodni za siromašnija tržišta za koja su *μPADs* primarno i namijenjeni. U slučaju da je metoda imobilizacije dobro odabrana, može pozitivno utjecati na stabilnost, selektivnost i aktivnost enzima. Stabilnost enzima određuje broj i vrsta veza između enzima i nosača (papir) te mikrookolina oko imobiliziranog enzima. Imobilizirani enzimi mogu dobiti i nova svojstva. Imobilizacijom im se može povećati aktivnost ili se optimalne vrijednosti pH i temperature na kojima postižu maksimalne aktivnosti mogu promijeniti. Drugim riječima, maksimalnu aktivnost mogu postići u višim ili nižim pH vrijednostima i na višim temperaturama nego prije imobilizacije, a može se i reći da im "ekstremnije" vrijednosti pH i temperature ne narušavaju, već djeluju pozitivno na aktivnost. Mogućnost ponovne upotrebe enzima još je jedna pozitivna strana imobilizacije enzima na nosač, a smanjuje i ukupan trošak analize. Odabir metode imobilizacije enzima primarno ovisi o vrsti analize koja će se provoditi, zatim o temperaturi na kojoj se senzori planiraju skladištiti i koristiti, te o razini stabilnosti koja se želi postići imobilizacijom. Drugim riječima, korištenje skuplje metode imobilizacije tada kada to nije potrebno, povećava ukupan trošak analize (Nery i Kubota, 2016). U istom je radu dokazano da je enzim (glukoza oksidaza) koji je na papirnatu supstrat imobiliziran adsorpcijom, koja je jeftina i jednostavna metoda imobilizacije enzima, ostao stabilan do osam tjedana, prilikom skladištenja na 4°C. Nadalje, enzimi koji su imobilizirani adsorpcijom pokazali su višu inicijalnu aktivnost, od enzima koji su bili inkapsulirani u gelu. Razlog je tome vjerojatno manja dostupnost supstrata enzimu, kada je inkapsuliran u polimer. Kovalentnom imobilizacijom enzima na papir mogu se narušiti fizikalna svojstva papira, kao što je fleksibilnost, papir se može i lakše potrgati, a nakon kovalentne imobilizacije enzima, reagense je izrazito teško isprati sa papira, te oni koji zaostaju mogu interferirati kod daljnjih mjerenja ili mogu deaktivirati enzime. Sve su imobilizacijske metode u radu od Nery i Kubota (2016), a posebice metode vezanja enzima u gelove, dovele do povećanja K_m vrijednosti enzima usporedno sa slobodnim enzimom. Razlog je tome vjerojatno smanjena dostupnost supstrata aktivnom mjestu enzima. Kod kovalentnih metoda sa EDC/NHS imobilizacijom, K_m vrijednost je najmanje narasla, što može biti objašnjeno činjenicom da kovalentna veza specifično orijentira enzim, za razliku od ostalih metoda u kojima se

molekule nasumično orijentiraju. Bitno je još jednom naglasiti da ne postoji idealna metoda imobilizacije enzima, već odabir metode ovisi o puno faktora. Međutim, postoje generalni trendovi koje su svi enzimi u navedenom radu pratili, a mogu pomoći u odabiru metode imobilizacije i skladištenja imobiliziranih enzima. Skladištenje enzima na 4°C produžilo je stabilnost enzima od 8 do 20 tjedana, za razliku od skladištenja na sobnoj temperaturi. Skoro sve metode isprobane u radu, pokazale su da imobilizacijom enzim duže zadržava aktivnost na sobnoj temperaturi, od neimobiliziranog, tj. slobodnog enzima, što dokazuje potrebu za imobilizacijskim koracima prilikom izrade papirnatih mikrofluidičkih enzimskih biosenzora (Nery i Kubota, 2016).



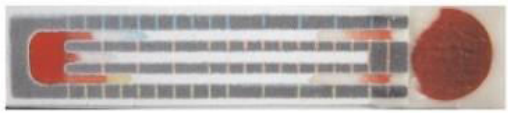



Slika 7. Glicin - esterificirana celuloza (Liu i sur., 2016).

2.4. Područja primjene papirnatih mikrofluidičkih uređaja

Zbog mnogih svojih pozitivnih karakteristika, među kojima se ističu: niska cijene izrade, jednostavnost rukovanja i biorazgradivost, papirnati mikrofluidički uređaji nalaze primjenu u brojnim područjima. U samim začetcima $\mu PADS$ -a, upotrebljavani su primarno u medicinskoj dijagnostici, a kasnije im se područje primjene proširilo i na monitoring ekoloških parametara, forenziku i nadzor namirnica u prehrambenoj industrij. Kardiovaskularne su bolesti glavni uzrok smrti ljudi u svijetu, a prate ih infektivne bolesti (malarija, HIV, tuberkuloza), koje su odgovorne za 95% svih smrti u nerazvijenim dijelovima svijeta. Procjenjeno je i da će oko 22 milijuna ljudi svake godine, u sljedećih 20 godina, oboljeti od raka. U kompleksnim je biološkim uzorcima kao što su urin, stolica, krv i slina, i tkiva, danas moguće dijagnosticirati rak, infektivne bolesti, kardiovaskularne bolesti i dijabetes. Primarno zbog svoje niske cijene proizvodnje $\mu PADS$ -i zamjenjuju klasične dijagnostičke uređaje u cilju brze, jeftine i efikasne detekcije i prevencije bolesti. Jednom kada se biološki uzorak nanese na papirić, kapilarnom silom prolazi kroz kanaliće (Ozer i sur., 2020).

Noiphung i sur. (2015.) razvili su papirnati mikrofluidički uređaj koji simultano može provoditi tri funkcije. Klasične su metode za određivanje krvnih grupa, korištene u godinama prije razvitka ovog uređaja (test aglutinacije) skupe i vremenski duže za izvedbu, stoga neadekvatne za korištenje u ruralnim područjima zemalja u razvoju. Zahtjevaju skuplju opremu, pripremu, centrifugiranje i inkubaciju uzorka. Određivanje ABO krvnih grupa i Rh faktora temelji se na detekciji A ili B antigena na eritrocitima i anti-A i anti-B u krvnom serumu. Rh krvna grupa im oko 45 različitih antigena, ali najčešće se određuje postojanje D- antigena u uzorku, kako bi se odredilo dali je osoba Rh pozitivna ili Rh negativna. Test aglutinacije međutim nije dovoljno osjetljiva metoda za određivanje "slabijih" podskupina antigena (sekundarne krvne grupe). U spomenutom je radu opisana metoda kojom je moguće istovremeno, takozvano: početno i reverzno (*forward-reverse grouping*) određivanje : A i B antigena na eritrocitima i anti-A i anti-B u serumu i Rh faktora. Kod klasičnih metoda za određivanje krvnih grupa, potrebne su dvije analize, tj. dva koraka. Uređaj je izrađen od dva listića papira na kojima su hidrofobne regije isprintane od voska, a na papirić su imobilizirana antitijela i antigeni te membrana za odvajanje seruma od krvne plazme. Zbog viskoznosti krvi, uzorak je razrijeđen fiziološkom otopinom, kako bi mogao lakše teći kroz kapilare na papiru. Opisani je μPAD pokazao visoku preciznost mjerenja, a krvne su se grupe sa visokom točnošću mogle odrediti i na 21. dan skladištenja. Rezultati su interpretirani na temelju udaljenosti koje aglutinirane i neaglutinirane crvene krvne stanice prođu. Općenito, aglutinirane crvene

krvne stanice prošle su kraću udaljenost kroz kanaliće nego neaglutinirane stanice. Na papiriću je iz navedenog razloga izrađena i mjerna skala (Slika 8). Za razliku od ostalih standardnih testova za određivanje krvnih grupa, ovaj uređaj radi sa 85-95%-tnom točnošću. Obzirom na stabilnost tako izvedenog $\mu PAD-a$ kroz duži vremenski period, pozitivne osobine tehnologije na papiru, opisani uređaj, uz dodatne modifikacije u cilju postizanja 100%-tne preciznosti, ima obećavajuću ulogu u vojnoj medicini i ruralnim područjima zemalja u razvoju. Wang i sur. (2019) izradili su papirnati mikrofluidički elektrokemijski aptasenzor (aptamer= oligonukleotid ili peptid) za simultano mjerenje karcinoembrijskog antigena (CEA) i neuron-specifične enolaze (NSE), u cilju rane detekcije raka pluća. Povećanjem broja biomarkera koji se mjere, povećava se i vjerodostojnost rezultata analiza. Uređaj omogućuje detekciju dva biomarkera raka u jednom uzorku. Mikrokanali na papiru izrađeni su od voska, a na uređaj su isprintane i tri elektrode. Uređaj je pokazao veliku osjetljivost, a granice detekcije, tj. minimalne vrijednosti CEA, odnosno NSE koje je uređaj mogao pouzdano izmjeriti su sljedeće: 2 pg ml⁻¹, 10 pg ml⁻¹. Tipična je koncentracija CEA u serumu 5 ng ml⁻¹, a NSE je 15 ng ml⁻¹.

Paper-based assay	Distance ratio		Interpretation
	F-side*	R-side**	
	0.33	0.63	A Rh-Positive
	0.25	-	
	0.57	0.35	
	0.62	0.33	B Rh-Positive
	0.50	-	
	0.33	0.67	
	0.67	0.13	O Rh-Positive
	0.50	-	
	0.70	0.24	
	0.50	0.50	AB Rh-Positive
	0.43	-	
	0.33	0.53	

Slika 8. Rezultati simultanog izvođenja početnog (F-forward) i reverznog (R-reverse) testiranja i određivanja Rh faktora na istom uređaju. Na $\mu PAD-u$ su izrađene i mjerene skale kako bi se rezultat uz postavljanje odnosa između R i F vrijednosti mogao preciznije interpretirati (Noiphung i sur., 2015).

Papirnati mikrofluidički senzori mogu poslužiti i za nadzor namirnica u prehrambenoj industriji. *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Streptococcus spp* i Norovirus su mikroorganizmi, kontaminanti hrane, zaslužni za oko 48 milijuna oboljenja godišnje i oko 3,000 smrti od trovanja hranom. U idealnim bi uvjetima nakon svakog koraka u proizvodnji hrane, trebalo slijediti testiranje na patogene mikroorganizme, a papirnati mikrofluidički uređajii bi u on-site detekciji patogena u prehrambenoj industriji mogli igrati značajnu ulogu. Srisa-Art i sur.(2017) razvili su μ PAD sa kolorimetrijskom detekcijom analita i imunomagnetskom separacijom (IMS), za detekciju *Salmonella typhymurium* u uzorcima ptičjeg fecesa i mlijeka. U uzorak se dodaju male magnetizirane čestice koje na sebi imaju vezana anti-*Salmonella* antitijela te se na njih vežu stanice *Salmonella*, a pomoću magneta se stanice izdvajaju iz uzorka i koncentriraju. Uzorak se potom analizira na μ PAD-u, ELISA tehnikom sa β -galaktozidazom kao detekcijskim enzimom, a kolorimetrijska je detekcija provedena dodatkom klorofenol-crveno- β -D-galaktopiranozida. Razvoj crvene boje označuje prisutnost te bakterije u uzorku, a intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji stanica u uzorku. Za očitavanje rezultata koristi se kamera na mobitelu i aplikacija *Image J*. Potvrđeno je da je metoda visoko specifična za *S.typhimurium* vrstu, a u 90 je minuta postignuta i granica detekcije u uzorku ptičjeg fecesa od 10^5 CFU g⁻¹ te od 10^3 CFU g⁻¹ za uzorak mlijeka. Tradicionalne metode za detekciju *Salmonella* temelje se na uzgoju bakterija u kulturi ili PCR tehnici. PCR tehnike nije pogodna za on-site analizu, jer u slučaju da se u velikom volumenu uzorka nalazi mala koncentracija patogena, uzorak se mora predobraditi, tj. koncentrirati. Obje metode zahtjevaju puno vremena za provedbu, educirano osoblje i laboratorijsku opremu. Konvencionalne metode stoga nisu praktične za *on-site* analizu kontaminanata. Na neke su uređaje u cilju kvantifikacije rezultata integrirani i kemometri, na kojima se nalazi mjerna skala. Povećanje koncentracije stanica u uzorku, proporcionalno je putu koji je boja prošla na kemometru, a očitavanje rezultata može se izvesti direktno na uređaju, bez slikanja i analize. Tako izrađen uređaj ima sposobnost detekcije *S. typhymurium* u kompleksnom uzorku, lako je prenosiv, a za cijelu analizu nije potrebno puno vremena.

Rana je detekcija kemijskih kontaminanata (pesticidi, lijekovi, teški metali, perklorati, fenolni spojevi i fluorirani spojevi) u prirodi bitna kako se dalje nebi širili vodom, zrakom i zemljom te naštetili biljnom i životnjskom svijetu. Dugo izlaganje takvim spojevima ima i posljedice na ljudsko zdravlje, a može dovesti do razvitka raka, respiratornih bolesti, bolesti bubrega i živčanog sustava. U današnje je vrijeme prisutna izuzetno velika količina štetnih spojeva , kako u vodi, tako i u tlu, stoga je bitan razvitak uređaja za čija proizvodnja nije skupa, a koji sa visokom preciznošću i reproducibilnošću mogu detektirati takve spojeve (Ozer i sur., 2020). Problem je kod ekoloških testova, što su uzorci, kao što je primjerice

uzorak tla, kompleksnog sastava i prije analize ih je potrebno obraditi kako bi se izdvojio analit od interesa. U suprotnom bi ostale komponente uzorka mogle interferirati tijekom mjerenja. Tradicionalne su metode za obradu bioloških uzoraka komplicirane i dugotrajne te neadekvatne za terensku analizu, a danas se istražuju metode za integraciju manje agresivnih sustava za pročišćavanje uzoraka, direktno na μPAD (Ozer i sur., 2020). Nouanthavong i sur. (2016) razvili su papirnati mikrofluidički uređaj za detekciju organofosfornih pesticida (OP) u biljkama i školjkama. Organofosforne pesticide u perifernom i centralnom živčanom sustavu inhibiraju djelovanje enzima acetilkolin-esteraze (AChE), što za posljedicu ima nakupljanje acetilkolina u stanicama. Nakupljanje acetilkolina uzrokuje otkazivanje organa i živčanog sustava. Iz tog je razloga izrazito bitan razvitak uređaja koji će sa velikom osjetljivošću i selektivnošću detektirati OP-e u uzorku. Za detekciju OP-a koriste se HPLC, LC-MS/GC-MS (liquid/gas chromatograph-mass spectrometry), elektrokemijske analize ili *ELISA*. Sve navedene metode omogućuju preciznu analizu, sa visokom osjetljivošću i postižu granice detekcije u nanomolarnim područjima. Međutim, zahtjevi za skupim instrumenima, educirano osoblje i dugotrajnost analize, čine ih nepogodnima za terensku analizu. Na površinu su papira, modificiranu nanočesticama cerijeva-oksida, imobilizirani acetilkolin-esteraza (AChE) i kolin-oksidaza (ChOX). U prisutnosti acetilkolina, AChE i ChOX kataliziraju nastanjanje H_2O , koji zajedno sa cerijevim oksidom daje žuto obojenje. Nakon inkubacije enzima na papiru sa OP-im pesticidima, pesticidi inhibiraju djelovanje enzima AChE i nastaje manje H_2O_2 i smanjuje se intenzitet žute boje. Rezultat se analize može kvantificirati upotrebom software-a za procesiranje slike. Ovakvom je metodom moguće detektirati OP-e pesticide bez upotrebe sofisticirane opreme, a postignute su i sljedeće granice detekcije za dva najpoznatija OP pesticida: 18 ng ml^{-1} za metil-paraokson (pesticid u kupusu) i 5.3 ng ml^{-1} za klorpirifos okson (pesticid u sušenim namirnicama morskog podrijetla). Rezultati su provjereni i na LC-MS/MS te je potvrđeno da metoda razvijena na μPAD -u daje precizne rezultate te da je pogodna za terensku analizu i detekciju OP-a u pravim uzorcima. Procjenjeno je da je ukupan trošak u koji ulaze cijena reagensa i izrade uređaja, za papirnati mikrofluidički uređaj na kojem je od voska isprintan kružić 5 mm promjera, \$0.0341. Teški metali u vodi i hrani također predstavljaju prijetnju kako za ljude, tako i za životinje i potrebno ih je na vrijeme detektirati i eliminirati. Sun i sur. (2018) razvili su μPAD za simultanu detekciju Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{4+} u jezerskoj i morskoj vodi. Radi se o papirnatom mikrofluidičkom senzoru koji ima hidrofobne regije izrađene printanjem voska na papir, a zone su za detekciju međusobno odvojene. Ugrađeni su i "rotacijski" ventili, tj. mobilne strukture koje omogućuju odvajanje i spajanje kanala sa detekcijskim zonama te osiguravaju precizno dodavanje kolorimetrijskog reagensa u svaku detekcijsku zonu i sprječavaju pogreške u analizu koje nastaju kod neravnomjerne difuzije reagenasa. Postignute su

granice detekcije od: 4.8 mg L^{-1} , $1,6 \text{ mg L}^{-1}$, $0,18 \text{ mg L}^{-1}$. Tradicionalne metode detekcije teških metala u vodi, masena spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS), metoda atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) i atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS), zahtjevaju izrazito skupu opremu, educirano osoblje i dugo vremena za izvedbu. Prisutnost je određenog metala u uzorku kolorimetrijski detektirana, jer reakcijom metala i kolorimetrijskog reagensa nastaje stabilni obojeni kompleks, a razvijena je boja specifična za svaki pojedini metal. Za kvantifikaciju su rezultata izrađene kalibracijske krivulje, iz kojih je vidljivo da se povećanjem koncentracije metala povećava i intenzitet razvijene boje. ICP-MS analizom potvrđeni su rezultati dobiveni na tako izrađenom μPAD -u, a zaključeno je da je tako izrađen μPAD sa rotacijskim ventilom pogodan za jeftinu terensku analizu.

3. ZAKLJUČCI

1. U radu je dan pregled metoda izrade papirnatih mikrofluidičkih uređaja te su opisane prednosti i mane svake spomenute metode. Printanje voskom u masnom tisku čini se kao najjeftinija i najjednostavnija metoda za izradu papirnatih mikrofluidičkih uređaja, u slučaju da im je primjena orijentirana ka dijagnostici i analizi u siromašnijim predjelima svijeta. U drugim slučajevima, izbor metode izrade ovisit će o vrsti analize koja se planira provesti.
2. U radu su opisane i najkorištenije metode detekcije analita kod papirnatih mikrofluidičkih uređaja. Bez obzira što se kolorimetrijska detekcija čini kao najjednostavnija metoda detekcije, elektrokemijska je detekcija, iako trenutno skuplja za provedbu, puno osjetljivija i preciznija metoda kvantifikacije analita u uzorku. Danas se stoga intenzivno istražuju načini za integraciju jeftinijih metoda elektrokemijske detekcije s papirnatim mikrofluidičkim uređajima.
3. Unatoč raznovrsnim analizama koje se danas provode na papirnatim mikrofluidičkim uređajima, rijetko se koje provode izvan laboratorija. Širu komercijalnu upotrebu papirnatih mikrofluidičkih uređaja još uvijek priječe relativno visoka cijena njihove proizvodnje i nemogućnost *on-site* analize kompleksnih uzoraka.

4. POPIS LITERATURE

Akyazi, T., Basabe-Desmonts, L., & Benito-Lopez, F. (2018) Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. *Analytica Chimica Acta*, **1001**, 1–17.

Apilux, A., Dungchai, W., Siangproh, W., Praphairaksit, N., Henry, C. S., & Chailapakul, O. (2010) Lab-on-Paper with Dual Electrochemical/Colorimetric Detection for Simultaneous Determination of Gold and Iron. *Analytical Chemistry*, **82**, 1727–1732.

Beebe, D. J., Mensing, G. A., & Walker, G. M. (2002) Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **4**, 261–286.

Bruzewicz, D. A., Reches, M., & Whitesides, G. M. (2008). Low-Cost Printing of Poly(dimethylsiloxane) Barriers To Define Microchannels in Paper. *Analytical Chemistry*, **80**, 3387–3392.

Calabretta, M. M., Zangheri, M., Lopreside, A., Marchegiani, E., Montali, L., Simoni, P., & Roda, A. (2020) Precision medicine, bioanalytics and nanomaterials: toward a new generation of personalized portable diagnostics. *Analyst*, **145**, 2841-2853.

Cate, D. M., Adkins, J. A., Mettakoonpitak, J., & Henry, C. S. (2014) Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry*, **87**, 19–41.

Channon R.B., Srisa-Art M., Boehle K., Henry C. (2019) Critical Components and Innovations in Paper-Based Analytical Devices, u: Paper-based Diagnostics (ur. K.J. Land), 1. izd, Springer, str. 47-78.

Dungchai, W., Chailapakul, O., & Henry, C. S. (2009) Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, **81**, 5821–5826.

Fiorini, G. S., & Chiu, D. T. (2005) Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *BioTechniques*, **38**, 429–446.

Fu, E., Lutz, B., Kauffman, P., & Yager, P. (2010) Controlled reagent transport in disposable 2D paper networks. *Lab on a Chip*, **10**, 918.

Galaziou, A., Christopoulos, T.K. & Ioannou, P.C. (2019) Paper-based device providing visual genetic signatures for precision medicine: application to breast cancer. *Anal Bioanal Chem*, **411**, 3769–3776.

Ge, S., Ge, L., Yan, M., Song, X., Yu, J., & Huang, J. (2012) A disposable paper-based electrochemical sensor with an addressable electrode array for cancer screening. *Chemical Communications*, **48**, 9397.

He, Y., Wu, Y., Fu, J.-Z., & Wu, W.-B. (2015) Fabrication of paper-based microfluidic analysis devices: a review. *RSC Advances*, **5**, 78109–78127.

Hrvatska enciklopedija, <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=19453>, pristupljeno travanj 2020.

Hu, J., Wang, S., Wang, L., Li, F., Pingguan-Murphy, B., Lu, T. J., & Xu, F. (2014) Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, **54**, 585–597.

Jeong, S.-G., Kim, J., Jin, S. H., Park, K.-S., & Lee, C.-S. (2016) Flow control in paper-based microfluidic device for automatic multistep assays: A focused minireview. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **33**, 2761–2770.

Land, K.J., Smith, S., Peeling, R. W. (2019) Unmet Diagnostics Needs for the Developing World, u: Paper-based Diagnostics, (ur. K.J. Land), 1. izd, Springer, str. 1-23.

Li, X., Ballerini, D. R., & Shen, W. (2012) A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. *Biomicrofluidics*, **6**, 011301.

Li, X., Tian, J., & Shen, W. (2010) Progress in patterned paper sizing for fabrication of paper-based microfluidic sensors. *Cellulose*, **17**, 649–65.

Li, Z., Yang, J., Zhu, L., & Tang, W. (2016) Fabrication of paper micro-devices with wax jetting. *RSC Advances*, **6**, 17921–17928.

Lisowski, P., & Zarzycki, P. K. (2013) Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PADs) and Micro Total Analysis Systems (μ TAS): Development, Applications and Future Trends. *Chromatographia*, **76**, 1201–1214.

Liu, B., Du, D., Hua, X., Yu, X.-Y., & Lin, Y. (2014). Paper-Based Electrochemical Biosensors: From Test Strips to Paper-Based Microfluidics. *Electroanalysis*, **26**, 1214–1223.

Liu, Y., & Chen, J. Y. (2016) Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **31**, 553–567.

Lu, Y., Shi, W., Jiang, L., Qin, J., & Lin, B. (2009) Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*, **30**, 1497–1500

Lu, Y., Shi, W., Qin, J., & Lin, B. (2010) Fabrication and Characterization of Paper-Based Microfluidics Prepared in Nitrocellulose Membrane By Wax Printing. *Analytical Chemistry*, **82**, 329–335.

Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., & Whitesides, G. M. (2007) Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, **46**, 1318–1320.

Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., & Carrilho, E. (2010) Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*, **82**, 3–10.

Mendez, M.A., Calahorrano, A., Costa-Vera, C., Sanchez, R., & Montero-Oleas, A.(2019) Microfluidic paper-based analytical devices for reliable and low-cost point-of-care applications. U 2019 *IEEE Fourth Ecuador Technical Chapters Meeting (ECTM)* (pp.1-6). IEEE.

Mendez, S., Fenton, E. M., Gallegos, G. R., Petsev, D. N., Sibbett, S. S., Stone, H. A., López, G. P. (2010) Imbibition in Porous Membranes of Complex Shape: Quasi-stationary Flow in Thin Rectangular Segments. *Langmuir*, **26**, 1380–1385.

Mendez, M.A., Calahorrano, A., Costa-Vera, C., Sanchez, R., & Montero-Oleas, A.(2019) Microfluidic paper- based analytical devices for reliable and low-cost point-of-care applications. U 2019 *IEEE Fourth Ecuador Technical Chapters Meeting (ECTM)* (pp.1-6). IEEE

Nie, J., Liang, Y., Zhang, Y., Le, S., Li, D., & Zhang, S. (2013) One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices. *The Analyst*, **138**, 671–676.

Nery, E. W., & Kubota, L. T. (2016) Evaluation of enzyme immobilization methods for paper-based devices—A glucose oxidase study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **117**, 551–559.

Nouanthavong, S., Nacapricha, D., Henry, C. S., & Sameenoi, Y. (2016) Pesticide analysis using nanoceria-coated paper-based devices as a detection platform. *The Analyst*, **141**, 1837–1846.

Olkkonen, J., Lehtinen, K., & Erho, T. (2010) Flexographically Printed Fluidic Structures in Paper. *Analytical Chemistry*, **82**, 10246–10250.

Ozer, T., McMahon, C., & Henry, C. S. (2020) Advances in Paper-Based Analytical Devices. *Annual Review of Analytical Chemistry*, **13**.

Prakash, S., Pinti, M., & Bhushan, B. (2012) Theory, fabrication and applications of microfluidic and nanofluidic biosensors. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **370**, 2269–2303.

Rajendra, V., Sicard, C., Brennan, J. D., & Brook, M. A. (2014) Printing silicone-based hydrophobic barriers on paper for microfluidic assays using low-cost ink jet printers. *The Analyst*, **139**, 6361–6365.

Ramachandran, S., Fu, E., Lutz, B., & Yager, P. (2014) Long-term dry storage of an enzyme- based reagent system for ELISA in point-of-care devices. *The Analyst*, **139**, 1456–1462.

Stone, H. A., Stroock, A. D., & Ajdari, A. (2004) Engineering flows in small devices. *Annual Review of Fluid Mechanics*, **36**, 381–411.

Sun, X., Li, B., Qi, A., Tian, C., Han, J., Shi, Y., ... Chen, L. (2018) Improved assessment of accuracy and performance using a rotational paper-based device for multiplexed detection of heavy metals. *Talanta*, **178**, 426–431.

Thom, N. K., Yeung, K., Pillion, M. B., & Phillips, S. T. (2012) “Fluidic batteries” as low-cost sources of power in paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, **12**, 1768.

Weaver, A. A., Reiser, H., Barstis, T., Benvenuti, M., Ghosh, D., Hunckler, M., Lieberman, M. (2013) Paper Analytical Devices for Fast Field Screening of Beta Lactam Antibiotics and Antituberculosis Pharmaceuticals. *Analytical Chemistry*, **85**, 6453–6460.

Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, **442**, 368–373.

Xia, Y., Si, J., & Li, Z. (2016) Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, **77**, 774–789.

Yang, Y., Noviana, E., Nguyen, M. P., Geiss, B. J., Dandy, D. S., & Henry, C. S. (2016) Paper- Based Microfluidic Devices: Emerging Themes and Applications. *Analytical Chemistry*, **89**, 71–91.

Yetisen, A. K., Akram, M. S., & Lowe, C. R. (2013) Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, **13**, 2210.

Zhao, C., Thuo, M. M., & Liu, X. (2013) A microfluidic paper-based electrochemical biosensor array for multiplexed detection of metabolic biomarkers. *Science and Technology of Advanced Materials*, **14**, 054402.

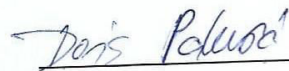
Zhong, Z. W., Wang, Z. P., & Huang, G. X. D. (2012) Investigation of wax and paper materials for the fabrication of paper-based microfluidic devices. *Microsystem Technologies*, **18** , 649–659.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



ime i prezime studenta