

### **Parte 3: Dispositivos analíticos baseados em papel.**

#### **Componentes Críticos e Inovações em dispositivos analíticos baseados em papel**

Robert B. Channon, Monpichar Srisa-Art, Katherine Boehle, e Charles Henry

Apesar de uma longa história como uma ferramenta analítica, o papel entrou em significativa importância acadêmica e foco industrial nos últimos 10 anos. Este ressurgimento coincidiu com o trabalho inovador do grupo Whitesides em 2007 sobre padronização fotorresistente de papel para criar canais microfluídicos bem definidos [1]. O crescimento exponencial pode em grande parte estar ligada a inovações importantes, que levaram dispositivos analíticos baseados em papel de um aparato de nicho em alguns laboratórios analíticos a uma ferramenta poderosa usada em uma variedade de disciplinas em todo o mundo. Aqui, descrevemos alguns dos principais avanços e seu impacto.

#### **3.1 Ferramentas de Manipulação de Fluxo**

Dispositivos analíticos baseados em papel (PAD do inglês Paper Analytical Device) podem ser amplamente segregados em três facções distantes com base em seu design, ou seja, testes pontuais, dispositivos baseados em distância e dispositivos microfluídicos. Os testes pontuais têm sido historicamente populares devido à sua simplicidade e têm implantado em uma ampla gama de campos, desde monitoramento ambiental até diagnóstico da doença. Informações mais específicas sobre testes pontuais, PADs estacionários, são abordados em outras partes deste livro, bem como em várias revisões de literatura [2, 3].

Os PADs que empregam fluxo de fluido são comumente conhecidos como dispositivos analíticos microfluídicos à base de papel ( $\mu$ PADs). O recente movimento geral na academia e na indústria de PADs estacionários para  $\mu$ PADs podem ser entendidos em termos

de várias vantagens de  $\mu$ PADs sobre suas contrapartes estacionárias:

- O transporte de amostras facilita reações sequenciais online e pré-concentração de um analito alvo que é difícil de implementar em um teste local. Essas ferramentas analíticas são abordadas com mais detalhes posteriormente neste capítulo.
- A adição de fluxo a uma amostra de analito geralmente resulta em sensibilidades aumentadas e limites de detecção mais baixos para muitos métodos de detecção em comparação com detecções estacionárias [4].
- Para reações colorimétricas (reação com um analito resultando em uma mudança de cor), reagentes podem ser depositados ao longo de um canal para reagir com um analito alvo durante transporte de fluido, resultando em uma distância definida de geração de cor, correspondente para a concentração do analito. A detecção baseada em distância é um método popular para PADs colorimétricos, particularmente em locais de atendimento devido à simplicidade de leitura [5].

### 3.1.1 Velocidade de Absorção

O fluxo de fluido no papel existe desde 1956 através de testes de fluxo lateral [6], por exemplo, o teste de gravidez comum. Crucialmente, o fluxo de fluido é gerado através ação capilar nas fibras do papel. Isso evita a necessidade de bombas externas tornando os  $\mu$ PADs baratos, pequenos e simples de usar. Com o tempo, a resistência viscosa de um fluido age contra a ação capilar, diminuindo a velocidade do fluido. A distância percorrida pelo canal,  $l(t)$  (m), no tempo  $t$  (s), é dada pela equação de LucasWashburn [7]:

$$l(t) = \sqrt{\frac{\gamma r t \cos \theta}{2\mu}} \quad (3.1)$$

onde  $\gamma$  é a tensão interfacial ( $\text{N m}^{-1}$ ),  $r$  é o raio capilar médio (m),  $\theta$  é o ângulo de contato do fluido no papel e  $\mu$  é a viscosidade

do fluido ( $\text{N s m}^{-1}$ ). Esta equação assume (i) uma seção transversal constante de poros retos cilíndricos, (ii) que os efeitos gravitacionais são desprezíveis (ou seja, fluxo horizontal), (iii) que o papel é quimicamente homogêneo, e iv) um volume de reservatório de entrada ilimitado.

Os  $\mu$ PADs podem ser projetados para gerar uma taxa de fluxo constante, por exemplo, através de um aumentando a geometria do canal [8]. Neste caso, a vazão em regime permanente é dada por Lei de Darcy [9]:

$$Q = \frac{-\kappa A \Delta P}{\mu L} \quad (3.2)$$

onde  $Q$  é a vazão volumétrica ( $\text{m s}^{-1}$ ),  $K$  é a permeabilidade do papel ( $\text{m}^2$ ),  $A$  é a área da seção transversal do papel normal ao fluxo ( $\text{m}^2$ ), e  $\Delta P$  é a diferença de pressão ( $\text{N m}^{-2}$ ) ao longo do comprimento  $L$  do canal ( $\text{m}$ ). Esta equação assume (i) energia cinética desprezível, (ii) uma seção transversal de fibra circular e (iii) capilares retos. Essas equações não são de forma alguma modelos perfeitos exaustivos para fluidos fluem em todos os dispositivos de papel, mas servem como aproximações valiosas de sistemas reais. Vários outros modelos analíticos e computacionais foram propostos para explicar variáveis adicionais, como evaporação (umidade), diferentes barreiras de fluido (por exemplo, cera) e dispositivos multicamadas (por exemplo, fluxo entre duas camadas de papel) [10, 11], embora nenhum tenha ainda alcançado ampla adoção pelo campo.

O Controle sobre velocidades de fluido e taxas de fluxo volumétrico é fundamental para o uso adequado de  $\mu$ PADs. Por exemplo, reações enzimáticas e imunoenaios em papel requerem taxas de fluxo lentas, mas a medição de reagentes ou analitos quase estáveis em concentrações residuais requer altas taxas de fluxo. A Tabela 3.1 lista algumas propriedades ajustáveis de  $\mu$ PADs e seus efeitos sobre taxas de fluxo.

**Tabela 3.1** Métodos para controlar a vazão em  $\mu$ PADs, organizados em termos de facilidade de implementação (de baixo para alto)

Propriedade	Método de controle	Efeito na velocidade de fluxo
Tipo de papel	Variar média dos raios capilares	Tamanhos de poros maiores aumentam a taxa de fluxo (Eq. 3.1)
Encapsulação	Canais abertos x selados	A vedação inibe a evaporação levando a mais tempo distâncias de fluxo, mas pode reduzir a taxa de fluxo se vedação apertada (por exemplo, laminação ou prensagem)
Modificação do papel	Linhas de cera impressas ou microcanais cortados no papel	Pequenas linhas impressas com cera podem reduzir a ação capilar para um fluxo mais lento, microcanais podem ser cortados em papel para acelerar o fluxo, deposição de ionogel/açúcar pode ser usado para diminuir o fluxo
Geometria	Largura do canal, por exemplo, distância entre barreiras de cera	A cera e outros materiais comuns têm ângulos de contato menores, por exemplo, canais mais finos têm menos resistência e taxas de fluxo mais rápidas; por outro lado, uma geometria de 270 "ventilador" gera fluxo de estado estacionário
Temperatura	Mudança de temperatura no lab.	Temperaturas mais altas resultam em viscosidade reduzida e fluxo mais rápido, hidrogéis sensíveis à temperatura também foram usados para controlar a taxa de fluxo
Volume	Varie os volumes de amostra adicionada ao dispositivo	O fluxo de amostra requer um excesso de amostra na entrada, portanto, as taxas de fluxo podem ser reduzidas/interrompidas por meio de pequenos volumes de entrada
Orientação	Mude o ângulo do dispositivo, por exemplo, vertical ou horizontal	As forças gravitacionais podem inibir ou aumentar as taxas de fluxo com base na direção do fluxo, por exemplo, em dispositivos orientados verticalmente, o fluxo pode cessar quando as forças capilares e gravitacionais se equilibram.
Número de camadas de papel	Várias camadas de papel ou canais ociosos	A criação de um canal oco por meio de uma lacuna acima do papel ou de várias camadas fornece melhorias significativas na taxa de fluxo
Pressão da cabeça	Poços de entrada elevados acima do canal	O uso de poços de entrada impulsiona o fluxo através da pressão da cabeça, fazendo uso da gravidade

A geração de regime estacionário ou taxas de fluxo constantes é crítica para muitas medidas analíticas. Por exemplo, as correntes redox eletroquímicas são proporcionais à raiz cúbica da taxa de fluxo (para canais retangulares) [12] e, portanto, pequenas

alterações na taxa de fluxo durante um experimento podem ter efeitos significativos nos sinais analíticos.

O fluxo quase estacionário pode ser alcançado através de um aumento na área da seção transversal como mostrado na Fig. 3.1. Aqui, um aumento na largura do canal/volume dos poros resulta em taxa de fluxo de estado estacionário à medida que a região do ventilador/bombeamento absorve o fluido com uma força constante. Taxas de fluxo nestes os sistemas são tipicamente em torno de  $0,020 \text{ cm s}^{-1}$  ou  $7,1 \times 10^{-6} \text{ mL min}^{-1}$ . Uma parte considerável da pesquisa recente sobre  $\mu$ PADs é focada em métodos para aumentar as velocidades e taxas de fluxo volumétrico. Os avanços variam de simples mudanças geométricas para a adição de ferramentas analíticas mais complexas, como seringa bombas.

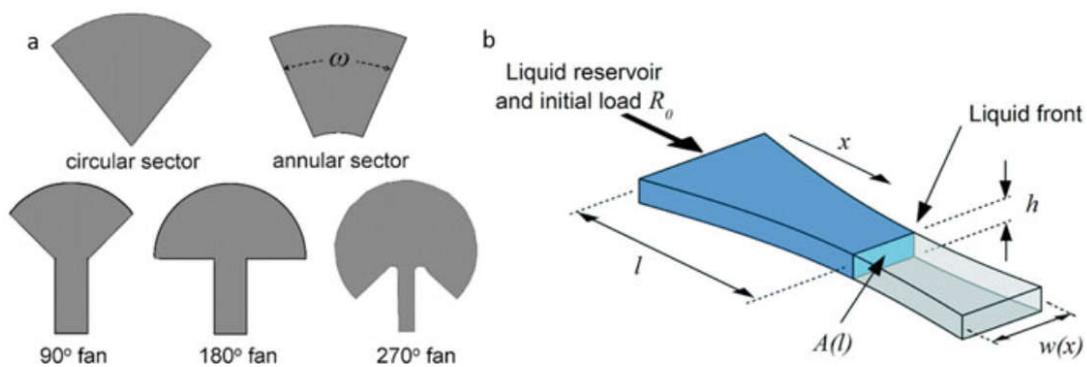


Figura 3.1 Duas abordagens para escoamento quase estacionário em  $\mu$ PADs. (a) Canal com diferentes geometrias para gerar fluxo de estado estacionário, (b) modelo de fluxo de fluido em largura de canal em expansão  $\mu$ PADs, adaptados com permissão das referências [8, 157], respectivamente.

Uma solução elegante foi proposta por Crooks et al. [13] com base no escoamento acionado por pressão em um canal oco, conforme

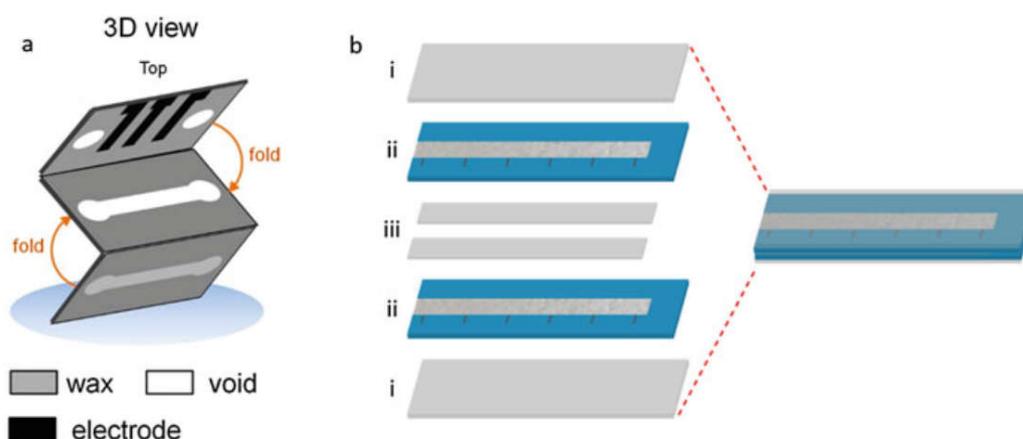


Fig. 3.2 Fluxo rápido (a) canal oco e (b)  $\mu$ PADs multicamadas (i - fita de embalagem, ii - papel qualitativo Whatman 1 modificado com cera e iii - fita dupla face) adaptado com permissão de referências [4, 13], respectivamente.

mostrado na Fig. 3.2a. Esses PADs de canal oco (HC-PAD) foram aplicados para detecção eletroquímica sob taxas de fluxo de  $1,2 \text{ cm s}^{-1}$  ou  $0,21 \text{ mL min}^{-1}$ , por meio de pressão aplicada de um poço de entrada acoplado ao canal oco. Essa abordagem foi expandida por Henry e co-autores [4] para atingir taxas de fluxo de até  $1,56 \text{ cm s}^{-1}$  ou  $1,65 \text{ mL min}^{-1}$  em  $\mu$ PADs multicamadas, através do controle preciso da altura/folga do canal entre as camadas de papel (até  $390 \mu\text{m}$ , Fig. 3.2b).

### 3.1.2 Chaves e Válvulas

A manipulação controlada do fluxo de fluido é uma ferramenta crítica em  $\mu$ PADs. Isto é particularmente verdadeiro para reações on-line de várias etapas, onde diferentes taxas de fluxo/reação tempos são necessários para diferentes etapas do ensaio. Embora simples de implementar por meio de controle manual em ensaios analíticos clássicos (por exemplo, através do controle do operador), este é mais desafiador de implementar em  $\mu$ PADs, particularmente sem operador manual ao controle. O  $\mu$ PAD ideal permitiria o controle direto para parar/iniciar o fluxo (em diferentes taxas de fluxo), para muitas etapas de ensaio online.

Vários grupos de pesquisa ao redor o mundo deu passos significativos em direção a este objetivo. Os métodos de controle manual usam o envolvimento do operador para controlar as taxas de fluxo, permitindo um controle preciso do fluido. Os interruptores mecânicos são as abordagens mais comuns para controle de fluidos, pois não requerem equipamentos externos caros, tornando-os bem apropriados para uso em ambientes de ponto de atendimento. As cunhas de tração empregam o usuário puxa uma tira que pode então abrir/fechar um canal para iniciar/parar o fluxo de fluido. Estes têm sido usados para uma variedade de aplicações, tais como ensaios imunossorventes enzimáticos (ELISAs) baseados em papel [14]. Um exemplo de dispositivo onde o deslizamento de a camada de amostra inicia o fluxo é mostrada mais adiante neste capítulo na Fig. 3.5 (Seção 3.2.2).

Da mesma forma, abas ou dobras foram demonstradas como válvulas, onde empurrar para baixo uma guia/dobrar um dispositivo conecta os canais de papel para iniciar o fluxo. Um design simples de guia/válvula é mostrado na Fig. 3.3a, onde o fluxo de reagente em um reator é iniciado pressionando uma válvula [15]. Dobrar dispositivos para iniciar as etapas de fluxo/reagentes também foi previamente demonstrado. Por exemplo, a Fig. 3.3b mostra uma dobradura tipo origami dispositivo para extração de ácido nucleico no local de atendimento. As camadas L1-L4 se dobram acima e abaixo da camada L0, e as funcionalidades do dispositivo representam 1 filtro de DNA, 2 resíduos almofada de absorção com suporte de Mylar, 3 copos de carregamento de amostra, 4 tampões de lise/lavagem almofada de armazenamento e reidratação, 5 canais de transporte de buffer e 6 pilhas de contato [16]. Os interruptores manuais do operador também podem empregar controles de tempo ou volume para iniciar, parar ou atrasa o fluxo da amostra. Por exemplo, a Fig. 3.3c, d mostra um interruptor on, onde o fluxo de fluido para baixo um "canal de temporização" incha um atuador facilitando o fluxo de fluido de amostra atrasado, com comprimentos de canal de temporização diferentes, resultando em atrasos diferentes. Os métodos não mecânicos controlados pelo operador são menos comuns e geralmente empregar

chaves e válvulas de temperatura, elétricas ou magnéticas. A temperatura pode ser usada para variar a hidrofobicidade do papel modificado com um surfactante. Por exemplo, O papel modificado com brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTMAB) é hidrofóbico em baixas temperaturas (inibindo o fluxo de fluido), mas torna-se hidrofílico em temperaturas mais altas.

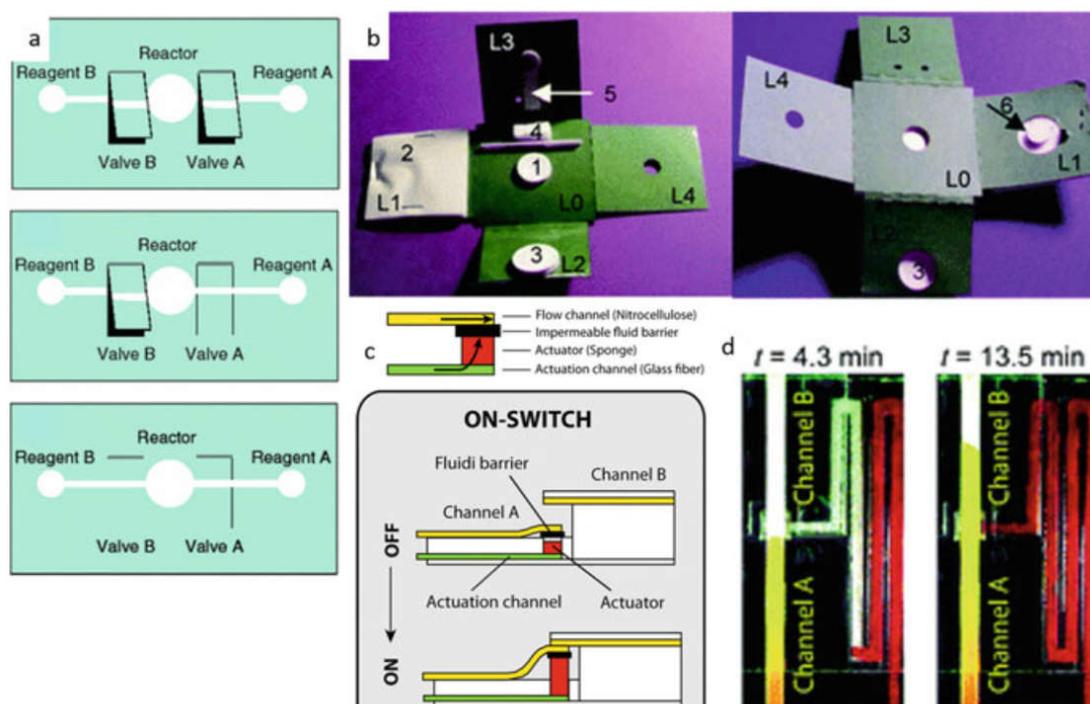


Figura. 3.3 Interruptores mecânicos controlados pelo operador, (a) um projeto simples de válvula de pressão para introdução de reagentes em um reator [15], (b) um dispositivo de origami microfluídico para extração de ácido nucleico (esquerda: lado frontal, direita: parte traseira do dispositivo) [16], (c) um interruptor de medição de tempo para o controle atraso do fluxo de amostra [158], adaptado com permissão das referências [15, 16, 158], respectivamente, (d) Imagens de lapso de tempo de um interruptor com um canal de atuação serpentina para fornecer válvula cronometrada atuação temperaturas (permitindo o fluxo de fluido) [17].

Da mesma forma, dielétricos podem ser empregados para alterar a hidrofobicidade de um canal de papel, com base na aplicação de uma tensão para eletrodos hidrofóbicos/hidrofílicos para interromper/iniciar o fluxo de fluido [18]. Interruptores magnéticos foram desenvolvidos para retardar o fluxo da amostra

por aproximadamente 30 min, com base em um resistor disparando um eletromagnético que abre/fecha uma válvula cantilever de papel, iniciar/parar o fluxo [19].

Os métodos automatizados destinam-se a controlar o fluxo sem entrada do operador e são normalmente projetados para volumes específicos, taxas de fluxo e tempos para específicos formulários. Um exemplo simples e elegante disso envolve o corte de microcanais em canais de papel usando uma lâmina de faca [20]. Quando os canais são paralelos No canal, as taxas de fluxo são aumentadas em aproximadamente 60% em comparação com dispositivos não tratados. Além disso, as taxas de fluxo podem ser reduzidas em aproximadamente 45% por meio de microcanais esculpidos perpendicular à direção do fluxo. Mudanças na geometria/área da seção transversal podem também ser usados para gerar atrasos de fluido in situ. Por exemplo, a colocação de uma camada absorvente pode gerar atrasos de até 20 min [21]. Finalmente, a modificação do papel pode ser usada para gerar um atraso no fluxo de fluido in situ. Um exemplo comum disso é através da deposição de açúcares, onde uma maior concentração de açúcar resulta em uma taxa de fluxo mais lenta/atraso mais longo [22].

### **3.2 Carregamento de Amostras**

A adição de amostra é um aspecto crítico dos PADs que muitas vezes recebe pouca consideração apesar de sua importância. Além dos pré-tratamentos de amostra que serão cobertos mais adiante neste capítulo (Seção 3.3), há uma variedade de abordagens para carregamento, cada um com suas próprias vantagens e desvantagens. Fundamentalmente, a abordagem deve ser voltada para as circunstâncias; pipetar um volume definido de analito em um tempo definido a um dispositivo por um técnico treinado é ideal para testes de laboratório centralizados. Por outro lado, muita pesquisa recente no campo baseado em papel é focada no rápido, robusto, injeção controlada e sequencial de vários reagentes, em horários definidos, em condições, dentro de uma configuração de recursos limitados, sem envolvimento do operador e em baixo custo.

### 3.2.1 Entrega Única

A entrega de amostras a um PAD pode ser realizada por meio de abordagens externas (por exemplo, pipetagem) ou abordagens online (por exemplo, injeções). Em ambos os casos, o específico volume e tempo de entrega são os fatores críticos. Algumas abordagens manuais comuns que empregam o manuseio do operador são detalhadas na Tabela 3.2. Para alcançar a implantação de dispositivos em configurações de recursos limitados, muitas inovações buscam aplicar carregamento sem operador de volumes controlados de amostra.

Tabela 3.2 Abordagens manuais para entrega de reagente único em PADs.

Abordagem	Aplicação Comum	vantagens/desvantagens da aplicação
Pipetagem manual	Entrega de reagente centralizado em laboratórios	Ideal para pesquisa e controle de volume e tempo de injeção, mas requer treinamento técnico
Pipetas descartável	Amostragem ambiental, por exemplo, amostras de águas residuais	Simples, barato para testes em campo, mas variabilidade inerente e não descartável com operador amador
Picadas digitais	Amostragem de sangue	Pode ser usada por não especialistas no local dos cuidados, mas com transferências variáveis e volumes desconhecidas
Microagulhas [23]	Amostragem de sangue	Volume mais preciso do que picadas digitais e integrado com PAD, mas usa dispositivo mais complexos
Slipchip [24]	Processamento paralelo/adição de reagentes para um uma série de poços/dispositivos	Detecção multiplexada/de alto rendimento facilitado, mas requer pré-carregamento de reservatórios com pipeta

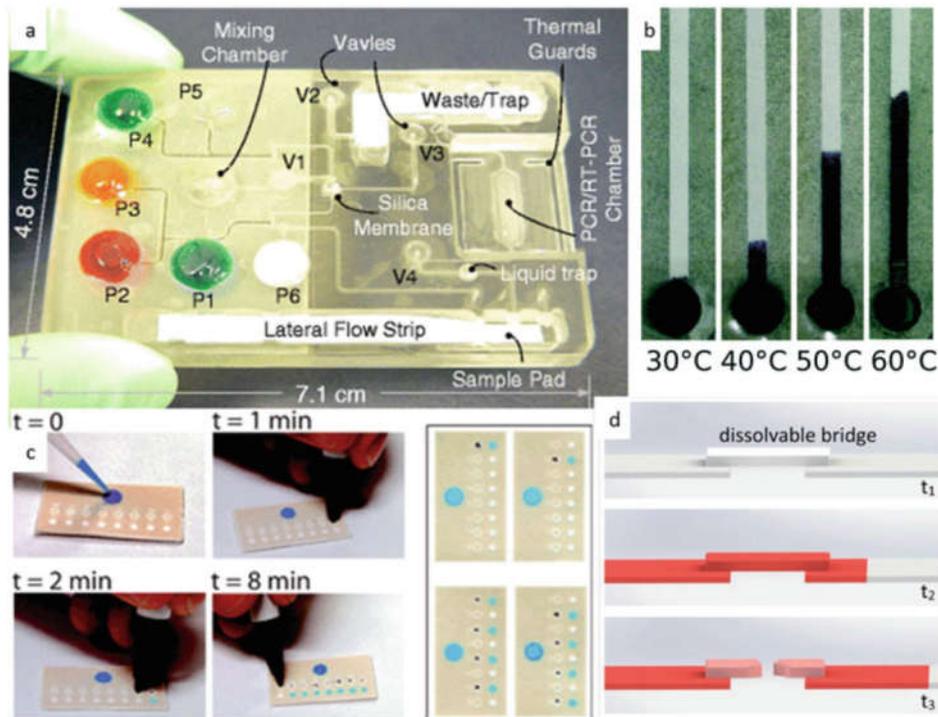


Figura. 3.4 Métodos de adição de amostra no dispositivo, (a) embalagens de bolhas (p1-p6) para injeção de amostra em um ensaio de fluxo lateral [25], (b) liberação de amostra mediada por temperatura de um hidrogel [27], (c) pressão botões “on” para iniciar a adição de amostras a diferentes regiões de um  $\mu$ PAD [26], (d) açúcar solúvel pontes para controle de volume de amostra [28], reproduzido com permissão das referências [25–28], respectivamente.

O volume da amostra é uma variável particularmente crítica, pois afeta o carregamento de massa/partícula de uma amostra real e, portanto, deve ser rigorosamente controlada para testes analíticos. Pacotes de bolhas são uma excelente ferramenta para armazenar um volume de reagente definido em um dispositivo, o que pode ser liberado pressionando a bolsa por um operador ou fechando de um cassete. Um exemplo de dispositivo é mostrado na Fig. 3.4a, onde os reagentes são injetados das embalagens bolhas através de êmbolos controlados por dispositivo que estão alojados no cassete, resultando em injeção de amostra controlada em direção a um ensaio de fluxo lateral para detecção de ácido nucleico [25]. Um conceito semelhante foi demonstrado para amostras além de diferentes regiões de um dispositivo, por meio de pressão de

pontos com uma caneta para fechar canais e iniciar o fluxo de fluido, conforme mostrado na Fig. 3.4c [26]. Os hidrogéis podem ser usados para armazenar reagentes e liberá-los com estímulos externos, como uma mudança de temperatura. A Figura 3.4b demonstra esse conceito com liberação linear de soluto de um composto Hidrogel de N-isopropilacrilamida/acrilamida em temperaturas crescentes [27]. Uma solução interessante para controlar volumes de amostra é através de pontes solúveis como mostrado na Fig. 3.4d. Aqui, a ponte de açúcar pode ser ajustada para entregar diferentes volumes baseado na concentração de açúcar e geometria [28].

### 3.2.2 Entrega Sequencial

A entrega ou injeção sequencial é naturalmente mais complexa do que a entrega única e tornou-se foco recente do campo nos últimos aproximadamente 5 anos. A capacidade para adicionar diferentes reagentes de diferentes volumes e em tempos e fluxos controlados taxas é fundamental para o desenvolvimento de  $\mu$ PADs, dado que muitos ensaios analíticos envolvem várias etapas e tempos/condições de reação controlados. Enquanto depósito de reagentes em um  $\mu$ PADs para reidratação posterior pode facilitar reações sequenciais, isso formato é inflexível e aplicável apenas a reagentes com solubilidade apropriada para deposição que será estável quando seca no papel. Uma das abordagens mais simples para a entrega sequencial de reagentes é empregar canais de comprimento de caminho variado, onde caminhos de entrada mais longos demoram mais para atravessar permitindo a adição de amostra cronometrada. Um exemplo disso é mostrado na Fig. 3.5a; para um ELISA, um anticorpo (c) e substrato (d) são adicionados sequencialmente para zonas de teste (b) e zonas de controle (a) [29]. Uma desvantagem dessa abordagem é que comprimentos de canal mais longos resultam em maior perda de amostra e, portanto, a maioria de abordagens de injeção sequencial empregam métodos alternativos [30]. Como anteriormente descrito, a deposição de açúcar pode ser usada para retardar o fluxo de fluido, e isso tem sido demonstrado para injeção sequencial com base na concentração

de açúcar depositado em diferentes canais de um cassete dobrável como mostrado na Fig. 3.5b [22].

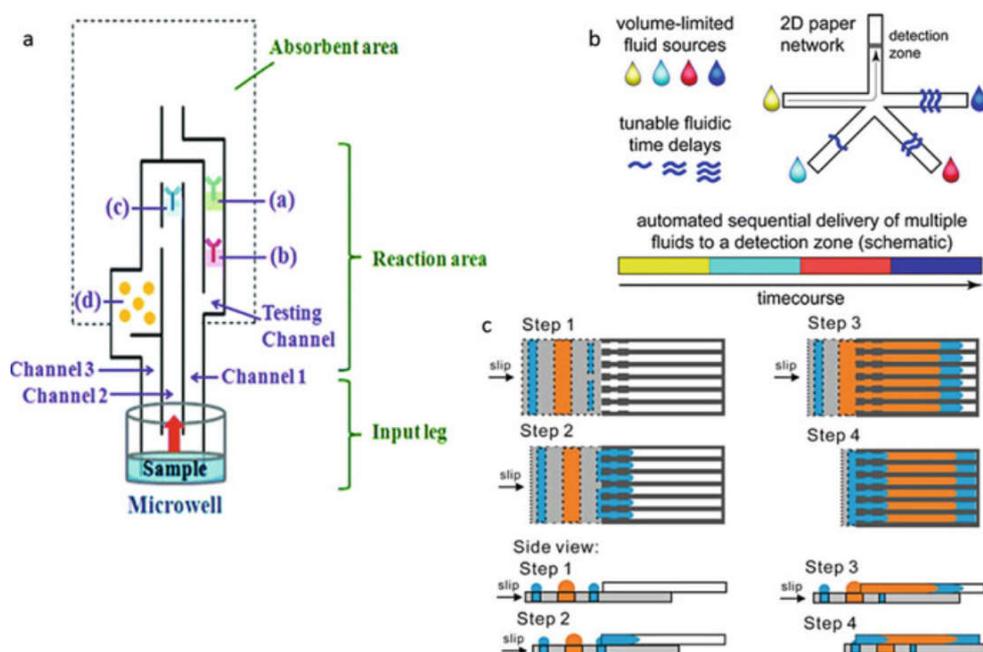


Figura. 3.5 Dispositivos de papel de entrega sequencial simples, (a) sanduíche ELISA com base no comprimento do canal [29], (b) canais modificados por açúcar para injeção sequencial de canais de comprimento idêntico [22], (c) slipPAD para entrega sequencial através de uma tira de puxar [24], reproduzida com permissão de referências [22, 24, 29], respectivamente.

Finalmente, *slipPADs* que empregam tiras de puxar podem ser empregados para a entrega sequencial de reagentes pré-carregados, como mostrado na Fig. 3.5c [24]. Redes de papel são uma classe útil de  $\mu$ PADs de injeção sequencial, com algumas funcionalidades avançadas sobre o anterior nos dispositivos. Exemplos de redes de papel de uma, duas e três dimensões (1DPN, 2DPN, 3DPN) são mostrados na Fig. 3.6. 1DPNs entrega poços para conter os diferentes reagentes que então liberam sequencialmente ao longo de um canal de papel reto (Fig. 3.6a) [31]. 2DPN entrega pernas de entrada paralelas

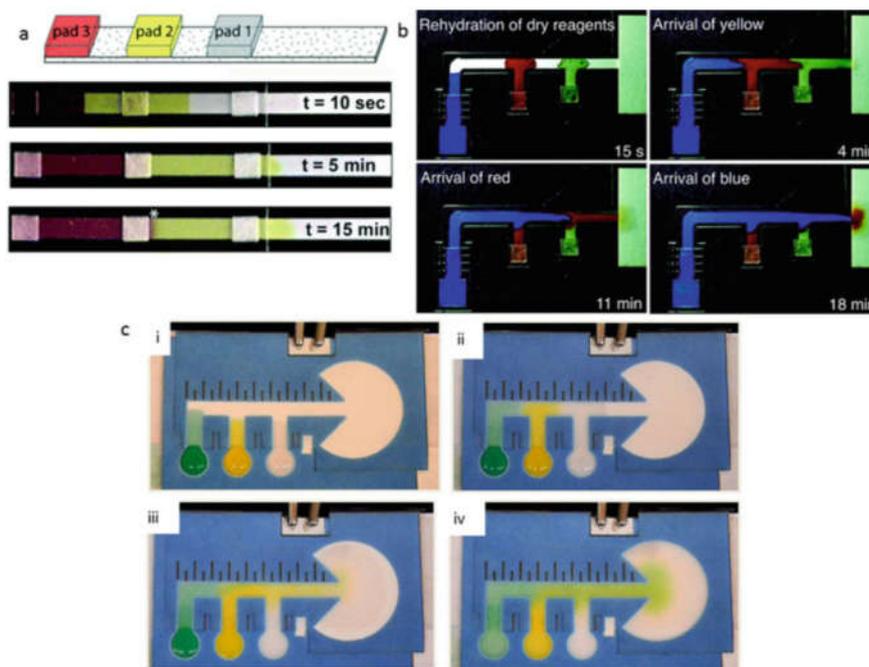


Figura. 3.6 Dispositivos de injeção sequencial de rede de papel, ilustrados com diferentes corantes, (a) 1DPN [31], (b) 2DPN [32], (c) 3DPN [4], reproduzido com permissão das referências [4, 31, 32], respectivamente.

ao canal principal do papel que pode ser iniciado na entrega do reagente às pernas, ou pré-carregadas com reagentes (amostra seca nas pernas para reidratação e entrega sequencial) [32]. As amostras se esgotam sequencialmente a partir da eluição das pernas e estes 2DPN foram testados com uma variedade de aplicações [33]. 3DPN empregam os mesmos princípios de perna de entrada como 2DPN, mas empregam um grande canal oco ( $390\ \mu\text{m}$ ) entre duas camadas de papel conforme descrito anteriormente na Fig. 3.2 (Seção 3.1.1), resultando em vazões significativamente mais rápidas [4]. Recurso 1DPN e 2DPN taxas de fluxo mais lentas do que 3DPN (1 vs. 15 min), mas arquiteturas de dispositivos mais simples e esquemas de fabricação. Esses dispositivos de rede de papel são mais receptivos do que os PADs de injeção sequencial anteriores para aplicações com grandes volumes de amostra, reagentes quase estáveis, ou métodos analíticos onde a taxa de fluxo contribui para o sinal (por exemplo, eletroquímica).

### 3.3 Pré-tratamento da Amostra

Ao detectar um analito específico em amostras ambientais ou biológicas, muitos componentes estão presentes na matriz além do analito de interesse. Enquanto estes componentes adicionais podem ser inertes ao ensaio, em muitos casos eles podem causar falso positivos ou negativos, necessitando de etapas adicionais de pré-tratamento para removê-los. Além disso, uma armadilha comum do PAD são os limites de detecção (LODs) mais altos em comparação com os métodos tradicionais, portanto, a pré-concentração da amostra geralmente é necessária para atingir os LODs necessários dependendo da aplicação. Aqui, discutimos algumas das várias abordagens para remover interferências de amostras complexas e ferramentas de pré-concentração.

#### 3.3.1 Remoção de interferências da matriz de amostra

Ao detectar metais específicos em amostras ambientais, é importante que o método de detecção não apresente reação cruzada com outras espécies metálicas, causando falsos positivos (Fig. 3.7a, b). Infelizmente, este é um desafio comum enfrentado em motivos de detecção colorimétrica para metais. Agentes de mascaramento podem ser usados para prevenir o substrato colorimétrico de reagir com metais de interferência [2]. Agentes de mascaramento podem ser reagentes usados para ajustar o pH ou oxidar ou reduzir uma determinada espécie metálica, facilitando a seletividade [5, 34, 35]. De forma útil, o papel pode ser padronizado tal que uma única adição de amostra a um  $\mu$ PAD pode ser guiada para vários canais, permitindo aos usuários rastrear vários agentes de mascaramento ao mesmo tempo [36].

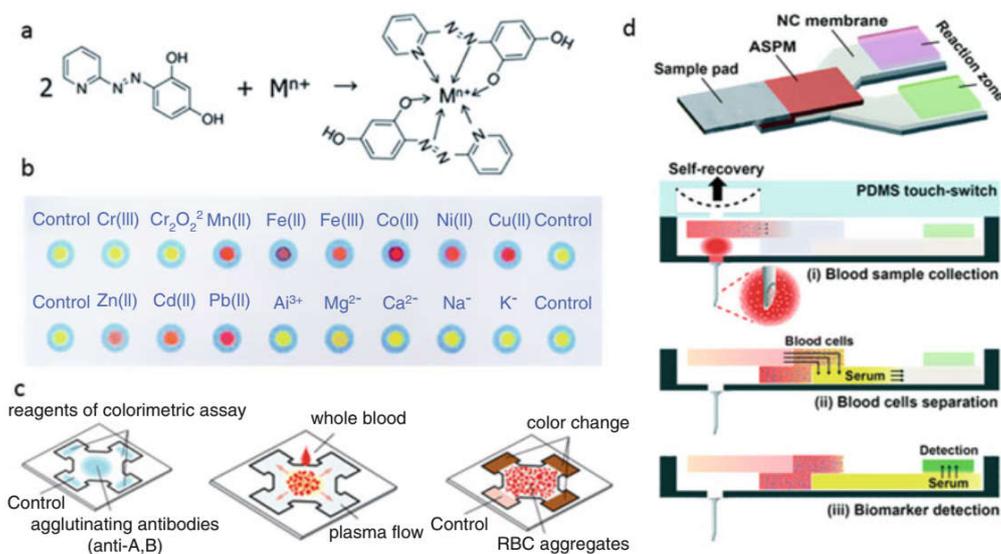


Figura. 3.7 (a) Complexação de 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) e espécies metálicas ( $\text{Mn}^{2+}$ ) [36]; (b) teste de manchas em papel mostrando reatividade metal-PAR (formação de cor laranja e vermelha) para vários metais de transição, alcalinos e alcalino-terrosos [36]; (c) dispositivo baseado em papel que primeiro separa glóbulos vermelhos do plasma através da aglutinação e, em seguida, detecta a glicose através da colorimetria [38]; (d) sistema multidiagnóstico ativado por toque com polissulfona assimétrica e nitrocelulose membranas para separação de plasma [23], reproduzidas com permissão das referências [23, 36, 38], respectivamente

Eficiência de mascaramento de um produto químico específico usado para espécies interferentes é então definida por variação percentual no sinal entre a intensidade de mascaramento e a intensidade de controle. As amostras biológicas são tipicamente complexas, incluindo uma variedade de componentes na amostra além do biomarcador ou patógeno que o usuário detecta. Por exemplo, o sangue é um coquetel de biomarcadores imunológicos e moleculares usados para diagnóstico de doenças, tornando-a uma matriz de amostra crítica para aplicações biomédicas de dispositivos baseados em papel. Devido à complexidade do sangue total, muitos diagnósticos removem glóbulos vermelhos para detecção, necessitando de soluções prontas para o campo para filtrar e processar o sangue. Em laboratórios de diagnóstico, as centrífugas são uma ferramenta comum para separar os glóbulos

vermelhos do plasma. O papel foi usado para desenvolver uma centrífuga manual para uso em campo com base na física de um brinquedo giratório, que pode atingir velocidades de até 125.000 RPM [37]. Além disso, como os  $\mu$ PADs são mais comumente fabricados usando papel de filtro, muitos dispositivos foram desenvolvidos onde a filtração do sangue e a detecção de biomarcadores são concluídas *in situ*. A maioria dos dispositivos baseados em papel que empregam a filtração do sangue filtram o plasma do sangue total com base em agregação de glóbulos vermelhos [38, 39] ou exclusão de tamanho [40]. Após a filtração, o plasma é usado para testes bioquímicos para detectar biomarcadores específicos, como anticorpos específicos para tipagem sanguínea ou glicose (Fig. 3.7c, d) [23, 38, 39]. Embora o papel seja uma plataforma válida para processamento e filtragem de sangue total, é não aplicável a outras amostras biológicas. Existem muitos exemplos complexos matrizes onde biomarcadores específicos devem ser filtrados de outros componentes de a amostra de modo a não interferir com o ensaio de detecção. Para essas amostras, os usuários podem implementar a separação imunomagnética (IMS), onde os anticorpos específicos a um biomarcador ou patógeno são ligados covalentemente à superfície de uma pérola. As esferas imunomagnéticas são adicionadas a uma amostra complexa para aderir ao analito antes de separar os grânulos da amostra usando um ímã, seguido de reconstituir os grânulos em tampão fresco. A IMS tem sido usada, além de dispositivos papel, para muitas amostras complexas diferentes, incluindo carne e laticínios, bem como amostras biológicas como sangue total e até fezes de animais [41]. Em  $\mu$ PADs especificamente, o IMS foi demonstrado para a detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* em água, leite integral e fezes de pássaros [42, 43].

### 3.3.2 Pré-concentração

Além de superar os efeitos da matriz, as concentrações do analito em condições biológicas ou amostras ambientais podem ser altamente escassas. Portanto, a capacidade de pré-concentração uma amostra, especialmente online, é uma ferramenta poderosa para

atingir os limites de detecção de traços que são regularmente exigidos. Por exemplo, além de filtrar o analito alvo em sua matriz, a IMS também facilita a pré-concentração por meio da reconstituição em um tamanho menor volume de tampão do que o volume de amostra inicial. Uma das abordagens mais simples para pré-concentração é capturar o alvo de interesse em um sensor durante fluxo. Isso pode ser realizado através da ligação de um alvo a partículas magnéticas, por pré-concentração conforme mostrado na Fig. 3.8a. Da mesma forma, as partículas de vírus têm foram capturados em eletrodos modificados por anticorpos colocados em um  $\mu$ PAD multicamada de canal oco, conforme mostrado na Fig. 3.8b [44].

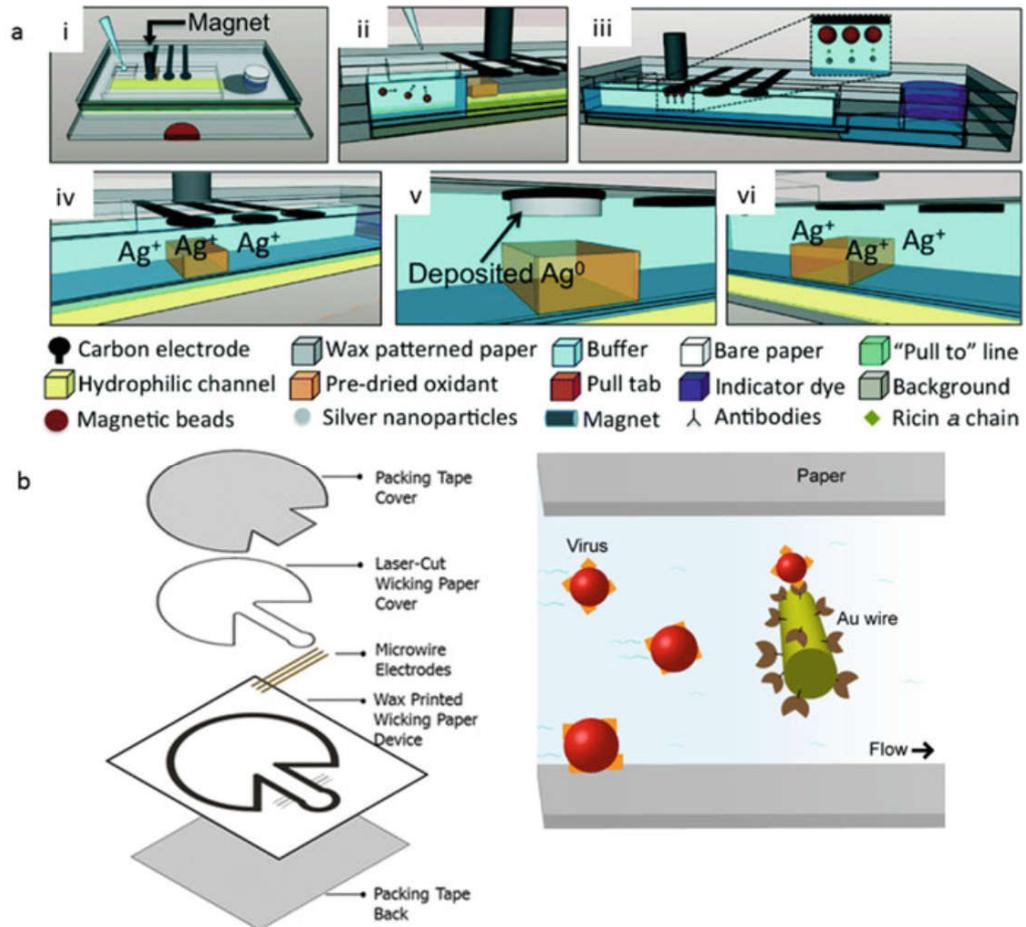


Fig. 3.8 Pré-concentração através de captura a jusante, (a) captura magnética de ricina/anticorpo/esferas magnéticas [159], (b) captura de partículas virais em anticorpos modificados eletrodos de microfios em um  $\mu$ PAD multicamada [44, 160], reproduzido com permissão de referências [44, 159, 160], respectivamente.

A polarização por concentração de íons (ICP) é uma técnica poderosa para a pré-concentração de espécies carregadas. Aqui, a aplicação de um campo elétrico separa partículas carregadas do resto de uma amostra para facilitar a pré-concentração. Por exemplo, corantes fluorescentes carregados podem ser separados do soluto em diferentes canais fluídicos a jusante, na aplicação de carga de eletrodos Nafion, como mostrado na Fig. 3.9a [45]. Uma abordagem semelhante pode ser usada para a separação e detecção de ds- e ssDNA, usando um campo elétrico para migração eletroforética e fluxo eletrosmótico, conforme mostrado na Fig. 3.9b [46]. O empilhamento eletrocinético emprega um campo

elétrico para realizar uma titulação entre um eletrólito de fundo e uma amostra solução em um  $\mu$ PAD.

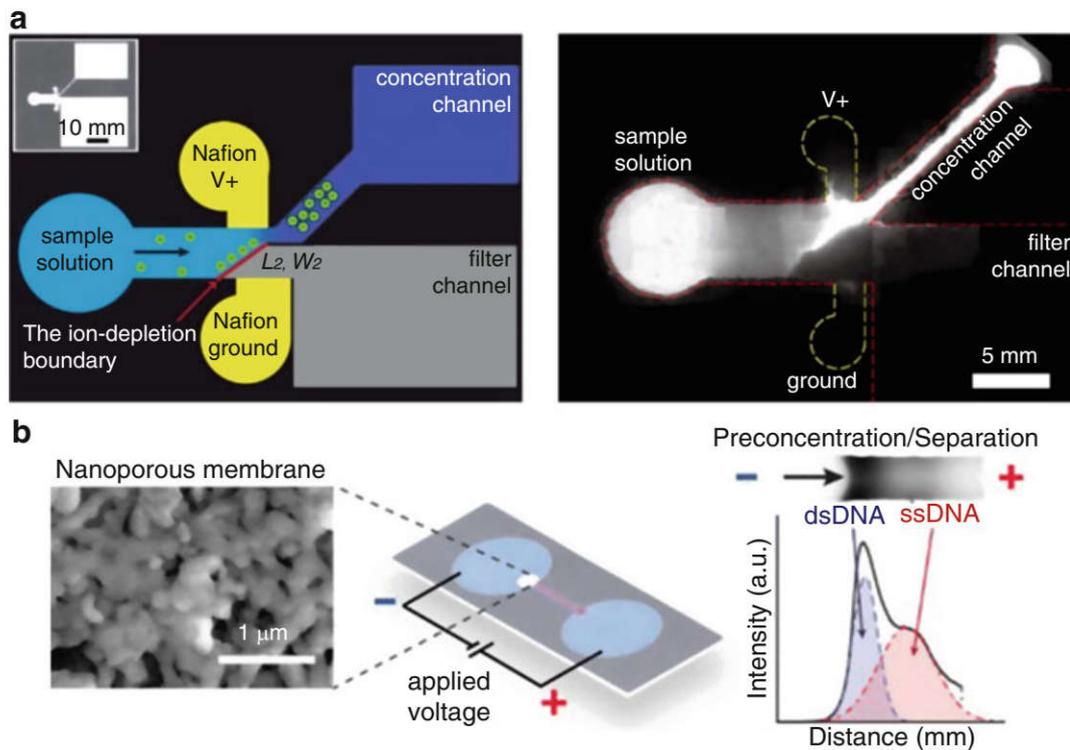


Fig. 3.9 Polarização da concentração de íons para pré-concentração em  $\mu$ PADs, (a) separação de partículas fluorescentes sob fluxo [45], (b) polarização da concentração de íons para a separação e pré-concentração de ssDNA [46], reproduzido com permissão das referências [45, 46], respectivamente.

Isso forma uma zona titulada/esgotada de baixa condutividade no canal, gerando um alto campo elétrico no limite entre esta zona e o eletrólito de fundo e concentrando os íons da amostra nesta interface. Isso foi previamente empregado para empilhamento/pré-concentração de 150 vezes de proteínas [47]. Finalmente, polieletrólitos carregados, como Nafion ou membranas de inclusão de polímeros têm sido demonstrados para a pré-concentração de espécies carregadas, como Cu ou corantes sintéticos [48, 49]. Estes são simples de implementar, mas não são tão poderosos na pré-concentração em comparação com a polarização da concentração iônica de eletrocinética empilhamento.

### **3.4 Mecanismos de Reação**

Embora o papel tenha muitas propriedades diferentes que são vantajosas para detecção, uma das propriedades mais críticas é sua capacidade de armazenar e estabilizar reagentes químicos. Isso permite que reações químicas e biológicas ocorram em o substrato de papel, facilitando a detecção online de inúmeros analitos que variam de contaminantes ambientais, como metais e pesticidas, a marcadores biológicos e agentes infecciosos.

#### **3.4.1 Reações Químicas: Complexação de Metal para Análise ambiental**

Eletroquímica e colorimetria são abordagens de detecção comuns para a quantificação de espécies metálicas em PADs. Embora os metais possam ser detectados diretamente através análise de decapagem, aumentando a sensibilidade, seletividade e limites de detecção mais baixos requerem o uso de modificadores químicos para os eletrodos [50, 51]. Para detecção colorimétrica de metais, um substrato químico é frequentemente usado para complexar com o metal de interesse, resultando em uma mudança de cor correspondente à concentração do metal alvo (Fig. 3.10a) [5, 34, 48, 52, 53]. Ao desenvolver e otimizar um PAD para detecção de metais baseada em complexação química, reatividade cruzada com outros metais é um desafio comum que exige testes de interferência com metais comuns presentes na matriz de interesse (por exemplo, ar, água, solo) além do metal alvo.

Além do teste de interferência, a complexação também tem sido usada para detectar produtos químicos, como antibióticos, em amostras de água [54, 55].

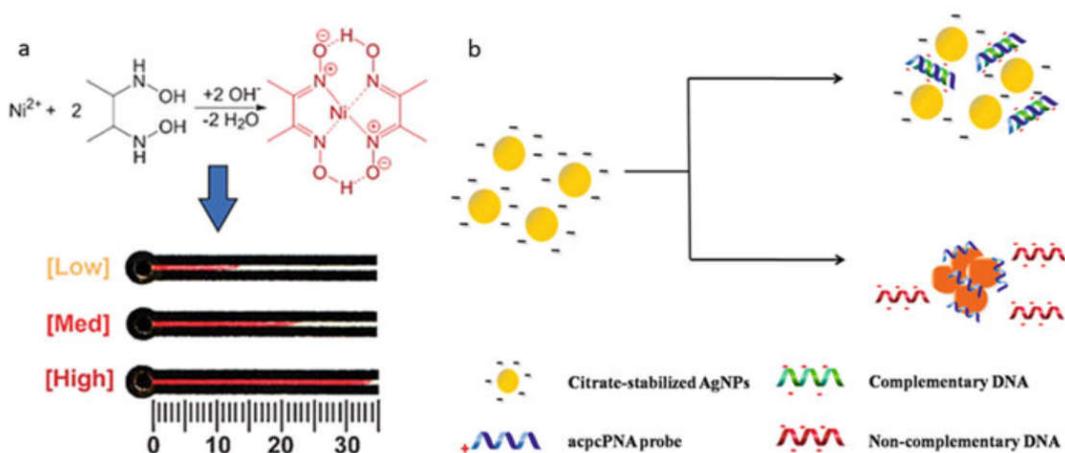


Fig. 3.10 (a) Detecção baseada em distância de níquel (II) usando complexação de metal para uma mudança mensurável de cor de claro para vermelho [52], (b) detecção de DNA viral usando ácidos nucleicos peptídicos (PNA) e nanopartículas [61], reproduzidos com permissão das referências [52, 61], respectivamente.

### 3.4.2 Nanopartículas

Nanopartículas compostas de vários materiais diferentes têm sido usadas em dispositivos baseados em papel, mas as nanopartículas de ouro e prata são duas das mais comuns. As nanopartículas têm uma propriedade natural de mudar de cor ao agregar, tornando-os uma escolha popular para detecção colorimétrica simples e robusta em  $\mu$ PADs (Fig. 3.10b). As nanopartículas estão associadas a altos coeficientes de extinção, facilitando um método robusto e sensível para a detecção colorimétrica [3], embora detecção mais quantificável pode ser alcançada através da detecção eletroquímica de nanopartículas [56]. A agregação tem sido usada para detectar metais como o cobre [57] e mercúrio [58], juntamente com biomoléculas [59, 60], vírus [56, 61, 62] e bactérias [63]. Além da agregação, as nanopartículas também podem ser usadas para melhorar uma reação química [64], e nanopartículas de sílica têm sido usadas para melhorar e unificar a formação de cor para reações enzimáticas colorimétricas [65].

### 3.4.3 Reações Químicas para Análise Forense

Embora os dispositivos baseados em papel sejam mais comumente usados para testes ambientais e biológicos, vários dispositivos

foram usados em aplicações forenses de ponto de necessidade [66]. Por exemplo,  $\mu$ PADs foram desenvolvidos para detectar compostos associados com explosivos caseiros desconhecidos [67, 68]. Este  $\mu$ PAD, que executa cinco análises separadas de uma vez por meio de um dispositivo ramificado, detecta explosivos como TNT e RDX através da detecção de compostos associados a explosivos, incluindo nitrato, nitrito, clorato, oxidantes de perclorato e amônio. Outro dispositivo foi desenvolvido para detectar drogas desconhecidas apreendidas para análise forense, incluindo cocaína, opiáceos, cetamina e fenetilaminas [69]. Finalmente, para ajudar a combater o problema significativo de uísque adulterado no Brasil, um teste spot em papel foi projetado para detectar corante alimentício caramelo comumente usado na adulteração de uísque [70].

#### **3.4.4 Detecção baseada em enzimas**

As enzimas são um dos motivos de detecção mais populares associados a dispositivos baseados em papel devido às suas habilidades catalíticas para acelerar uma reação química e amplificar um produto detectável. As enzimas podem ser usadas para detectar analitos específicos, incluindo uma das reações de prova de conceito mais populares usadas em dispositivos: glucose [71]. Esta reação é um sistema bienzimático que funciona através glucose oxidase catalisando uma reação com glucose para resultar em peróxido de hidrogênio como um produto, que é subsequentemente reagido com peroxidase de rábano (HRP) como visto na Fig. 3.11a. Existem vários substratos que podem ser usados com HRP para resultar em um produto detectável, colorimetricamente ou eletroquimicamente [71].

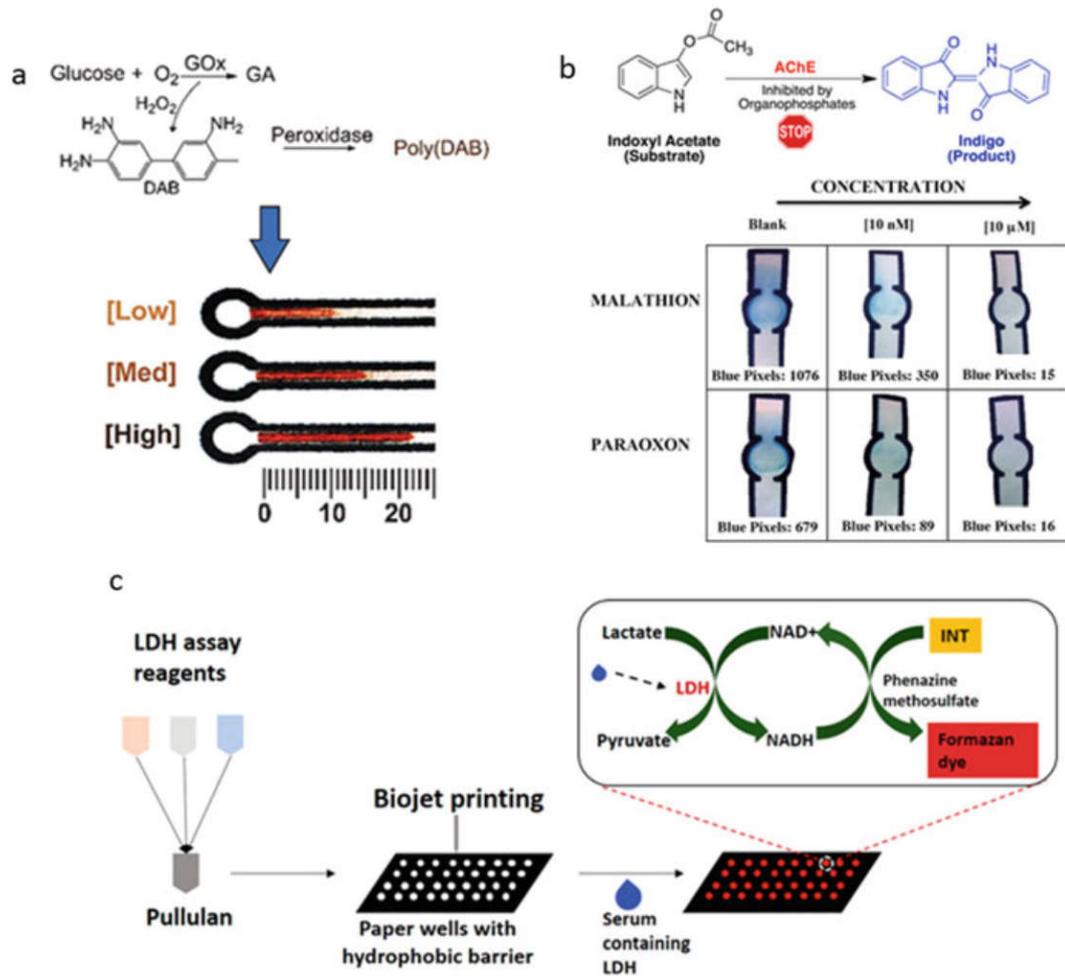


Fig. 3.11 (a) Usando um sistema bioenzimático de glicose oxidase (GOx) e peroxidase de rábano (HRP) para detectar glicose [52], (b) detectar pesticidas organofosforados através da inibição de acetilcolinesterase, resultando em menos mudança de cor à medida que a concentração aumenta [77], (c) avaliando falência de órgãos através da detecção da enzima de ocorrência natural, lactato desidrogenase, usando substratos colorimétricos [86], reproduzidos com permissão das referências [52, 77, 86], respectivamente.

Outras reações enzimáticas que foram usadas em  $\mu$ PADs incluem a detecção de outras biomoléculas como ácido úrico, creatina urinária, fenilalanina e lactato [72-76]. Além do uso de enzimas na detecção de um analito com base na mudança de cor, os analitos podem ser detectados através da inibição da enzima, resultando em uma falta de mudança de cor. Este tem sido usado na detecção de pesticidas organofosforados que inibem a reação de acetilcolinesterase com um substrato colorimétrico, resultando

em menos mudança de cor a concentração de pesticidas aumenta (Fig. 3.11b) [77, 78].

O uso de enzimas em  $\mu$ PADs, várias publicações discutiram quais substratos de papel resultam na reação mais eficiente [79] e as melhores modificações químicas para estabilizar e armazenar enzimas por meses, aumentando a robustez do dispositivo para implantação em campo [80].

Além de usar enzimas para detectar analitos, substratos podem ser usados para detectar a atividade enzimática em uma amostra. Detecção da atividade de enzimas específicas pode indicar certos patógenos ou problemas de saúde. Por exemplo, os  $\mu$ PADs foram desenvolvidos para detecção de bactérias com base em enzimas produzidas pelas bactérias. Detecção de enzimas selecionadas que as bactérias produzem podem distinguir entre diferentes espécies [81-83], patogenicidade [42] e bactérias resistentes a certos antibióticos [84].

A detecção de bactérias com base na atividade enzimática é uma plataforma atraente porque detecta bactérias saudáveis e viáveis. Outros métodos populares, como anticorpos e amplificação de ácidos nucleicos, detectam bactérias, quer os patógenos estejam vivos ou mortos.

A avaliação da saúde humana é outra aplicação da detecção de enzimas, porque muitas doenças estão associadas com a expressão ou falta de função de enzimas específicas (Fig. 3.11c). Dispositivos baseados em papel para avaliação de saúde foram estabelecidos para detecção de enzimas para avaliar a função hepática [85], falência de órgãos [86], fertilidade masculina [87] e até envenenamento por organofosforados [88].

#### **3.4.5 Detecção baseada em anticorpos**

Os imunoenaios, detectando um analito com base em anticorpos, fornecem aos cientistas analíticos uma detecção específica e sensível de biomoléculas e patógenos associados com doença humana. Os anticorpos são muitas vezes muito específicos para o analito com pouca reatividade cruzada e pode ser fabricado para

ser específico para quase qualquer analito. Uma das formas mais conhecidas de dispositivos baseados em papel é o teste de gravidez, que é um ensaio de fluxo lateral (LFA) baseado em anticorpos específicos para coriônica humana gonadotrofina (hCG), uma proteína que as mulheres expressam durante a gravidez [89]. LFAs costumam usar anticorpos com nanopartículas ligadas covalentemente que se agregam, indicando uma amostra positiva através da mudança de cor. Outra aplicação popular de anticorpos é imunossorvente ligado a enzimas ensaios (ELISAs) onde as enzimas são ligadas covalentemente aos anticorpos em vez de nanopartículas. As enzimas fornecem uma vantagem sobre as nanopartículas porque as enzimas podem amplificar continuamente um substrato, fornecendo um limite inferior de detecção. ELISAs são tradicionalmente concluídos em placas de poliestireno de 96 poços e um leitor de placas, mas ELISA foi introduzido em dispositivos baseados em papel em 2010 [90]. Ao mover o ensaio para o papel, houve diminuição do consumo de reagente, desperdício e tempo total do ensaio. Desde a sua introdução ao papel, o ELISA foi demonstrado na detecção de biomarcadores [91–93] e patógenos como vírus [94, 95] e bactérias [96]. ELISAs são conhecidos por exigir um procedimento trabalhoso com várias etapas de pipetagem e reagentes necessário para a detecção final, tornando o ensaio menos desejável para aplicações pontuais associadas a  $\mu$ PADs. Com a capacidade do papel de armazenar reagentes, uns poucos dispositivos foram desenvolvidos onde o usuário adiciona amostra do paciente e tampão para reidratar os reagentes e interagir com a amostra para completar o ensaio. Tais dispositivos incluem um dispositivo deslizante de tira de papel [14] e um dispositivo rotativo [93] onde o usuário desliza ou gira o dispositivo para depositar diferentes reagentes associados a cada etapa do ensaio. Implementação de semi-automação amigável do procedimento laborioso permite o uso de ELISA como um método sensível e fácil de usar para o ponto de necessidade formulários. Além disso, modificações químicas adequadas podem facilitar o armazenamento de anticorpos e enzimas em papel por pelo menos 5 meses, aumentando a robustez do dispositivo [97]. Para um resumo

detalhado do procedimento de um ELISA baseado em sanduíche, (ver Fig. 3.12a).

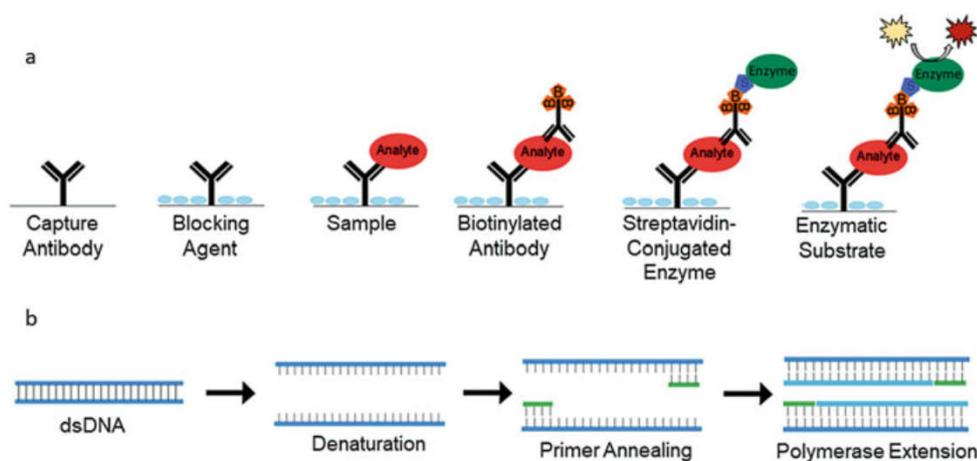


Fig. 3.12 (a) A amplificação de ácido nucleico é um motivo de detecção baseado na amplificação de DNA específico ou sequências de RNA até uma concentração detectável, (b) procedimento para completar o ensaio sanduíche de imunossorção enzimática (ELISA) para detecção de analito específico e sensível.

### 3.4.6 Amplificação de Ácido Nucleico

Um dos métodos diagnósticos mais rápidos e sensíveis usados na área da saúde e pesquisa é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que é um método baseado em amplificação de ácidos nucleicos a uma concentração detectável (Fig. 3.12a). PCR não foi aplicado diretamente em dispositivos baseados em papel, provavelmente porque o PCR requer um termociclador, um equipamento caro e complexo que faz o ensaio não ser ideal para configurações de ponto de necessidade. Um termociclador é necessário porque a PCR requer que a solução mude entre várias temperaturas específicas para completar o ensaio [98]. Em vez disso, técnicas de amplificação isotérmica, incluindo amplificação isotérmica (LAMP) e amplificação da recombinase polimerase (RPA) foram aplicadas a  $\mu$ PADs para detecção sensível de bactéria [99] e vírus [100-102]. Os sistemas isotérmicos ainda exigem que o sistema seja aquecido, apenas até uma determinada temperatura de 60 °C para LAMP e 40 °C para RPA. Para estabelecer ainda mais este método para configurações de campo, uma incubadora de baixo custo foi

desenvolvida usando um copo de isopor e aquecedores químicos de mãos [103], e foi relatado que a polietersulfona é o melhor substrato de papel para usar em  $\mu$ PADs baseados em LAMP [104].

#### **3.4.7 Hibridização de Ácido Nucleico**

Os oligonucleotídeos, ou primers, são cadeias curtas de DNA e RNA necessárias para amplificação de ácidos nucleicos; no entanto, eles também podem ser usados como um diagnóstico separado motivo para detectar sequências de DNA complementares. Os oligonucleotídeos fornecem um motivo de detecção porque o DNA de fita simples (ssDNA) é muito específico para o seu próprio sequência complementar para formar o DNA de fita dupla (dsDNA). Esses  $\mu$ PADs muitas vezes funcionam através de uma mudança conformacional entre ssDNA e dsDNA, causando uma mudança no sinal detectável (Fig. 3.12b). Ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) também têm sido usados em ensaios de diagnóstico baseados em oligonucleotídeos [61, 105, 106]. PNA é como o DNA, mas com um esqueleto baseado em peptídeos, que elimina uma molécula carregada e a preocupação de enzimas que ocorrem naturalmente visando o oligonucleotídeos, que são considerados DNA estranho, em uma matriz biológica. Sequências complementares de ácidos nucleicos têm sido usadas em  $\mu$ PADs para a detecção de sequências de ácidos nucleicos associadas ao câncer [106] e doenças neurológicas [107], e no diagnóstico de infecções virais [61, 105].

### **3.5 Detecção**

Uma vez que o objetivo final de desenvolver PADs desde o início era em aplicação em análise no local (POC, do inglês Point Of Care) esquemas de detecção acoplados com PADs devem ser simples, rápidos, sensível, específico, econômico e confiável. Sem dúvida, a colorimetria é o método de detecção mais comum devido à sua simplicidade e potencial para quantificação sem instrumentos. A mudança de cor causada por uma reação que ocorre nos PADs pode ser facilmente observada a olho nu e corresponde à quantidade do analito alvo.

Alternativamente, a detecção eletroquímica também é usada como uma abordagem de detecção para PADs, ou seja, dispositivos eletroquímicos analíticos baseados em papel (ePADs), para melhorar sensibilidade, seletividade e faixa dinâmica de resultados quantitativos. Além disso, outros métodos de detecção, como quimioluminescência (CL), eletroquimioluminescência (ECL), fluorescência (FL) e espectroscopia Raman também foram aplicadas para detecção dos ensaios em PADs.

### 3.5.1 Colorimetria

A detecção colorimétrica provou ser o método de detecção mais comum para PADs devido à sua simplicidade, confiabilidade, baixo custo e alta possibilidade de detecção. Este método de detecção é baseado na observação visual da mudança de cor intensidade ou brilho causado por uma reação enzimática ou química e comparando a mudança com os padrões com intensidade de cor conhecida. Anteriormente, a detecção colorimétrica como uma resposta “sim/não” ou leitura semiquantitativa pode ser simplesmente alcançada a olho nu, que é detecção livre de instrumentos e é suficiente para análise. No entanto, diferenças na percepção das pessoas e condições de iluminação externa podem causar variação na intensidade da cor. Para obter resultados quantitativos mais confiáveis, uma ferramenta de imagem (por exemplo, uma câmera digital, uma câmera de telefone ou um scanner) é usada para capturar imagens da reação e as imagens são posteriormente analisadas por software de imagem (por exemplo, Illustrator, ImageJ) para medir com precisão a intensidade que corresponde à quantidade de analito. Quantificação precisa de ensaios colorimétricos em PADs pode ser alcançado medindo a quantidade de luz refletida dos ensaios em papel usando uma ferramenta de imagem apropriada, por exemplo, uma câmera digital, um telefone celular câmera/smartphone ou um scanner.

**Scanner:** Um scanner de escritório é um dispositivo comum para medir a intensidade da cor dos ensaios em PADs. Um scanner oferece alta resolução, é fácil de usar e não é afetado pelas condições externas de iluminação [2]. Além disso, todas as imagens

parâmetros para digitalização podem ser definidos com precisão. No entanto, medir a intensidade da cor usando um scanner requer uma zona de reação seca. Assim, o ensaio colorimétrico em PADs é normalmente seco ao ar antes de ser digitalizado por um scanner, o que pode levar mais de uma hora, dependendo do volume do ensaio. Além disso, as diferenças na cor do ensaio entre um papel seco e um papel molhado pode causar variação de resultados. Um problema associado ao desbotamento da cor enquanto a reação está secando pode resultar em baixa sensibilidade e uma faixa dinâmica estreita. Além disso, a cor análise de substâncias tóxicas ou biomarcadores de doenças infecciosas usando um scanner sem limpeza e desinfecção adequadas pode causar contaminação e espalhar doenças.

**Câmera digital:** A câmera digital é uma alternativa e muito utilizada para capturar imagens de ensaios colorimétricos em PADs. Câmeras digitais com sensores CCD fornecem dados de imagem de alta qualidade. Usando uma câmera digital, as imagens do ensaio podem ser capturadas em qualquer tempo de reação desde o início da reação até que seque. Normalmente, o tempo de reação é fixo para tirar imagens para garantir que a cor seja medida em o mesmo tempo de reação para resolver o problema associado ao desbotamento da cor com o tempo. Ao capturar imagens, não há contato direto entre uma câmera e a reação, evitando contaminação cruzada e infecção. Além disso, todos os parâmetros de imagem da câmera podem ser definidos e controlados com precisão e exatidão. Imagens com alta qualidade pode ser obtida com câmeras digitais, o que é adequado para aplicações que requerem imagens de alta resolução. Ao contrário dos scanners, a captura de imagens usando digital câmeras requer iluminação externa. Assim, a configuração de luz para a fotografia é importante porque pode afetar a intensidade das imagens digitais. Além disso, o foco da imagem depende dos fotógrafos; no entanto, o foco automático pode ser usado, mas é menos confiável quando comparado aos scanners. Com dispositivos compactos e portáteis, digital as câmeras ganharam popularidade por gerar imagens de ensaios colorimétricos em PADs.

**Câmara do telefone móvel:** Hoje em dia, os telefones celulares são sem dúvida importantes para nossa vida diária. A tecnologia avançada faz com que o preço dos telefones móveis seja muito mais barato do que antes, tornando-o acessível para todos. Além disso, outros recursos/funções, como câmeras, são significativamente melhorados. Portanto, com seus dispositivos leves, portabilidade, baixo custo e fáceis de usar, telefones celulares prometem ferramentas potencialmente de imagem para detecção colorimétrica de PADs. Embora a qualidade de imagem geralmente obtida de câmeras de telefones celulares com sensores CMOS não é tão alta quanto a das câmeras digitais, é suficiente para análise de cores de algumas aplicações com menos exigências de qualidade. Semelhante a câmeras digitais, iluminação e condições afetam a intensidade das imagens. Além disso, alguns telefones celulares possuem um problema com uma distância focal longa, o que torna o telefone incapaz de capturar imagens em close para ter alta resolução de pequenas áreas de teste. Isso pode ser amenizado por usando lente adicional para ajudar a focar em objetos próximos. Além disso, ângulos de imagem e a sombra também causam variações na qualidade das imagens captadas pelos telefones com câmera.

No entanto, a principal vantagem em usar câmeras de telefones celulares como ferramentas de imagem é que as imagens tiradas no local ou em áreas remotas podem ser transferidas eletronicamente posteriormente para especialistas ou médicos físicos fora do local para interpretar resultados para diagnósticos e tratamentos. Assim, os telefones celulares oferecem uma rota direta para serem ferramentas úteis em telemedicina.

**Análise de imagem:** As imagens dos ensaios capturadas por ferramentas de imagem são ainda mais processadas usando software de manipulação de imagem, como Adobe Photoshop® ou ImageJ, que está disponível comercialmente para obter informações de cores para análise. A região de interesse dos ensaios colorimétricos em PADs é definida para quantificação de cores. Mudanças de cor ou a mudança na intensidade da cor é quantificada usando um sistema de cores, também conhecido como espaço de cores.

Normalmente, a cor os espaços especificam a cor com base nas três cores primárias, o que é semelhante ao sistema visual humano. Portanto, a maioria dos espaços de cores são representados como três componentes [108], como RGB (vermelho, verde e azul), HSV (matiz, saturação e valor), e CIE (a Comissão Internacional de Iluminação) 1931. Entre estes espaços de cores, RGB é o espaço de cores mais comum usado em dispositivos de imagem e detectores de cores e amplamente utilizados no processamento digital de imagens para extrair cores informação porque funciona de forma semelhante ao sistema visual humano [108]. O desenvolvimento de outros espaços de cores é baseado no sistema RGB. A maioria dos PADs colorimétricos usa o sistema RGB para quantificação de cores devido devido à sua simplicidade e medições diretas. No entanto, RGB é um dispositivo dependente sistema de cores [108]. Portanto, diferentes dispositivos podem fornecer informações de cores baseado no sistema RGB de forma diferente. Assim, ao trabalhar aplicações em alta resolução, o RGB pode ser problemático e outros espaços de cores podem ser considerados em vez de. Por exemplo, HSV [109] e CIE 1931 [110] também são aplicados para cor análise em PADs colorimétricos para minimizar o efeito de variações de luz na iluminação, resultando em medições mais precisas e reprodutíveis. Além de três representações de componentes, outros espaços de cores, como CYMK (representando ciano, amarelo, magenta e preto) que normalmente é usado para impressão colorida, tem sido usado na análise colorimétrica para PADs para obter uma faixa dinâmica maior e melhorar a precisão na análise de cores para algumas aplicações [111, 112]. Assim, a seleção de espaços de cores para quantificação de cores depende de muitos fatores, como aplicações, iluminação, mudança de cor e instrumento usado [108]. No entanto, RGB é normalmente escolhido primeiro porque é simples e mais familiar com usuários. Se o RGB sistema não for satisfeito, outros sistemas de cores são considerados determinar o modelo de melhor ajuste.

### **3.5.2 Detecção Eletroquímica**

A análise capturando imagens e medindo a intensidade da cor depende de iluminação de fundo e ambiente, dispositivos de imagem e fotógrafos, produzindo resultados irreprodutíveis e não confiáveis. Além disso, uma dinâmica estreita faixa e baixa sensibilidade são normalmente observadas a partir da detecção colorimétrica [51]. Para superar essas limitações associadas à detecção colorimétrica, um sensor eletroquímico é uma alternativa a ser utilizada como abordagem de detecção de PADs. Dispositivos analíticos eletroquímicos baseados em papel (ePADs) mostraram melhorias em termos de sensibilidade e seletividade com sistemas um pouco mais complicados em comparação com os formatos PAD colorimétricos. No entanto, um potenciostato portátil processa ePADs aplicáveis para monitoramento no local. Além disso, os eletrodos podem ser minimizados e facilmente fabricado em papel. Assim, a detecção eletroquímica tem mostrado sua capacidade de ser acoplado como uma boa combinação para PADs.

**Métodos de fabricação de eletrodos:** Baseados na fabricação de eletrodos de microfluidos sistemas, eletrodos para PADs seguiram as pegadas daqueles usados em formatos microfluídicos tradicionais. Existem vários métodos de fabricação de eletrodos em papel (Fig. 3.13), como impressão em tela/estêncil [113–115], impressão a jato de tinta [116, 117], desenho [118–121], microfio [122, 123] e pulverização catódica [124–127].

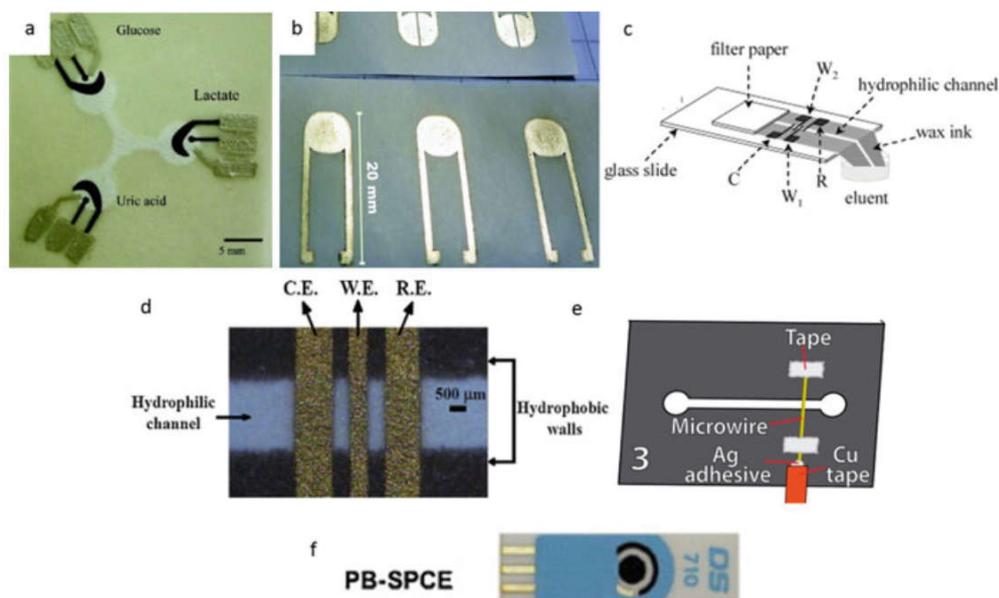


Fig. 3.13 Eletrodos de ePADs fabricados por diferentes métodos; (a) serigrafia [113], (b) impressão a jato de tinta [116], (c) desenho a lápis [118], (d) pulverização catódica [124], (e) um microfio [122] e (f) um eletrodo de carbono impresso em tela comercial (SPCE) modificado com azul da Prússia (PB) [161], reproduzido com permissão das referências [113, 122, 161], respectivamente.

Entre as técnicas emergentes, os eletrodos impressos em tela (SPEs), relatados pela primeira vez como eletrodos para ePADs [113], ganharam popularidade devido à sua facilidade de fabricação em papel, alta reprodutibilidade em termos de fabricação lote a lote, baixo custo e adequação para produção em massa [114]. Além disso, os SPEs podem ser facilmente modificados com uma variedade de elementos de reconhecimento, como enzimas [113, 115], anticorpos [56, 128–130], aptâmeros [131] e polímeros de impressão molecular [132, 133]. Para melhorar o desempenho eletroquímico de SPEs, modificadores, como polímeros condutores [128, 132], nanomateriais de carbono (nanotubos [134, 135], grafeno [135, 136] e carbono traseiro [135, 137]), mediadores (tetraetilfulvaleno [134] e azul da Prússia [138]) e nanopartículas de ouro [139, 140], têm sido usadas para modificação de eletrodos.

Hoje em dia, SPEs modificados e nus estão disponíveis comercialmente em uma variedade de formas e desenhos [141].

Diferentes abordagens eletroquímicas, como voltametria, amperometria e potenciometria, foram aplicadas para ePADs, dependendo das aplicações e sensibilidade. A voltametria, especialmente a voltametria de stripping anódico (ASV), tem sido demonstrado como um método altamente sensível para a análise de traços de metais pesados devido à sua alta sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade [51]. ASV envolve uma etapa de pré-concentração na qual um íon metálico de interesse é eletrodepositado na superfície do eletrodo de trabalho e uma etapa de decapagem na qual o metal depositado é varrido seletivamente do eletrodo aplicando uma varredura de potencial anódico para o processo de oxidação. A corrente, correspondente à concentração do analito, é medida durante o processo de decapagem. ePADs acoplados com ASV foram relatados para determinação altamente sensível e seletiva de uma variedade de metais, como  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Ag^+$  e  $Au^{3+}$  [142, 143]. A detecção amperométrica é a medição da corrente proveniente da oxidação/redução de uma espécie eletroativa. A corrente obtida na reação é proporcional à concentração do analito. Comparado com outras técnicas amperométricas, cronoamperometria, medição de corrente em função do tempo em uma tensão aplicada constante, oferece uma melhor relação sinal-ruído porque a corrente é integrada ao longo de um período de tempo [115]. Medidas de cronoamperometria de corrente faradaica ( $i$  na unidade A) que é proporcional à concentração do analito de acordo com a equação de Cottrell ( $i = nFAD^{1/2}\pi^{-1/2}t^{-1/2}C$ ), onde  $n$  é o número de elétrons,  $t$  é o tempo (s),  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $A$  é a área do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão do analito ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ), e  $C$  é a concentração inicial do reagente ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) [115]. Medições amperométricas são normalmente usadas com ePADs porque a maioria dos ensaios são baseados em enzimas que catalisam a oxidação ou redução do analito de interesse em uma espécie eletroativa [115, 144]. O exemplo mais comum de amperometria medições em ePADs é a determinação de glucose em amostras biológicas, como sangue, urina e suor.

Detecção potenciométrica, medindo a diferença de potencial entre um indicador eletrodo e um eletrodo de referência, é aplicado em ePADs para determinação de íons através do uso de eletrodos seletivos de íons (ISEs) [145, 146]. O uso de ISEs permite a análise seletiva a baixo custo. Além disso, o próprio papel também atua como um filtro que pode impedir partículas/moléculas grandes, especialmente ao realizar medições em amostras biológicas, de atingir a superfície do eletrodo, minimizando a incrustação do eletrodo. Devido à dificuldade de fabricar ISEs em papel e incrustação de eletrodos, ePADs com medições potenciométricas são normalmente aplicados para determinação de íons inorgânicos, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  e pH [145, 146].

### 3.5.3 Luminescência

Abordagens de detecção de luminescência, como quimioluminescência (CL), eletroquimioluminescência (ECL) e fluorescência (FL), têm atraído consideráveis atenção para ser acoplado com PADs. CL e ECL, medindo a emissão de luz gerados a partir de uma reação química e uma reação eletroquímica, respectivamente, são simples, baratos, portáteis e requerem menos instrumentação. As vantagens de ECL sobre CL e FL são que o potencial do eletrodo é controlado mais facilmente do que a adição de reagente em um momento específico e a seletividade do método pode ser alcançada controlando o potencial do eletrodo [3]. Ao contrário de CL e ECL, FL requer uma fonte de excitação para obter luminescência, tornando a técnica mais complicada em termos de instrumentos extras. Além disso, os aditivos de branqueamento de papel podem aumentar a fluorescência de fundo [3]. No entanto, CL, ECL e FL oferecem informações mais sensíveis métodos de detecção de PADs quando comparados aos ensaios colorimétricos. Portanto, limites de detecção aprimorados são normalmente alcançados ao realizar ensaios baseados em CL [147], ECL [148] e FL [149].

### 3.5.4 Outros métodos de detecção

A espectroscopia Raman também é aplicada como uma abordagem de detecção para PADs. A espectroscopia Raman aprimorada por superfície (SERS) emergiu como uma técnica poderosa fornecendo informações estruturais de moléculas com alta sensibilidade de detecção. O a miniaturização de espectrômetros Raman permite a integração de SERS e PADs para aplicações no local. Atualmente, há um interesse crescente na fabricação de sensores SERS baseados em papel de baixo custo, fáceis, fáceis e descartáveis com excelente SERS desempenho [150]. Além disso, a espectrometria de massa (MS) como um poderoso método de detecção método foi incorporado com PADs para a análise de amostras complexas para fornecem estruturas químicas e pesos moleculares de analitos [151].

### 3.6 Saída de Resultados

Para detecção colorimétrica, a leitura do resultado pode ser categorizada em três diferentes abordagens: (i) produção qualitativa, (ii) produção semiquantitativa e (iii) produção quantitativa resultado. No entanto, resultados quantitativos são normalmente obtidos de ePADs com sinal eletroquímico.

#### 3.6.1 Detecção Colorimétrica

Saídas qualitativas: A saída mais simples obtida de PADs colorimétricos é se o analito está presente na amostra, o que é uma resposta sim/não. Esta abordagem não requer nenhum instrumento porque uma mudança de cor devido à presença do analito de interesse é observada a olho nu a partir da zona de reação. No entanto, um controle é necessário para evitar uma falha positiva e confirmar que a reação está funcionando corretamente.

Assim, este tipo de exibição de resultado é normalmente encontrado com varetas e lateral ensaios de fluxo que requerem diagnósticos rápidos e permitem que pessoas com pouca ou nenhum treinamento para realizar os próprios testes [152]. O mais conhecido teste sim/não realizado em um formato de fluxo lateral é um teste de gravidez. No entanto, um teste sim/não pode ser encontrado em

outras aplicações, conforme mostrado na Fig. 3.14 que é um exemplo de teste faixa para detecção de pesticidas.

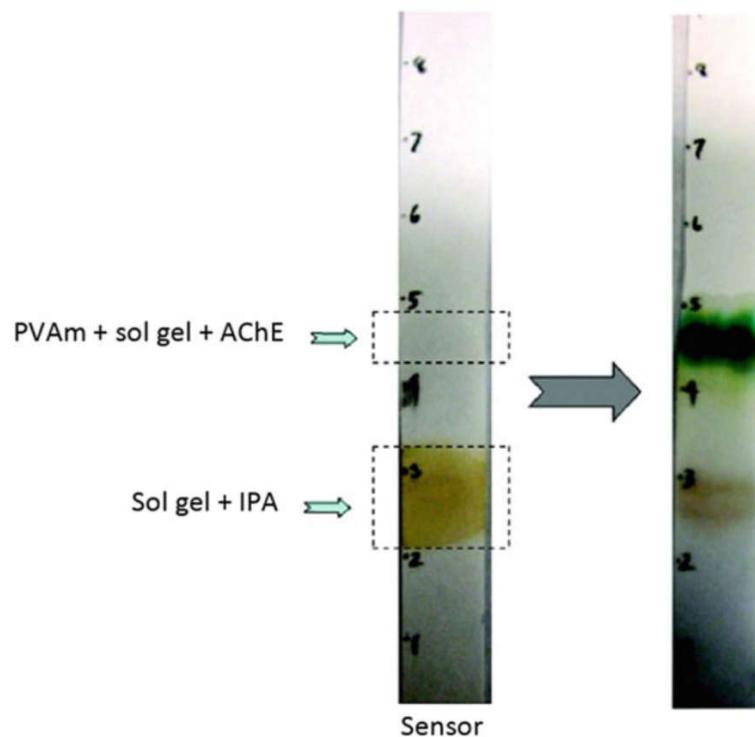


Fig. 3.14 Sensores de papel bioativo de fluxo lateral para detecção de pesticidas. O mecanismo de detecção é baseado na reação entre acetilcolinesterase (AChE) e indofenil acetato (IPA), um substrato cromogênico, produzindo uma cor azul. Na presença de pesticidas, que são AChE inibidores, observa-se o desaparecimento da cor azul. Polivinilamina (PVAm), um catiônico polímero, é usado para prender o produto azul em uma zona confinada [78], adaptado com permissão de referência [78]

Os resultados quantitativos são importantes quando uma leitura de “sim” ou “não” não é suficiente. Portanto, a maioria dos ensaios em papel visa quantificar a quantidade de analito de interesse. No entanto, com o conceito de PADs originalmente desenvolvido para ser um dispositivo de teste sem instrumental, pouco ou nenhum instrumento é preferido para quantificação de analitos, levando à análise colorimétrica semiquantitativa. Para ser capaz de realizar análise semiquantitativa sem instrumento externo, uma escala/barra de gráfico de cores é normalmente fornecida com os dispositivos de papel como um guia de leitura de cores para a comparação entre a cor obtida pela reação nos

PADs e a escala da cartela de cores para estimar a quantidade do analito. Portanto, apenas uma faixa de concentração ou uma concentração aproximada do analito é obtida, o que não é altamente preciso. No entanto, em algumas circunstâncias, leituras semiquantitativas sem instrumento podem ser suficientes para diferenciar a quantidade de analito em níveis baixo, moderado e alto, que pode ser usado para classificar as condições do paciente em três grupos diferentes ao realizar teste de triagem para diagnósticos médicos em áreas remotas com baixa recursos, conforme mostrado na Fig. 3.15. Normalmente, a realização de ensaios em PADs requer resultados quantitativos precisos; portanto, uma faixa de concentração ou uma concentração aproximada do alvo o analito obtido de leituras semiquantitativas não é suficiente para muitas aplicações. Um instrumento externo é normalmente necessário para obter resultados quantitativos de PADs; no entanto, a análise quantitativa em PADs também é possível sem extra equipamento. Para realizar análises quantitativas em PADs, um instrumento externo, como scanners, câmeras digitais ou câmeras de smartphones, normalmente está envolvido para obter imagens dos ensaios colorimétricos antes de usar o software de imagem para medir intensidade da cor associada à quantidade do analito alvo. Geralmente, um a curva de calibração é construída plotando a intensidade da cor em função do analito concentração. Posteriormente, a concentração do analito é extrapolada de a curva de calibração usando sua intensidade de cor. Este método fornece dados mais precisos leituras em comparação com métodos semiquantitativos. Para tornar simples e prático trabalhar em áreas remotas com poucos recursos, uma abordagem sem instrumentos também é desenvolvida para análise quantitativa usando PADs.

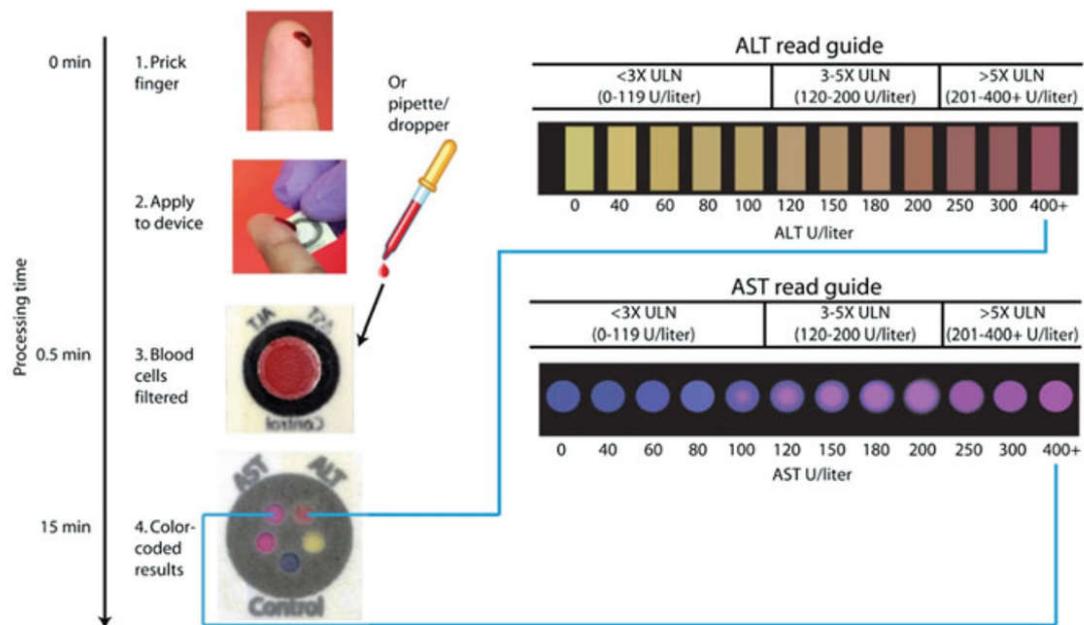


Fig. 3.15 Um dispositivo baseado em papel multiplexado para monitorar lesão hepática induzida por drogas por meio de medições semiquantitativas de transaminases séricas (aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)). Amostras de sangue/soro são aplicadas nas zonas de teste de um papel dispositivo para testes individuais de AST e ALT. As cores desenvolvidas a partir dos ensaios são comparadas com o guia de leitura colorido fornecido para classificar a condição do paciente em três regiões diferentes (<3× limite superior do normal (LSN), 3–5× LSN e >5× LSN) com precisão >90% [85], reproduzido com permissão da referência [85]

Isso pode ser alcançado ao usar PADs em uma plataforma baseada em distância. baseado em distância detecção, uma alternativa para leitura quantitativa, pode ser empregada para análise em PADs sem o auxílio de um instrumento externo [52]. Esse tipo de dispositivos de papel consiste em uma zona de teste circular conectada com um canal reto com uma barra de escala impressa para medir uma distância (Fig. 3.16a). Em vez de medir intensidade de cor desenvolvida a partir do ensaio, comprimento de cor viajando ao longo da reta canal é lido na escala impressa, que corresponde à quantidade de o analito alvo. Essa abordagem de detecção permite análises quantitativas sem instrumentos medições em PADs e aborda os problemas clássicos associados com seleção de fundo e iluminação ambiental de PADs colorimétricos. Ambas as medições,

semiquantitativas e quantitativas, podem ser obtidas a partir de detecção baseada em distância.

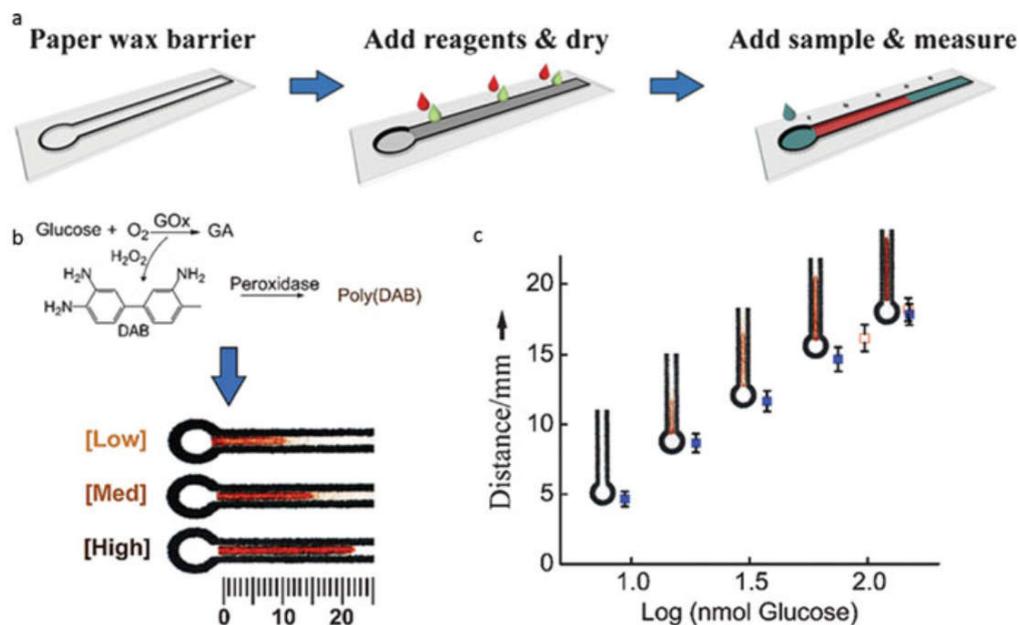


Fig. 3.16 (a) Um conceito operacional de detecção baseada em distância para medições quantitativas. (b) Uma abordagem de detecção baseada em distância para medições semiquantitativas e quantitativas de glicose usando PADs. A cor marrom desenvolvida ao longo do canal é produto da reação entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (gerado a partir da oxidação da glicose pela glicose oxidase) e 3,3 - diaminobenzidina (DAB) com o auxílio da enzima peroxidase. (c) Uma curva de calibração plotada entre a distância da cor e a concentração de glicose é usado para medições quantitativas [52], reproduzido com permissão da referência [52].

Uma curva de calibração construída a partir da distância de cor como uma função da concentração do analito é normalmente empregada para obter dados mais precisos resultados para análise quantitativa (Figura 3.16c).

### 3.6.2 Detecção Eletroquímica

Os ePADs são métodos de detecção intrinsecamente baseados em instrumentos. Sinal eletroquímico obtido do ensaio é processado e exibido em formato digital. De acordo, resultados quantitativos são normalmente recebidos de ePADs. Semelhante a detecção colorimétrica, uma curva de calibração, traçada entre leitura eletroquímica e concentração, é normalmente construída para obter resultados mais precisos.

### 3.7 Leitores Digitais

Normalmente, um processo para obter resultados quantitativos envolve a detecção de ensaios, construindo uma curva de calibração e extrapolando a concentração do alvo analito da curva de calibração. Todos esses processos são executados manualmente, e assim demorado. Para agilizar todos os processos, dispositivos extras como leitores de ensaios são desenvolvidos para detectar, processar e transferir automaticamente todas as informações do ensaio em um formato digital e a concentração do analito pode ser exibida em uma tela imediatamente após o processo de detecção. Portanto, os leitores de ensaio consistem em ferramentas de detecção e software para detectar e digitalizar os ensaios.

#### 3.7.1 Leitores Portáteis

Os leitores portáteis são desenvolvidos para serem incorporados aos PADs para digitalizar o sinal dos ensaios (Fig. 3.17). Para ensaios colorimétricos, leitores portáteis são desenvolvidos com base em medições ópticas da transmissão de luz através do papel [153] ou a reflexão da luz [154]. Após os ensaios, um papel dispositivo é inserido diretamente em um leitor portátil para processamento de sinal e resultados são exibidos na tela. Além disso, os leitores portáteis podem transferir dados digitais informações através de um smartphone que pode transmitir ainda mais as informações para especialistas. No entanto, os leitores portáteis são personalizados para se adequarem a um determinado ALMOFADA. Para detecção eletroquímica, os ePADs podem ser facilmente integrados com dispositivos portáteis leitores. Aproveitando as vantagens da tecnologia existente para diagnóstico POC, os dispositivos POC comerciais podem ser adaptados para serem usados como leitores portáteis para ePADs. Por exemplo, um glucosímetro comercial pode ser acoplado a ePADs para medição quantitativa análise de compostos (por exemplo, glucose, colesterol, lactato e álcool) relevantes para saúde humana [155]. No entanto, os leitores portáteis encontram dificuldades associadas com a transferência de informações porque não são dispositivos de comunicação sem fio.



Fig. 3.17 Leitores portáteis para PADS. Para ensaios colorimétricos, os colorímetros ópticos portáteis são desenvolvidos para quantificar ensaios colorimétricos por meio de (a) medições baseadas em transmitância [153] ou (b) medições baseadas em refletância [154], (c) um glucosímetro comercial empregado como um leitor portátil para ePADs para medir quantitativamente glicose, colesterol, lactato e álcool em sangue e urina [155], reproduzidos com permissão das referências [153–155], respectivamente

Alternativamente, um leitor externo é desenvolvido em uma plataforma compacta para anexar em um telefone celular para digitalizar informações obtidas a partir de imagens tiradas pela câmera do telefone (Fig. 3.18). As imagens capturadas pela câmera de um celular são ainda mais processadas por meio de um aplicativo personalizado executado em um telefone celular para gerar todos os resultados quantitativos e exibir digitalmente depois. Semelhante aos ensaios colorimétricos, os smartphones também são

desenvolvidos para análises eletroquímicas. Com base em medições potenciométricas, o potencial proveniente da reação pode ser medida por um leitor potenciométrico conectado a um smartphone através de uma porta USB (Fig. 3.19) [156]. Foi desenvolvido um aplicativo personalizado do smartphone para converter o sinal eletroquímico do leitor potenciométrico na concentração do analito com base em uma curva de analítica.



Fig. 3.18 Leitores externos acoplados a smartphones para PADs colorimétricos; (a) um leitor óptico instalado em um telefone Android (Samsung Galaxy S II) para diagnóstico rápido de malária, tuberculose, e HIV [162]; (b) um acessório de smartphone integrado para monitorar mudanças no suor e pH salivar [163]: (i) uma capa de smartphone com um compartimento de armazenamento para tiras de teste, (ii) amostragem métodos para amostras de suor e saliva, (iii) inserção de uma tira de teste para aquisição e leitura de dados, (iv) os resultados são analisados usando um aplicativo para iPhone especialmente desenvolvido e exibidos na tela; (c) o combinação entre PADs colorimétricos e um smartphone para determinação de explosivos [164], reproduzido com permissão das referências [162–164], respectivamente.

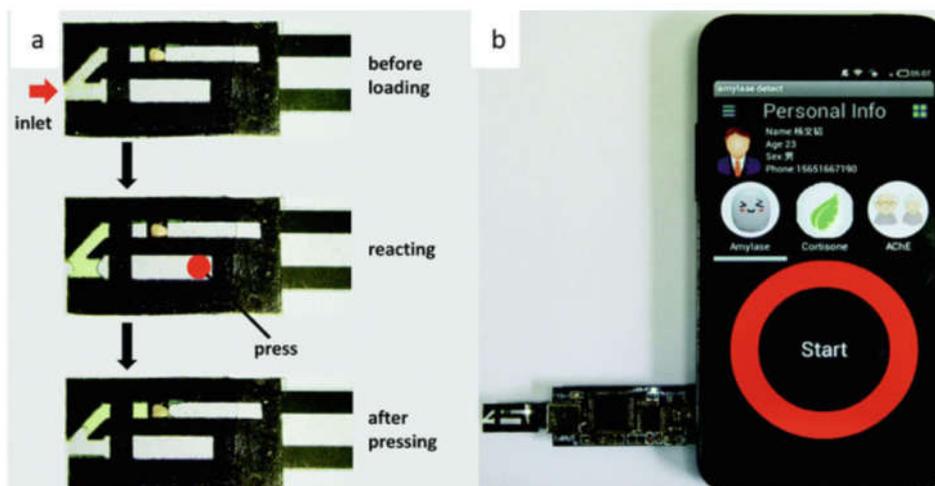


Fig. 3.19 Medições potenciométricas de  $\alpha$ -amilase salivar usando um smartphone [156], (a) um dispositivo de teste consiste em eletrodos impressos em uma película de transparência, (b) um potenciômetro leitor com um dispositivo de teste é conectado a um smartphone através de uma porta USB para converter eletroquímica sinal na concentração do analito, reproduzido com permissão da referência [156].

### 3.7.2 Leitores baseados em smartphones

A principal vantagem dos leitores baseados em smartphones é que, após os ensaios, todas as informações dos PADs podem ser transferidas diretamente para especialistas ou médicos para interpretação de dados ou tratamentos médicos. Além disso, os telefones celulares permitem o compartilhamento de dados, fornecendo resultados em tempo real e armazenando informações em um ambiente global banco de dados em caso de acompanhamento da evolução das doenças. Além disso, alguns aplicativos dos telefones celulares têm funções para extrair informações de cores diretamente do JPEG imagens. No entanto, para obter resultados mais precisos, um telefone celular personalizado aplicativo é devidamente desenvolvido para realizar a aquisição e processamento de imagens e lidar com armazenamento e manipulação de dados. Isso faz com que os smartphones tenham dual funciona um dispositivo de captura para detectar a cor dos ensaios colorimétricos baseados em papel e um leitor. Assim, este tipo de smartphone consiste em uma câmera embutida e um microprocessador interno para análise de imagem e uma unidade de

processamento de dados, evitando a necessidade de computadores e instrumentos externos e proporcionando uma rápida e resultados precisos (Fig. 3.20). Embora os smartphones tenham mostrado sua capacidade de aplicativos móveis de saúde e a combinação de smartphones e PADs podem oferecer uma plataforma potencial para triagem de doenças em países em desenvolvimento e países remotos áreas com recursos limitados, eles ainda estão limitados a alguns modelos de smartphones e software ou aplicativos desenvolvidos sob medida são especialmente necessários para executar os ensaios, o que implica que eles ainda não ganharam popularidade.

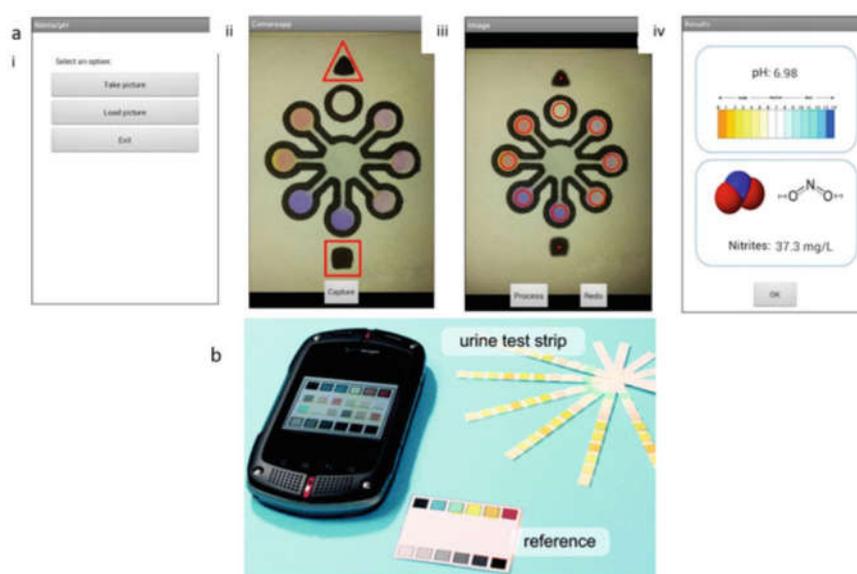


Fig. 3.20 Leitores baseados em smartphone para PADs colorimétricos, (a) um telefone celular com um android aplicativo para medições colorimétricas de concentração de nitrito e determinação de pH [109]: (i) menu principal, (ii) processo de aquisição, (iii) marcas e áreas selecionadas para detecção, e (iv) o resultado é exibido na tela após a análise de imagem e processamento de dados; (b) um smartphone para Medições de pH usando tiras de teste de urina colorimétricas [110], reproduzidas com permissão de referências [109, 110], respectivamente.

## Referências

1. Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, Whitesides GM (2007) Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew Chem Int Ed* 46:1318–1320
2. Nery EW, Kubota LT (2013) Sensing approaches on paper-based devices: a review. *Anal Bioanal Chem* 405:7573–7595

3. Cate DM, Adkins JA, Mettakoonpitak J, Henry CS (2015) Recent developments in paperbased microfluidic devices. *Anal Chem* 87:19–41
4. Channon RB, Nguyen M, Scorzelli A, Henry E, Volckens J, Dandy D, Henry C (2018) Rapid flow in multilayer microfluidic paper-based analytical devices. *Lab Chip* 18:793–802
5. Cate DM, Noblitt SD, Volckens J, Henry CS (2015) Multiplexed paper analytical device for quantification of metals using distance-based detection. *Lab Chip* 15:2808–2818
6. Singer JM, Plotz CM (1956) The latex fixation test. *Am J Med* 21:888–892
7. Washburn EW (1921) The dynamics of capillary flow. *Phys Rev* 17:273–283
8. Mendez S, Fenton EM, Gallegos GR, Petsev DN, Sibbett SS, Stone HA, Zhang Y, López GP (2010) Imbibition in porous membranes of complex shape: quasi-stationary flow in thin rectangular segments. *Langmuir* 26:1380–1385
9. Darcy H (1856) *Les fontainespubliques de la ville de Dijon : exposition et application des principes à suivre et des formules à employer dans les questions de distribution d'eau*. Victor Dalmont, Paris, p 647
10. Camplisson CK, Schilling KM, Pedrotti WL, Stone HA, Martinez AW (2015) Two-ply channels for faster wicking in paper-based microfluidic devices. *Lab Chip* 15:4461–4466
11. Hong S, Kim W (2015) Dynamics of water imbibition through paper channels with wax boundaries. *Microfluid Nanofluid* 19:845–853
12. Larich VG (1962) *Physicochemical hydrodynamics*, Prentice-Hall international series in the physical and chemical engineering sciences. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, p 700
13. Renault C, Anderson MJ, Crooks RM (2014) Electrochemistry in hollow-channel paper analytical devices. *J Am Chem Soc* 136:4616–4623
14. Verma MS, Tsaloglou M-N, Sisley T, Christodouleas D, Chen A, Milette J, Whitesides GM (2018) Sliding-strip microfluidic device enables ELISA on paper. *Biosens Bioelectron* 99:77–84
15. Li X, Tian J, Shen W (2010) Progress in patterned paper sizing for fabrication of paper-based microfluidic sensors. *Cellulose* 17:649–659
16. Govindarajan AV, Ramachandran S, Vigil GD, Yager P, Bohringer KF (2012) A low-cost point-of-care viscous sample preparation device for molecular diagnosis in the developing world; an example of microfluidic origami. *Lab Chip* 12:174–181
17. Cai L, Zhong M, Li H, Xu C, Yuan B (2015) Defining microchannels and valves on a hydrophobic paper by low-cost inkjet printing of aqueous or weak organic solutions. *Biomicrofluidics* 9:046503
18. Koo CKW, He F, Nugen SR (2013) An inkjet-printed electrowetting valve for paper-fluidic sensors. *Analyst* 138:4998–5004

19. Li X, Zwanenburg P, Liu X (2013) Magnetic timing valves for fluid control in paper-based microfluidics. *Lab Chip* 13:2609–2614
20. Giokas DL, Tsogas GZ, Vlessidis AG (2014) Programming fluid transport in paper-based microfluidic devices using razor-crafted open channels. *Anal Chem* 86:6202–6207
21. Toley BJ, McKenzie B, Liang T, Buser JR, Yager P, Fu E (2013) Tunable-delay shunts for paper microfluidic devices. *Anal Chem* 85:11545–11552
22. Lutz B, Liang T, Fu E, Ramachandran S, Kauffman P, Yager P (2013) Dissolvable fluidic time delays for programming multi-step assays in instrument-free paper diagnostics. *Lab Chip* 13:2840–2847
23. Li CG, Joung H-A, Noh H, Song M-B, Kim M-G, Jung H (2015) One-touch-activated blood multidagnostic system using a minimally invasive hollow microneedle integrated with a paper-based sensor. *Lab Chip* 15:3286–3292
24. Liu H, Li X, Crooks RM (2013) Paper-based SlipPAD for high-throughput chemical sensing. *Anal Chem* 85:4263–4267
25. Chen D, Mauk M, Qiu X, Liu C, Kim J, Ramprasad S, Ongagna S, Abrams WR, Malamud D, Corstjens PLAM, Bau HH (2010) An integrated, self-contained microfluidic cassette for isolation, amplification, and detection of nucleic acids. *Biomed Microdevices* 12:705–719
26. Martinez AW, Phillips ST, Nie Z, Cheng C-M, Carrilho E, Wiley BJ, Whitesides GM (2010) Programmable diagnostic devices made from paper and tape. *Lab Chip* 10:2499–2504
27. Niedl RR, Beta C (2015) Hydrogel-driven paper-based microfluidics. *Lab Chip* 15:2452–2459
28. Houghtaling J, Liang T, Thiessen G, Fu E (2013) Dissolvable bridges for manipulating fluid volumes in paper networks. *Anal Chem* 85:11201–11204
29. Apilux A, Ukita Y, Chikae M, Chailapakul O, Takamura Y (2013) Development of automated paper-based devices for sequential multistep sandwich enzyme-linked immunosorbent assays using inkjet printing. *Lab Chip* 13:126–135
30. Nguyen MP, Meredith NA, Kelly SP, Henry CS (2018) Design considerations for reducing sample loss in microfluidic paper-based analytical devices. *Analytica Chimica Acta* 1017: 20–25
31. Dharmaraja S, Lafleur L, Byrnes S, Kauffman P, Buser J, Toley B, Fu E, Yager P, Lutz B (2013) Programming paper networks for point of care diagnostics. *SPIE MOEMS-MEMS* 8615:11
32. Fu E, Liang T, Spicar-Mihalic P, Houghtaling J, Ramachandran S, Yager P (2012) Twodimensional paper network format that enables simple multistep assays for use in lowresource settings in the context of malaria antigen detection. *Anal Chem* 84:4574–4579
33. Fu E, Downs C (2017) Progress in the development and integration of fluid flow control tools in paper microfluidics. *Lab Chip* 17:614–628
34. Rattanarat P, Dungchai W, Cate D, Volckens J, Chailapakul O, Henry CS (2014) Multilayer paper-based device for

- colorimetric and electrochemical quantification of metals. *Anal Chem* 86:3555–3562
35. Meredith NA, Quinn C, Cate DM, Reilly TH 3rd, Volckens J, Henry CS (2016) Paper-based analytical devices for environmental analysis. *Analyst* 141:1874–1887
  36. Meredith NA, Volckens J, Henry CS (2017) Paper-based microfluidics for experimental design: screening masking agents for simultaneous determination of Mn(II) and Co(II). *Anal Methods* 9:534–540
  37. Bhamla MS, Benson B, Chai C, Katsikis G, Johri A, Prakash M (2017) Hand-powered ultralow-cost paper centrifuge. *Nat Biomed Eng* 1:0009
  38. Yang X, Forouzan O, Brown TP, Shevkoplyas SS (2012) Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices. *Lab Chip* 12:274–280
  39. Samad Khan M, Thouas G, Shen W, Whyte G, Garnier G (2010) Paper diagnostic for instantaneous blood typing. *Anal Chem* 82:4158–4164
  40. Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS, Laiwattanapaisal W (2012) Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. *Lab Chip* 12:3392–3398
  41. He J, Huang M, Wang D, Zhang Z, Li G (2014) Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: a review. *J Pharm Biomed Anal* 101:84–101
  42. Zakir Hossain SM, Ozimok C, Sicard C, Aguirre SD, Monsur Ali M, Li Y, Brennan JD (2012) Multiplexed paper test strip for quantitative bacterial detection. *Anal Bioanal Chem* 403:1567–1576
  43. Srisa-Art M, Boehle KE, Geiss BJ, Henry CS (2018) Highly sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using a colorimetric paper-based analytical device coupled with immunomagnetic separation. *Anal Chem* 90:1035–1043
  44. Channon RB, Yang Y, Feibelman KM, Geiss BJ, Dandy DS, Henry CS (2018) Sensitive virus particle detection using an electrochemical paper-based analytical device. *Anal. Chem.* 90, 12, 7777–7783
  45. Hong S, Kwak R, Kim W (2016) Paper-based flow fractionation system applicable to preconcentration and field-flow separation. *Anal Chem* 88:1682–1687
  46. Gong MM, Nosrati R, San Gabriel MC, Zini A, Sinton D (2015) Direct DNA analysis with paper-based ion concentration polarization. *J Am Chem Soc* 137:13913–13919
  47. Ma B, Xie S-F, Liu L, Fang F, Wu Z-Y (2017) Two orders of magnitude electrokinetic stacking of proteins in one minute on a simple paper fluidic channel. *Anal Methods* 9:2703–2709
  48. Jayawardane BM, Coold, Cattrall RW, Kolev SD (2013) The use of a polymer inclusion membrane in a paper-based sensor for the selective determination of Cu(II). *Anal Chim Acta* 803:106–112
  49. Zhu Y, Zhang L, Yang L (2015) Designing of the functional paper-based surface-enhanced Raman spectroscopy substrates for colorants detection. *Mater Res Bull* 63:199–204
  50. Adkins J, Boehle K, Henry C (2015) Electrochemical paper-based microfluidic devices. *Electrophoresis* 36:1811–1824

51. Mettakoonpitak J, Boehle K, Nantaphol S, Teengam P, Adkins JA, Srisa-Art M, Henry CS (2016) Electrochemistry on paper-based analytical devices. *Electroanalysis* 28:1420-1436
52. Cate DM, Dungchai W, Cunningham JC, Volckens J, Henry CS (2013) Simple, distance-based measurement for paper analytical devices. *Lab Chip* 13:2397-2404
53. Pratiwi R, Nguyen MP, Ibrahim S, Yoshioka N, Henry CS, Tjahjono DH (2017) A selective distance-based paper analytical device for copper(II) determination using a porphyrin derivative. *Talanta* 174:493-499
54. Gomes HI, Sales MG (2015) Development of paper-based color test-strip for drug detection in aquatic environment: Application to oxytetracycline. *Biosens Bioelectron* 65:54-61
55. Silva TI, Moreira FT, Truta LA, Sales MG (2012) Novel optical PVC probes for on-site detection/determination of fluoroquinolones in a solid/liquid interface: application to the determination of Norfloxacin in aquaculture water. *Biosens Bioelectron* 36:199-206
56. Li X, Scida K, Crooks RM (2015) Detection of hepatitis B virus DNA with a paper electrochemical sensor. *Anal Chem* 87:9009-9015
57. Ratnarathorn N, Chailapakul O, Henry CS, Dungchai W (2012) Simple silver nanoparticle colorimetric sensing for copper by paper-based devices. *Talanta* 99:552-557
58. Chen GH, Chen WY, Yen YC, Wang CW, Chang HT, Chen CF (2014) Detection of mercury (II) ions using colorimetric gold nanoparticles on paper-based analytical devices. *Anal Chem* 86:6843-6849
59. Dungchai W, Sameenoi Y, Chailapakul O, Volckens J, Henry CS (2013) Determination of aerosol oxidative activity using silver nanoparticle aggregation on paper-based analytical devices. *Analyst* 138:6766-6773
60. Piyanan T, Athipornchai A, Henry CS, Sameenoi Y (2018) An instrument-free detection of antioxidant activity using paper-based analytical devices coated with nanoceria. *Anal Sci* 34:97-102
61. Teengam P, Siangproh W, Tuantranont A, Vilaivan T, Chailapakul O, Henry CS (2017) Multiplex paper-based colorimetric DNA sensor using pyrrolidinyI peptide nucleic acid-induced AgNPs aggregation for detecting MERS-CoV, MTB, and HPV oligonucleotides. *Anal Chem* 89:5428-5435
62. Hu J, Wang L, Li F, Han YL, Lin M, Lu TJ, Xu F (2013) Oligonucleotide-linked gold nanoparticle aggregates for enhanced sensitivity in lateral flow assays. *Lab Chip* 13:4352-4357
63. Wang Y, Ping J, Ye Z, Wu J, Ying Y (2013) Impedimetric immunosensor based on gold nanoparticles modified graphene paper for label-free detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens Bioelectron* 49:492-498
64. Kumar A, Hens A, Arun RK, Chatterjee M, Mahato K, Layek K, Chanda N (2015) A paper based microfluidic device for easy

- detection of uric acid using positively charged gold nanoparticles. *Analyst* 140:1817–1821
65. Evans E, Gabriel EF, Benavidez TE, Tomazelli Coltro WK, Garcia CD (2014) Modification of microfluidic paper-based devices with silica nanoparticles. *Analyst* 139:5560–5567
  66. Silva TG, de Araujo WR, Munoz RA, Richter EM, Santana MH, Coltro WK, Paixao TR (2016) Simple and sensitive paper-based device coupling electrochemical sample pretreatment and colorimetric detection. *Anal Chem* 88:5145–5151
  67. Pesenti A, Taudte RV, McCord B, Doble P, Roux C, Blanes L (2014) Coupling paper-based microfluidics and lab on a chip technologies for confirmatory analysis of trinitro aromatic explosives. *Anal Chem* 86:4707–4714
  68. Peters KL, Corbin I, Kaufman LM, Zreibe K, Blanes L, McCord BR (2015) Simultaneous colorimetric detection of improvised explosive compounds using microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs). *Anal Methods* 7:63–70
  69. Musile G, Wang L, Bottoms J, Tagliaro F, McCord B (2015) The development of paper microfluidic devices for presumptive drug detection. *Anal Methods* 7:8025–8033
  70. Cardoso TMG, Channon RB, Adkins JA, Talhavini M, Coltro WKT, Henry CS (2017) A paper-based colorimetric spot test for the identification of adulterated whiskeys. *Chem Commun (Camb)* 53:7957–7960
  71. Liu S, Su W, Ding X (2016) A review on microfluidic paper-based analytical devices for glucose detection. *Sensors (Basel)* 16(12)
  72. Gabriel EF, Garcia PT, Cardoso TM, Lopes FM, Martins FT, Coltro WK (2016) Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosanmodified paper microfluidic devices. *Analyst* 141:4749–4756
  73. Chen X, Chen J, Wang F, Xiang X, Luo M, Ji X, He Z (2012) Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices. *Biosens Bioelectron* 35:363–368
  74. Talalak K, Noiphung J, Songjaroen T, Chailapakul O, Laiwattanapaisal W (2015) A facile low-cost enzymatic paper-based assay for the determination of urine creatinine. *Talanta* 144:915–921
  75. Robinson R, Wong L, Monnat R, Fu E (2016) Development of a whole blood paper-based device for phenylalanine detection in the context of PKU therapy monitoring. *Micromachines* 7:28
  76. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS (2010) Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. *Anal Chim Acta* 674:227–233
  77. Sicard C, Glen C, Aubie B, Wallace D, Jahanshahi-Anbuhi S, Pennings K, Daigger GT, Pelton R, Brennan JD, Filipe CD (2015) Tools for water quality monitoring and mapping using paper-based sensors and cell phones. *Water Res* 70:360–369
  78. Zakir Hossain SM, Luckham RE, McFadden MJ, Brennan JD (2009) Reagentless bidirectional lateral flow bioactive paper

- sensors for detection of pesticides in beverage and food samples. *Anal Chem* 81:9055–9064
79. Evans E, Gabriel EF, Coltro WK, Garcia CD (2014) Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices. *Analyst* 139:2127–2132
  80. Nery EW, Kubota LT (2016) Evaluation of enzyme immobilization methods for paper-based devices—a glucose oxidase study. *J Pharm Biomed Anal* 117:551–559
  81. Jokerst JC, Adkins JA, Bisha B, Mentele MM, Goodridge LD, Henry CS (2012) Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogen. *Anal Chem* 84:2900–2907
  82. Bisha B, Adkins JA, Jokerst JC, Chandler JC, Perez-Mendez A, Coleman SM, Sbodio AO, Suslow TV, Danyluk MD, Henry CS, Goodridge LD (2014) Colorimetric paper-based detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* from large volumes of agricultural water. *J Vis Exp* (88)
  83. Adkins JA, Boehle K, Friend C, Chamberlain B, Bisha B, Henry CS (2017) Colorimetric and electrochemical bacteria detection using printed paper- and transparency-based analytic devices. *Anal Chem* 89:3613–3621
  84. Boehle KE, Gilliland J, Wheelton CR, Holder A, Adkins JA, Geiss BJ, Ryan EP, Henry CS (2017) Utilizing paper-based devices for antimicrobial-resistant bacteria detection. *Angew Chem Int Ed Engl* 56:6886–6890
  85. Pollock NR, Rolland JP, Kumar S, Beattie PD, Jain S, Noubary F, Wong VL, Pohlmann RA, Ryan US, Whitesides GM (2012) A paper-based multiplexed transaminase test for low-cost, point-of-care liver function testing. *Sci Transl Med* 4:152ra129
  86. Kannan B, Jahanshahi-Anbuhi S, Pelton RH, Li Y, Filipe CD, Brennan JD (2015) Printed paper sensors for serum lactate dehydrogenase using pullulan-based inks to immobilize reagents. *Anal Chem* 87:9288–9293
  87. Nosrati R, Gong MM, San Gabriel MC, Pedraza CE, Zini A, Sinton D (2016) Paper-based quantification of male fertility potential. *Clin Chem* 62:458–465
  88. Yen TH, Chen KH, Hsu MY, Fan ST, Huang YF, Chang CL, Wang YP, Cheng CM (2015) Reprint of 'Evaluating organophosphate poisoning in human serum with paper'. *Talanta* 145:66–72
  89. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A (2009) Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 393:569–582
  90. Cheng CM, Martinez AW, Gong J, Mace CR, Phillips ST, Carrilho E, Mirica KA, Whitesides GM (2010) Paper-based ELISA. *Angew Chem Int Ed Engl* 49:4771–4774
  91. Wang S, Ge L, Song X, Yu J, Ge S, Huang J, Zeng F (2012) Paper-based chemiluminescence ELISA: lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing. *Biosens Bioelectron* 31:212–218

92. Murdock RC, Shen L, Griffin DK, Kelley-Loughnane N, Papautsky I, Hagen JA (2013) Optimization of a paper-based ELISA for human performance biomarker. *Anal Chem* 85:11634–11642
93. Sun X, Li B, Tian C, Yu F, Zhou N, Zhan Y, Chen L (2018) Rotational paper-based electrochemiluminescence immunodevices for sensitive and multiplexed detection of cancer biomarkers. *Anal Chim Acta* 1007:33–39
94. Mu X, Zhang L, Chang S, Cui W, Zheng Z (2014) Multiplex microfluidic paper-based immunoassay for the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Anal Chem* 86:5338–5344
95. Khan MS, Pande T, van de Ven TG (2015) Qualitative and quantitative detection of T7 bacteriophages using paper-based sandwich ELISA. *Colloids Surf B Biointerfaces* 132:264–70
96. Shih CM, Chang CL, Hsu MY, Lin JY, Kuan CM, Wang HK, Huang CT, Chung MC, Huang KC, Hsu CE, Wang CY, Shen YC, Cheng CM (2015) Paper-based ELISA to rapidly detect *Escherichia coli*. *Talanta* 145:2–5
97. 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. *Analyst* 139:1456–1462
98. Schochetman G, Ou C, Jones WK (1988) Polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 158:1154–1157
99. Lafleur LK, Bishop JD, Heiniger EK, Gallagher RP, Wheeler MD, Kauffman P, Zhang X, Kline EC, Buser JR, Kumar S, Byrnes SA, Vermeulen NM, Scarr NK, Belousov Y, Mahoney W, Toley BJ, Ladd PD, Lutz BR, Yager P (2016) A rapid, instrument-free, sample-to-result nucleic acid amplification test. *Lab Chip* 16:3777–3787
100. Rodriguez NM, Linnes JC, Fan A, Ellenson CK, Pollock NR, Klapperich CM (2015) Paperbased RNA extraction, in situ isothermal amplification, and lateral flow detection for low-cost, rapid diagnosis of Influenza A (H1N1) from clinical specimens. *Anal Chem* 87:7872–7879
101. Rodriguez NM, Wong WS, Liu L, Dewar R, Klapperich CM (2016) A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples. *Lab Chip* 16:753–763
102. Rohrman BA, Richards-Kortum RR (2012) A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. *Lab Chip* 12:3082–3088
103. Huang S, Do J, Mahalanabis M, Fan A, Zhao L, Jepeal L, Singh SK, Klapperich CM (2013) Low-cost extraction and isothermal amplification of DNA for infectious diarrhea diagnosis. *PLoS One* 8:e60059
104. Linnes JC, Rodriguez NM, Liu L, Klapperich CM (2016) Polyethersulfone improves isothermal nucleic acid amplification compared to current paper-based diagnostics. *Biomed Microdevices* 18:30
105. Teengam P, Siangproh W, Tuantranont A, Henry CS, Vilaivan T, Chailapakul O (2017) Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus. *Anal Chim Acta* 952:32–40

106. Yildiz UH, Alagappan P, Liedberg B (2013) Naked eye detection of lung cancer associated miRNA by paper based biosensing platform. *Anal Chem* 85:820–824
107. Noor MO, Krull UJ (2014) Camera-based ratiometric fluorescence transduction of nucleic acid hybridization with reagentless signal amplification on a paper-based platform using immobilized quantum dots as donors. *Anal Chem* 86:10331–10339
108. Capitán-Vallvey LF, López-Ruiz N, Martínez-Olmos A, Erenas MM, Palma AJ (2015) Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Anal Chim Acta* 899:23–56
109. Lopez-Ruiz N, Curto VF, Erenas MM, Benito-Lopez F, Diamond D, Palma AJ, CapitanVallvey LF (2014) Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices. *Anal Chem* 86:9554–9562
110. Shen L, Hagen JA, Papautsky I (2012) Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. *Lab Chip* 12:4240–4243
111. Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, Sindi H, Whitesides GM (2008) Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal Chem* 80:3699–3707
112. Klasner SA, Price AK, Hoeman KW, Wilson RS, Bell KJ, Culbertson CT (2010) Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. *Anal Bioanal Chem* 397:1821–1829
113. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS (2009) Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Anal Chem* 81:5821–5826
114. Arduini F, Micheli L, Moscone D, Palleschi G, Piermarini S, Ricci F, Volpe G (2016) Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends Anal Chem* 79:114–126
115. Nie Z, Nijhuis CA, Gong J, Chen X, Kumachev A, Martinez AW, Narovlyansky M, Whitesides GM (2010) Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab Chip* 10:477–483
116. Maattanen A, Ihalainen P, Pulkkinen P, Wang SX, Tenhu H, Peltonen J (2012) Inkjet-printed gold electrodes on paper: characterization and functionalization. *ACS Appl Mater Interfaces* 4:955–964
117. Hu CG, Bai XY, Wang YK, Jin W, Zhang X, Hu SS (2012) Inkjet printing of nanoporous gold electrode arrays on cellulose membranes for high-sensitive paper-like electrochemical oxygen sensors using ionic liquid electrolytes. *Anal Chem* 84:3745–3750
118. Dossi N, Toniolo R, Piccin E, Susmel S, Pizzariello A, Bontempelli G (2013) Pencil-drawn dual electrode detectors to discriminate between analytes comigrating on paper-based fluidic devices but undergoing electrochemical processes with different reversibility. *Electroanalysis* 25:2515–2522
119. Dossi N, Toniolo R, Pizzariello A, Impellizzieri F, Piccin E, Bontempelli G (2013) Pencil-drawn paper supported

- electrodes as simple electrochemical detectors for paper-based fluidic devices. *Electrophoresis* 34:2085–2091
120. Santhiago M, Kubota LT (2013) A new approach for paper-based analytical devices with electrochemical detection based on graphite pencil electrodes. *Sens Actuat B Chem* 177:224–230
  121. Dossi N, Toniolo R, Impellizzieri F, Bontempelli G (2014) Doped pencil leads for drawing modified electrodes on paper-based electrochemical devices. *J Electroanal Chem* 722:90–94
  122. Fosdick SE, Anderson MJ, Renault C, DeGregory PR, Loussaert JA, Crooks RM (2014) Wire, mesh, and fiber electrodes for paper-based electroanalytical devices. *Anal Chem* 86:3659–3666
  123. Adkins JA, Henry CS (2015) Electrochemical detection in paper-based analytical devices using microwire electrodes. *Anal Chim Acta* 891:247–254
  124. Shiroma LY, Santhiago M, Gobbi AL, Kubota LT (2012) Separation and electrochemical detection of paracetamol and 4-aminophenol in a paper-based microfluidic device. *Anal Chim Acta* 725:44–50
  125. Siegel AC, Phillips ST, Wiley BJ, Whitesides GM (2009) Thin, lightweight, foldable thermochromic displays on paper. *Lab Chip* 9:2775–2781
  126. Carvalhal RF, Kfourri MS, Piazzetta MHD, Gobbi AL, Kubota LT (2010) Electrochemical detection in a paper-based separation device. *Anal Chem* 82:1162–1165
  127. Lankelma J, Nie ZH, Carrilho E, Whitesides GM (2012) Paper-based analytical device for electrochemical flow-injection analysis of glucose in urine. *Anal Chem* 84:4147–4152
  128. Jagadeesan KK, Kumar S, Sumana G (2012) Application of conducting paper for selective detection of troponin. *Electrochem Commun* 20:71–74
  129. Ge SG, Zhang LN, Zhang Y, Liu HY, Huang JD, Yan M, Yu JH (2015) Electrochemical K-562 cells sensor based on origami paper device for point-of-care testing. *Talanta* 145:12–19
  110. Shen L, Hagen JA, Papautsky I (2012) Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. *Lab Chip* 12:4240–4243
  111. Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, Sindi H, Whitesides GM (2008) Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal Chem* 80:3699–3707
  112. Klasner SA, Price AK, Hoeman KW, Wilson RS, Bell KJ, Culbertson CT (2010) Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. *Anal Bioanal Chem* 397:1821–1829
  113. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS (2009) Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Anal Chem* 81:5821–5826
  114. Arduini F, Micheli L, Moscone D, Palleschi G, Piermarini S, Ricci F, Volpe G (2016) Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends Anal Chem* 79:114–126
  115. Nie Z, Nijhuis CA, Gong J, Chen X, Kumachev A, Martinez AW, Narovlyansky M, Whitesides GM (2010) Electrochemical

- sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab Chip* 10:477–483
116. Maattanen A, Ihalainen P, Pulkkinen P, Wang SX, Tenhu H, Peltonen J (2012) Inkjet-printed gold electrodes on paper: characterization and functionalization. *ACS Appl Mater Interfaces* 4:955–964
  117. Hu CG, Bai XY, Wang YK, Jin W, Zhang X, Hu SS (2012) Inkjet printing of nanoporous gold electrode arrays on cellulose membranes for high-sensitive paper-like electrochemical oxygen sensors using ionic liquid electrolytes. *Anal Chem* 84:3745–3750
  118. Dossi N, Toniolo R, Piccin E, Susmel S, Pizzariello A, Bontempelli G (2013) Pencil-drawn dual electrode detectors to discriminate between analytes comigrating on paper-based fluidic devices but undergoing electrochemical processes with different reversibility. *Electroanalysis* 25:2515–2522
  119. Dossi N, Toniolo R, Pizzariello A, Impellizzieri F, Piccin E, Bontempelli G (2013) Pencil-drawn paper supported electrodes as simple electrochemical detectors for paper-based fluidic devices. *Electrophoresis* 34:2085–2091
  120. Santhiago M, Kubota LT (2013) A new approach for paper-based analytical devices with electrochemical detection based on graphite pencil electrodes. *Sens Actuat B Chem* 177:224–230
  121. Dossi N, Toniolo R, Impellizzieri F, Bontempelli G (2014) Doped pencil leads for drawing modified electrodes on paper-based electrochemical devices. *J Electroanal Chem* 722:90–94
  122. Fosdick SE, Anderson MJ, Renault C, DeGregory PR, Loussaert JA, Crooks RM (2014) Wire, mesh, and fiber electrodes for paper-based electroanalytical devices. *Anal Chem* 86:3659–3666
  123. Adkins JA, Henry CS (2015) Electrochemical detection in paper-based analytical devices using microwire electrodes. *Anal Chim Acta* 891:247–254
  124. Shiroma LY, Santhiago M, Gobbi AL, Kubota LT (2012) Separation and electrochemical detection of paracetamol and 4-aminophenol in a paper-based microfluidic device. *Anal Chim Acta* 725:44–50
  125. Siegel AC, Phillips ST, Wiley BJ, Whitesides GM (2009) Thin, lightweight, foldable thermochromic displays on paper. *Lab Chip* 9:2775–2781
  126. Carvalhal RF, Kfoury MS, Piazzetta MHD, Gobbi AL, Kubota LT (2010) Electrochemical detection in a paper-based separation device. *Anal Chem* 82:1162–1165
  127. Lankelma J, Nie ZH, Carrilho E, Whitesides GM (2012) Paper-based analytical device for electrochemical flow-injection analysis of glucose in urine. *Anal Chem* 84:4147–4152
  128. Jagadeesan KK, Kumar S, Sumana G (2012) Application of conducting paper for selective detection of troponin. *Electrochem Commun* 20:71–74
  129. Ge SG, Zhang LN, Zhang Y, Liu HY, Huang JD, Yan M, Yu JH (2015) Electrochemical K-562 cells sensor based on origami paper device for point-of-care testing. *Talanta* 145:12–19
  130. Ge SG, Zhang Y, Zhang L, Liang LL, Liu HY, Yan M, Huang JD, Yu JH (2015) Ultrasensitive electrochemical cancer cells

- sensor based on trimetallic dendritic Au@PtPd nanoparticles for signal amplification on lab-on-paper device. *Sens Actuat B Chem* 220:665–672
131. Cunningham JC, Brenes NJ, Crooks RM (2014) Paper electrochemical device for detection of DNA and thrombin by target-induced conformational switching. *Anal Chem* 86:6166–6170
  132. Ge L, Wang SM, Yu JH, Li NQ, Ge SG, Yan M (2013) Molecularly imprinted polymer grafted porous Au-paper electrode for an microfluidic electro-analytical origami device. *Adv Funct Mater* 23:3115–3123
  133. Wang PP, Sun GQ, Ge L, Ge SG, Yu JH, Yan M (2013) Photoelectrochemical lab-on-paper device based on molecularly imprinted polymer and porous Au-paper electrode. *Analyst* 138:4802–4811
  134. Jia W, Bandodkar AJ, Valdés-Ramírez G, Windmiller JR, Yang Z, Ramírez J, Chan G, Wang J (2013) Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration. *Anal Chem* 85:6553–6560
  135. Cinti S, Arduini F, Carbone M, Sansone L, Cacciotti I, Moscone D, Palleschi G (2015) Screenprinted electrodes modified with carbon nanomaterials: a comparison among carbon black, carbon nanotubes and graphene. *Electroanalysis* 27:2230–2238
  136. Ruecha N, Rangkupan R, Rodthongkum N, Chailapakul O (2014) Novel paper-based cholesterol biosensor using graphene/polyvinylpyrrolidone/polyaniline nanocomposite. *Biosens Bioelectron* 52:13–19
  137. Arduini F, Forchielli M, Amine A, Neagu D, Cacciotti I, Nanni F, Moscone D, Palleschi G (2015) Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase. *Microchim Acta* 182:643–651
  138. Michopoulos A, Kouloumpis A, Gournis D, Prodromidis MI (2014) Performance of layer-by-layer deposited low dimensional building blocks of graphene-Prussian blue onto graphite screen-printed electrodes as sensors for hydrogen peroxide. *Electrochim Acta* 146:477–484
  139. Kong FY, Gu SX, Li WW, Chen TT, Xu Q, Wang W (2014) A paper disk equipped with graphene/polyaniline/Au nanoparticles/glucose oxidase biocomposite modified screenprinted electrode: Toward whole blood glucose determination. *Biosens Bioelectron* 56:77–82
  140. Liana DD, Raguse B, Wieczorek L, Baxter GR, Chuah K, Gooding JJ, Chow E (2013) Sintered gold nanoparticles as an electrode material for paper-based electrochemical sensors. *RSC Adv* 3:8683–8691
  141. Pedroza RHP, Serrano N, Díaz-Cruz JM, Ariño C, Esteban M (2016) Integration of commercial screen-printed electrodes into a voltammetric electronic tongue for the analysis of aminothiols. *Electroanalysis* 28:1570–1577
  142. Apilux A, Dungchai W, Siangproh W, Praphairaksit N, Henry CS, Chailapakul O (2010) Lab-on-paper with dual

- electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron. *Anal Chem* 82:1727–1732
143. Ruecha N, Rodthongkum N, Cate DM, Volckens J, Chailapakul O, Henry CS (2015) Sensitive electrochemical sensor using a graphene-polyaniline nanocomposite for simultaneous detection of Zn(II), Cd(II), and Pb(II). *Anal Chim Acta* 874:40–48
  144. Noiphung J, Songjaroen T, Dungchai W, Henry CS, Chailapakul O, Laiwattanapaisal W (2013) Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices. *Anal Chim Acta* 788:39–45
  145. Lisak G, Cui J, Bobacka J (2015) Paper-based microfluidic sampling for potentiometric determination of ions. *Sens Actuators B Chim* 207:933–939
  146. Lan WJ, Zou XU, Hamedi MM, Hu JB, Parolo C, Maxwell EJ, Buhlmann P, Whitesides GM (2014) Paper-based potentiometric ion sensing. *Anal Chem* 86:9548–9553
  147. Wang Y, Liu H, Wang P, Yu J, Ge S, Yan M (2015) Chemiluminescence excited photoelectrochemical competitive immunosensing lab-on-paper device using an integrated paper supercapacitor for signal amplification. *Sens Actuators B Chim* 208:546–553
  148. Wu L, Ma C, Zheng X, Liu H, Yu J (2015) Paper-based electrochemiluminescence origami device for protein detection using assembled cascade DNA-carbon dots nanotags based on rolling circle amplification. *Biosens Bioelectron* 68:413–420
  149. Zhang Y, Zuo P, Ye B-C (2015) A low-cost and simple paper-based microfluidic device for simultaneous multiplex determination of different types of chemical contaminants in food. *Biosens Bioelectron* 68:14–19
  150. Qu L-L, Li D-W, Xue J-Q, Zhai W-L, Fossey JS, Long Y-T (2012) Batch fabrication of disposable screen-printed SERS arrays. *Lab Chip* 12:876–881
  151. Wang H, Liu J, Cooks RG, Ouyang Z (2010) Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed* 49:877–880
  152. Hu J, Wang S, Wang L, Li F, Pingguan-Murphy B, Lu TJ, Xu F (2014) Advances in paperbased point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron* 54:585–597
  153. Ellerbee AK, Phillips ST, Siegel AC, Mirica KA, Martinez AW, Striehl P, Jain N, Prentiss M, Whitesides GM (2009) Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper. *Anal Chem* 81:8447–8452
  154. Lee D-S, Jeon BG, Ihm C, Park J-K, Jung MY (2011) Size limits the formation of liquid jets during bubble bursting. *Lab Chip* 11:120–126
  155. Nie Z, Deiss F, Liu X, Akbulut O, Whitesides GM (2010) Integration of paper-based microfluidic devices with commercial electrochemical readers. *Lab Chip* 10:3163–3169
  156. Zhang L, Yang W, Yang Y, Liu H, Gu Z (2015) Smartphone-based point-of-care testing of salivary [small alpha]-amylase for personal psychological measurement. *Analyst* 140:7399–7406

157. Elizalde E, Urteaga R, Berli CLA (2015) Rational design of capillary-driven flows for paper-based microfluidics. *Lab Chip* 15:2173–2180
158. Toley BJ, Wang JA, Gupta M, Buser JR, Lafleur LK, Lutz BR, Fu E, Yager P (2015) A versatile valving toolkit for automating fluidic operations in paper microfluidic devices. *Lab Chip* 15:1432–1444
159. Cunningham JC, Scida K, Kogan MR, Wang B, Ellington AD, Crooks RM (2015) Paper diagnostic device for quantitative electrochemical detection of ricin at picomolar levels. *Lab Chip* 15:3707–3715
160. Adkins JA, Noviana E, Henry CS (2016) Development of a quasi-steady flow electrochemical paper-based analytical device. *Anal Chem* 88:10639–10647
161. Chandra Sekar N, Mousavi Shaegh SA, Ng SH, Ge L, Tan SN (2014) A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian blue modified screen-printed electrodes. *Sens Actuat B Chem* 204:414–420
162. Mudanyali O, Dimitrov S, Sikora U, Padmanabhan S, Navruz I, Ozcan A (2012) Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone. *Lab Chip* 12:2678–2686
163. Oncescu V, O'Dell D, Erickson D (2013) Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva. *Lab Chip* 13:3232–3238
164. Salles MO, Meloni GN, de Araujo WR, Paixao TRLC (2014) Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach. *Anal Methods* 6:2047–2052