

# Primjena kurkumina u kemijskim senzorima

---

Grbić, Marlena

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:168462>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Marlena Grbić

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Marlena Grbić

**PRIMJENA KURKUMINA U KEMIJSKIM SENZORIMA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Steinberg

Članovi ispitnog povjerenstva: Izv. prof. dr. sc. Ivana Steinberg

Dr. sc. Petar Kassal, poslijedoktorand

Dr. sc. Ema Horak

Zagreb, rujan 2018.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, izv.prof.dr.sc. Ivani Steinberg na predloženoj temi, kao i poslijedoktorandu dr. sc. Petru Kassalu na savjetima i pomoći koju mi je pružio tijekom pisanja ovog rada. Također hvala obitelji i Pavelu na podršci.*

## SAŽETAK

Optički senzori zbog svojih neminovnih prednosti kao što su jednostavnost izvedbe, mjerenje u realnom vremenu, male dimenzije te niža cijena počinju zamijenjivati tradicionalne metode i zahtjevne instrumentalne analitičke metode. Mogućnost prijenosa senzora na teren, uz potrebe malih količina uzoraka i detektiranje golim okom posebice je važno u zdravstvu, analizi pitke vode i uvjetima ograničenih resursa. S obzirom na sve veću osviještenost o zagađenosti okoliša kao i ekcesivno korištenje sintetskih materijala koji predstavljaju određenu opasnost kontaminacije, javlja se potreba za korištenjem jestivih i prirodnih komponenti u senzorskim uređajima. Svoju primjenu u takvim sensorima nalazi kurkumin, pigment izdvojen iz kurkume, koji osim optičkih ima i značajna farmaceutska svojstva, zbog kojih se konzumira već više od dvjesto godina. Zahvaljujući svojoj strukturi, kurkumin podliježe kiselobaznim reakcijama i reakcijama kompleksiranja, što rezultira optički uočljivim promjenama u pH sensorima ili drugim ion-selektivnim optodama.

U ovom radu okarakterizirana su kemijska i fotofizikalna svojstva kurkumina te je predstavljen pregled izvedbi senzora temeljenih na biorazgradivim materijalima, koji uključuju kurkumin.

### **Ključne riječi:**

Optički senzor

pH senzor

Kurkumin

Biorazgradivi materijali

## **SUMMARY**

Optical sensors are starting to replace traditional analytical methods that use sophisticated instruments because many of their advantages, i.e. simplicity, real-time monitoring, small dimensions and lower cost. Possibility of using sensors on the field, demand for smaller sample quantities and naked eye detection are especially important in healthcare, drinking water analysis and in conditions of limited resources. Given the rise of the environmental awareness and the excessive use of synthetic materials that might represent a certain contamination risk, there is a need for using edible and natural components in sensing devices. In such sensors, curcumin could be used. Curcumin is a pigment, extracted from tumeric, that yields significant pharmaceutical properties, which because of it has been consumed for over two hundred years. Because of its structure, it can exhibit keto-enol tautomerism, which leads to deprotonation, and can undergo complexation with specific ions. Those reactions can make changes in optical properties in pH sensors or other ion-selective optodes.

This work discusses chemical and photophysical properties of curcumin and reviews sensor platforms made of biodegradable materials, including curcumin.

### **Key words:**

Optical sensor

pH sensor

Curcumin

Biodegradable materials

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 2. OPĆI DIO .....  | 3  |
| 2.1. Kemijski senzori.....   | 4  |
| 2.1.1. Podjela kemijskih senzora .....   | 4  |
| 2.1.2. Optički senzori .....   | 5  |
| 2.1.3. Ion-selektivne optode .....   | 6  |
| 2.1.3.1. Mehanizam rada ion-selektivnih optoda.....                                  | 6  |
| 2.1.3.2. Ion-selektivne optode na papiru .....                                       | 8  |
| 2.2. UV-vidljiva apsorpcijska spektroskopija .....                                   | 10 |
| 2.3. Kurkumin.....   | 13 |
| 2.3.1. Struktura kurkumina .....   | 13 |
| 2.3.2. Kiselo-bazna ravnoteža .....  | 14 |
| 2.3.3. Keto-enolna tautomerija i <i>cis-trans</i> izomerija .....                    | 15 |
| 2.3.4. Razgradnja kurkumina.....   | 16 |
| 2.3.5. Fotofizikalna svojstva kurkumina .....  | 16 |
| 2.3.5.1. Utjecaj otapala .....   | 17 |
| 2.3.5.2. Utjecaj pH.....   | 21 |
| 2.3.5.3. Utjecaj temperature .....   | 23 |
| 2.3.5.4. Utjecaj koncentracije .....   | 26 |
| 2.3.6. Imobilizacija kurkumina.....  | 28 |
| 2.4. Primjena kurkumina u sensorima .....  | 30 |
| 2.4.1. Fluorescencijski senzor za detekciju $\text{Cu}^{2+}$ i $\text{S}^{2-}$ ..... | 30 |
| 2.4.1.1. Priprema i karakterizacija nanočestica .....                                | 31 |
| 2.4.1.2. Fotofizikalna svojstva nanočestica kurkumina .....                          | 32 |
| 2.4.1.3. Trajanje fluorescencije nanočestica.....                                    | 33 |
| 2.4.1.4. Selektivnost na $\text{Cu}^{2+}$ .....                                      | 33 |
| 2.4.1.5. Utjecaj koncentracije $\text{Cu}^{2+}$ na fluorescenciju .....              | 34 |
| 2.4.1.6. Mehanizam kompleksiranja.....   | 35 |
| 2.4.1.7. Selektivnost kompleksa na $\text{S}^{2-}$ ione .....                        | 35 |
| 2.4.1.8. Utjecaj koncentracije $\text{S}^{2-}$ na fluorescenciju .....               | 36 |
| 2.4.1.9. Mehanizam „Turn-On“ senzora .....   | 37 |
| 2.4.2. pH senzor s nanočesticama kurkumina na papiru .....                           | 38 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.4.2.1. Priprema i izvedba senzora.....              | 38        |
| 2.4.2.2. Odziv senzora .....                          | 39        |
| 2.4.3. pH senzor za praćenje kvarenja hrane .....     | 40        |
| 2.4.3.1. Priprema senzora i uzorka .....              | 41        |
| 2.4.3.2. Odziv senzora i količina TVBN .....          | 41        |
| 2.4.3.3. Odziv senzora i pH.....                      | 42        |
| 2.4.4. Senzori bazirani na kurkuminu i želatini.....  | 43        |
| 2.4.4.1. Priprema senzora .....                       | 44        |
| 2.4.4.2. Karakterizacija i odziv senzora .....        | 44        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>                   | <b>47</b> |
| 3.1. Priprema matične ( <i>stock</i> ) otopine.....   | 48        |
| 3.2. Snimanje UV-Vidljivog apsorpcijskog spektra..... | 48        |
| 3.3. Priprema uzorka za snimanje.....                 | 49        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>                  | <b>50</b> |
| 4.1. Utjecaj promjene pH na spektralna svojstva ..... | 51        |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>                             | <b>54</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>                            | <b>56</b> |
| <b>7. ŽIVOTOPIS.....</b>                              | <b>58</b> |



# **1. UVOD**

Optički senzori su podvrsta kemijskih senzora u kojima se analitički signal u pretvorniku dobiva pomoću elektromagnetskog zračenja. Interakcija elektromagnetskog zračenja s uzorkom mjeri se promjenom određenog optičkog parametra te je povezana s koncentracijom analita. Mogu se temeljiti na raznim optičkim mehanizmima kao što su apsorpcija, refleksija, luminiscencija, fluorescencija [1].

pH optode od posebne su važnosti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, medicini te analizi okoliša.

Kurkumin je jedan od mnogih obećavajućih prirodnih supstrata koji se naveliko istražuje u biologiji i kemiji [2]. Molekula kurkumina sastoji se od dva metoksifenolna prstena, povezanih  $\alpha,\beta$ -nezasićenim  $\beta$ -diketonima [3].  $\beta$ -diketo skupine podliježu keto-enolnoj tautomeriji, pri čemu se enolni oblik lako deprotonira u bazičnim uvjetima. Rezultat toga je vidljiva promjena boje i spektralnih svojstava.

Mogućnost primjene kurkumina u optičkim sensorima očituje se u promjeni njegovih spektralnih svojstava u kontaktu s određenim ionima. U ovom su radu ispitana spektralna svojstva kurkumina u ovisnosti o pH medija UV-vidljivom spektrofotometrijom te je dan pregled spektralnih svojstava (apsorpcijskih i fluorescencijskih) u ovisnosti o vrsti otapala, pH medija, temperaturi, koncentraciji kurkumina i određenih iona ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ). Prikazani su uvjeti u kojim se odvijaju fenomeni razgradnje i agregiranja molekula kurkumina te načini imobilizacije u svrhu poboljšanja topljivosti u vodenom mediju.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzor je uređaj koji pretvara kemijsku informaciju, dobivenu iz koncentracije specifične komponente u čistom ili složenom uzorku, u analitički koristan signal. Spomenuta kemijska informacija može potjecati od kemijske reakcije analita ili od fizičkog svojstva sustava od interesa.

Kemijski senzori sastoje se od dvije osnovne jedinice: receptorskog dijela i pretvornika. Neki kemijski senzori sadrže i separator, na primjer membranu. Receptorski dio pretvara kemijsku informaciju u oblik energije koji pretvornik može mjeriti, te ga pretvoriti u analitički koristan signal. Pretvornik kao takav ne pokazuje selektivnost [4].

### 2.1.1. Podjela kemijskih senzora

Kemijski senzori često su klasificirani prema pretvorniku.

*Optički senzori (optode)* pretvaraju promjenu optičkog fenomena (rezultat interakcije analita sa receptorom) u koristan signal. U podskupinu optički kemijskih senzora, prema vrsti mjerenja, spadaju: apsorpcijski senzori, refleksijski senzori, luminiscencijski senzori, optotermalni senzori i senzori koji mjere indeks loma.

*Elektrokemijski senzori* pretvaraju učinke elektrokemijskih interakcija analita i elektrode u koristan signal. Efekti mogu biti stimulirani električnim putem ili spontane interakcije bez dodatka struje. Dalje se mogu podijeliti na: voltamerijske senzore, amperometrijske senzore, potenciometrijske senzore i potenciometrijske plinske senzore sa čvrstim elektrolitom.

*Električni senzori* bazirani su na mjerenjima gdje se ne odvijaju elektrokemijski procesi, ali signal se dobiva promjenom električnih svojstava, uzrokovanom interakcijom s analitom.

Neki od primjera su poluvodiči od metalnih oksida, organski poluvodiči, električni senzor permeabilnosti i dr.

*Maseni senzori* pretvaraju promjenu mase na specijalno modificiranoj površini u promjenu svojstva materijala, pri čemu je promjena mase uzrokovana akumulacijom analita. U takve ubrajamo piezoelektričke senzore, bazirane na mjerenju frekvencije kvarcnog oscilatora, koja se mijenja adsorpcijom mase analita na oscilator (kristalna nanovaga).

*Magnetski senzori* temelje se na promjeni paramagnetskih svojstava analiziranog plina.

*Termometrijski uređaji* mjere toplinske promjene specifičnih kemijskih reakcija ili adsorpcije analita [4].

### **2.1.2. Optički senzori**

Boja neke tvari uzrokovana je apsorpcijom elektromagnetskog zračenja u vidljivom dijelu spektra. Apsorbira li tvar od vidljivoga dijela spektra stanovito spektralno područje, tj. odgovarajuću boju propušta (ako je prozirna), ili difuzno raspršuje ako je neprozirna, svjetlost preostalog dijela svjetla, a time i boja tvari komplementarna je apsorbiranoj boji [5].

U optičkim sensorima interakcija između analita i senzora izaziva optički uočljivu promjenu u osjetilnom materijalu. To je omogućeno indikatorskim bojilom koje mijenja spektralne karakteristike (apsorbanciju i/ili fluorescenciju) pri kontaktu s analitom [6].

Prednosti optoda u odnosu na elektrode su selektivnost, otpornost na elektromagnetske interferencije, jednostavnost smanjivanja dimenzija i jeftinija proizvodnja [1]. Optode omogućavaju kolorimetrijsku osjetljivost, baziranu na vidu ili prijenosnoj kameri, imajući jedinstven potencijal u razvoju jednostavne i kompaktne senzorske platforme bez potrebe za izvorom energije i instrumentacijom [7]. Zbog kombiniranja ionofora (s različitom selektivnošću i afinitetom prema analitu) s lipofilnim pH indikatorima (s optimiziranom kiselošću i spektralnim svojstvima), optodama se mogu podesiti selektivnost i dinamičko područje te se mogu optimizirati za specifične namjene [6].

Nedostaci optoda su moguća interferencija ambijentalnog svjetla, kraća stabilnost uslijed blijedenja indikatora, ograničeno dinamičko područje, prijenos analita do indikatorske faze za dobivanje signala [1].

Fiziološki relevantni ioni (kalij, natrij i klorid) te ioni često zastupljeni u okolišu i hrani (kalcij, magnezij, amonij, fosfat, ugljikov dioksid, nitrat i nitrit) predmet su nedavnih istraživanja, posebno u vidu jeftinih i/ili jednokratnih optoda [6].

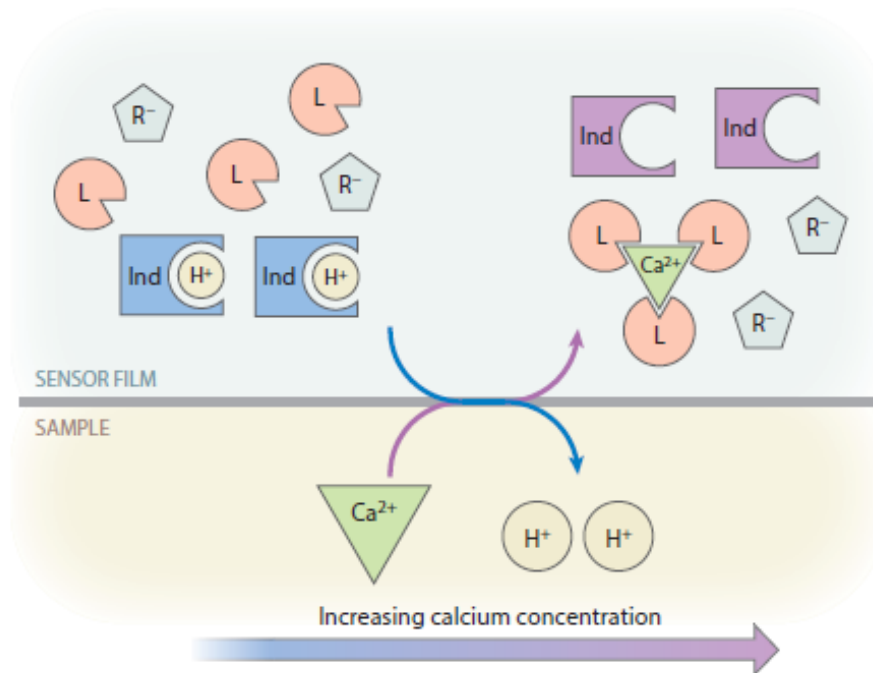
### 2.1.3. Ion-selektivne optode

Ion-selektivne optode (ISO) kemijski su senzori bazirani na fazi koja se ne miješa s vodom, dopiranoj s ion-selektivnim ionoforom. Razne ion-selektivne optode razvijene su za direktnu detekciju preko 60 organskih, anorganskih i bioloških iona te indirektnu detekciju plinova, neutralnih otopina, kemijskih i biokemijskih reakcija. Senzorske mogućnosti ih čine korisnima u bitnim analitičkim područjima, primjerice u kliničkoj analizi, analizi okoliša i kontroli kvalitete hrane. Uz ion-selektivne elektrode, ion-selektivne optode potpuno su zamijenile klasičnu atomsku spektroskopiju u određivanju elektrolita (Na, K, Ca, Cl, itd.) u biološkim fluidima, kao što su urin i krv, te se rutinski koriste u bolnicama diljem svijeta. Primjer ion-selektivnih optoda su pH indikatori, gdje pH uzorka utječe na stupanj protoniranja indikatorskog bojila i time određuje boju senzora. Trenutak povezivanja analita s receptorom može potaknuti sekundarni, optički uočljivi proces, što se događa u sensorima baziranim na ionoforima. Ionofor je molekula koja ima visok afinitet za analitom te ga selektivno veže. Lipofilni pH indikatori su molekule koje, ovisno o stupnju protoniranja, mijenjaju spektralna svojstva tj. boju. U posebnim slučajevima ionofor se ponaša i kao indikator, što znači da vezanje na ciljani ion (osim protona) potiče promjenu u spektralnim svojstvima. Takvi ionofori nazivaju se *kromogenkim* ionoforima, ako se promijeni njihov spektar apsorbancije, ili *fluorogenkim* ionoforima ako se promijeni njihov spektar fluorescentne emisije [6,7].

#### 2.1.3.1. Mehanizam rada ion-selektivnih optoda

Ion-selektivne optode bazirane na ionoforima obično koriste organski medij nemješljiv s vodom. Pri kontaktu s vodenim uzorkom, analit se iz uzorka ekstrahira u organsku fazu ionskim prepoznavanjem (npr. vodikovim vezama ili Lewisovim kiselobaznim interakcijama) s ionoforima. Može se odvijati koekstrakcija suprotno nabijenog referentnog iona ili otpuštanje referentnog iona s istim nabojem. U većini slučajeva referentni ioni su protoni zbog visoke selektivnosti dostupnih proton ionofora. Ovisno o naboju ionofora, može se koristiti ionski izmjenjivač kako bi se olakšala ekstrakcija iona. Idealni anionski ili kationski izmjenjivač treba nadomjestiti jedino neravnotežu naboja u membrani, bez sudjelovanja u bilo kakvim drugim reakcijama kompleksiranja ili procesima disocijacije. U tu svrhu koriste se veliki lipofilni ioni. Još jedna važna komponenta jest omekšivač (plastifikator), koji povećava pokretljivost

slobodnih i vezanih ionofora te uspostavlja mehanička svojstva (elastičnost) matrice. U najzastupljenijem primjeru, prikazanom na slici 1, kombinirani su neutralni ionofor (L); pozitivno nabijeni, protonirani indikator (IndH<sup>+</sup>); i negativno nabijeni ionski izmjenjivač (R<sup>-</sup>), koji tvore kation-selektivnu optodu. Ekstrakcija ciljanog kationa (I<sup>+</sup>) u optodu rezultira oslobađanjem protona, mijenjajući stupanj protoniranja, time i boju indikatora [5,6,8].



**Slika 1.** Shematski prikaz ionske izmjene u ion-selektivnoj optodi, potaknute povećanom koncentracijom iona analita [6].

### 2.1.3.2. Ion-selektivne optode na papiru

U proteklih nekoliko godina primjećen je povećan interes za razvoj senzorskih platformi baziranih na papiru. Papir je vrlo jeftin, lagan za proizvodnju, prijenos, rukovanje i skladištenje. Još važnije, kapilarno djelovanje i porozna struktura omogućavaju razvoj mikrofluida bez prisiljenog toka. Prema tome, za integrirane uređaje ili kolorimetrijsku detekciju, nije potrebna dodatna oprema, osim kapilarnih sila koje služe umjesto pumpe. Razne senzorske platforme na papiru provedene su za ione, metabolite, enzime, proteine, nukleinske kiseline i bakterije.

Prednosti celuloze kao senzorskog substrata:

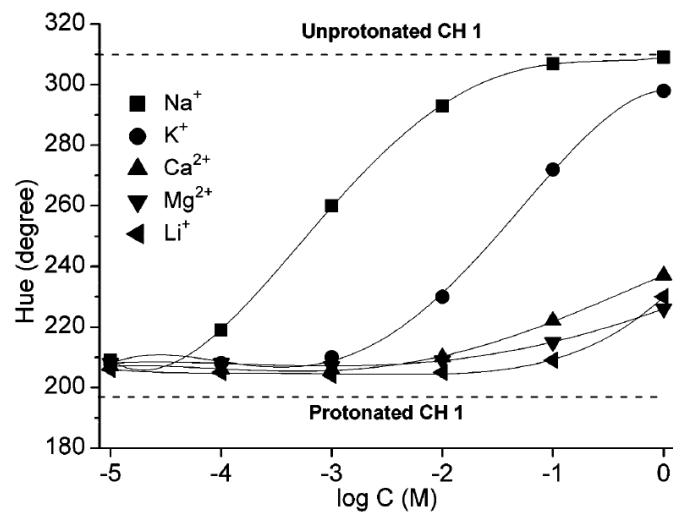
- Odlična propusnost, dopušta mikrofluidiku bez vanjske pumpe
- Snažna adsorpcija analita, vrlo kompatibilna s printerima
- Jednostavna kemijska modifikacija (kovalentno ili nekovalentno)
- Jednostavno slaganje, prijenos i transport

Dokazano je da veliki omjer površine naspram volumena, porozna struktura i mali volumen papirnatih uređaja rezultiraju puno kraćim vremenom potrebnim za analizu. Procesiranje krvnih uzoraka može biti postignuto unutar 16 minuta, za razliku od 1 h ili cijelonoćnog ispitivanja, ponekad potrebnog kod drugih metoda [8,9].

Celulozni papir pokazao se odličnim supstratom za adsorpciju kromoionfora, ionfora i ionskih izmjenjivača. Hidrofobni mikro-okoliš može biti formiran zbog samih komponentni u optodi, koja imaju hidrofobna svojstva pa oponašaju plastificiranu polimernu fazu tradicionalnih ion-selektivnih optoda. Adsorbirane komponente tvore hidrofobnu fazu koja omogućuje heterogeni optički senzor, uz odsudstvo bilo kakvih organskih polimernih molekula. Iako je celulozni papir smatran vrlo hidrofilnim (dokaz - nagla adsorpcija i širenje vode), prepoznata je i njegova izvanredna hidrofobna priroda (podrijetlom iz nevodikovih veza i nepolarnih protona celuloze). Navedeno hidrofobno svojstvo još više poboljšava rezidenciju ionskih komponenti na papiru, zbog hidrofobnih interakcija pri močenju papira vodom. Adsorpcija lipofilnih komponenti također tvori hidrofobni mikro-okoliš, koji je dokazan mjerenjem kontaktnog kuta glicerola na takvoj optodi. Formirani hidrofobni mikro-okoliš omogućava ionsku osjetljivost analognu s ion-selektivnim optodama, dok se vodena otopina i dalje može širiti na senzornom području [7,8].



Wang i suradnici (2015) proizveli su jednu takvu  $\text{Na}^+$ -selektivnu optodu na papiru, koristeći kameru mobilnog uređaja kao detektor. Kao odziv na ione analizirana je zasićenost promijenjene boje, iz modre u ljubičastu. Prema slici 2, logaritam koeficijenta selektivnosti testiranih  $\text{Na}^+$ -selektivnih optoda iznose -1,7 za  $\text{K}^+$  i  $<-3$  za ostale katione. Isprekidane linije odziva odgovaraju optodi u otopini  $10^{-2}$  M HCl-a (potpuno protonirana optoda), odnosno NaOH (potpuno deprotonirana optoda). Takva selektivnost zadovoljava zahtjeve za detekciju  $\text{Na}^+$  u razrijeđenim i nerazrijeđenim krvnim/serumskim uzorcima (maksimum interferencije od 1%). Prema dinamičkom području i selektivnosti testirana optoda je usporediva sa tradicionalnim plastificiranim polimernim optodama [7].



**Slika 2.** Odzivne krivulje (zasićenost boje)  $\text{Na}^+$ -selektivne optode na papiru za različite katione [7].

## 2.2. UV-vidljiva apsorpcijska spektroskopija

Djelovanje optičkih senzora temelji se na interakciji svjetla i materije. Elektromagnetsko zračenje ima dualnu prirodu: valnu i čestičnu. Prvo se svojstvo opisuje valom, kojemu je sinusoidno osciliranje električnog polja okomito na magnetsko polje te su ta dva polja u fazi. Val se definira frekvencijom osciliranja ( $\nu$ ), valnom duljinom ( $\lambda$ ) i brzinom kretanja ( $c$ ):

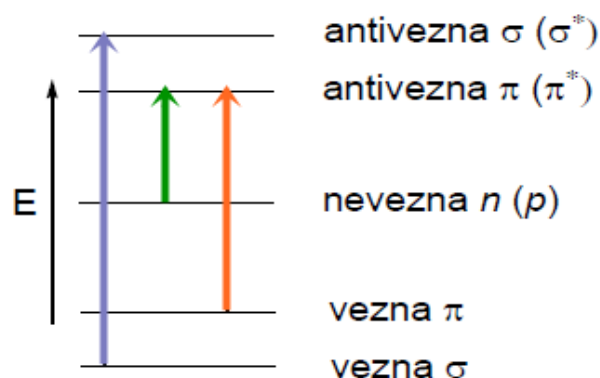
$$c \text{ (ms}^{-1}\text{)} = \lambda \text{ (m)} * \nu \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

Drugo svojstvo elektromagnetskog zračenja govori kako je ono kvantizirano, odnosno da se sastoji od kvantova energije nazvanim fotonima. Energiju fotona ( $E$ ) definiraju frekvencija ( $\nu$ ) i Planckova konstanta ( $6,626 * 10^{-34}$  J s):

$$E \text{ (J)} = h \text{ (J)} * \nu \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad (2)$$

Propuštanjem zrake svjetla kroz sloj materije, ona može apsorbirati svjetlo, što rezultira smanjenjem intenziteta primarne zrake. Dio molekule odgovoran za apsorpciju svjetla zove se kromofor. Energije molekula također su kvantizirane pa one mogu apsorbirati fotone točno određenih energija. Hoće li molekula apsorbirati UV, odnosno vidljivo svjetlo, ovisi o energiji fotona i o elektronskoj konfiguraciji molekule, tj. o energijskim razlikama između elektronskih stanja u molekuli. Svjetlo se može apsorbirati samo ako se energija pobuđivanja podudara s energijom fotona,  $\Delta E = h\nu$ .

Pri apsorpciji elektromagnetskog zračenja tj. fotona, pobuđeni elektron prelazi iz osnovnog singletnog u prvo pobuđeno singletno stanje, odnosno iz popunjene orbitale niže energije u nepopunjenu orbitalu više energije. Prijelaz elektrona odvija se između molekulskih orbitala, koje se razlikuju po sadržaju energije, odnosno po stabilnosti (slika 3). Prema slici može se vidjeti da je najteži prijelaz iz vezne  $\sigma$  u pripadajuću antiveznu  $\sigma^*$  orbitalu ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ), dok je najlakši iz nevezne  $n$  (slobodni elektroni) u antivezne  $\pi^*$  ( $n \rightarrow \pi^*$ ).



**Slika 3.** Mogući elektronski prijelazi unutar molekularnih orbitala

Odnos između relativne apsorpcije i valne duljine svjetla naziva se apsorpcijski spektar te se utvrđuje metodama spektrometrije. Područje mjerenja UV/Vis spektrofotometara obično su 200-380 nm za ultraljubičasti (UV) i 380-780 nm za vidljivi (Vis) dio spektra.

Većina optičkih senzora djelovanje temelji na apsorpciji svjetlosti, a mjeri se intenzitet pobudne svjetlosti ( $I_0$ ) naspram intenziteta propuštenog svjetla ( $I$ ), pri čemu se intenzitet definira kao broj fotona koji prolazi jediničnom površinom.

Odnos pobudnog i propuštenog svjetla definira se Lambert-Beerovim zakonom:

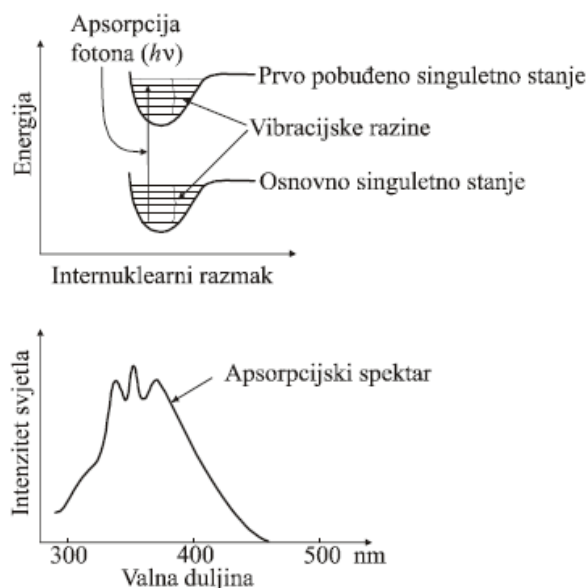
$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon * c * l \quad (3)$$

gdje su:

- $A$  = apsorbancija, veličina koja iskazuje slabljenje intenziteta svjetla pri linearnom prolazu kroz medij
- $\varepsilon$  = molarni apsorpcijski koeficijent, ovisan o svojstvu molekule i valnoj duljini svjetla ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
- $c$  = koncentracija molekula koje apsorbiraju svjetlo ( $\text{mol dm}^{-3}$ )
- $l$  = optički put koje svjetlo prelazi putujući kroz medij, određen širinom kivete (cm)

Iz snimljenog spektra može se očitati na kojoj valnoj duljini ispitivana molekula najbolje apsorbira. Prema Lambert-Beerovom zakonu apsorbancija je proporcionalna broju molekula koje apsorbiraju zračenje ( $c$ ) i učinkovitosti apsorpcije ( $\varepsilon$ ) te se uz njegovu pomoć može analitički odrediti koncentracija otopine ispitivane molekule iz izmjerene apsorpcije.

Unutar elektronskih stanja postoji niz vibracijskih razina. Energije vibracije također su kvantizirane i međusobno se razlikuju mnogo manje od energija elektronskih prijelaza. Tokom elektronskog prijelaza dolazi i do promjene vibracijskog stanja te se takvi prijelazi nazivaju vibronskim (slika 4). Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja može doći do niza prijelaza, koji vode do različitih energijskih razina, tako da se apsorpcijski spektar sastoji od niza blisko postavljenih linija koje su djelomično razlučene ili potpuno nerazlučene te spektar ima oblik krivulje. Apsorpcijski spektri organskih molekula najčešće su nerazlučeni zbog međudjelovanja s molekulama otapala. Utjecaj otapala na apsorpcijski spektar posljedica je intermolekulskih veza između otapala i otopljene tvari. Polarna otapala se mogu vezati za tvar vodikovim vezama ili dipol-dipolnim međudjelovanjima, a nepolarna otapala Londonovim silama. Međudjelovanja utječu na položaj energijskih stanja u molekuli pa prema tome i na frekvenciju apsorbiranog fotona, odnosno položaj vrpece u spektru. Polarna otapala koja tvore jače vodikove veze s polarnim molekulama u osnovnom stanju, nego u pobuđenom, povišuju energiju elektronskih prijelaza, odnosno pomiču apsorpciju prema kraćim valnim duljinama. Ako pobuđeno stanje tvori jače vodikove veze s otapalom, nego osnovnog stanje, energija apsorpcije se smanji, odnosno pomiče se prema duljim valnim duljinama [5,10].



**Slika 4.** Elektronski prijelaz (pobuda) u interakciji elektromagnetskog vala i materije i pripadajući apsorpcijski spektar [5].

## 2.3. Kurkumin

Kurkumin je žuta bioaktivna komponenta kurkume, biljke (*Curcuma longa*) iz porodice đumbira, autohtone tropskoj Južnoj Aziji. Intenzivno se koristi kao začin, konzervans i sredstvo za boju [3]. Pokazuje mnoga korisna biološka i farmakologijska svojstva, zbog čega je korišten kao terapeutik protiv raznih kroničnih bolesti kao što su infekcije kože, bolesti kardiovaskularnog sustava i očne bolesti [11]. Kurkumin je u ljudskoj upotrebi više od dvjesto godina, ali još uvijek privlači pozornost znanosti diljem svijeta. Znanstvena istraživanja započeta prije više od četiri desetljeća potvrdila su raznoliki farmaceutski utjecaj kurkumina i otvorila mogućnost korištenja u tretiranju tumora i raznih kroničnih bolesti. Istraživanje kurkumina postao je interes i raznih grana kemije. Fokus organske kemije glede kurkumina jest ekstrakcija i sinteza novih derivata. Anorganski kemičari proučavaju njegovo kompleksiranje s metalima kako bi stvorili nove strukturne jedinice s modificiranim biokemijskim aktivnostima. Fizikalna grana kemije bavi se spektroskopskim svojstvima kurkumina, kako bi se bolje definirale interakcije s biomolekulama i mikroheterogenim sistemima. S analitičkog gledišta, kurkumin se koristi kao jedinstveni indikator za kvalitativno, ali i kvantitativno određivanje tragova elemenata [2].

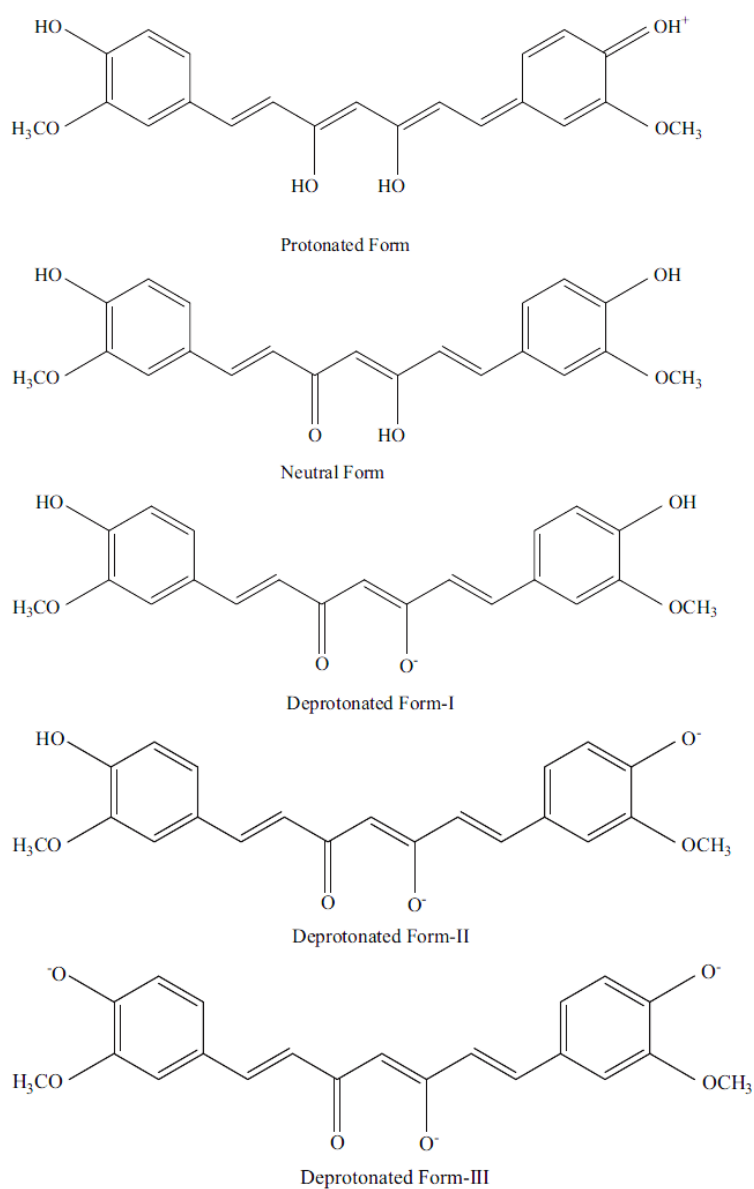
### 2.3.1. Struktura kurkumina

Molekula kurkumina je simetrična, također poznata kao diferuloilmetan. Kemijska formula kurkumina glasi  $C_{21}H_{20}O_6$ , dajući mu molekulsku masu od 368,38  $g\text{mol}^{-1}$ . Puni IUPAC-ov naziv mu je 1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion [3].

Sadrži 3 kemijske strukturne jedinice: dva aromatska prstena s o-metoksifenolnim grupama, povezana mostom od sedam ugljikova atoma, koji čine  $\alpha,\beta$ -nezasićeni  $\beta$ -diketon. Proširena konjugacija omogućava protezanje  $\pi$  elektronskog oblaka preko cijele molekule [2]. Zahvaljujući diketonskom mostu, postoji u dva tautomerna oblika (keto-enol) i u više izomernih oblika, ovisno o uvjetima u kojima se nalazi [11].

### 2.3.2. Kiselo-bazna ravnoteža

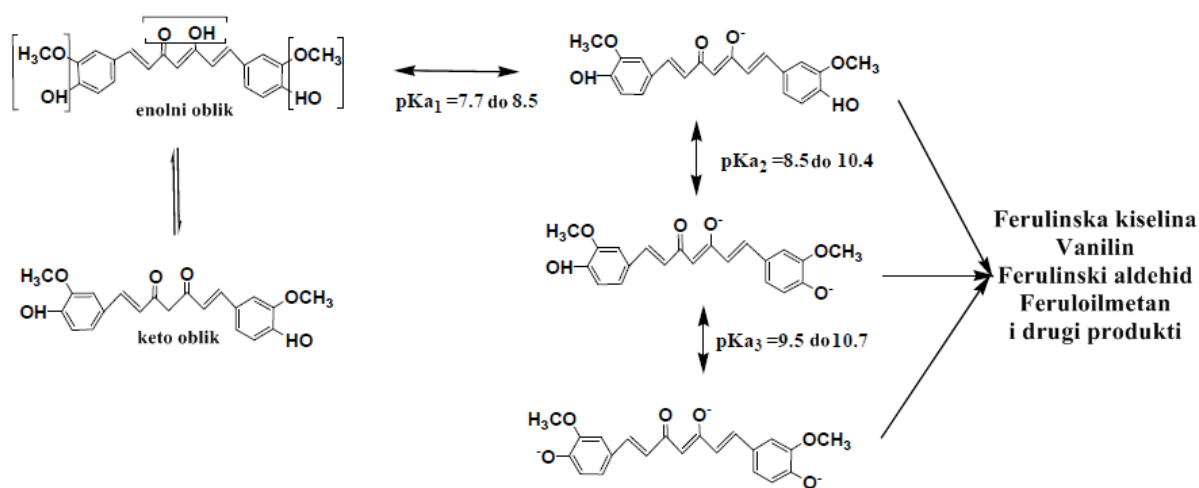
Kurkumin je slaba kiselina po Brönstedu. Ima tri kiselna protona (jedan enolni te dva fenolna), od kojih svakih korespondira jednom ravnotežom i  $pK_a$  vrijednošću, no i dalje nije poznato koji je najkiseliji. Deprotonirani oblici prikazani su na slici 5. Prva konstanta disocijacije  $pK_a$  nalazi se u rangu pH od 7,5 do 8,5, pri čemu kurkumin mijenja boju iz žute u crvenu. Anion je kemijski reaktivniji i topljiviji u vodi od neutralne molekule [2]. Može pokazivati različite konstante disocijacije ( $pK_a$ ), ovisno o otapalu. Keto oblik je proton donor, dok je enolatni oblik (anion) elektron donor [11].



**Slika 5.** Različiti oblici protoniranosti molekule kurkumina [3].

### 2.3.3. Keto-enolna tautomerija i *cis-trans* izomerija

Tautomerija je izraz koji se odnosi na ravnotežu dviju različitih struktura istog spoja. Obično se tautomeri razlikuju u mjestu spajanja vodikovog atoma. Najčešći primjer tautomernog sustava je ravnoteža između ketona (keto) i aldehida (enol). Struktura  $\beta$ -diketona podliježe keto-enolnoj tautomeriji u otopinama (slika 6), koja pruža svojstvena fotofizikalna i fotokemijska svojstva [11]. Pri sobnoj temperaturi dominira enolni oblik. Relativni doprinos tautomeriji ima i *cis-trans* izomerija, ovisna o otapalu, temperaturi i polarnosti otapala [3]. U kristalnom obliku egzistira u *cis*-enolnoj konfiguraciji, pri čemu je stabiliziran vodikovim vezama, dok strukturu čine tri supstituirane planarne skupine (dvije metoksifenolne skupine i  $\beta$ -diketon) međusobno povezane dvjema dvostrukim vezama. U većini nepolarnih otapala stabilniji je enolni oblik za 5 do 8 kcal/mol. U otopinama postoji kao *cis-trans* izomer. U *trans* obliku metoksifenolne skupine su na suprotnim stranama, stvarajući manje steričke smetnje i ujedno stabilniji oblik od *cis* izomera [2].



**Slika 6.** Prikaz tautomernih oblika, kiselo-bazne ravnoteže i produkata razgradnje molekule kurkumina [2].

#### 2.3.4. Razgradnja kurkumina

Kurkumin podliježe kemijskoj razgradnji u binarnim mješavinama vode i organskog otapala. Razgradnja se pojačava porastom pH, što stvara problem u primjeni. Razgradnja kurkumina odvija se preko  $\alpha,\beta$ -nezasićenih  $\beta$ -diketona, vjerojatno hidrolizom. U razrijeđenim otopinama razgradi se 90% kurkumina za 30 minuta, međutim stopa razgradnje smanjena je ako je riječ o koncentriranoj otopini. Razgradnjom se dobiva više produkata: trans-6(4-hidroksi-3-metoksifenil)-2-4-dioksa-5-heksanal, ferulinski aldehid, ferulinska kiselina, feruloilmetan i vanilin (slika 6). Razgradnja je značajno smanjena ukoliko je kurkumin imobiliziran lipidima, liposomima, albuminima, ciklodekstrinima, surfaktantima, polimerima i ostalim makromolekulskim sustavima. Kurkumin je također fotorazgradiv te se izlaganjem sunčevoj svjetlosti dobivaju slični bezbojni produkti kao kemijskom razgradnjom. Fotorazgradnja podrazumijeva pobuđivanje kurkumina, koje se provodi preko tripletnog pobuđenog stanja. Vrijeme raspada tripletnog pobuđenog stanja iznosi nekoliko mikrosekundi, što upućuje da je razgradnja vrlo brza. Fotorazgradnja može se ubrzati pomoću nanočestica titanijeva dioksida ( $\text{TiO}_2$ ) [2].

#### 2.3.5. Fotofizikalna svojstva kurkumina

Apsorpcijski spektar kurkumina pokazuje dvije snažne vrpce. Jedna vrpca je u vidljivom dijelu spektra s maksimumom između  $\lambda_{\text{max}} = 410 - 430$  nm. Druga vrpca nalazi se u UV dijelu spektra, s maksimumom oko 260 nm, koji je pripisan produktima razgradnje (ako su uvjeti takvi koji to omogućuju). Molarni apsorpcijski koeficijent kurkumina u metanolu iznosi  $55\,000\text{ cm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , pri 425 nm. Apsorpcijski maksimum potpuno deprotoniranog kurkumina, u bazičnim uvjetima ( $\text{pH} > 10$ ), je oko 467 nm te molarni apsorpcijski koeficijent iznosi  $53\,000\text{ cm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  [2].

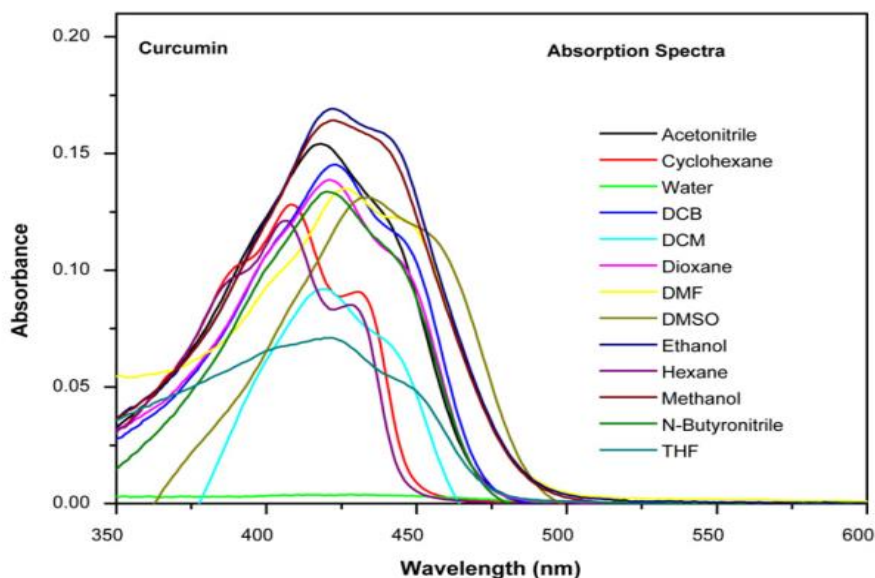


### 2.3.5.1. Utjecaj otapala

Fotofizikalna svojstva ovise o mikrookolišu molekule, polarnosti otapala, kao i o tome radi li se o protičnom ili aprotičnom otapalu. Kurkumin je lako topljiv u polarnim organskim otapalima, manje topljiv u alifatskim i cikličkim organskim otapalima kao što su heksan i cikloheksan. Apsorpcijski maksimum kurkumina varira između  $\lambda_{\max} = 408$  nm i  $\lambda_{\max} = 430$  nm u većini organskih otapala. Porastom nepolarnosti otapala maksimum apsorpcije pomiče se prema manjim valnim duljinama, tj. događa se hipsokromni pomak (*blue shift*), dok se u porastom polarnosti maksimum pomiče prema većim valnim duljinama, tj. događa se batokromni pomak (*red shift*).

Ispitivanjem fluorescencije kurkumina u različitim organskim otapalima, uočen je širi Stokesov pomak u protičnim otapalima, nego u aprotičnim i nepolarnim otapalima. Razlog tomu je smanjenje rigidnosti molekule zbog ometanih intramolekulskih veza uslijed stvaranja vodikovih veza s otapalom [11].

Patra i Barakat (2010) proučavali su utjecaj otapala na apsorpcijski spektar kurkumina. Pripremili su stock otopinu kurkumina u diklormetanu. Željena količina je uzeta iz stock uzorka u kivetu te je otapalo ispareno laganim zagrijavanjem. Konačni uzorak za ispitivanje dobiven je dodavanjem potrebne količine željenog otapala u istu kivetu. Provedena su ispitivanja za cikloheksan, heksan, diklormetan (DCM), diklorbenzen (DCB), dioksan, metanol, etanol, acetonitril, n-butironitril, dimetilsulfoksid (DMSO), tetrahidrofuran, i N,N-dimetilformamid, vodu bez dodatnih pročišćavanja. Apsorpcijski spektar različitih otapala dobiveni su pri sobnoj temperaturi, pri čemu je kao izvor pobude korištena ksenonska lampa od 100 W. Na slici 7 prikazan je apsorpcijski spektar kurkumina snimljen u različitim otapalima. Apsorpcija je unutar vidljivog dijela spektra kod svakog otapala.



**Slika 7.** Apsorpcijski spektar kurkumina u različitim otapalima, pri sobnoj temperaturi [3].

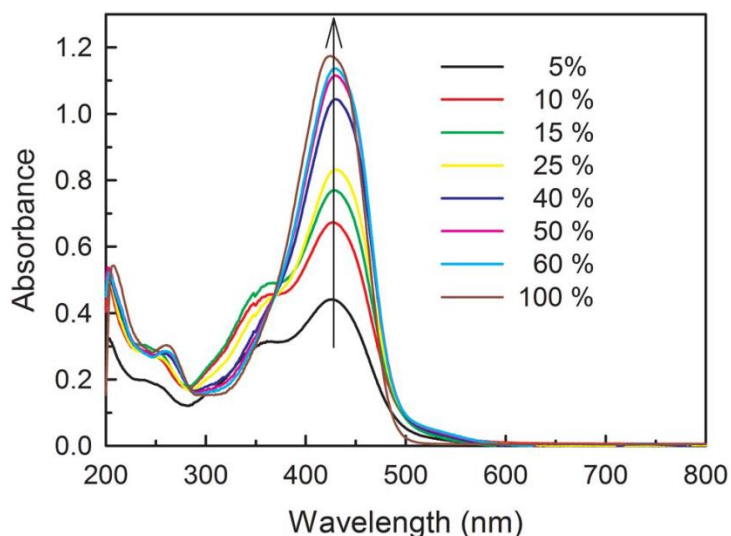
Kurkumin pokazuje snažnu i intenzivnu vrpču između  $\lambda = 350$  i  $\lambda = 480$  nm u svim otapalima. Apsorpcijski spektar je u svim otapalima širok, dok prisutnost više od jednog „ramena“ ukazuje na postojanje više od jednog izomernog oblika u osnovnom stanju. Kurkumin je u vodi praktički netopljiv, što je vidljivo je prema vrlo slabom intenzitetu apsorpcije, dok je u topljiv u polarnim organskim otapalima. Prema topljivosti u različitim medijima, maksimum apsorpcije kurkumina može se podijeliti u 4 područja:

1. Cikloheksan i heksan
2. Voda
3. THF, N-butironitril, 1,4-dioksan, acetonitril, DCM, metanol, etanol, DCB i DMF
4. DMSO

Od heksana ( $\lambda_{\max} = 406$  nm) do DMSO ( $\lambda_{\max} = 434$  nm) uočava se batokromni pomak (*red shift*) prema polarnijim otapalima. U slučaju vode uočava se hipsokromni pomak (*blue shift*) u odnosu na DMSO (negativni solvatokromizam) te batokromni pomak (*red shift*) u odnosu na heksan (pozitivni solvatokromizam) [3].

Bhatia i suradnici (2016) proučavali su utjecaj udjela polarnog otapala na fotofizikalna svojstva kurkumina. Koristili su tri različita pH uvjeta pri istraživanju, snimajući apsorpcijsko i emisijsko ponašanje u binarnim mješavinama etanola i vode. Različite binarne mješavine pripremljene su mješanjem pufera određenog pH i etanola u prikladnom volumenu. Izabrana koncentracija kurkumina bila je 25  $\mu\text{M}$ . Valna duljina pobude držana je na  $\lambda = 429$  nm te su

emisijski spektri snimljeni u području od  $\lambda = 450$  do 800 nm. Na slici 8 prikazan je dobiven apsorpcijski spektar kurkumina otopljenog u mješavinama različitih udjela etanola.

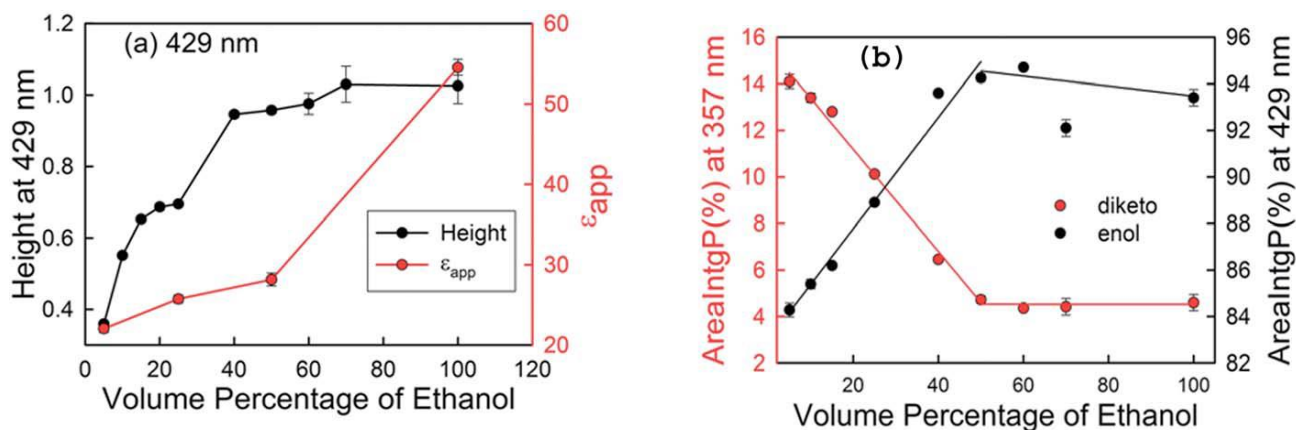


**Slika 8.** Apsorpcijski spektar kurkumina u različitim binarnim mješavinama etanola i fosfatnog pufera pri pH 7,0 i temperaturi 25° C [11].

Uočena je istaknuta vrpca na  $\lambda = 429$  nm, uz blagi pik na  $\lambda = 357$  nm u 5%-tnoj otopini etanola u vodi. Slabiji pik na  $\lambda = 357$  nm pripisuje se keto obliku, dok se pik na  $\lambda = 429$  nm pripisuje enolnom ili monoanionskom obliku. Blagi pik uočen je u otopinama do 20% sadržaja etanola, nakon čega postupno nestaje s povećanjem udjela etanola. Intenzitet drugog pika na  $\lambda = 429$  nm (enolni ili monoanionski oblik) raste s porastom volumnog udjela etanola. Ta pojava može imati dva uzroka:

1. Povećanje molarnog apsorpcijskog koeficijenta ( $\epsilon$ ) različitih konformacija u različitim binarnim mješavinama
2. Pomak ravnoteže prema enolnom obliku pri većim udjelima etanola

Kako bi se utvrdio razlog povećanja intenziteta pika na  $\lambda = 429$  nm, izračunate su vrijednosti  $\epsilon$  kurkumina mjerenjem apsorbanije kao funkcije koncentracije u vodenim otopinama etanola (slika 9), prema spomenutom Lambert-Beerovom zakonu (2.2.). Vrijednosti  $\epsilon$  određene su iz nagiba kalibracijskih krivulja u vodenim otopinama. Pri nižim udjelima etanola postojalo je postupno povećanje  $\epsilon$  kako se udio etanola povećavao. Međutim pri volumnim udjelima etanola iznad 50% dolazi do naglog povećanja  $\epsilon$  vrijednosti, što i dalje ne objašnjava koji je uzrok povećanja pika. Daljnje istraživanje je provedeno tako da je napravljen grafički prikaz relativnog povećanja intenziteta pika na  $\lambda = 429$  nm i na  $\lambda = 357$  nm kao funkcije koncentracije etanola te je izračunata površina ispod pika integriranjem (slika 9).

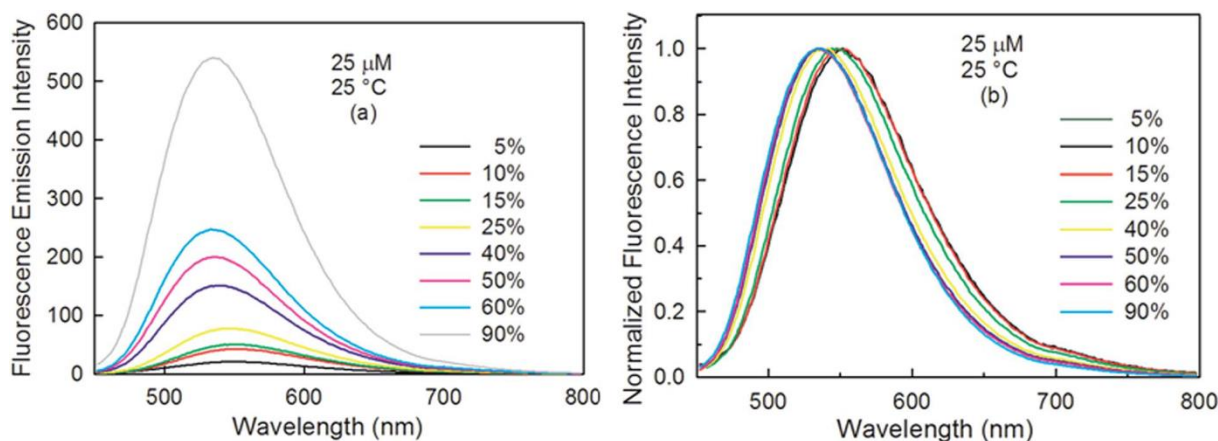


**Slika 9.** Promjena molarnog apsorpcijskog koeficijenta ( $\epsilon$ ) i apsorbancija pri 429 nm kurkumina pri različitim volumnim udjelima etanola (a); Relativni postoci diketo i enolnog oblika kurkumina (25  $\mu$ M) s povećanjem volumnog udjela etanola (b) [11].

Pri volumnom udjelu etanola od 50% vidi se oštar pad postotnog područja koji pripada diketo piketu (357 nm) te je snižena vrijednost ostala konstantnom s daljnim povećanjem etanola. Slično tomu, udio enolnog oblika prvo je rastao te iznad 50% volumnog udjela etanola ostao konstantnim, indicirajući da nema znatne promjene u ravnoteži između keto i enolnog oblika pri visokim udjelima etanola. Rezultati upućuju da je konverzija iz keto u enolni oblik dominantan faktor te da on stoji iza povećanja apsorbancije na  $\lambda = 429$  nm u otopinama s volumnim udjelom etanola do 50%. U otopinama s udjelima etanola više od 50%, povećanje apsorbancije na  $\lambda = 429$  nm izravno je rezultat povećanja molarnog apsorpcijskog koeficijenta ( $\epsilon$ ) [11].

Značajnu uloga u konverziji iz enolnog u keto oblik ima anomalijsko ponašanje mješavine etanol-voda. Takve binarne mješavine pokazuju devijaciju od idealnog ponašanja pri niskim i srednjim volumnim udjelima etanola zahvaljujući pojavi mikroheterogenosti u sistemu. Prisutnost klastera etanola pri višim volumnim udjelima povećava koncentraciju etanola oko kurkumina i time favorizira enolni oblik, koji je stabilniji u nepolarnim otapalima. Pri nižim udjelima etanola, prisutnost vodenih klastera remeti intramolekulske vodikove veze u enolnoj formi i ravnoteža je pomaknuta prema diketo obliku [3].

Utjecaj volumnog udjela etanola na fotofizikalna svojstva kurkumina također je proučavan pobuđivanjem svjetlošću valne duljine  $\lambda = 429$  nm te mjerenjem fluorescencije u različitim binarnim mješavinama etanola i pufera. Dobiveni emisijski spektri prikazani su na slici 10.



**Slika 10.** Emisijski spektar kurkumina ( $25 \mu\text{M}$ ) u otopinama različitih volumnih udjela etanola, pri pH 7,0 (lijevo). Normalizirani emisijski spektar kurkumina ( $25 \mu\text{M}$ ) u otopinama različitih volumnih udjela etanola (desno) [11].

Uočen je oštar pik s maksimumom fluorescencije na  $\lambda = 548 \text{ nm}$  u 90%-tnom etanolu, čiji je intenzitet postupno padao povećanjem vodenog (puferskog) udjela. Pik na  $\lambda = 548 \text{ nm}$  pripisan je enolnom obliku kurkumina. Povećanjem udjela polarne komponente (pufera), uočava se batokromni pomak. Pad intenziteta fluorescencije može imati dva uzroka:

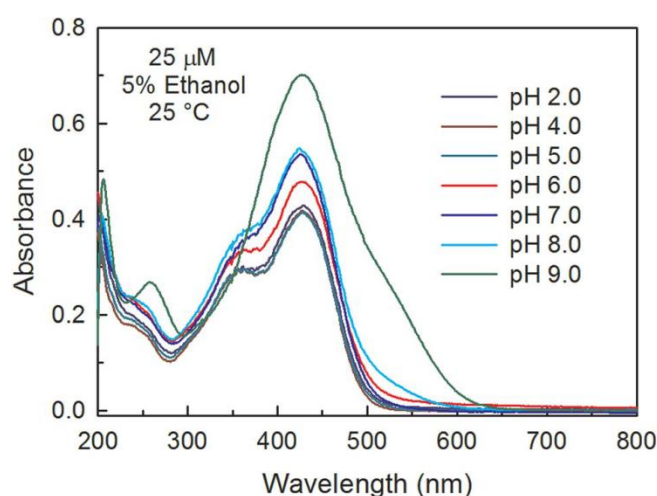
1. Pad  $\epsilon$  vrijednosti kurkumina u otopini sa visokim udjelom vode
2. Gašenje fluorescencije zbog prisutnosti vode

Za razumijevanje razloga snižavanja intenziteta fluorescencije na  $\lambda = 548 \text{ nm}$ , uspoređena je relativna promjena područja ispod pika i relativna promjena u  $\epsilon$  vrijednostima kurkumina u različitim binarnim mješavinama. Povećanje područja ispod pika na  $\lambda = 548 \text{ nm}$  bilo je mnogo veće, nego povećanje  $\epsilon$  vrijednosti s porastom volumnog udjela etanola, što upućuje da su za gašenje fluorescencije zaslužni i neki neradijativni procesi, uz pad  $\epsilon$  vrijednosti s povećanjem udjela vode.

### 2.3.5.2. Utjecaj pH

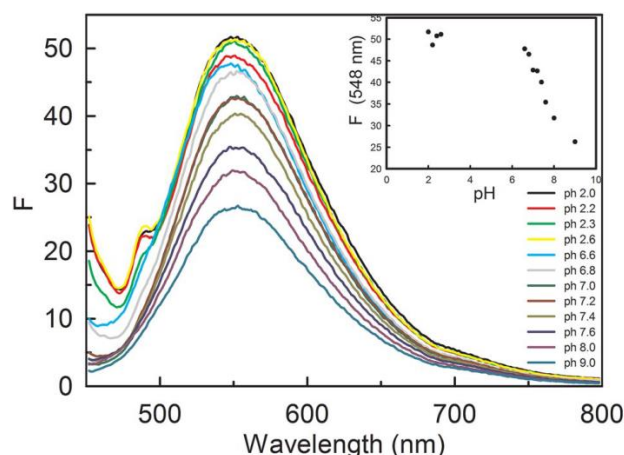
Bhatia i suradnici (2016) ispitali su utjecaj pH na konformacijsku ravnotežu pri niskim koncentracijama kurkumina. Pufери su pripremljeni mješanjem 50 mM fosforne kiseline ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) i 50 mM kalijeva dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) u određenim omjerima za dobivanje željene pH vrijednosti rangirajući od 2,0 do 3,0. Za dobivanje vrijednosti pH od 6,0 do 9,0 pomiješane su određene količine 50 mM kalijeva dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) i 50 mM kalijeva

hidrogenfosfata ( $K_2HPO_4$ ). Udio etanola u otapalu bio je 5%. Prema spektru na slici 11 pri nižim pH vrijednostima (pH 2,0), kurkumin pokazuje dvije svojstvene vrpce: oštar pik enolnog oblika na  $\lambda = 429$  nm i slabiji pik diketo oblika na  $\lambda = 357$  nm. U neutralnim uvjetima (pH 7,0) dolazi do pojačanja intenziteta enolnog pika, dok se u bazičnim uvjetima (pH 9,0) spektar značajno mijenja – pik na  $\lambda = 357$  potpuno je nestao. To upućuje da je keto oblik u bazičnim uvjetima nefavoriziran. Porast intenziteta na  $\lambda = 429$  nm s povećanjem pH uzrokovan je pomakom ravnoteže oblicima s većim  $\epsilon$ , što je svojstvo anionskih oblika. Pri višim pH pojavljuju se novi pikovi: na  $\lambda = 509$  nm, koji se pripisuje nastanku dianiona te pik na  $\lambda = 260$  nm, koji je pripisan produktima razgradnje.



**Slika 11.** Apsorpcijski spektar kurkumina pri različitim pH vrijednostima u otopinama etanola (5%), pri temperaturi 25°C [11].

Proučen je i emisijski spektar pri različitim pH vrijednostima, pobudom svjetlosti valne duljine  $\lambda = 429 \text{ nm}$ , kojom se pobuđuju samo enolni i enolatni oblik kurkumina (slika 12).



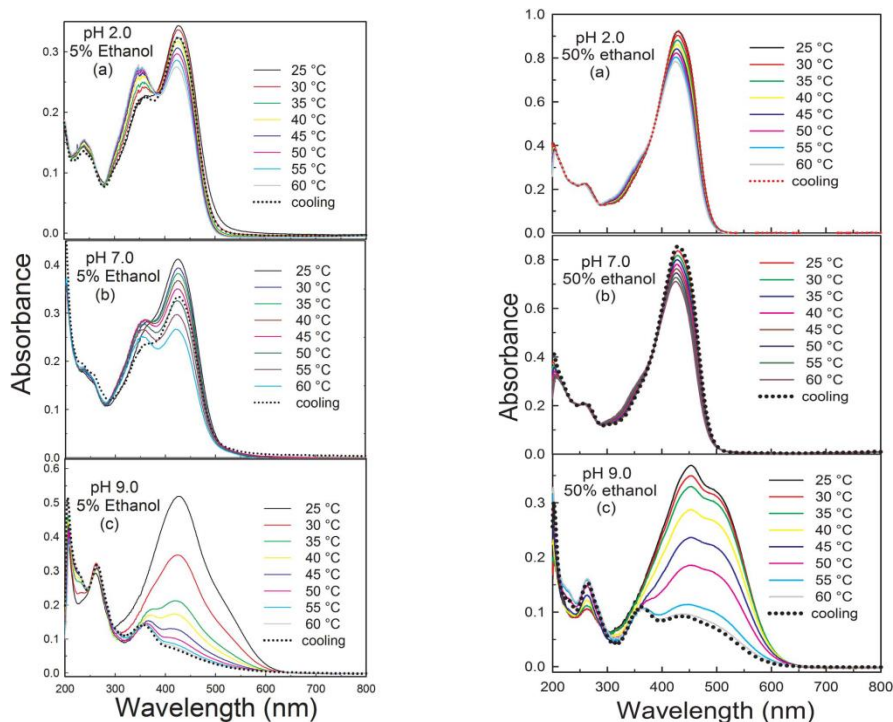
**Slika 12.** Emisijski spektar kurkumina pri različitim pH vrijednostima u otopinama etanola (5%), pobudna valna duljina:  $\lambda = 429 \text{ nm}$  [11].

U kiselim uvjetima (pH 2,0) uočen je široki pik na  $\lambda = 548 \text{ nm}$ , uz blagi pik na  $\lambda = 488 \text{ nm}$ , koji je nestajao s povećanjem pH. Povećanjem pH također je uočen pad fluorescencije na  $\lambda = 548 \text{ nm}$  (enolni oblik). Taj je trend suprotan onom uočenom na apsorpcijskom spektru. Kako deprotonirani oblici (dianioni) imaju veće  $\epsilon$  vrijednosti od neutralnog enolnog oblika, povećanjem njihove koncentracije (porastom pH) dolazi do gašenja fluorescencije. Pik na  $\lambda = 488 \text{ nm}$  pripisan je stvaranju agregata kurkumina, koji su slabije topljivi pri nižim pH [11].

### 2.3.5.3. Utjecaj temperature

Bhatia i suradnici (2016) ispitivali su utjecaj temperature na konformacijsku ravnotežu kurkumina pri niskim koncentracijama. Koristili su tri različita pH uvjeta pri istraživanju utjecaja, snimajući apsorpcijsko i emisijsko ponašanje u binarnim mješavinama etanola i vode. Termički testovi provedeni su variranjem temperature od  $25^\circ\text{C}$  do  $60^\circ\text{C}$ , s korakom od  $5^\circ\text{C}$ , uz termostatiranje uzorka 10 minuta na svakoj temperaturi prije mjerenja. Dobiveni apsorpcijski i emisijski spektri prikazani su na slici 13.





**Slika 13.** ApSORPCIJSKI spektri kurkumina pri različitim temperaturama u otopini etanola (5%, lijevo i 50%, desno), u kiselim (a), neutralnim (b) i bazičnim (c) uvjetima (lijevo) [11].

ApSORPCIJSKI spektar u otopini etanola 5% (slika 13, lijevo) pokazuje da u kiselim uvjetima, pri temperaturi od 25°C, uočljiv je prominentan pik na  $\lambda = 429$  nm i blagi pik na  $\lambda = 357$  nm. Porastom temperature intenzitet pika na  $\lambda = 429$  nm postupno se snizuje, dok se pik na  $\lambda = 357$  nm povećava, što je znak da dolazi do pomaka ravnoteže prema keto obliku pri višim temperaturama. Postojanje izobestičke točke na  $\lambda = 382$  nm sugerira da su ta dva oblika u ravnoteži. Porastom temperature također se uočava hipsokromni pomak od 10 nm (od 357 nm do 347 nm), kao rezultat slabijih intermolekularnih interakcija između otopine i pobuđenog stanja kurkumina.

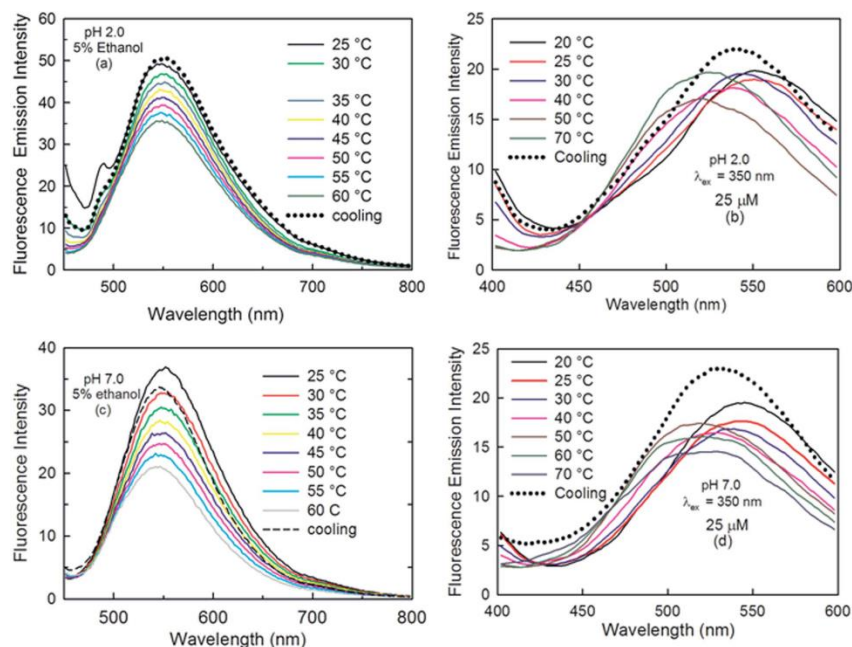
Termalni profil dobiven u neutralnim uvjetima (pH 7,0) sličan je onom u kiselim uvjetima, s prominentnim pikom na  $\lambda = 429$  nm i slabim pikom na  $\lambda = 357$  nm. Porastom temperature, intenzitet pika na  $\lambda = 429$  nm pada, dok onaj na  $\lambda = 357$  nm prvo raste, potom pri temperaturi od 55 °C počinje padati. Pad intenziteta oba pika uzrokovan je razgradnjom, koja se može pojavljivati već u neutralnom području pH. Općenito u kiselim i neutralnim uvjetima porast temperature pomiče izomernu ravnotežu prema diketo obliku, zahvaljujući kidanju intramolekularnih vodikovih veza *cis*-enolnih oblika. Proces je reverzibilan, a tomu je dokaz da se spekter vraća u prvobitni oblik ako se otopina ohladi.



U bazičnim uvjetima (pH 9,0) termalni profil pokazuje nastanak dodatnog pika na  $\lambda = 260$  nm, uz široki pik na  $\lambda = 429$  nm i slabi pik na  $\lambda = 366$  nm. Intenzitet pika na  $\lambda = 429$  nm drastično pada povećanjem temperature i postaje zanemariv pri  $60^\circ\text{C}$ . Pik na  $\lambda = 260$  nm je izražen pri svim temperaturama te pripada produktima razgradnje. Dokaz tomu je da je proces ireverzibilan, odnosno hlađenjem sa  $60^\circ\text{C}$  na  $25^\circ\text{C}$ , spektar se ne vraća u prvobitni oblik.

Proučen je i apsorpcijski spektar kurkumina pri različitim temperaturama za 50%-tnu otopinu etanola (slika 13, desno). Termalni profil je pri kiselim i neutralnim uvjetima ostao sličan. Mali pad intenziteta na  $\lambda = 429$  nm, pri višim temperaturama sugerira da se zbog većeg udjela etanola intramolekularne vodikove veze kurkumina nenarušene čak i pri višim temperaturama. Međutim u bazičnim uvjetima (pH 9,0) dolazi do većih promjena s povećanjem temperature, čime se zaključuje da je ponašanje kurkumina pri različitim temperaturama uvelike definirano otapalom koje ga okružuje.

Za bolji uvid u konformacijsku ravnotežu molekula kurkumina u pobuđenom stanju, napravljen je spektar fluorescencije, tj. emisije. Spektri su dobiveni pobuđivanjem kurkumina svjetlošću dvama valnim duljinama:  $\lambda = 429$  nm (apsorpcijski maksimum enolnog ili anionskog oblika) i  $\lambda = 350$  nm (apsorpcijski maksimum keto oblika), pri različitim temperaturama i različitim pH (2,0 i 7,0) te su prikazani na slici 14.

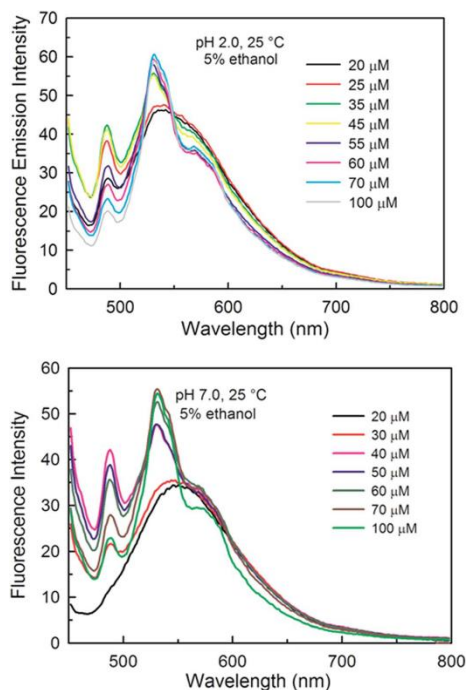


**Slika 13.** Utjecaj temperature na emisijski spektar kurkumina pri pH 2,0 (a i b) i pH 7,0 (c i d) u 5%-tnim otopinama etanola. Valna duljina pobude lijevog stupca  $\lambda = 429$  nm, desnog  $\lambda = 350$  nm [11].

U kiselim uvjetima, pobuđivanjem kurkumina svjetlošću valne duljine  $\lambda = 429$  nm, uočen je blagi pik na  $\lambda = 488$  nm, koji je potpuno nestao povišavanjem temperature. Hlađenjem na  $25^{\circ}\text{C}$  se blagi pik ponovno pojavio, što ukazuje na to da pik pripada nekoj vrsti agregata kurkumina. Uz njega uočen je izraženi pik na  $\lambda = 548$  nm, čiji se intenzitet porastom temperature smanjivao. Pobuđivanjem kurkumina svjetlošću valne duljine  $\lambda = 350$  nm, pri nižoj temperaturi također se javlja pik na  $\lambda = 548$  nm. Temperatura ne pokazuje značajan utjecaj na intenzitet fluorescencije, ali se povišenjem temperature javlja hipsokromni pomak (*blue shift*), na valnu duljinu oko 490 nm. Kako je već spomenuto, pik na  $\lambda = 548$  nm pripisuje se enolnom obliku, dok se pik na  $\lambda = 490$  nm pripisuje diketo obliku te je pri višim temperaturama favoriziran diketo oblik. Hlađenjem na  $25^{\circ}\text{C}$ , pik se vraća na položaj  $\lambda = 548$  nm, odnosno proces je reverzibilan. U neutralnim uvjetima (pH 7,0), pobuđivanjem kurkumina svjetlošću valne duljine 429 nm, intenzitet fluorescencijskog (emisijijskog) maksimuma na  $\lambda = 548$  nm smanjuje se porastom temperature. Drugi se, blagi pik, ne pojavljuje, što ukazuje na nemogućnost stvaranja agregata pri pH 7,0 i koncentraciji kurkumina  $25 \mu\text{M}$ . Pobuđivanjem svjetlošću valne duljine  $\lambda = 350$  nm, u istim uvjetima, također se javlja pik oko  $\lambda = 548$  nm, čiji intenzitet se povišenjem temperature ne mijenja, no također se javlja hipsokromni pomak (*blue shift*) [11].

#### **2.3.5.4. Utjecaj koncentracije**

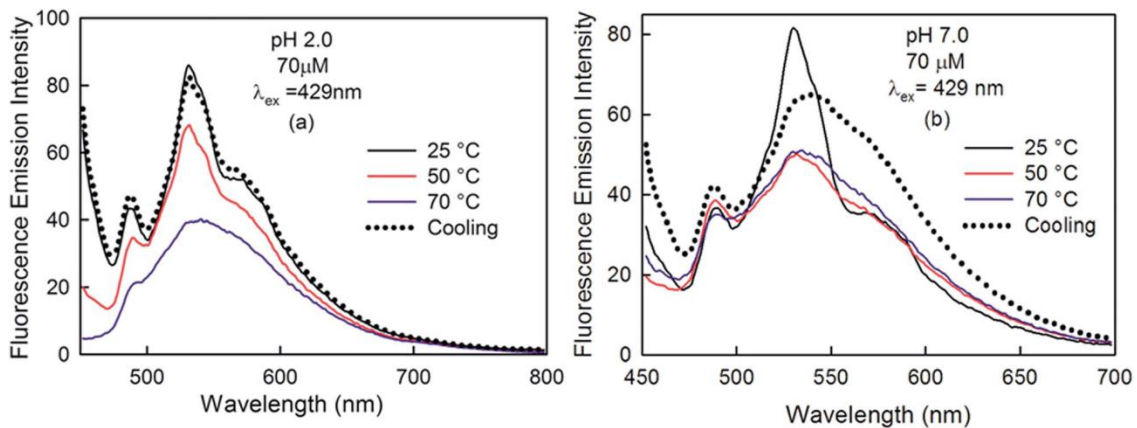
Kako bi se detaljnije proučila pojava agregacije molekula kurkumina, snimljen je utjecaj koncentracije kurkumina, na fluorescencijski (emisijijski) spektar, pri različitim uvjetima (pH 2,0 i 7,0), u 5%-tnoj otopini etanola. Spektri su dobiveni pobuđivanjem svjetlošću valne duljine  $\lambda = 429$  nm te su prikazani na slici 14.



**Slika 14.** Utjecaj koncentracije na emisijski spektar kurkumina pri pH 2,0 (gore) i pH 7,0 (dolje), u 5%-tnim otopinama etanola, pri 25°C [11].

U kiselim i neutralnim uvjetima (pH 2,0 i 7,0) povećanjem koncentracije kurkumina uočene su znatne promjene emisijskog spektra. Intenzitet pika na  $\lambda = 488$  nm prvobitno je rastao povećanjem koncentracije, potom padao pri koncentracijama većim od 35  $\mu\text{M}$ . Istodobno se pri višim koncentracijama javljao pik na  $\lambda = 590$ . Promjene u emisijskom spektru ukazuju na nastanak jedne vrste agregata, no s daljnim povećanjem koncentracije egzistiraju nove vrste agregata kurkumina, s drugim emisijskim maksimumom.

Za bolje razumijevanje promjena uočениh u emisijskom spektru pri različitim koncentracijama, snimljen je utjecaj temperature na fluorescencijski (emisijski) spektar otopine s većom koncentracijom kurkumina (70  $\mu\text{M}$ ), u kiselim (pH 2,0) i neutralnim uvjetima (pH 7,0) te je prikazan na slici 15.



**Slika 15.** Utjecaj temperature na emisijski spektar kurkumina ( $70 \mu\text{M}$ ) pri pH 2,0 (lijevo) i pH 7,0 (desno) u 5%-tnim otopinama etanola; pobudna valna duljina  $\lambda = 429 \text{ nm}$  [11].

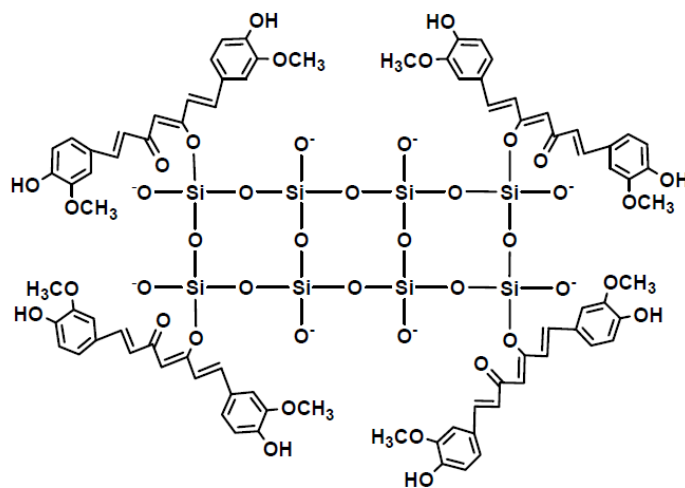
U kiselim i neutralnim uvjetima (pH 2,0 i 7,0) pikovi na  $\lambda = 488 \text{ nm}$  i  $\lambda = 590 \text{ nm}$  nestali su pri visokoj temperaturi. Hlađenjem na  $25^\circ\text{C}$ , spektar se vratio u prvobitni oblik, što ukazuje na reverzibilnost fenomena prilikom hlađenja i zagrijavanja. Pretpostavlja se da kurkumin može tvoriti više agregiranih vrsta pri nižoj temperaturi, no zagrijavanjem agregati se odvajaju, čineći otopinu homogenijom [11].

### 2.3.6. Imobilizacija kurkumina

Slaba topljivost kurkumina u vodi rezultira niskom biodostupnošću u stanicama, što mu onemogućava terapeutsko djelovanje. Biodostupnost obuhvaća brzinu apsorpcije i količinu aktivne tvari, odnosno lijeka koji doprije u sistemska cirkulaciju te se zatim izlučuje kroz urin. Kako bi se taj problem ublažio, znanstvenici nastoje razviti nove formulacije koje će kurkuminu omogućiti kvalitetniji ulazak u organizam [12]. One se baziraju na biokompatibilnim organskim komponentama kao što su liposomi, polietilen glikoli, biopolimeri, celuloza, hidrogelovi, ciklodekstrini, kukurbutiril i slično. Svaki od tih sustava pokazuje olakšano otapanje kurkumina u vodi i povećanu biodostupnost. Glavna metoda otapanja u takvim sustavima je zarobljavanje kurkumina unutar hidrofobnih džepovima, pomoću hidrofobnih interakcija. Fluorescencija kurkumina otopljenog u takvom sustavu je pojačana, što omogućava praćenje efikasnosti njihova vezanja. Liposomatski kurkumin se pokazao najboljim sredstvom za povećanje biodostupnosti kurkumina u stanicama te su razvijeni različiti oblici primjene liposomatskih formulacija. Vodene otopine kurkumina mogu se pripremiti i dodatkom površinski aktivnih tvari, surfaktanta. Micelarne otopine dobivene

dodatkom surfaktanta najpogodnije su za pripremu vrlo koncentriranih otopina kurkumina u vodi. Međutim surfaktanti mogu interferirati prilikom istraživanja u biološkim sustavima, zbog čega im je primjena ograničena.

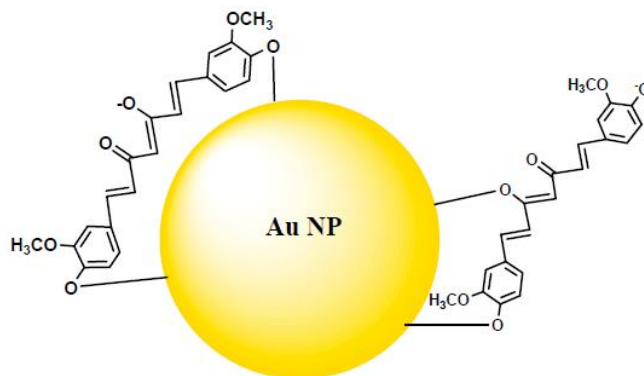
Osim korištenja organskih komponenti, biodostupnost i anti-tumorsko djelovanje kurkumina može se unaprijediti anorganskim nanoformulacijama. Riječ je o vezivanju molekula kurkumina na metale i metalne okside. Takvim se sustavima lako upravlja kako bi se poboljšao unos, aktivitet i specifičnost. Najpoznatiji nanosistem za povećanje biodostupnosti lijekova netopljivih u vodi su biokompatibilne srednjeporozne silikonske nanočestice. Zahvaljujući njihovoj uređenoj nanoporoznoj strukturi, velikoj specifičnoj površini, porama velikih volumena i hidroksilnim grupama na površini, lako se funkcionaliziraju te su često korištene u medicini. Kurkumin se na njih veže kovalentno na silicij-kisik veze preko diketo mosta (slika 16). Fluorescencija kurkumina vezanog na silikonske nanočestice je pojačana pa ima potencijala za primjenu u slikovnom prikazu organela i biomolekula. Silikonske nanočestice funkcionalizirane ciklodekstrinom mogu biti foto-termalno kontrolirane, odnosno izlaganjem svjetlu kurkumin izlazi iz sustava u okoliš.



**Slika 16.** Kurkumin vezan na srednjeporozne silikonske nanočestice [2].

Osim spomenutih, u posljednje vrijeme razvijene su kurkuminske formulacije na nanočesticama zlata, koje se koriste u biologiji i medicini, za unos lijekova, dijagnoze i liječenje raka. Postoji više metoda pripreme. Jedna je miješanje bazične otopine kurkumina sa soli zlata, pri čemu se kurkumin ponaša kao reducens. Fenolna i enolna hidroksilna skupina doniraju proton, reducirajući  $\text{Au}^{3+}$  ione te su dobiveni konjugati hemokompatibilni i netoksični (slika

17). Druga metoda je miješanje soli zlata s kurkuminom pri povišenoj temperaturi, čime se dobiju nanočestice s povećanim antioksidativnim djelovanjem. Tako dobivene biokompatibilne nanočestice pokazivale su veću citotoksičnost u stanicama raka od čistog kurkumina [2].



**Slika 17.** Vezanje kurkumina na nanočestice zlata [2].

## 2.4. Primjena kurkumina u sensorima

### 2.4.1. Fluorescencijski senzor za detekciju $\text{Cu}^{2+}$ i $\text{S}^{2-}$

Detekcija metalnih iona i aniona važna je zbog njihovih uloga u biološkim i kemijskim procesima. Fluorescencijski senzori od posebnog su interesa zbog jednostavnosti i visoke osjetljivosti. Organske fluorescirajuće nanočestice mogu se koristiti u sensorima zbog sposobnosti selektivnog vezanja s analitom. Njihova preparacija je fleksibilna, lako su topljive u vodi te su im pojačana optička svojstva. Reprecipitacija je jedna od metoda pripreve organskih nanočestica, u kojoj nanočestice nastanu zbog međumolekulskih interakcija ili se zarobe u matrici. Metoda je jednostavna, brza, jeftina i ekološki prihvatljiva.

Ioni bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ) imaju bitnu ulogu u fiziološkim procesima u živim organizmima te su također veliki zagađivači okoliša. Povezuje ih se sa Parkinsonovom i Wilsonovom bolešću. Dopuštena količina u vodi za piće prema World Health Organization (WHO) iznosi 2 ppm. Ioni sulfida ( $\text{S}^{2-}$ ) koriste se u industriji za proizvodnju sumpora i sumporne kiseline. Također postoje u biosustavu, zbog mikrobne redukcije sulfata anaerobnim bakterijama ili iz aminokiselina koje sadrže sumpor (cistein) u proteinima životinjskog podrijetla. Sulfidi su također toksični

onečišćivači te izlaganjem većim količinama može doći do gušenja i gubitka svijesti. Kationi bakra i sulfidni anioni snažno se privlače u vodenom mediju te se korištenjem pogodnog indikatora, kao što su nanočestice kurkumina, istodobno određuju količine obje vrste, zbog njihove kompeticijske interakcije s indikatorom. Takav sustav s indikatorom koji detektira i katione i anione jeftiniji je od prije korištenih metoda za detekciju obje vrste iona. Razvoj fluorescirajućih senzora u vodenom mediju važna je zbog primjene u realnim uzorcima [13].

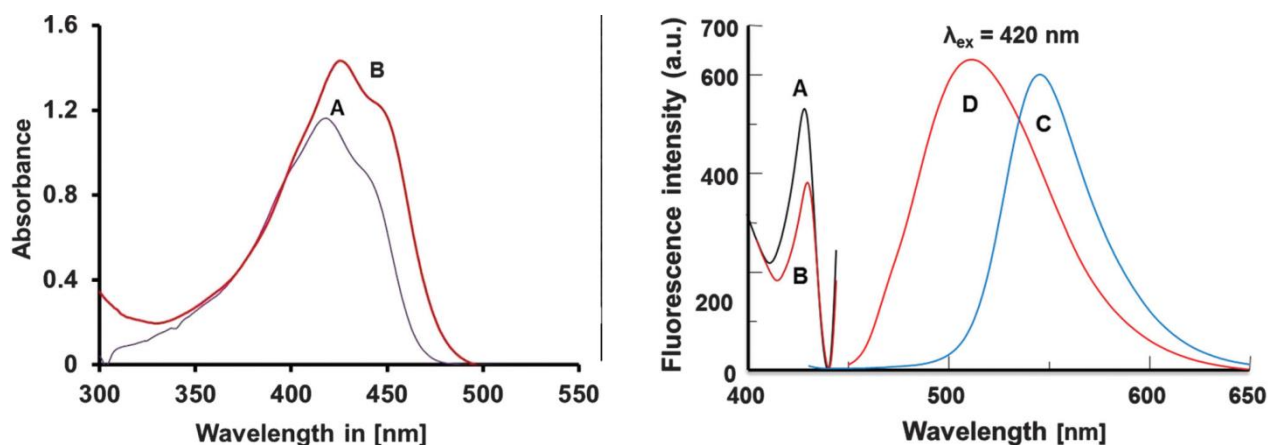
#### **2.4.1.1. Priprema i karakterizacija nanočestica**

Nanočestice kurkumina pripremljene su reprecipitacijom. Prvo je priređena organska faza: tako da je otopljeno 125 mg kurkumina u 25 ml diklormetana. Vodena faza priređena je dodatkom 10 mL 5%-tnog polisorbata 80 (emulgator) u 90 ml vrijuće vode. 2 ml organske faze nakapano je u vodenu fazu. Otopina je miješana magnetskom miješalicom 30 minuta pri sobnoj temperaturi do žutog obojenja, zatim sonicirana 20 minuta. Kako bi se uklonilo organsko otapalo, mješavina je isparena rotirajućim isparivačem. Dobivena suspenzija nanočestica čuvana je u tamnoj boci.

Veličina čestica određena je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS metoda) te je dobivena distribucija veličina. Distribucija veličina bila je vrlo uska, s prosječnim promjerom nanočestica od 35 nm. Veličina čestica osušenog tankog sloja suspenzije također je promatrana elektromagnetskim mikroskopom. Na slici se uočava sferičan, uglavnom jednoličan oblik čestica. Procijenjeni prosječni promjer je 150 nm. Povećanje veličine u odnosu na srednju veličinu dobivenu DLS metodom uzrokovano je aglomeracijom čestica prilikom sušenja suspenzije [13].

### 2.4.1.2. Fotofizikalna svojstva nanočestica kurkumina

Apsorpcijski spektar nanočestica kurkumina (slika 18, lijevo) pokazuje maksimum na  $\lambda_{\max} = 423$  nm, što se očituje kao *red shift* (batokromni pomak) u odnosu na maksimum apsorpcije otopine kurkumina u diklormetanu, koji je iznosio 414 nm.



**Slika 18.** UV-Vis apsorpcijski spektar homogene otopine kurkumina u diklormetanu (A) i nanočestica kurkumina u vodenoj disperziji (B) (lijevo); ekscitacijski (A) i fluorescencijski spektar (D) suspenzije nanočestica kurkumina, ekscitacijski (B) i fluorescencijski spektar (C) otopine kurkumina u diklormetanu (desno) [13].

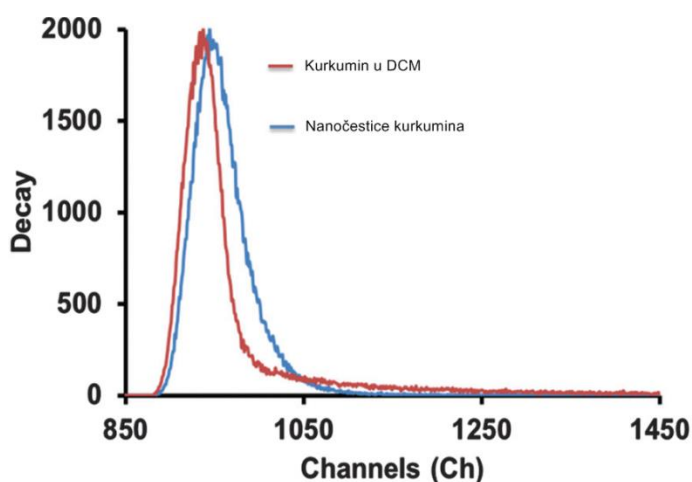
Fluorescencijski (emisijski) spektar nanočestica (slika 18, desno) pokazuje vrpcu s pikom na  $\lambda = 507$  nm, dok vrpca otopine kurkumina u diklormetanu obuhvaća spektralno područje od 500 do 600 nm, s maksimumom na  $\lambda = 550$  nm. Hipsokromni pomak (*blue shift*) u spektru nanočestica uzrokovan je dipol-dipol interakcijama monomera u nanočesticama, koje uzrokuju cijepanje molekulskih energijskih razina. Radijativni raspad (fluorescencija) pobuđenih agregata nanočestica kurkumina odvija se preferirano od viših singletnih stanja ( $n \rightarrow p^*$ ), nego od nižih ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ), no međumolekulske interakcije cijepaju energijske razine te je  $n \rightarrow n^*$  prijelaz olakšan.

Valna duljina pobude nanočestica kurkumina u suspenziji i kurkumina otopljenog u diklormetanu je identična, s maksimumom na  $\lambda = 420$  nm. Ona se podudara s maksimumom apsorpcije od  $\lambda_{\max} = 414$  nm otopine (slika 18, lijevo) [13].



### 2.4.1.3. Trajanje fluorescencije nanočestica

Profil fluorescencijskog raspada kurkumina u diklormetanu (snimljen pri  $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$ ) i nanočestica kurkumina (snimljen pri  $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em}} = 507 \text{ nm}$ ) prikazan je na slici 19. Trajanje fluorescencije nanočestica se pokazalo duljim (9,01 ns) od trajanja fluorescencije kurkumina u diklormetanu (7,1 ns). Dulje vrijeme fluorescencije ukazuje na to da se agregacija kurkumina u nanostrukture odvija spontano. Agregacija u nanočestice ograničava rotaciju i vibraciju molekula, što potiče dulju emisiju. Pobuda paralelno naslaganih dipola stabilizira više energetske razine, a ne niže energetske razine jer je vrijeme fluorescencije nanočestica dulje od monomera otopljenih u diklormetanu. Ta se pojava naziva inducirano pojačavanje emisije agregata (*aggregation induced enhanced emission, AIEE*) [13].



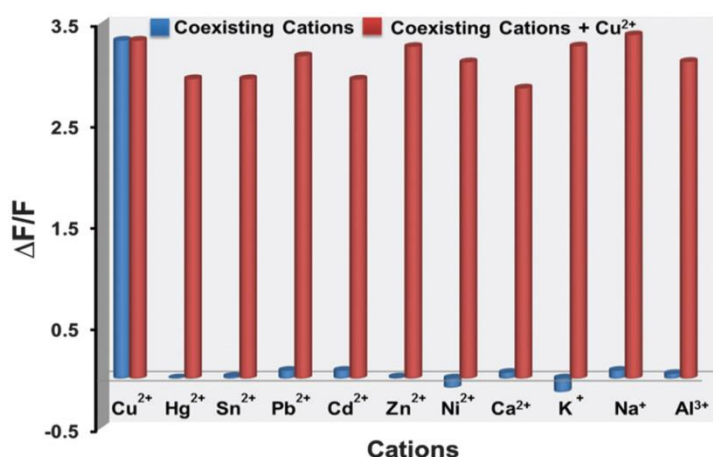
**Slika 19.** Spektar fluorescencijskog raspada suspenzije nanočestica kurkumina (plavo) i otopine kurkumina u diklormetanu (crveno) [13].

### 2.4.1.4. Selektivnost na $\text{Cu}^{2+}$

Nanočestice kurkumina vežu se s metalnim ionima zahvaljujući mjestima prepoznavanja, kao što su karbonilna i hidroksilna skupina. Fluorescencijski spektri dobiveni su pobuđivanjem svjetlošću valne duljine  $\lambda = 420 \text{ nm}$  u acetatnom puferu (pH = 4). Dobiven je oštri pik na  $\lambda = 507 \text{ nm}$ . Kompleksiranje kurkuminskih nanočestica i metalnih iona ispitivano je promjenom u fluorescencijskom spektru, dodatkom vodenih otopina metalnih soli. Fluorescencijski spektar

snimljen je uz prisutnost raznih metalnih iona ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$ ), koncentracije  $62,5 \text{ ng ml}^{-1}$ .

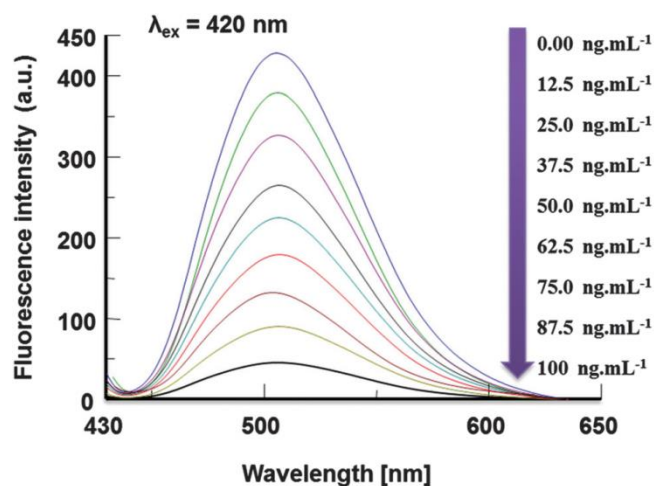
Promjena intenziteta fluorescencije prikazana je dijagramom na slici 20, dobivenim prema formuli  $\Delta F/F$ , gdje je  $\Delta F = F_0 - F$ .  $F_0$  je intenzitet fluorescencije nanočestica bez metalnih iona, a  $F$  uz prisutnost metalnih iona. Prisutnost  $\text{Cu}^{2+}$  uzrokovala je snažno gašenje fluorescencije (plavi stupac), dok drugi kationi nisu pokazali značajan utjecaj. Selektivnost na  $\text{Cu}^{2+}$  ione očituje se u tome da je promjena fluorescencije kod drugih metalnih iona izražena jedino uz prisutnost bakrenih iona. Drugim riječima, prilikom detekcije  $\text{Cu}^{2+}$  iona, drugi metalni ioni nisu interferirali (crveni stupac) [13].



**Slika 20.** Intenzitet fluorescencije ( $\Delta F/F$ ) nanočestica kurkumina u prisutstvu raznih iona [13].

#### 2.4.1.5. Utjecaj koncentracije $\text{Cu}^{2+}$ na fluorescenciju

Kako bi se ispitala mogućnost korištenja nanočestica kurkumina za kvantitativno određivanje  $\text{Cu}^{2+}$  iona, dodavane su rastuće količine iona u vodenu suspenziju nanočestica ( $\text{pH} = 4$ ) te je mjerena fluorescencija. Spektar prikazan na slici 21, snimljen je za koncentracije od  $12,5 - 100 \text{ ng ml}^{-1}$ , pobudnom valnom duljinom od  $420 \text{ nm}$  pri sobnoj temperaturi. Pokazalo se da je intenzitet fluorescencije pri  $\lambda_{\text{em}} = 507 \text{ nm}$  padao s porastom koncentracije iona. Efikasnost gašenja fluorescencije izračunata je jednadžbom  $1 - F/F_0$ . Najveće gašenje od  $86,54\%$  dobiveno je pri koncentraciji  $\text{Cu}^{2+} 100 \text{ ng ml}^{-1}$ . Senzor za određivanje bakra zbog efekta gašenja nazvan je „Turn-Off“ senzor [13].



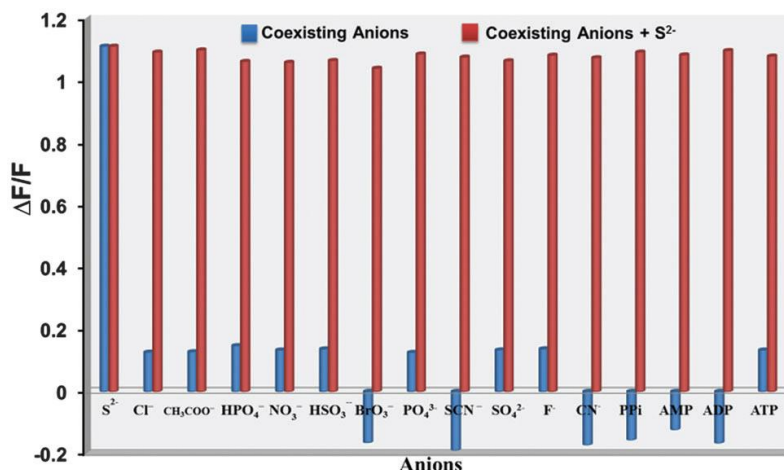
**Slika 21.** Fluorescencijski spektar nanočestica kurkumina za različite koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$  [13].

#### 2.4.1.6. Mehanizam kompleksiranja

Slobodni par elektrona liganda na karbonilnoj ili hidroksilnoj skupini čini kurkumin snažnim nukleofilom.  $\text{Cu}^{2+}$  ioni imaju elektronsku konfiguraciju  $d^9$  te sadrže više pozitivnog naboja zbog manje elektronegativnosti.  $\text{Cu}^{2+}$  veže se s nanočesticama kurkumina, odnosno njenim slobodnim elektronim tvoreći kompleks  $\text{Cu}-(\text{nanočestica})_2^{2+}$ . Sklonost vezanja  $\text{Cu}^{2+}$ s kurkuminom rezultat je veličine i naboja iona. Kompleksiranje je također potvrđeno mjerenjem veličine čestica. Srednja veličina nanočestica bila je 35 nm, a dodatkom 50 i 100  $\text{ng mL}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  narasla je na 131, odnosno 187,1 nm [13].

#### 2.4.1.7. Selektivnost kompleksa na $\text{S}^{2-}$ ione

Sulfidni ioni ( $\text{S}^{2-}$ ) snažno se vežu za  $\text{Cu}^{2+}$  ione tvoreći stabilan CuS, čime se otpuštaju ligandi - nanočestice kurkumina. Za takav mehanizam isproban je tzv. „Turn On“ senzor na raznim anionima ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{BRO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{S}^{2-}$ ) u koncentracijama 7,5  $\text{ng mL}^{-1}$ . Otopine aniona, u prisutnosti i odsudnosti  $\text{S}^{2-}$  iona, pobuđene su valnom duljinom od 420 nm. Prema dobivenom fluorescencijskom spektru uočeno je da prisutnost  $\text{S}^{2-}$  iona pojačava fluorescenciju, dok drugi reagiraju suprotno, gaseći fluorescenciju.

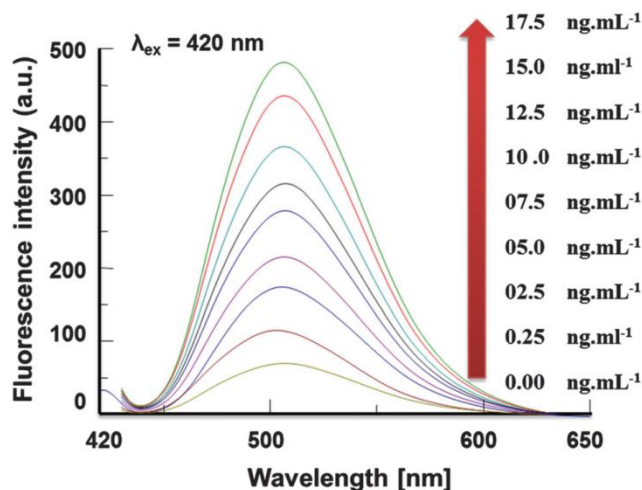


**Slika 22.** Intenzitet fluorescencije ( $\Delta F/F$ ) kompleksa u prisutstvu raznih aniona [13].

Dijagram prikazan na slici 22, pokazuje promjenu intenziteta fluorescencije  $\Delta F/F$ , gdje je  $\Delta F = F_0 - F$ .  $F_0$  je intenzitet fluorescencije kompleksa u odsutnosti aniona, a  $F$  uz prisutnost aniona. Porast intenziteta uočen je jedino za  $S^{2-}$  (plavi stupac), dok drugi anioni smanjuju intenzitet fluorescencije kompleksa. Selektivnost za  $S^{2-}$  anione očituje se u tome da oni pojačavaju fluorescenciju bez interferencija drugih aniona (crveni stupac) [13].

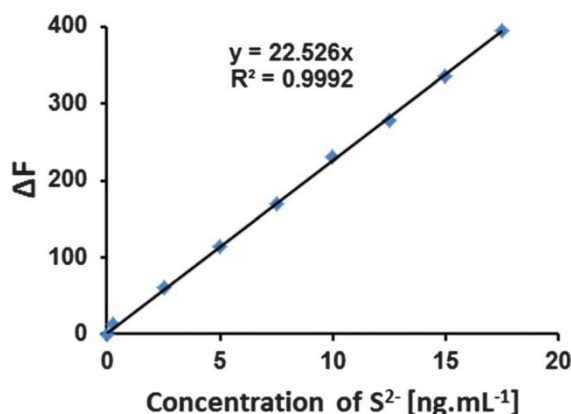
#### 2.4.1.8. Utjecaj koncentracije $S^{2-}$ na fluorescenciju

Dodavana je rastuća količina ( $0,25 - 17,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) otopine  $S^{2-}$  iona u mješavinu nanočestica kurkumina i  $\text{Cu}^{2+}$  iona ( $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Prema dobivenom fluorescencijskom spektru (slika 23), snimljenom pobudnom valnom duljinom od  $420 \text{ nm}$  pri sobnoj temperaturi, uočeno je da intenzitet fluorescencije nanočestica postupno raste s porastom koncentracije  $S^{2-}$  iona.



**Slika 23.** Fluorescencijski spektar kompleksa za različite koncentracije S<sup>2-</sup>[13].

Promjena intenziteta fluorescencije ( $\Delta F$ ) stavljena je u linearnu korelaciju s koncentracijom S<sup>2-</sup> iona kako bi se dobila kalibracijska krivulja (slika 23). Porast intenziteta („Turn On“) fluorescencije linearno raste s porastom koncentracije S<sup>2-</sup>. Korelacijski koeficijent je  $R^2 = 0,999$  [13].



**Slika 23.** Kalibracijska krivulja fluorescencijskog „Turn-On“ senzora (Intenzitet vs. koncentracija S<sup>2-</sup>) [13].

#### 2.4.1.9. Mehanizam „Turn-On“ senzora

Snažna interakcija između Cu<sup>2+</sup> kationa s S<sup>2-</sup> aniona očituje se u konstantama produkta topljivosti njihovih taloga ( $pK_{pt}(CuS) = 35,2$  i  $pK_{pt}(Cu_2S) = 47,6$ ). Vrijednosti konstanti produkta topljivosti Cu<sup>2+</sup> s ostalim anionima puno su manje. S<sup>2-</sup> ioni (bogatiji elektronima) u otopini kompleksa nanočestica kurkumina s bakrom vežu se s Cu<sup>2+</sup> snažnim elektrostatskim interakcijama, pri čemu se raspada kompleks s kurkuminom. To se očituje porastom

fluorescencije nanočestica u usporedbi s fluorescencijom kompleksa nanočestica s bakrom i usporedbom veličina čestica. Prosječna veličina čestica kompleksa bila je 187,5 nm, a nakon dodatka  $S^{2-}$  iona u iznosu od 7,5 ng ml<sup>-1</sup> i 17,5 ng ml<sup>-1</sup> smanjila se na 121,4 nm, odnosno 98,97 nm [13].

## **2.4.2. pH senzor s nanočesticama kurkumina na papiru**

Kolorimetrijski testovi mogu se provesti korištenjem digitalne kamere, skenera ili kamere mobilnog uređaja, dok su za analizu potrebni jednostavni softveri kao što je *Photoshop*. Mogu biti kombinirani s papirnom podlogom senzora, čija se fleksibilna i porozna matrica sastoji od hidrofilnih celuloznih vlakana s intrinzičnim kapilarnim svojstvima. Kapilarnost papira potiče tok tekućih uzoraka bez upotrebe vanjske sile. Općenito su papirni senzori biorazgradivi, lako prenosivi, široko dostupni te zahtjevaju minimalnu količinu uzroka. Prednosti kolorimetrijskih testova na papiru su brzina, jednostavnost izvedbe i niska cijena. Nanočestice kurkumina kao kolorimetrijski agens sigurne su za okoliš, što je dodatni plus [14].

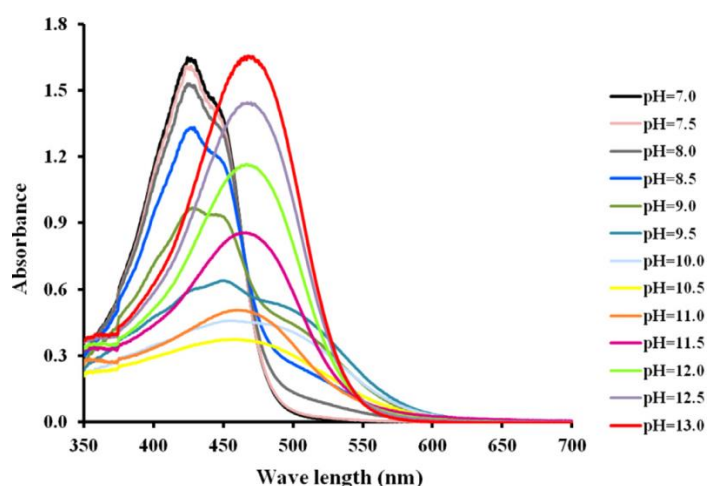
### **2.4.2.1. Priprema i izvedba senzora**

Nanočestice su dobivene tako da je 2 mL pripremljene organske faze (125 mg kurkumina u 25 mL diklormetana) nakapano u vodenu fazu (10 mL Triton X-100 surfaktanta 5% u 90 mL kipuće vode), 10 kapi po minuti u ultrazvučnoj kupelji. Otopina je potom stavljena u cirkulirajući isparivač kako bi se uklonilo otapalo diklormetan. Papirni senzori dobiveni su metodom uranjanja u vosak. Izrezan je komadić *Whatman No.1* filter papira (2,5 cm x 7,5 cm) i stavljen na stakalce. Deset kružnih magneta stavljeni su na papiriće te magnetskom silom privremeno vezani na komadić željeza smješten sa stražnje strane stakalca. Tako namješteni papir umočen je u vosak 1 sekundu, pri čemu otopljeni vosak penetrira u dubinu papira, tvoreći hidrofobne „zidove“. Prvi korak izvedbe je dodati 1 mL otopine nanočestica kurkumina u sredinu hidrofilne zone papirnog senzora te sušenje 15 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su dodani 1 mL otopina uzorka s različitim pH, na svaki senzor odvojeno. Dodatak otopina

rezultirao je promjenom boje senzora od žute, preko narančaste do smeđe, u rangu pH od 8 do 13. Nakon pola sata zabilježena je svaka test zona digitalnom kamerom te je slika analizirana *Adobe Photoshop* softverom. Srednja vrijednost intenziteta određena je u crno-bijelom načinu te korištena kao analitički signal za sensoriranje pH [14].

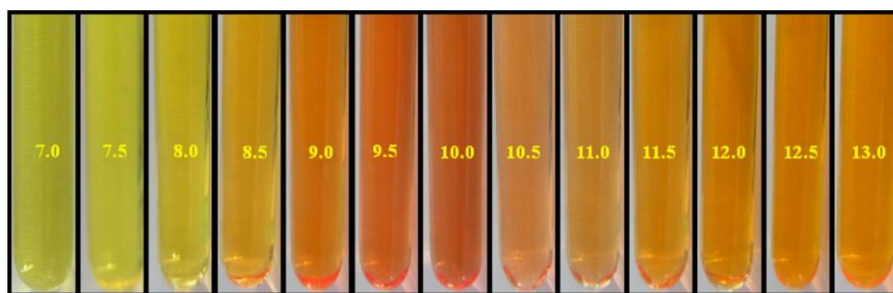
#### 2.4.2.2. Odziv senzora

Utjecaj pH na boju kurkuminskih nanočestica dobiven je promjenom pH od neutralnog do jako bazičnog. Za razumijevanje promjene boje, snimljen je apsorpcijski spektar otopine nanočestica kurkumina pri različitim pH vrijednostima, prikazan na slici 24.



**Slika 24.** UV-Vis spektar otopine nanočestica kurkumina u različitim pH [14].

Intenzitet apsorpcije prvotno je pado (hipokromni pomak) na  $\lambda_{\max} = 423$  nm, u rangu pH 7,0 – 9,0, uz promjenu boje od žute do crvene (slika 25). U rangu pH 10,0 – 13,0 uočen je batokromni pomak vrpce do 460 nm (*red shift*), uz porast intenziteta (hiperkromni pomak) i promjenu boje od crvene do smeđe (slika 25). U jako bazičnim uvjetima molekule kurkumina potpuno su deprotonirane u vodi s maksimumom apsorpcije na  $\lambda_{\max} = 468$ . Međutim ponašanje nanočestica na papirnom senzora razlikovalo se od onog u otopinama. Srednja vrijednost intenziteta padala je proporcionalno s porastom pH otopina. Kako bi se vrednovala promjena optičkih svojstava nanočestica, papirni senzori testirani pri različitim pH karakterizirani su skenirajućim elektronskim mikroskopom. Dobivene slike ukazivale su na smanjenje broja nanočestica i njihovo povećanje veličine s promjenom pH od 7,0 do 13,0. Osim toga, molekule kurkumina pri neutralnim i bazičnim pH podliježu hidrolitičkoj razgradnji. Prema tome, za promjenu optičkih svojstava odgovorne su i agregacija i razgradnja nanočestica.



**Slika 25.** Otopine anočestica kurkumina u različitim pH [14].

Senzor je pokazao dobru selektivnost bez interefencija kationa i aniona (mjereno pri pH 10, prije i nakon dodatka), pri čemu se interferencijom smatra relativna pogreška senzora  $\pm 5\%$ . Izvedba je također validirana određivanjem pH prethodno filtriranih vodenih otopina različitog podrijetla (otpadna, riječna i voda iz slavine). Rezultati senzora dobro se slagali s rezultatima pH metra, pokazajući tako da matrica uzorka nemaju utjecaja na izvedbu [14].

### 2.4.3. pH senzor za praćenje kvarenja hrane

Najveći uzrok kvarenja većine ribljih proizvoda je mikrobiološki raspad. Prilikom raspada oslobađaju se hlapljivi spojevi kao što su amonijak, dimetilamin i trimetilamin, poznati pod zajedničkim nazivom hlapljivi bazični spojevi dušika (*total volatile basic nitrogen, TVBN*), te se smatraju mogućim indikatorima kvarljivosti. Kvaliteta ribe najčešće je procijenjena parametrima svježine kao što su tekstura, miris i boja, a njihova promjena upućuje na kvarenje. Neke laboratorijske metode mogu biti mikrobiološke (*ukupni broj bakterija*), kemijske (ukupni hlapljivi bazični spojevi dušika, *TVBN*) fizikalne (miris, tekstura i boja), no danas se široko primjenjuju senzori. U većini senzora koriste se kemijska bojila (npr. bromokrezol zeleno), koja mogu biti štetna ako se slučajno konzumiraju. Kako bi se to izbjeglo, treba proizvesti senzore bazirane na prirodnim bojilima ili jestivim materijalima, koji su u kontaktu s hranom bezopasni. Primjer takvog senzora je kurkumin na bakterijskoj celuloznoj membrani, kod kojeg su svi korišteni materijali jestivi. Takav senzor, koji se nalijepi na ambalažu, namijenjeni su kao dodatni uređaj u industriji ribe i trgovcima, koji žele koristiti sigurne, jeftine, jednostavne i razgradive uređaje koji omogućuju primjenu u realnom vremenu [15].



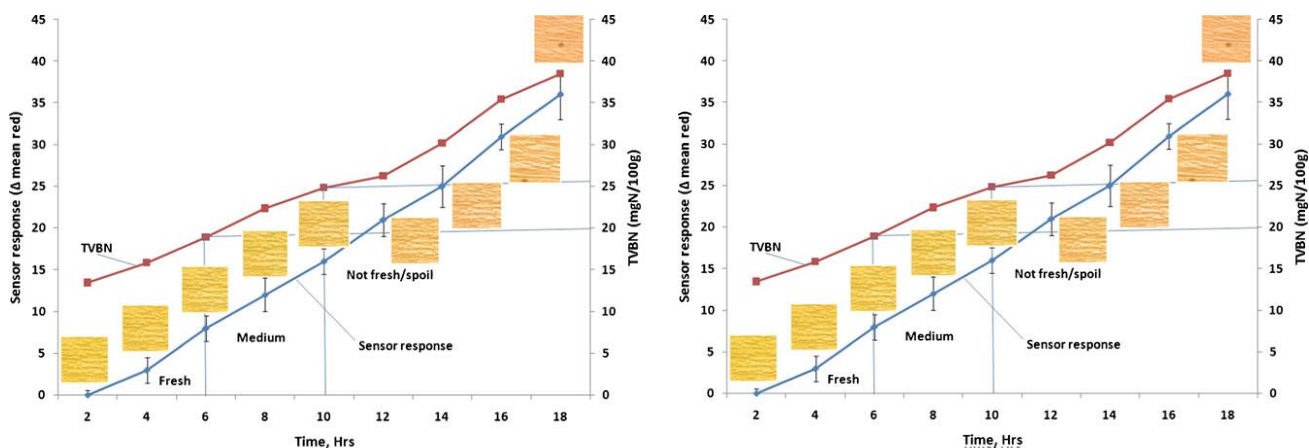
### 2.4.3.1. Priprema senzora i uzorka

Imobilizacija kurkumina na bakterijsku celuloznu membranu provedena je metodom adsorpcije. Membrane su uronjene u 10 mL stock otopine kurkumina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) preko noći, pri sobnoj temperaturi, isprane, osušene i izrezane u željene oblike.

Uzorci su čuvani u polistirenskim kutijama s ledom, u frižideru na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uzeto je 100 g uzorka i preneseno u sterilne Erlenmeyerove tikvice od 500 mL. Izrađeni senzori su zaljepljeni na vrh svake tikvice, pri čemu nisu u kontaktu s uzorcima. Referentne vrijednosti testiranja dobivene su iz tikvica bez uzorka, koje također imaju naljepljene senzore na vrhu. Kozice su odvojene u dvije skupine. Prva je skladištena pri ambijentalnim uvjetima (oko  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ) te analizirana svaka dva sata unutar 24 sata. Druga skupina skladištena je u frižideru ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i analizirana na dnevnoj bazi, unutar 10 dana, svaki dan u isto vrijeme. Odziv senzora tj. boja mjerena je digitalnim skenerom te analizirana *Adobe Photoshop*-om. Vrijednost boje određena je kao srednja vrijednost sadržaja crvene (ili  $\Delta$  srednje vrijednosti crvene ako se prati promjena boje) za sve membrane s obzirom da se boja mijenjala od žute, preko narančaste do narančasto-crvene [15].

### 2.4.3.2. Odziv senzora i količina TVBN

Dio kozica je opran, očišćen i samljeven. Uzeto je 10 g tako priređene smjese, pomiješano s 90 mL perklorne kiseline (6%) te isfiltrirano. 50 mL filtrata titrirano je hidroksidom (20% te su određene količine *TVBN*). Odziv senzora (promjena boje) praćena je istodobno s promjenom količine *TVBN* pri ambijentalnim i hladnim uvjetima. Odziv senzora pratio je sličan trend kao i analiza *TVBN*, koji se može vidjeti na slici 26.

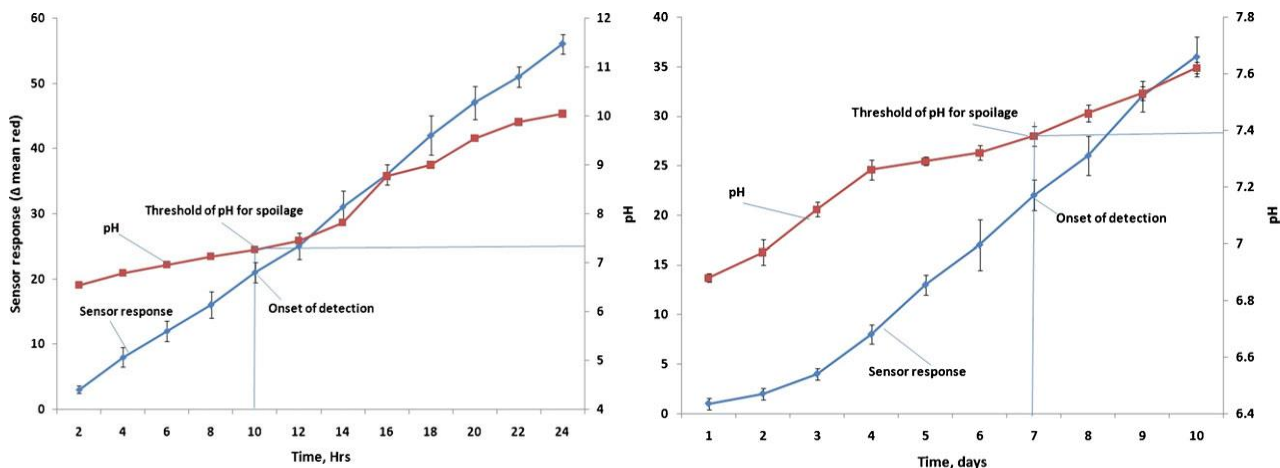


**Slika 26.** Koncentracija TVBN uzoraka i odziv senzora u ovisnosti o vremenu, pri ambijentalnim uvjetima (lijevo) i hladnim uvjetima (desno) [15].

Odziv senzora tj. srednja vrijednost crvene boje polagano je rasla, uz postepenu promjenu boje, unutar 24 sata pri ambijentalnim uvjetima. Membrana je mijenjala boju od žute do narančaste unutar 10 sati, potom od narančaste do narančasto-crvene nakon 10 sati. U hladnim uvjetima (slika 26, desno) prva tri dana nije uočena značajna promjena boje. Nakon četiri dana membrana je postepeno mijenjala boju iz žute u narančastu sve do sedmog dana, kada je počela mijenjati boju do narančasto-crvene. Signal senzora u dobroj je koleraciji s porastom količine TVBN spojeva. Određena prihvatljiva granica TVBN spojeva iznosi 25 mg u 100 g uzorka. Ta je granica ostvarena nakon 10 sati u ambijentalnim, odnosno nakon 7 dana u hladnim uvjetima. Vrijeme odziva senzora također ovisi o količini uzorka jer, ako uzorak zauzima manje od 30% volumena posude, TVBN spojevima treba dulje vremena da ispare do vrha [15].

### 2.4.3.3. Odziv senzora i pH

Vrijednosti pH u ovisnosti o vremenu otopina uzoraka kozica određivane su pH elektrodom. Dobivena je linearna povezanost između odziva senzora i pH vrijednosti izmjerene elektrodom. Promjena kvalitete kozica praćena je pH mjerenjima istodobno s mjerenjima odziva senzora, u ambijentalnim i hladnim uvjetima (slika 27).



**Slika 27.** pH uzoraka izmjeren elektrodom i odziv senzora u ovisnosti o vremenu, pri ambijentalnim uvjetima (lijevo) i hladnim uvjetima (desno) [15].

U ambijentalnim uvjetima pH se mijenjao od 6,54 (svježe kozice) do 10,04 (pokvarene kozice) unutar 24 sata. U hladnijim uvjetima pH se mijenjao od 6,88 do 7,53 unutar 10 dana. Prema očekivanom, odziv senzora u oba slučaja rastao je s porastom pH. Optimalan pH, kojem se pripisuje niska vrijednost *TVBN* spojeva, iznosi između 7,2 – 7,4. Ta je vrijednost postignuta nakon 10 sati u ambijentalnim uvjetima, odnosno nakon 7 dana u hladnim uvjetima.

S obzirom na dobro slaganje odziva senzora s promjenom količine *TVBN* spojeva kao i posljedičnom promjenom pH, senzor baziran na kurkuminu može se koristiti za vizualnu detekciju promjene kvalitete ribljih proizvoda [15].

#### 2.4.4. Senzori bazirani na kurkuminu i želatini

„Pametno pakiranje“ (*Smart packaging*) skupni je naziv za nove koncepte pakiranja, koji se mogu podijeliti u dvije skupine: aktivno i inteligentno pakiranje. Aktivno pakiranje je ono koje mijenja stanje zapakirane hrane u svrhu produljenja roka trajanja ili pak održava kvalitetu za povećanje sigurnosti ili senzorskih svojstava. Inteligentno pakiranje prati okolišne promjene ili razvoj specifičnih spojeva u zapakiranoj hrani kako bi dalo informacije o svježini, mikrobiološkom razvoju i kvaliteti. Primjerice tokom skladištenja hrane može se promijeniti pH medija zbog rasta mikroorganizama, što uzrokuje porast koncentracije ogranskih kiselina

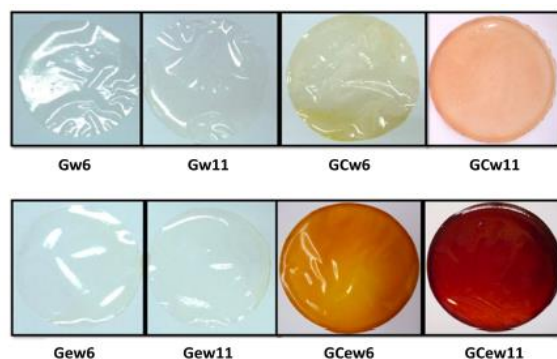
(n-butirat, D-laktat, L-mliječna kiselina i octena kiselina) i razvoj isparljivih komponenti (trimetilamin, dimetilamin, histamin, tiramin, sumporovodik itd.). Prema tome pH jedan je od potencijalnih indikatora pokvarenosti hrane. Musso i suradnici (2016) razvili su filmove bazirane na želatini i poznatim baznim indikatorima, kao što su metiloranž, neutralna crvena i bromokrezol zelena, u svrhu razvoja pH senzora. Potvrđeno je da ionizirajući ogranci proteina ne ometaju promjenu boje indikatora u različitim uvjetima pH. Idući korak je razvitak senzora s jestivom, bezopasnom bojom koja bi mogla zamijeniti sintetske indikatore [16].

#### **2.4.4.1. Priprema senzora**

Filmovi su izrađeni od vode i mješavine etanol-voda (1:1) kao otapala. Prvo su pripravljene dvije odvojene disperzije: prva je sadržavala želatinu ( $w=10\%$ ), pripravljenu u vodi na  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dok je druga sadržavala kurkumin ( $w=0,04\%$ ), otopljen u vodi, odnosno mješavini etanol-voda, pri sobnoj temperaturi. Jednaki volumeni dviju disperzija pomiješani su na magnetskoj miješalici, uz dodatak glicerola kao plastifikatora. pH svake pomiješane disperzije namiješten je na 6 ili 11 pomoću  $2\text{ mol L}^{-1}\text{ HCl}$ -a, odnosno  $2\text{ mol L}^{-1}\text{ NaOH}$ . 10 mL disperzije nanese se na polistirensku Petrijevu zdjelicu i sušeno u pećnici s cirkulacijom zraka na  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 sata. Pripremljeni su i referentni filmovi bez kurkumina u oba otapala pri pH 6 i 11 [16].

#### **2.4.4.2. Karakterizacija i odziv senzora**

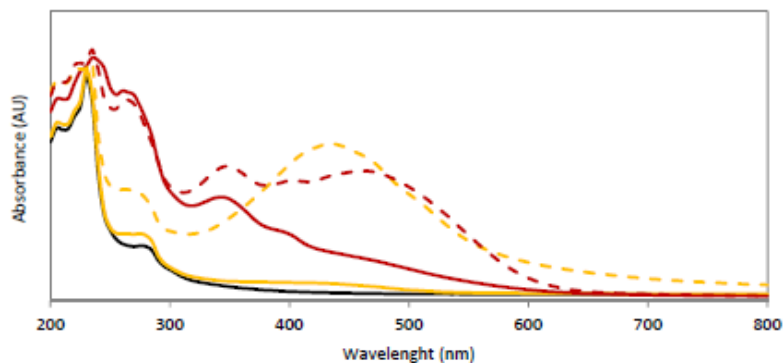
Dobiveni filmovi (slika 28) sa ili bez kurkumina u vodenoj ili hidroalkoholnoj disperziji pri pH 6 ili 11 bili su homogeni, tanki i fleksibilni. Filmovi bez kurkumina bili su prozirni bez obzira na otapalo i pH, dok su oni s kurkuminom postali žuti ili narančasto-crveni, ovisno je li pH bio 6, odnosno 11. Obojenost je bila pojačana u otapalu etanol-voda, čiji je uzrok bolja topljivost kurkumina u tom mediju, zbog svoje hidrofobne prirode. Razvoj boje u filmovima pokazuje da voda dispergira boju, dok ju hidroalkoholna mješavina potpuno otapa. Dodatak želatine i glicerola u sistem pojačava disperziju boja i modificira tonalitet, posebice u vodenoj disperziji.



**Slika 28.** Filmovi od želatine otopljeni u vodi bez (Gw) i sa kurkuminom (GCw) pri pH 6 i 11 (gore); filmovi od želatine otopljeni u mješavini etanol-voda bez (Gew) i sa kurkuminom (GCew) pri pH 6 i 11 (dolje) [16].

Svaki film je izrezan u pravokutnik i postavljen u ćeliju spektrofotometra. Izmjeren je spektar svakog filma, pri čemu je za referentnu vrijednost uzet zrak. Mjerenja su ponovljena tri puta. Dobiveni UV-Vis spektri filmova prikazani su na slici 29. Spektri filmova koji su izrađeni od želatine, bez kurkumina (Gw6, Gw11, Gew6, Gew11) pokazali su isti spektar bez obzira na pH i otapalo. Uočena su dva pika na  $\lambda = 205$  nm i na  $\lambda = 230$  nm, koji se pripisuju peptidnim vezama, zatim pik na  $\lambda = 260 - 280$  nm, koji odgovara aromatskim aminokiselinama te minimum apsorbcije u cijelom vidljivom spektru. Dodatak kurkumina u filmovima pojačao je apsorpciju pika u UV dijelu, posebice na  $\lambda = 260 - 265$  nm. Filmovi pri pH 11 (GCw11, GCew11) pokazali su dva nova pika u UV dijelu s maksimumima na  $\lambda = 345$  nm i na  $\lambda = 395$  nm, koji se pripisuju produktima razgradnje. Filmovi pri pH 6 (GCw6, GCew6), obojani žuto, pokazali su pik na  $\lambda = 420$  nm, dok su oni pri pH 11 (GCw11, GCew11), obojani crveno, pokazali pik na  $\lambda = 460$  nm.

Filmovi dobiveni s hidroalkoholnom disperzijom pokazali su intenzivniju apsorbciju u čitavom UV-Vis dijelu, poradi bolje topljivosti kurkumina.

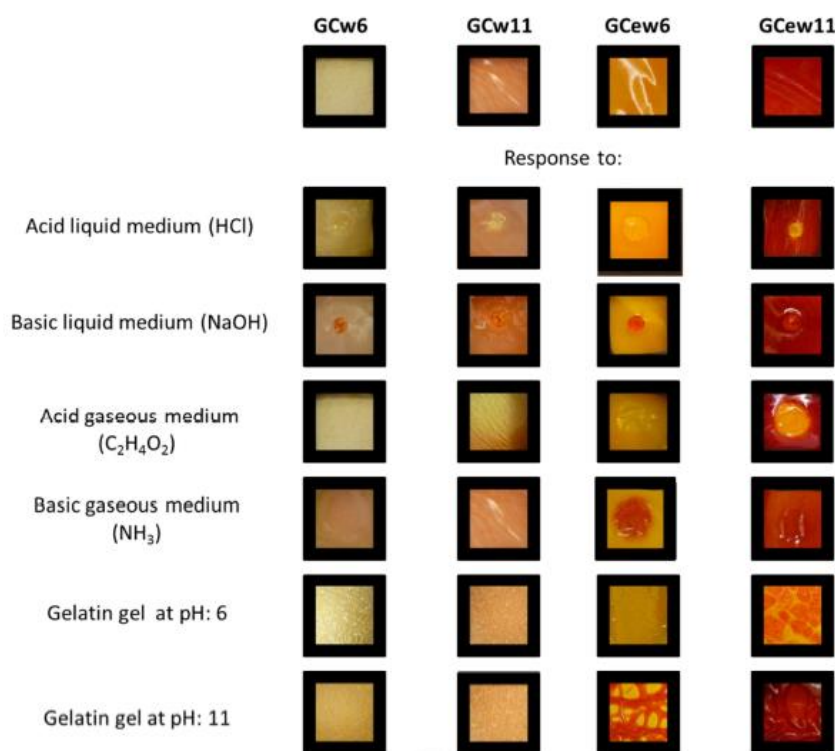


**Slika 28.** UV-Vis spektar filmova od želatine sa kurkuminom u vodi (puna crta) i mješavini etanol-voda (isprekidana crta), pri pH 6 (žuto) i 11 (crveno); bez kurkumina (crna crta) [16].

Svaki film je testiran s tekućim, polukrutim i plinovitim medijem različitih pH:

- 1) Dodana je kap  $2 \text{ mol L}^{-1}$  HCl-a ili  $2 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH direktno na filmove,
- 2) Filmovi stavljeni u kontakt s gelom pripremljenim od želatine (w=7,5%) pri pH=6 i 11
- 3) Filmovi su izlagani plinovima (ledena octena kiselina,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{OOH}$  i amonijak,  $\text{NH}_3$ ).

Filmovi su prije i nakon kontakta s takvim medijem pri različitim pH fotografirane digitalnom kamerom. Na slici 29 prikazani su svi filmovi s kurkuminom u kontaktu s kiselim ili bazičnim otopinama, polukrutinama i plinovima. Svi su pokazali odziv na pH, potvrđujući njihovu primjenu u tekućim, polukrutim proizvodima ili u zaglavlju pakiranja. Žuti filmovi pri pH 6 u kontaktu s bazičnim otopinama, polukrutinama i plinovima obojani su u narančasto-crvenu. Narančasto-crveni filmovi pri pH 11 u kontaktu s kiselim medijem obojani su u žuto. Prema očekivanom, filmovi pri pH bliskom mediju nisu promijenili boju. Promjene su bile uočljivije u filmovima od hidroalkoholnoj disperziji. Odzivi su bili trenutni i uočljivi s tekućinama i plinovima pri različitim pH, dok su s polukrutinama bili sporiji i slabije uočljivi. Sporiji odziv može se pripisati ograničenoj difuziji [16].



**Slika 29.** Odziv filmova od želatine i kurkumina otopljenih u vodi (GCw) ili mješavini voda-etanol (GCew), nakon kontakta s tekućim, plinovitim i polukrutim medijem pri pH 6 i 11 [16].

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

U ovom radu ispitana su kiselobazna svojstva kurkumina UV-vidljivom apsorpcijskom spektrofotometrijom s ciljem utvrđivanja primjene kao senzora za pH. Promatran je utjecaj vrijednosti pH na spektralna svojstva kurkumina te okarakteriziran dobiveni apsorpcijski spektar.

### 3.1. Priprema matične (*stock*) otopine

Matična (*stock*) otopina pripravljena je tako da je otopljeno 5 mg praha kurkumina u 5 mL etanola (50%).

Koncentracija matične otopine iznosi:

$$c / \text{mol dm}^{-3} = \frac{m (\text{g})}{M (\text{g mol}^{-1}) * V (\text{mL})} * 1000 \quad (4)$$

pri čemu su  $m$  = masa odvage kurkumina,  $M$  = molarna masa kurkumina,  $V$  = volumen otopine etanola (50%)

$$c / \text{mol dm}^{-3} = \frac{5,0 * 10^{-3}}{368,38 * 5,0} * 1000 = 2,715 * 10^{-3}$$

Prah kurkumina taložio se na dnu kivete te je pripravljena otopina miješana 15 min u vibracijskoj miješalici.

Zbog daljnjeg slabog otapanja kurkumina, navedena otopina je razrijeđena tako da je uzeto 0,5 mL prethodno pripravljene otopine ( $c / \text{mol dm}^{-3} = 2,715 * 10^{-3}$ ) i otopljeno u 2,5 mL etanola (100%), pri čemu je dobivena otopina imala udio etanola  $\varphi_{\text{etanol}} = 91,67\%$ .

Koncentracija razrijeđene matične otopine iznosi:

$$c' / \text{mol dm}^{-3} = \frac{c (\text{mol dm}^{-3}) * V_{\text{uzorka}} (\text{mL})}{V_{\text{ukupni}} (\text{mL})} \quad (5)$$

$$c' / \text{mol dm}^{-3} = \frac{2,715 * 10^{-3} * 0,5}{3,0} = 4,525 * 10^{-4}$$

### 3.2. Snimanje UV-Vidljivog apsorpcijskog spektra



Za snimanje UV-vidljivog apsorpcijskog spektra korištene su prethodno priređene otopine citratnih pufera u rasponu vrijednosti pH od 2,0 do 12,0. Za snimanje je korištena kvarcna kiveta koja je prije svakog stavljanja u UV apsorpcijski spektrofotometar isprana destiliranom vodom i dobro posušena. Sva snimanja provedena su u rasponu valnih duljina od ~380 nm do 800 nm. Kao slijepa proba korištena je destilirana voda.

### 3.3. Priprema uzorka za snimanje

U kvarcnu kivetu automatskom biretom stavljen je alikvot razrijeđene *stock* otopine od 100  $\mu\text{L}$  i 3 mL pufera, pri čemu je dobivena otopina imala udio etanola  $\varphi_{\text{etanol}} = 3,1\%$ . Uzorak je promiješan špahtlicom te je nakon 1 min i 20 sec započeto snimanje.

Koncentracije uzoraka kurkumina pri snimanju UV-vidljivih apsorpcijskih spektara iznose:

$$c_{\text{kurkumina}} / \text{mol dm}^{-3} = \frac{c'(\text{mol dm}^{-3}) * V_{\text{aliquot}} (\text{mL})}{V_{\text{ukupni}} (\text{mL})} \quad (6)$$

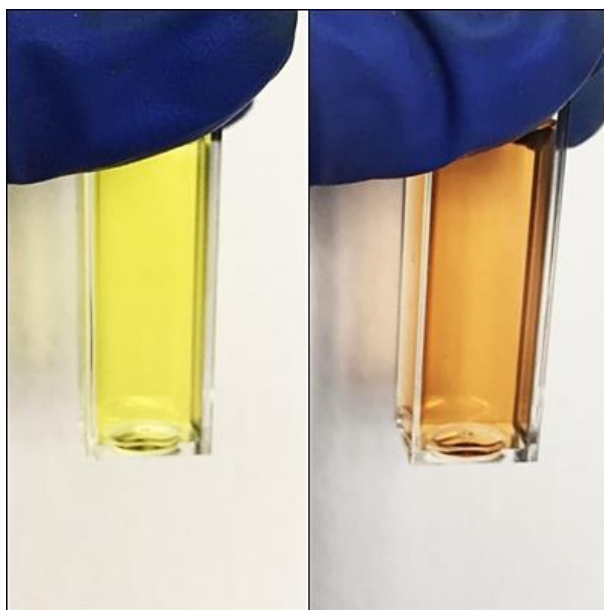
$$c_{\text{kurkumina}} / \text{mol dm}^{-3} = \frac{4,525 * 10^{-4} * 0,1}{3,0 + 0,1} = 1,460 * 10^{-5} \approx 1,5 * 10^{-5}$$

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Utjecaj promjene pH na spektralna svojstva

Kako bi se utvrdila mogućnost primjene kurkumina kao optičkog pH senzora, ispitana je promjena njegovih spektralnih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine. Snimljeni su apsorpcijski i spektri u otopinama citratnog pufera različitih vrijednosti pH prema ranije opisanom postupku (3.2.).

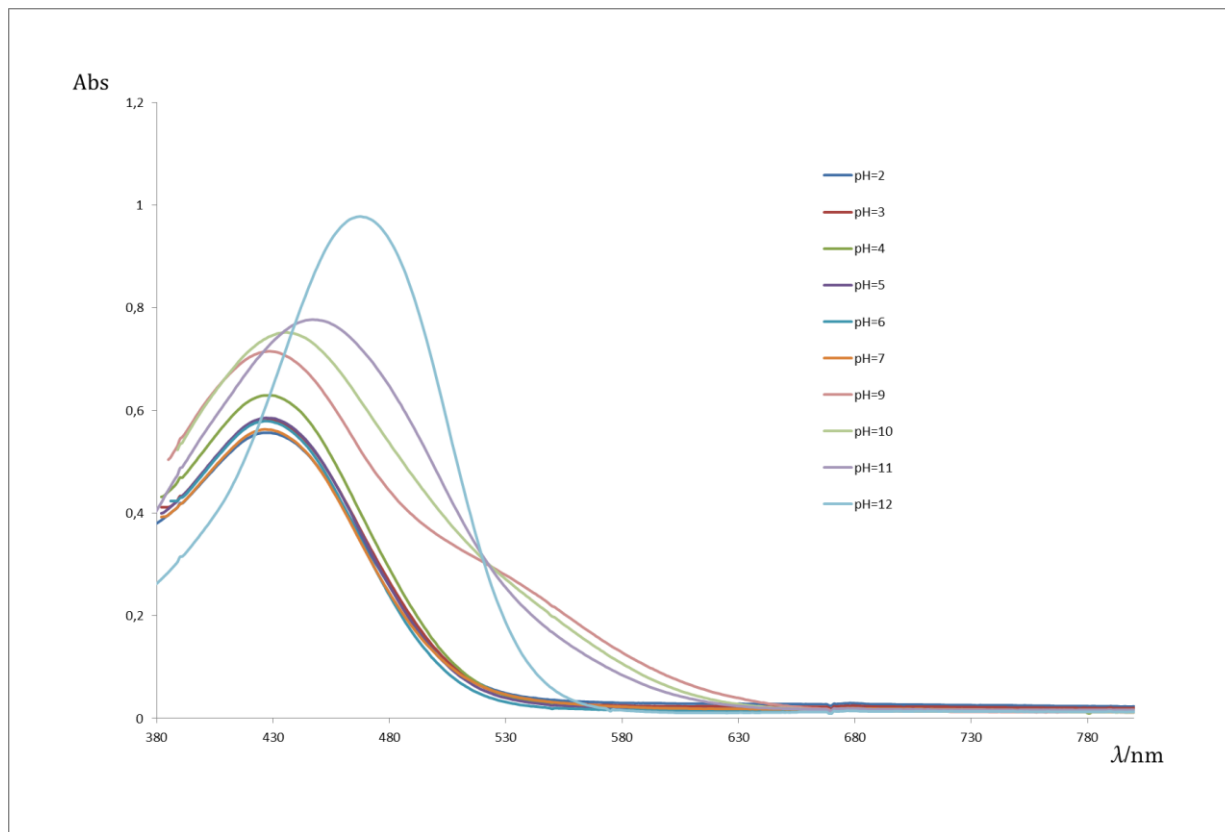
Otopine uzoraka kurkumina pod dnevnim svjetlom bili su obojani žuto do vrijednosti pH 9,0, pri kojem mijenjaju boju u svijetlo crvenu do vrijednosti pH 11,0, pri kojem mijenjaju boju u crvenu.



**Slika 30.** Prikaz otopina kurkumina ( $c = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u mješavini etanol-voda

( $\varphi_{\text{etanol}} = 3,1\%$ ) u neutralnom mediju (lijevo) i bazičnom mediju (desno)

Na slici 31 prikazan je dobiven apsorpcijski spektar otopine kurkumina u prethodno priređenim citratnim puferima s različitim vrijednostima pH.



**Slika 31.** Apсорpcijski spektar otopine kurkumina u citratnim puferima različitih pH vrijednosti

Prema dobivenom spektru, kurkumin otopljen u mješavini etanol-voda ( $\varphi_{\text{etanol}} = 3,1\%$ ) pokazuje apsorpcijski maksimum na  $\lambda = 430$  nm na svim vrijednostima pH do 10,0. Spektar se slaže s literaturnim podacima (2.3.5.), gdje kurkumin pokazuje jednu vrpcu u vidljivom dijelu spektra između  $\lambda_{\text{max}} = 410 - 430$  nm [2].

Pik na  $\lambda = 430$  nm pripisuje se enolnom obliku kurkumina, dok se keto oblik ne vidi jer apsorbira u UV području.

Pri pH = 10,0 uočen je apсорpcijski maksimum na  $\lambda = 437$  nm, pri pH = 11,0 na  $\lambda = 450$  nm, dok je pri pH = 12,0 na  $\lambda = 470$  nm. Prema literaturnim podacima u bazičnim uvjetima (pH > 10), apсорpcijski spektar pokazuje pomak pika na oko 467 nm [2]. U bazičnim uvjetima došlo je do batokromnog pomaka (*red shift*), što se očituje i promjenom boje iz žute u svijetlo crvenu.

Pri pH= 9,0 uočen je još jedan blagi pik na  $\lambda = 528$  nm, koji se pripisuje dianionskom obliku kurkumina, kao posljedica deprotoniranja po jednog protona na enolnoj i jednog na fenolnoj skupini. Ta je pojava očekivana kod viših pH vrijednosti te je u literaturnim podacima drugi blaži pik zabilježen na  $\lambda = 509$  nm [11]. Pri pH = 12,0 obje fenolne skupine i enolna skupina podliježu deprotoniranju, tj. molekula kurkumina je potpuno deprotonirana. Izobestička točka na  $\lambda = 521$  nm ukazuje na ravnotežu između dianionskog oblika (pH 9,0, 10,0 i 11,0) i potpuno deprotoniranog oblika (pH 12,0).

S povećanjem pH vrijednosti intenzitet apsorpcije na  $\lambda = 430$  nm raste, što se slaže s literaturnim podacima (2.3.5.2.). Porast intenziteta je očekivan zbog favoriziranja enolnog oblika koji se može deprotonirati u bazičnim uvjetima. Također porast intenziteta na  $\lambda = 430$  nm s povećanjem pH uzrokovan je pomakom ravnoteže oblicima s većim molarnim apsorpcijskim koeficijentom ( $\epsilon$ ), kojeg imaju anionski oblici kurkumina [11]. U vrlo bazičnim uvjetima pri pH = 12,0 intenzitet je veći u odnosu na kisele i neutralne uvjete zbog nemogućnosti postojanja drugih oblika osim potpuno deprotoniranog.

## **5. ZAKLJUČAK**

Optički senzori se zbog jednostavnosti, brzine, niže cijene i zadovoljavajuće selektivnosti sve više koriste u analitici, ponajviše za detekciju ciljanih iona u vodi za piće ili praćenje kvalitete prehrambenih proizvoda. U današnje vrijeme sve su češće izvedbe optičkih senzora na papiru zbog mikrofluidike koja ne zahtjeva vanjsku pumpu, jednostavne kemijske modifikacije i neštetnosti za okoliš. Zbog svojih osebujnih spektralnih svojstava, kao osjetilni materijal u optičkim pH sensorima može se primijenjivati kurkumin dok se zbog mogućnosti kompleksiranja može koristiti u „Turn-Off/On“ ion-selektivnim optodama. Kurkumin se, zahvaljujući svojoj strukturi, podvrgava keto-enolnoj tautomeriji. Deprotoniranje enolnog oblika, uz fenolnu skupinu, omogućava postojanje više vrsta aniona. Rezultat samog deprotoniranja u bazičnim uvjetima je promjena boje kurkumina iz žute u crvenu, što je ključni segment u pH optičkim sensorima. Slaba topljivost kurkumina u vodi mu ograničava senzorsko i terapijsko djelovanje pa se pribjegava metodama imobilizacije.

Kurkumin pokazuje snažnu dvije intenzivne vrpce: s pikom na  $\lambda = 350$  (keto) i s pikom između  $\lambda = 410-430$  (enol) nm u svim otapalima. S porastom polarnosti, uočen je batokromni pomak (*red shift*) maksimuma apsorpcije prema polarnijim otapalima, što se naziva pozitivni solvatokromizam. Udio nepolarnog otapala i povećanje bazičnosti medija također utječe na spektralna svojstva kurkumina, favorizirajući enolni oblik. U kiselim i neutralnim uvjetima povećanjem koncentracije kurkumina uočene su znatne promjene emisijskog spektra koje ukazuju na nastanak više vrsta agregata. Porast temperature u kiselim i neutralnim uvjetima pomiče reverzibilnu ravnotežu prema diketo obliku, zbog kidanja intramolekularnih vodikovih veza. U bazičnim uvjetima porastom temperature, osim pada intenziteta pika enolnog oblika, javljaju se pikovi koji se pripisuju produktima razgradnje te je proces ireverzibilan.

Ispitani utjecaj pH na apsorpcijska svojstva kurkumina ( $c = 1,5 * 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) u mješavini etanol-voda ( $\varphi_{\text{etanol}} = 3,1\%$ ) slaže se s literaturnim podacima. Kurkumin je pokazao vrpcu s  $\lambda_{\text{max}} = 430$  nm u svim vrijednostima pH do pH = 10. Nakon pH = 10 dolazi do batokromnog pomaka (*red shift*), što se očituje i promjenom boje iz žute u svijetlo crvenu. Porastom pH također dolazi do hiperkromnog pomaka, odnosno povećanja intenziteta na  $\lambda_{\text{max}} = 430$  nm, zbog favoriziranja enolnog oblika kurkumina. Primijećeno je slabo otapanje kurkumina u mješavini etanol-voda ( $\varphi_{\text{etanol}} = 50\%$ ), zbog čega je potrebno dodatno razrijeđivanje u čistom etanolu prije pripreme otopine za ispitivanje spektralnih svojstava.

## **6. LITERATURA**



1. Lobnik, Turel and Korent Urek, *Optical Chemical Sensors: Design and Applications* (2012), p: 3-4
2. Priyadarsini, *The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent* (2014), p: 20092-2013
3. Digambara Patra, Christelle Barakat, Synchronous fluorescence spectroscopic study of solvatochromic curcumin dye (2011), p:1034-1036
4. A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Chemical sensors: definitions and classification*, *Pure and Applied Chemistry*, 63 (1991) p:1247–1250
5. Ivan Piljac, *Senzori fizikalnih veličinai elektroanalitičke metode* (2010) p:593-610
6. Mistlberger, Crespo, Bakker, *Ionophore-Based Optical Sensors*(2014), p:484-485
7. Wang, Qin and Meyerhoff, Paper-based plasticizer-free sodium ion selective sensor with camera phone as a detector (2015), p:15176-15177
8. Wang, Zhang, Nam, Hickner, Mahoney, and Meyerhoff, Ionophore-based anion-selective optode printed on cellulose paper (2017)
9. Nery & Kubot, *Sensing approaches on paper-based devices: a review* (2013), p:7573-7575
10. Pavia, Lampman, Kriz, *Introduction to Spectroscopy*, Third Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, Australia (2001)
11. Bhatia, Kishor, Katyal, Gogoi, Narang and Deep, Effect of pH and temperature on conformational equilibria and aggregation behaviour of curcumin in aqueous binary mixtures of ethanol (2016), p: 103275-103284
12. Preetha Anand, Ajaikumar B. Kunnumakkara, Robert A. Newman, and Bharat B. Aggarwal, *Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises* (2007), p:807
13. Bhopate, Mahajan, Garadkar, Kolekar and Shivajirao R. Patil, A highly selective and sensitive single click novel fluorescent off–on sensor for copper and sulfide ions detection directly in aqueous solution using curcumin nanoparticles (2015), p:7086-7095
14. Pourreza, Golmohammadi, *Application of curcumin nanoparticles in a lab-on paper device as a simple and green pH probe* (2014), p:136-139
15. Bambang Kuswandi & Jayus & Tri Susanti Larasati & Aminah Abdullah & Lee Yook Heng, *Real-Time Monitoring of Shrimp Spoilage Using On-Package Sticker Sensor Based on Natural Dye of Curcumin* (2011), p:884-890
16. Yanina S. Musso, Pablo R. Salgado, Adriana N. Mauri, . *Smart edible films based on gelatin and curcumin* (2016), p:1-13, 29-33

## **7. ŽIVOTOPIS**

Marlena Grbić [REDACTED] Pohađala je osnovnu školu Antuna Augustinčića u Zaprešiću do 2011. godine te je iste godine upisala opću gimnaziju „Ivan Supek“ u Zagrebu. Maturirala je 2015. godine nakon čega upisuje preddiplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija. Obaveznu stručnu praksu odradila je 2018. godine u tvrtci Magdis d.o.o, koja se bavi proizvodnjom, razvojem, kontrolom i kvalitetom kozmetičkih, dijetetskih i medicinskih proizvoda.