

Primjena prirodnih materijala u razvoju nosivih (bio)kemijskih senzora

Kovačević, Rafaela

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:859973>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Rafaela Kovačević

PRIMJENA PRIRODNIH MATERIJALA U RAZVOJU
NOSIVIH(BIO)KEMIJSKIH SENZORA
ZAVRŠNI RAD

Mentor: Prof. dr.sc. Ivana Steinberg

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

Svjetlana Krištafor, izv. prof. dr. sc.

Juraj Šipušić, prof. dr. sc.

Zagreb, rujan 2022.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc Ivani Steinberg na ulozi mentora i prijedlogu ove zanimljive i izazovne teme. Zahvaljujem se asistentici Marleni Grbić na pomoći i strpljenju pri izradi eksperimentalnog dijela rada i pomoći tijekom pisanja. Zahvaljujem se svojim roditeljima, koji su mi omogućili ovaj studij. Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama na podršci tijekom cijelog studiranja.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opći dio	3
2.1. Kemijski senzori	4
2.1.1 Elementi kemijskog senzora	4
2.1.2. Klasifikacija kemijskih senzora	5
2.2. UV-Vis apsorpcijska spektroskopija.....	6
2.2.1. Hipsokromni i batokromni pomak	8
2.2.2. Utjecaj proširene konjugacije.....	9
2.2.3. Utjecaj pH	9
2.3. Reflektancija.....	10
2.4. Primjena prirodnih materijala u pH sensorima	12
2.5. Antocijanini	13
2.5.1. Svojstva antocijanina	14
2.5.2. Primjena antocijanina	16
2.6. Karboksimetilceluloza	17
2.6.1. Sinteza i svojstva CMC.....	17
2.6.2. Primjena CMC	18
3. Eksperimentalni dio	20
3.1. Potrebne kemikalije, posuđe i instrumentacija	21
3.2. Ekstrakcija crvenog kupusa	22
3.3. Filtracija matične otopine antocijanina	22
3.4. Postupak koncentriranja matične otopine antocijanina	23
3.5. Izrada pH senzora s imobiliziranim antocijaninom	23
3.5.1. Imobilizacija antocijanina u film na bazi CMC i TEOS-a.....	23
3.5.2. Imobilizacija antocijanina u film na bazi CMC	24
3.5.3. Priprema stakalaca s imobiliziranim antocijaninom u CMC filmu	25
3.6. UV-Vis spektroskopska karakterizacija	26
3.7. Mjerenje reflektancije antocijanina imobiliziranog u CMC filmovima na stakalcima	27
4. Rezultati i rasprava	29
4.1. Određivanje koncentracije antocijanina u otopini	30
4.2. Spektroskopska karakterizacija otopine antocijanina	31
4.3. Spektroskopska karakterizacija antocijanina imobiliziranog u CMC/TEOS filmu	33
4.4. Spektroskopska karakterizacija antocijanina imobiliziranog u CMC filmu.....	33

4.5.1. Reflektancija matične otopine antocijanina osušene na stakalcu.....	36
4.5.2. Reflektancija imobiliziranog antocijanina u CMC filmu na stakalcima	37
4.5.3. Usporedba reflektancije za pojedine pH vrijednosti	40
5. Zaključak.....	42
6. Literatura.....	44
7. Životopis	50

Sažetak

U današnje vrijeme sve je veći interes za korištenjem prirodnih materijala pri izradi nosivih kemijskih senzora (engl. *wearable chemical sensors*), uslijed njihove netoksičnosti, biorazgradivosti i općenito manjeg utjecaja na okoliš. Antocijanini su pigmenti topljivi u vodi, koji se dobivaju izoliranjem iz biljaka, poput voća i povrća. Pokazuju širok spektar boja ovisno o pH medija, zbog čega se mogu koristiti kao pH indikatori. Spektroskopske karakteristike otkrivaju mnogo o kemijskom ponašanju pigmenata te su neizostavan korak prilikom izrade optičkih senzora. Najčešće korištene su UV-Vis apsorpcijska, reflektancijska, fluorescencijska spektroskopija te kolorimetrija. Celuloza je najrašireniji prirodni polimer glukoze, koji pokazuje razna korisna svojstva, primjerice obnovljivost, visoku adsorpciju i mogućnost modifikacije. Njena mikrofibrilna struktura čini pogodni matriks za imobilizaciju antocijanina u sensorima baziranim na prirodnim materijalima. Od mnogobrojnih derivata, karboksimetilceluloza (CMC) pokazuje velik potencijal zbog topivosti u vodi, čime se izbjegava korištenje toksičnih otapala.

U ovom radu istraživana su optička svojstva antocijanina izoliranog iz crvenog kupusa, otopljenog u otopini, imobiliziranog u CMC trakicama te CMC filmovima osušenim na stakalcima. UV-Vis spektrofotometrija je korištena za karakterizaciju antocijanina u otopini te imobiliziranog u CMC trakicama, dok je za karakterizaciju CMC filmova osušenih na stakalcima korištena reflektancija. Promjena boje pri različitim pH imobiliziranog antocijanina usporediva je s promjenom boje u otopini. Najpogodnija svojstva u vidu najprimjetnije promjene boje, jasno definiranog reflektancijskog spektra i prikladne konzistencije filma postignuta su za filmove s najvećom korištenom koncentracijom antocijanina. Prikazani rezultati najavljuju mogućnost daljnjih istraživanja ove teme i razvoja nosivih pH osjetljivih materijala u potpunosti načinjenih od prirodnih, netoksičnih, štoviše jestivih materijala, čija primjena bi bila posebno atraktivna u nosivim kemijskim sensorima.

Ključne riječi:

senzor, antocijanin, celuloza, reflektancija, pH indikator

Summary

Nowadays there is a growing interest to apply natural materials into wearable chemical sensors, due to their lower impact on the environment, nontoxicity and biodegradability. Anthocyanins are water soluble pigments isolated from plants, like fruits and vegetables. They exhibit a broad spectrum of color depending on the pH, therefore could be used as pH indicators. Spectroscopic characteristics are important for defining chemical properties of the pigments and are a mandatory step in preparing an optical sensor. Characterization methods usually include UV-Vis absorbance, reflectance and fluorescence spectroscopy, as well as colorimetry. Cellulose is the most abundant glucose polymer, which shows great variety of properties, namely reusability, high adsorption and reactivity with other chemicals. Its microfiber structure allows to be utilized as an ideal matrix to immobilize anthocyanin in sensors based on natural materials. Out of many derivatives, carboxymethylcellulose shows great potential due to its solubility in water, thus avoiding the use of toxic solvents.

In this work the optical properties of anthocyanin isolated from red cabbage are investigated in solution as well as in immobilized forms as carboxymethylcellulose (CMC) film strips and as dried CMC spots on glass slides. To characterize the anthocyanin in solution and immobilized in CMC film strips UV-Vis spectroscopy was used, while reflectance spectroscopy measurements were used to characterize spots dried on glass slides. Color change of immobilized anthocyanin films exposed to solution of different pH value was comparable with changes obtained with anthocyanins dissolved in solution. Best properties in terms of most noticeable color change, well defined reflectance spectra and appropriate consistency were achieved for the films with highest concentration of anthocyanins. The results obtained here show great promise for development of new pH sensitive materials entirely made of natural, nontoxic and even edible materials, especially suitable for wearable sensing applications.

Key words:

Sensor, anthocyanin, cellulose, reflectance, pH indicator

1. Uvod

Nosivi senzori privukli su značajnu pozornost u raznim istraživačkim poljima i industrijama. Istraživanja povezana s nosivim sensorima dovela su do razvoja novih uređaja i napredne primjene kao što su biointegrirani uređaji, nosivi biokemijski sustavi, senzori za praćenje kvarljivosti hrane [1].

Antocijanini su pigmenti topljivi u vodi, koji pripadaju podskupini velikih sekundarnih biljnih metabolita nazvanim flavonoidi [2]. Prirodno ekstrahirani antocijanini u velikoj mjeri koriste se kao dodaci polimernim kompleksima, kao što je polivinil alkohol/kitozan, za praćenje kvalitete prehrambenih proizvoda u stvarnom vremenu [3]. Imaju brojna svojstva poput antioksidativno, antikancerogeno i antimikrobno djelovanje. Zbog svoje netoksičnosti koriste se kao bojila u prehrambenoj industriji. U ravnoteži antocijanina, ovisno o pH, mogu postojati različiti oblici koji pokazuju različitu stabilnost i obojenje - kinoidna baza, flavilijev kation, karbinol pseudobaza i halkon, [4]. Zahvaljujući tome, antocijanini mogu poslužiti kao kolorimetrijski indikator zbog širokog spektra boja [5]. Također na antocijanin i njegova svojstva utječe temperatura, svjetlost, otapalo, te sam sastav biljke [4].

Celuloza je najzastupljeniji prirodni polimer u biosferi, koji je našao primjenu kao obnovljiva i biorazgradiva sirovina. Celuloza je rasprostranjena u prirodi u biljkama, životinjama, algama, gljivama i mineralima. Ipak, glavni izvor celuloze su biljna vlakna [6].

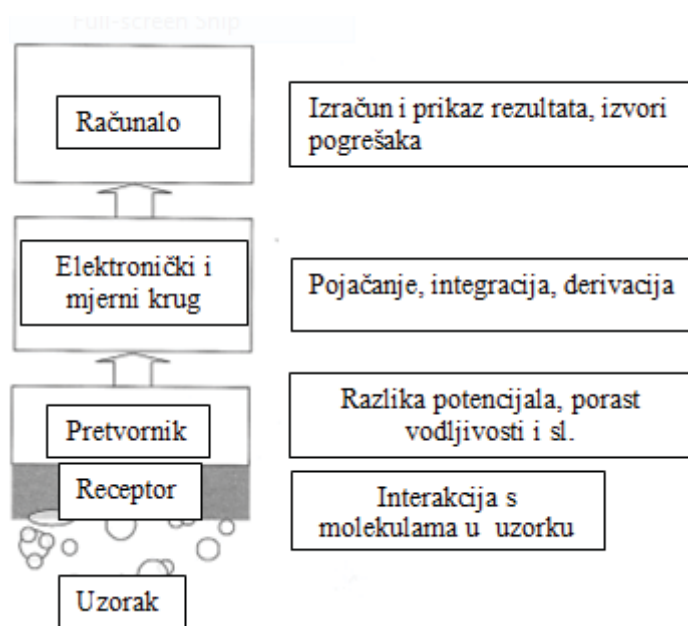
Kombinacija antocijanina na filmu na bazi celuloze pokazala se kao učinkoviti senzor za detekciju znoja i određivanje uree [7,8].

Za definiranje svojstava prirodnih materijala za moguću uporabu u optičkim sensorima vrlo je važna spektroskopska karakterizacija, pri čemu se najčešće koriste UV-Vis spektroskopija, fluorescencija, reflektancija te kolorimetrija. UV-Vis spektrom se mogu karakterizirati apsorpcijska svojstva pigmenta, te njegova obojanost. Reflektancijom se također može pratiti promjena na pigmentu, koja može u konačnici pokazati stanje pigmenta u biljkama. Pravilnom ekstrakcijom pigmenta te spektroskopskom karakterizacijom može se usmjeriti konstruiranje nosivog senzora za praćenje promjene pH. Nosivi biokemijski senzori na temelju prirodnih materijala imaju sve veći interes zbog netoksičnosti te razgradivosti [3].

2. Opći dio

2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzor je uređaj koji transformira kemijske informacije, primjerice koncentraciju specifične komponente uzorka ili ukupni sastav uzorka, u analitički koristan signal. Princip rada prikazan je na slici 1. Danas imaju primjenu u prehrambenoj industiji, u zdravstvu, sportu i šire [9].



Slika 1. Shema tipičnog kemijskog senzora [9]

2.1.1 Elementi kemijskog senzora

Prema IUPAC-u kemijski senzori obično sadrže dvije osnovne komponente spojene u seriju – receptor za kemijsko (molekularno) prepoznavanje i fizikalno-kemijski pretvornik [9]. Neki senzori mogu uključivati separator, odnosno membranu. U receptorskom dijelu senzora kemijska informacija se pretvara u oblik energije koja se može mjeriti pretvornikom. Pretvornik je dio senzora koji transformira energiju koja nosi kemijsku informaciju o uzorku u koristan analitički signal, te kao takav nije selektivan. Receptorski dio kemijskih senzora može se temeljiti na različitim principima:

fizički gdje se ne odvija kemijska reakcija. Tipični primjeri su oni koji se temelje na mjerenju apsorbancije, indeksa loma svjetlosti, vodljivosti, promjene temperature ili mase.

kemijski u kojoj kemijska reakcija uz sudjelovanje analita dovodi do nastanka analitičkog signala.

biokemijski u kojem je biokemijski proces izvor analitičkog signala. Primjeri su

mikrobni potenciometrijski senzori ili imunosenzori. Oni se mogu smatrati podskupinom kemijskih, još se nazivaju i biosenzori [10].

Signal koji se dobiva u pretvornicima je izravno proporcionalan promjeni svojstva receptora, koja je potaknuta interakcijom receptora sa uzorkom. Pretvornici se često klasificiraju prema izlaznom signalu, kao pretvornici napona, struje ili otpora [9].

2.1.2. Klasifikacija kemijskih senzora

Prema IUPAC-u kemijski senzori mogu se klasificirati u sedam skupina temeljem pretvornika koji se koristi.

Optički senzori temelje se na mjerenju optičkih pojava uzrokovanim interakcijom analit-receptor. Mogu izravno mjeriti apsorpciju analita ili intenzitet luminiscencije koju emitira indikatorska molekula u receptorskom sloju [11]. Skupina se može dalje podijeliti prema vrsti optičkog svojstva koja je primijenjena u kemijskim sensorima:

- a) apsorpcija, mjerena u prozirnomo mediju, uzrokovana apsorpcijskom sposobnošću samog analita ili reakcijom s nekim prikladnim indikatorom.
- b) reflektancija se mjeri u netransparentnom mediju, obično pomoću imobiliziranog indikatora.
- c) luminiscencija, koja se temelji na mjerenju intenziteta svjetlosti emitirane kemijskom reakcijom s receptorom, emisija, koja je rezultat svjetlosne pobude. Također, selektivno gašenje fluorescencije može biti temelj takvih uređaja.

To također može uključivati učinak površinske plazmonske rezonancije.

- d) optotermalni učinak, koji se temelji na mjerenju toplinskog učinka uzrokovano apsorpcijom svjetla.

- e) raspršenje svjetlosti, koje se odvija na česticama određene veličine prisutnim u uzorku.

Primjena mnogih od ovih fenomena u sensorima postala je moguća zahvaljujući upotrebi optičkih vlakana u različitim konfiguracijama. Takvi uređaji se također nazivaju optode. Treba naglasiti da su optička vlakna koja se danas uobičajeno koriste samo tehnički uređaji primjenjivi u velikoj skupini optičkih senzora, koji se mogu temeljiti na različitim principima [10]. Prednost krutih kolorimetrijskih dijagnostičkih biosenzora je detekcija golim okom, što ih čini jednostavnim, ekonomski prihvatljivim, neinvazivnim i pogodnim za prvo upozorenje mogućih nepravilnosti, bez potrebe za sofisticiranom instrumentacijom i profesionalnim osobljem [1].

Elektrokemijski senzori pretvaraju elektrokemijsku interakciju analita na modificiranoj elektrodi u naponski ili strujni signal [11].

Električni senzori uređaji na temelju mjerenja gdje se odvijaju elektrokemijski procesi.

Senzori osjetljivi na masu temelje se na piezoelektričnim kristalima (kvarcni kristali) koji nose sloj sposoban za selektivnu adsorpciju sastojaka analita.

Magnetski senzori uređaji temeljeni na promjeni paramagnetskih svojstava plina koji se analizira. Zastupljeni u određenim vrstama monitora kisika.

Termometrijski senzori uređaji temeljeni na mjerenju toplinskih učinaka određene kemijske reakcije ili adsorpcije koja uključuje analit [9].

2.2. UV-Vis apsorpcijska spektroskopija

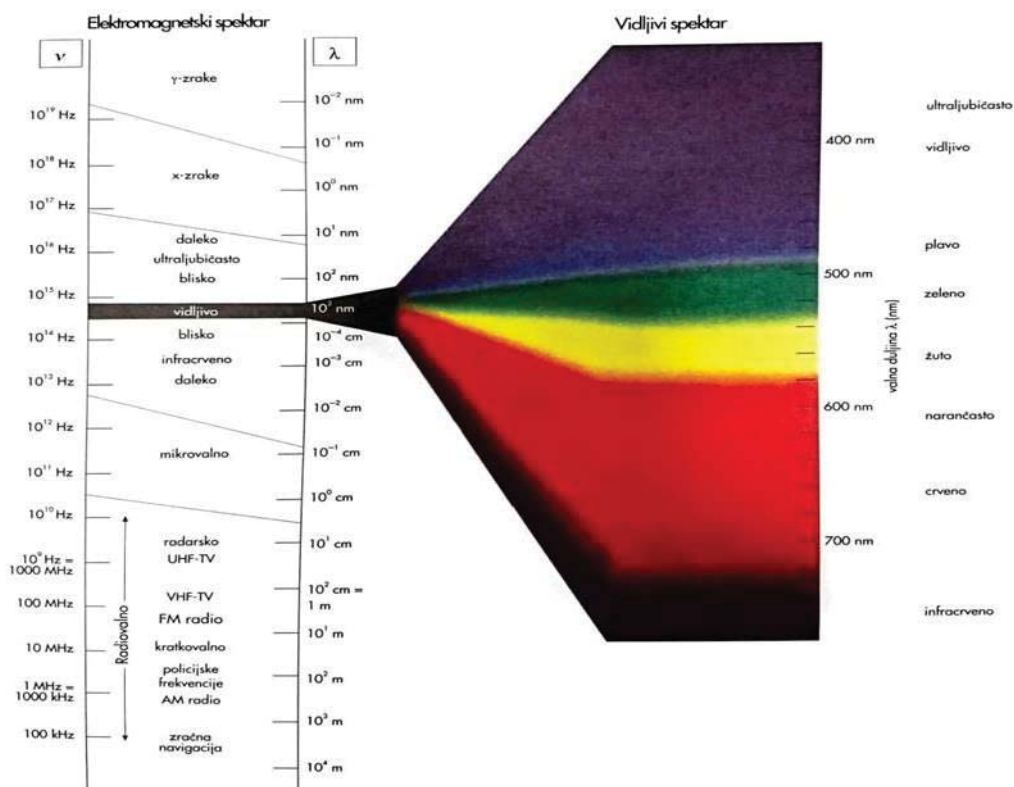
U spektroskopskom nazivlju apsorpcija je proces u kojemu neka kemijska vrsta prisutna u prozirnem mediju sredini selektivno prigušuje intenzitet neke frekvencije elektomagnetskog zračenja. Prema kvantnoj teoriji svaka elementarna čestica (atom, ion, molekula) ima jedinstven skup i raspored energijskih stanja, pri čemu je najniže među njima osnovno stanje. Apsorpcija fotona može nastati samo ako je energija fotona jednaka energijskoj razlici između osnovnog i nekog od viših energijskih stanja čestice. Pritom energija fotona ($h\nu$) prelazi u atom, ion ili molekulu dovodeći je u više energijsko pobuđeno (ekscitirano) stanje. Pobuđivanje vrste M u vrstu M^* može se opisati jednačicom [12]:



Spomenuto elektomagnetsko zračenje sastoji se od čestica energije zvanih fotona (ili kvanti) te obuhvaća veliko područje valnih duljina i energija (slika 2). Energija fotona ovisi o frekvenciji zračenja, a dana je jednačicom [12]:

$$E = h\nu \quad (2)$$

gdje je h Planckova konstanta i iznosi $6,63 \times 10^{-34}$ Js.



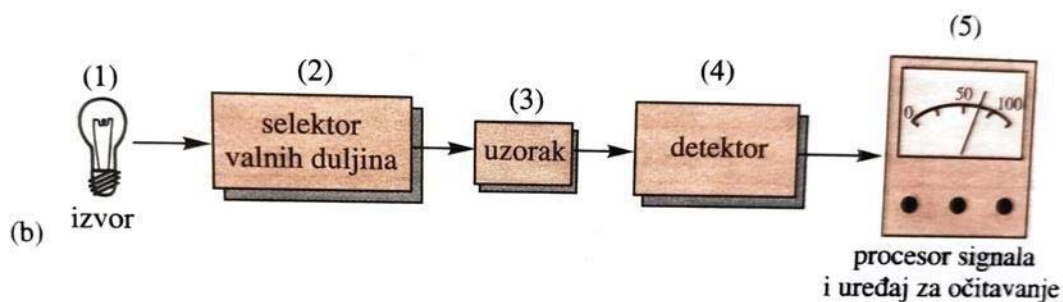
Slika 2. Prikaz valnog područja elektromagnetskog zračenja [13].

UV-Vis spektralno područje je konvencionalno podijeljeno u tri pod-domene - UV (185 – 400 nm), vidljivo (400 – 700 nm) i blisko infracrveno (700 – 1100 nm). Većina komercijalnih spektrofotometara pokriva spektralni raspon od 185 do 900 nm [13]. UV-Vis domena naširoko se koristi u kvantitativnoj analizi. Mjerenja se temelje na Lambert–Beerovom zakonu, koji pod određenim uvjetima povezuje apsorbanciju svjetla sa koncentracijom spoja u otopini prema izrazu:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \times l \times c \quad (3)$$

A apsorbancija, optički bezdimenzijski parametar, l je širina otopine odnosno kivete kroz koju prolazi upadna svjetlost izražena u cm, c je molarna koncentracija izražena u mol dm⁻³, a ε_{λ} molarni koeficijent apsorbancije L mol⁻¹ cm⁻¹, čija vrijednost ovisi o valnoj duljini na kojoj je mjerenje provedeno. Taj parametar, također nazvan molarna apsorbancija, karakterističan je za spoj koji se analizira i ovisi između ostalog o temperaturi i prirodi otapala [12].

Apsorbancija se mjeri na uređaju spektrofotometru. Dizajniran je s tri osnovna modula: izvor, disperzivni sustav (kombiniran u monokomatoru), koji čine optički dio i sustav detekcije. Ove komponente su tipično integrirane u jedinstveni okvir za izradu spektrometara za kemijsku analizu (slika 3) [13].



Slika 3. Shema apsorpcijskog spektrofotometra [12]

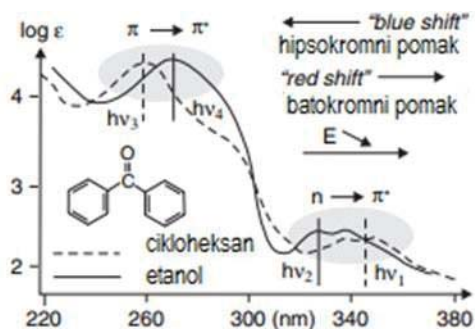
Većina je spektroskopskih uređaja sastavljena od pet osnovnih dijelova: (1) stabilnog izvora energije zračenja, (2) selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja, (3) jednoga ili više spremnika za uzorke, (4) detektora zračenja ili pretvornika energije zračenja u mjerljiv signal (najčešće električni) te (5) procesora signala uređaja za njegovo očitavanje [12].

U nastavku slijedi opis karakterističnih pojava u apsorpcijskom spektru koje služe za analizu i pobližem shvaćanju prirode analita.

2.2.1. Hipsokromni i batokromni pomak

Svako otapalo ima svoj karakterističan polaritet. Pošto je poznato da elektronski prijelazi mijenjaju distribuciju naboja spoja u otopini, očito je da će položaj i intenzitet apsorpcijskih vrpca malo varirati s prirodom korištenog otapala. Polarno otapalo će spontano okružiti polarnu molekulu uslijed elektrostatičkih interakcija. Stoga će za pobudu molekule biti potrebno uložiti više energije, čime se maksimum apsorpcije pomiče na kraće valne duljine, nego u slučaju s nepolarnim otapalom – hipsokromni pomak. To se pomicanje odvija u smjeru prema UV pa se naziva i *blue shift* [13].

Za manje polarne spojeve učinak otapala je slab. Ako se dipolni moment kromofora (funkcionalne skupine organskih spojeva odgovorne za apsorpciju u UV/Vis spektru) povećava tijekom prijelaza, konačno stanje će biti više solvatirano. Polarno otapalo tako može stabilizirati pobuđeni oblik, što pogoduje prijelazu (slika 4). Uočava se pomak apsorpcije prema dužim valnim duljinama, nego u slučaju s nepolarnim otapalom – batokromni pomak. Kako se pomicanje odvija u smjeru bliskog infracrvenog dijela spectra, naziva se *red shift* [13].



Slika 4. Primjer batokromnog i hipsokromnog pomaka benzofenona u otapalima različitim polarности - etanolu i cikloheksanu [13].

2.2.2. Utjecaj proširene konjugacije

Utjecaj proširene konjugacije na maksimum apsorbancije može se sažeti u pravilo da spoj koji sadržava veći broj konjugiranih dvostrukih veza apsorbira elektromagnetsko zračenje kod većih valnih duljina. Primjerice, β -karoten koji u svom π -sustavu ima 11 konjugiranih dvostrukih veza, apsorbira pri 454 nm, odnosno u vidljivom dijelu spektra, što odgovara apsorpciji plavog svjetla što rezultira narančastim obojenjem. Derivati karotena odgovorni su i za mnoge od boja koje srećemo kod voća, povrća i jesenskog lišća [14].

2.2.3. Utjecaj pH

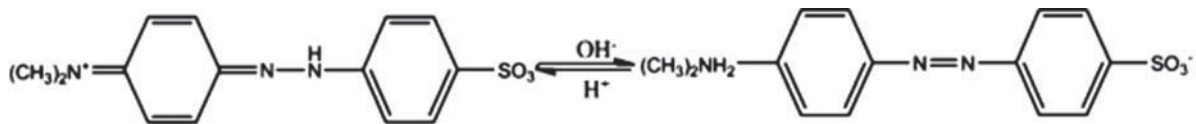
pH otapala može imati velik učinak na rezultirajući spektar kromofora. Među spojevima koji pokazuju ovaj učinak su kemijski pH indikatori, čija se promjena boje koristi tijekom acidimetrijskih mjerenja. Na temelju promjene maksimuma apsorbancije u različitim pH mogu se odrediti ekvivalentne, odnosno pK točke [13]. Vrijednost pH nekoga nepoznatog pufera određuje se dodatkom kiselog/ baznog indikatora i spektrofotometrijskim mjerenjem nastale otopine. Ukupna apsorbancija otopine pri bilo kojoj valnoj duljini jednaka je zbroju apsorbancija pojedinačnih komponenata u otopini. Taj odnos omogućuje određivanje koncentracija pojedinačnih komponenata smjese, čak i ako se njihovi spektri potpuno prekrivaju. Primjer za konstantu K_a ravnoteže hidratacije flavilijeveg kationa $[AH^+]$ pri ravnotežnim koncentracijama kinoidalne baze $[A]$ i vodikovih iona $[H^+]$ [15].

$$K_a = \frac{[H^+][A]}{[AH^+]} \quad (4)$$

iz toga slijedi

$$pK_a = -\log K_a \quad (5)$$

Najčešće korišteni indikatori u laboratoriju su metil oranž, fenolftalein, plavi i crveni lakmus papir. Metil oranž u kiselom pH je crvene boje, dok u lužnatom je žute boje (slika 5).



Slika 5. Struktura metil oranža pri kiselom i lužnatom pH [16]

Kao prirodni indikatori široku primjenu imaju antocijanini koji se mogu izolirati kao pigmenti iz voća, povrća i biljaka. Često korišteni u istraživanjima su crveni kupus, šipak, cikla, kurkuma [17].

2.3. Reflektancija

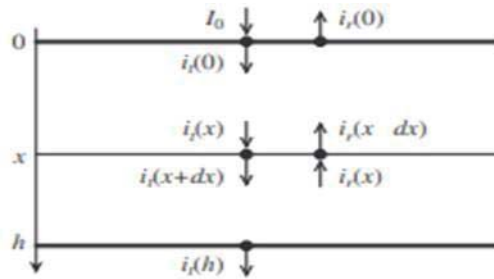
Spektroskopija refleksije je istraživanje spektralnog sastava površinski reflektiranog zračenja obzirom na njegovu kutnu ovisnost, intenzitet i sastav upadnog primarnog zračenja. Ako se pusti paralelni snop svjetlosti da padne na glatku površinu čvrstog materijala, javljaju se dva granična slučaja za reflektirani dio zračenja: ili se reflektira "spekularno" (to jest, kao od zrcala), ili se reflektira u svim smjerovima polutke jednoliko. U prvoj slučaju, površina je idealno reflektirajuća (polirana) površina, dok je u drugom slučaju to idealna mat (raspršujuća) površina. Ova dva idealna granična slučaja za površine nikada se ne postižu u praksi [18]. Kada se radi o mjerenjima na neprozirnim materijalima, različiti parametri igraju važnu ulogu definicija spektralnih značajki. Zrcalna komponenta je dio reflektiranog zračenja koji nije prodrlo u sloj boje, dok je difuzna komponenta onaj dio zračenja koji je prodrlo u sloj boje i stupa u interakciju s jednom ili više čestica pigmenta. Refleksija volumena sa sobom nosi glavnu spektralnu informaciju koje se koriste za identifikaciju materijala. Spektri refleksije mogu se izraziti kao prividna apsorbancija:

$$A' = \log \left(\frac{1}{R} \right) \quad (6)$$

ili kao Kubelka-Munk (KM) funkcija od homogenog materijala beskonačne debljine dana jednadžbom:

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1-R_{\infty})}{2R_{\infty}} = \frac{k}{s} \quad (7)$$

gdje su parametri k i s koeficijenti apsorpcije i raspršenja. R_{∞} je difuzno dobivena refleksija [19]. Ova jednačba pretpostavlja da je upadno zračenje monokromatsko, procesi raspršenja ne pokazuju ovisnost o valnoj duljini, a dva parametra k i s su konstantni u homogenom sredstvu. Obje formule pokušavaju prikazati odnos između intenziteta apsorpcije i koncentracije spoja na linearan način [20].



Slika 6. Prikaz Kubelka- Munk teorije [24].

Homogeni sloj debljine h karakteriziran je svojim koeficijentom apsorpcije k i koeficijentom raspršenja s . U ovom sloju difuzno zračenje i_r širi se prema gore i difuzno zračenje i_t se širi prema dolje. i_r i i_t su funkcije njihove dubine x u sloju. Dubina 0 odgovara granici sloja primanja upadnog zračenja I_0 . Dubina h označava granice drugog sloja supstrata. Proizvoljna dubina x je podsloj infinitezimalne debljine dx . Prima zračenje prema dolje $i_t(x)$ s jedne strane i zračenje prema gore $i_r(x+dx)$ na drugoj strani. U podsloju, na poziciji x , iz oba zračenja $i_r(x)$ i $i_t(x)$ se raspršuje unatrag, što dovodi do izmjene svjetla [20].

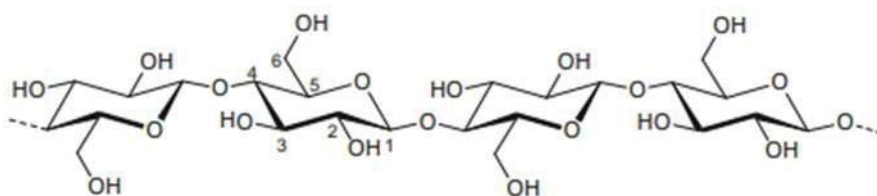
Fenomenološka teorija KM široko se koristi za izračune višestrukog raspršenja u industriji boja, podrazumijeva određene pretpostavke i stoga ima nekoliko ograničenja. Najznačajnija pretpostavka je izotropno raspršenje unutar uzorka. Upadno zračenje i njegova reflektirana komponenta moraju biti difuzni i bez stvaranja zračenja, poput fluorescencije i srodnih procesa [21]. Koriste se modeli kako bi se proširila KM teorija zbog njenog ograničenja [22].

2.4. Primjena prirodnih materijala u pH senzorima

U povijesti kao prirodni pH indikatori koristili su se grožđe, dud, crveni kupus i mnogi drugi. Vizualni indikatori su tvari koju u otopinama mijenjaju boju ovisno o karakteristikama otopine kao što je pH, električni potencijal, adsorpcija na krutim tvarima i kompleksiranje s metalnim ionima. Robert Boyle je prvi u 17. stoljeću proučavao prirodne indikatore na biljci ljubičice pripremom likera. Uočio je da ekstrakt pocrveni u kiselj otopini, u lužnatoj pozeleni. Na bijeli papir je nakapao liker i ocat, čime se liker obojao crveno. Tako su dobivena prva dva prirodna indikatora na papiru i otopini. Wiliam Lewis 1767. godine upotrijebio je biljne ekstrakte za određivanje krajnjih točaka u neutralizacijskim titracijama. Biljke koje su mijenjale boje ovisno o pH otopine nazvane su antocijanini (grč. *anthos* - cvijeće, *kianos* - plavo). Antocijanini imaju crvenu boju u kiselom, ljubičastu u neutralnom i modru u lužnatom. Daljnja istraživanja omogućila su da se danas iz prirodnog voća i biljaka mogu izolirati prirodne boje koje bi našle primjenu kao pH indikatori u senzorima, prehrambenoj industriji, zdravstvu i šire [23].

Rastuća globalna ekološka i socijalna zabrinutost, visoki postotak iscrpljenosti naftnih resursa i novi ekološki propisi nametnuli su potragu za novim kompozitima, kompatibilnim s okolišem. Polimerne matrice prirodnog podrijetla naveliko se istražuju radi potencijalne zamjene sintetičkih kompozitnih vlakana. Od posebnog su interesa polimeri dobiveni iz poljoprivrednog otpada. Biokompoziti (kompoziti od prirodnih vlakana) od lokalnih i obnovljivih resursa potiču značajnu održivost, ekološku učinkovitost i zelenu kemiju. Svojstva prirodnih vlakana ovise o prirodi biljke, lokalitetu u kojem se razvija, starosti biljke i korištenoj metodi ekstrakcije. Kompoziti od prirodnih vlakana korišteni su za različite konstrukcijske primjene zbog visoke specifične čvrstoće, među kojima prednjače celuloza i lignin [24]. Senzori na bazi celuloze su nedavno privukli više pažnje za praćenje okoliša i biomedicinske primjene zbog atraktivnih prednosti - biokompatibilnost, visoka sposobnost bubrenja, obnovljivost, visoka adsorpcija, niska cijena, necitotoksičnost, biorazgradivost i visoka aktivnost. Nadalje, celuloza se lako može kemijski modificirati ugradnjom kemijskih skupina u strukturu. Većina navedenih prednosti mogu se pripisati mikrofibrilnoj strukturi celuloze, koja omogućava veliku površinu. Također, visoka poroznost celuloznih materijala dovodi do brze difuzije molekula analita što pridonosi visokoj osjetljivosti senzora [8].

Celuloza se sastoji od D- glukopiranoznih prstena u četiri C1 konfiguraciji stolice, koja pokazuje najnižu energetska konformaciju (slika 7). Takve jedinice su povezane β -1,4-glikozidnim vezama što rezultira naizmjeničnim okretanjem osi celuloznog lanca za 180° . Tri reaktivne hidroksilne skupine postoje u svakoj anhidroglukoznoj jedinici unutar celuloznog lanca. Primarna skupina na C6 i dvije sekundarne grupe na C2 i C3, koje su smještene u ravnini prstena. Polimer celuloze formiran polikondenzacijom ima kemijski različite krajeve. Jedan kraj ima anomerni C atom povezan glikozidnim vezama (nereducirajući kraj). Drugi kraj ima D-glukopiranoze u ravnoteži sa aldehidnom funkcijom (reducirajući kraj). Promjene u molekularnoj strukturi potječu od hidrolize ili oksidacije celuloznog lanca. Reakcije se događaju na površini fibrila ili u amorfnom području [6].



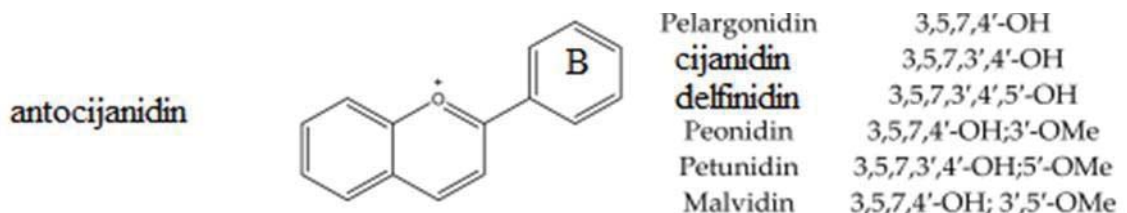
Slika 7. Prikaz strukture celuloze [6]

2.5 Antocijanini

Antocijanini su u vodi topljivi pigmenti, koji pripadaju podskupini velikih sekundarnih biljnih metabolita koji se nazivaju flavonoidi. Flavonoidi imaju dva aromatska prstena povezana središnjim C-3 piranskim prstenom (slika 8). Molarna masa iznosi $449,2 \text{ g mol}^{-1}$, a molekulska formula glasi $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$. Uobičajeni flavonoidi su antocijanini, auroni, kalkoni, žuti flavanoli, flavoni, nebojeni flavanoli, flavanoni, dihidroflavonoli, dihidrohalkoni, leukoantocijanidini, katehini, flavani, i izoflavonoidi [2,23,25].

Antocijanini su podložni modifikaciji hidroksilacijom, metilacijom, glikozilacijom i aciliranjem. Postepenom hidroksilacijom boja antocijanina postaje sve modrija, dok metilacijom postaje crvenija. Metilacija B-prstena dovodi do niske osjetljivosti na oksidaciju i stabilizaciju antocijana. Metil-modificirani flavonoidi često se nalaze na površinama lišća i cvijeća. Glikozilacija antocijanina dovodi do hipsokromnog pomaka maksimuma u apsorpcijskom spektru i povećava njegovu stabilnost za skladištenje u vakuolama. Aciliranje također povećava stabilnost i topljivost antocijana [4].

Antocijanini s većim brojem acilnih skupina pokazuju dobru stabilnost na temperaturi i svjetlosti. Tako cijanidin-3-glukozid, često nađen u crvenom kupusu, može svoju stabilnost i postojanost zahvaliti značajnoj količini mono- ili diacilarnog cijanidina [2].

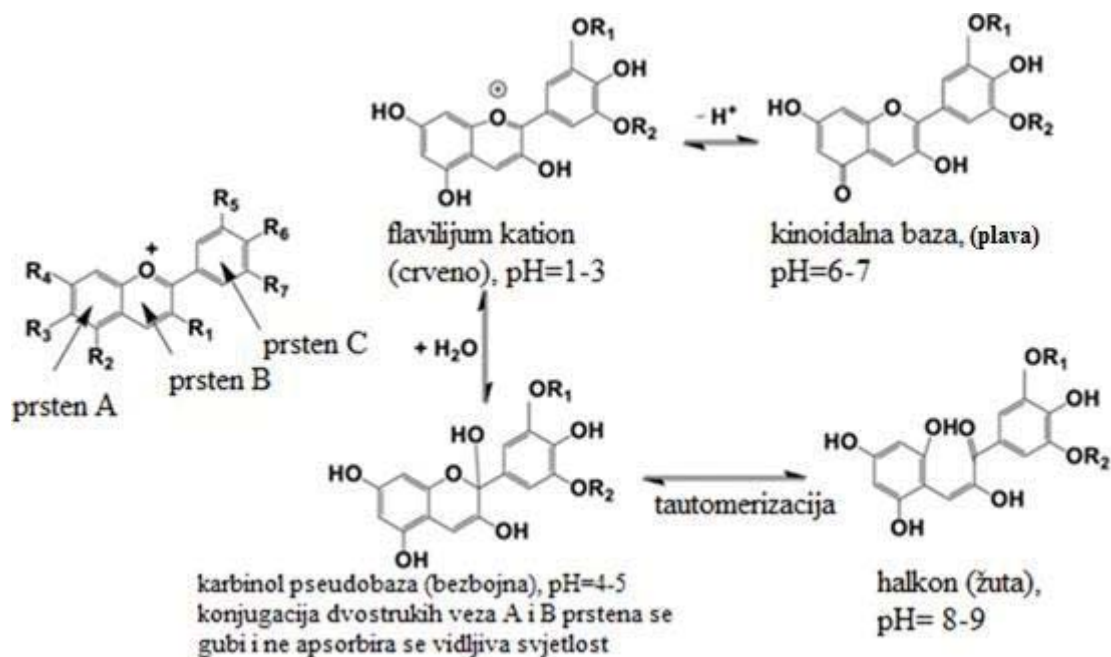


Slika 8. Prikaz strukture antocijanidina s nazivima vrsta i položajem supstituenta

2.5.1. Svojstva antocijanina

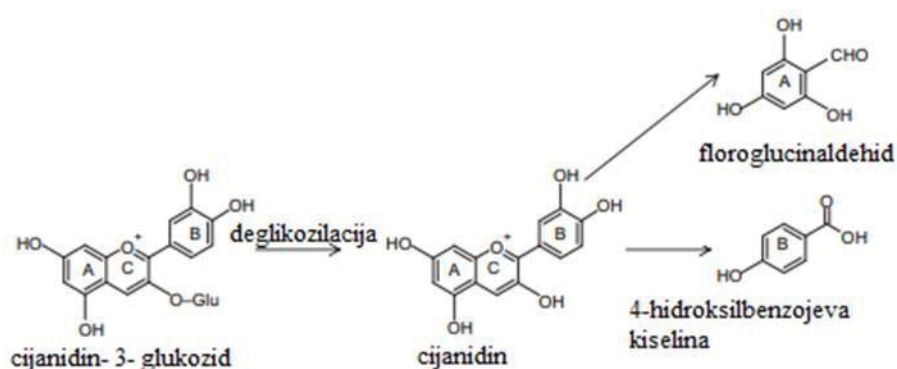
Antocijanini mogu imati različite strukturne oblike, koji su različito obojeni. Na ravnotežu može utjecati nekoliko čimbenika, ističući među njima temperaturu, pH vrijednost i interakcije s drugim tvarima [23].

U kiselom mediju (pH = 1-2) prisutan je stabilan flavilijev kation. Kako se pH povećava, dolazi do kompeticije između hidratacije flavilijevog kationa i protoniranja hidroksilnih skupina (slika 9). Pri pH = 4, hidratacijom nastaje bezbojna karbinol pseudobaza, koja zbog gubitka dvostruke veze između A i B prstena ne apsorbira u vidljivom dijelu spektra [15]. Pri pH > 8 dolazi do otvaranja C prstena karbinol pseudobaze i stvaranja nestabilnog *cis*-halkona, koji izomerizira u stabilniji *trans*-halkon žute boje. Deprotoniranjem flavilijeva kationa pri neutralnim uvjetima nastaje kinoidna baza modre boje [5,23].



Slika 9. Oblici antocijana pri različitom pH [26]

Vrlo je važan faktor temperatura jer se izolacija antocijanina provodi sušenjem biljaka, voća i povrća u kojima se nalaze. Poznato je da temperatura utječe na biosintezu antocijanina u biljkama. U ružama, hlađenjem pupova se potiče pigmentacija, dok visoka temperatura rezultira nižom koncentracijom antocijanina, uslijed degradacije [27]. Aktivnosti prisutnih enzima pri višim temperaturama također može dovesti do promjena pigmenta, odnosno boje latica [28,29].



Slika 10. Mehanizam toplinske razgradnje cijanidina-3-glukozida [30]

Deglikozilacijom se cijanidin-3- glikozid raspada na cijanidin koji daljnjim raspadom može ići do 4-hidroksilbenzojeve kiseline i floroglucinaldehidom [30].

Za primjenu iz prirodnih izvora najčešća metoda izolacije antocijanina jest ekstrakcija u otapalu. Antocijanini su polarni spojevi, pa se za ekstrakciju najčešće koriste etanol, metanol, mravlja kiselina, aceton i voda pri kiselim uvjetima. Kako je flavilijev kation ($\text{pH} = 1\text{-}2$) najstabilniji, ekstrakcija se najčešće provodi u kiselom, no u tu svrhu upotreba HCl-a je ograničena jer može doći do razgradnje antocijanina [4,25]. Istraživanjem sinergičnog učinka HCl-a i etanola, stupanj ekstrakcije povećavao se s povećanjem koncentracije etanola u zakiseljenoj vodi do 50% (v/v) nakon čega je zabilježen pad. Najveći stupanj ekstrakcije postignut je s acetonom, potom zakiseljenim metanolom i etanolom. No za primjenu antocijanina u prehrambenoj industriji metanol i aceton nisu povoljni, stoga se kao ekstrakcijski medij najviše koristi etanol [25].

Još jedan važan čimbenik koji kontrolira rast, razvoj i metabolizam je svjetlost. Biljke su razvile izuzetno delikatan mehanizam prijenosa svjetlosnog signala te mogu primati svjetlost različitim fotoreceptorima, uključujući receptore za plavo/ultraljubičasto (UV)-A svjetlo. Prisutnost svjetlosti pospješuje nakupljanje antocijanina jer potiče ekspresiju mnogih gena biosinteze antocijana [31].

Za razliku od većine drugih flavonoida, antocijanini apsorbiraju fotone vidljivog dijela sunčevog spektra. Ako antocijanini mogu kontrolirati svjetlosno okruženje unutar lista, tada imaju potencijal regulirati fotosintezu i ograničiti fotoinhibiciju. Varijacije u optičkim svojstvima lišća antocijana mogu biti povezane s razlikama u položaju pigmenta unutar tkiva lista. Antocijanske boje pokazuju apsorpciju u vidljivom području, na valnim duljinama između 450 - 580 nm. Pročišćeni ekstrakti antocijana u zakiseljenom metanolu obično apsorbiraju zeleno-žuto svjetlo između 500 i 550 nm [32,33].

2.5.2. Primjena antocijanina

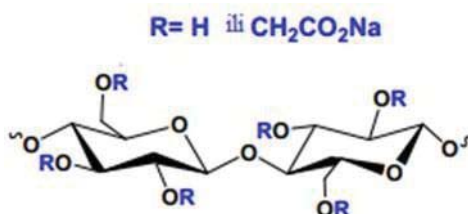
Brojna istraživanja prirodnih pigmenata su pokazala velik broj korisnih svojstava antocijanina. Jedno od njih je antioksidativna učinkovitost. Zbog konjugirane dvostruke veze, oksonijevog iona na C prstenu i hidroksilnih skupina, antocijanini hvataju slobodne radikale, koji uzrokuju oštećenja i bolesti. Brojne studije otkrile su antimikrobno djelovanje antocijanina, koja se pripisuju razaranju molekula polisaharida s vanjske membrane Gram-negativnih bakterija. Antocijanini također mogu utjecati na metabolizam mikroba uskraćujući organizmu supstrate potrebne za njegov rast. Također se spominju antikancerogeno djelovanje

potiskivanjem angiogeneze stanica raka te antidijabetičko djelovanje tako da cijanidin stimulira lučenje inzulina i ekspresiju gena β -stanica gušterače [4].

Glavna primjena antocijanina je u prehrambenoj industriji kao prirodna bojila - od crvene, modre, ljubičaste, ružičaste. No primjena je ograničena zbog njihove visoke reaktivnosti i destabilizirajućih interakcija s drugim molekulama. Kako bi se povećala stabilnost, provodi se kopigmentacija, kompleksiranje s raznim metalnim ionima i acilacija s raznim organskim kiselinama [4]. Posljednjih godina, opsežno su proučavani kako bi se mogli koristiti kao aktivni elementi u biokompatibilnim pH sensorima za praćenje kvalitete prehrambenih proizvoda u stvarnom vremenu [3].

2.6. Karboksimetilceluloza

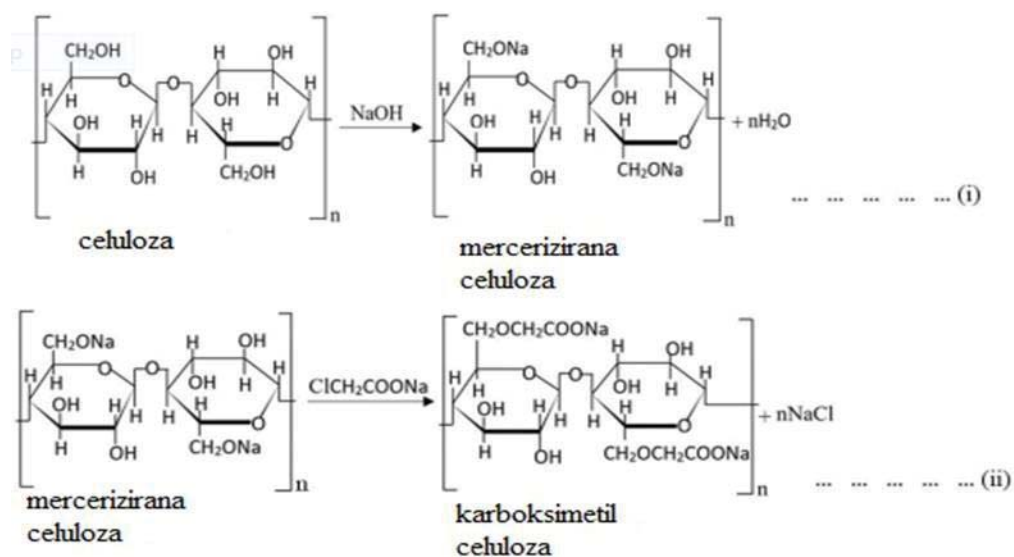
Karboksimetil celuloza (engl. *carboxymethyl cellulose*, CMC) jedan je od najperspektivnijih anionskih derivata celuloze, topljivih u vodi. Ponavljajuće jedinice povezane su β -1,4- glikozidnim vezama. Na molekulskoj razini, glavna razlika između CMC i celuloze je samo anionska karboksimetil skupina ($-\text{CH}_2\text{COOH}$), kao što je prikazano na slici 11 [34].



Slika 11. Prikaz strukture karboksimetil celuloze [35]

2.6.1. Sinteza i svojstva CMC

Karboksimetilacija celuloze izvodi se u dva koraka (slika 12). U prvom koraku, prethodno pročišćeni ekstrakti celuloze se miješaju s alkalnim reagensom npr. NaOH, čime se celuloza mercezira. Prilikom toga se hidroksilne skupine iz svake anhidroglukozne jedinice supstituiraju $-\text{ONa}$ skupinama. fizikalno-kemijska svojstva. Inertno otapalo, kao što je etanol, 2-propanol, izopropil alkohol ili izobutil alkohol, dodaje se u ovom koraku kao razrjeđivač i kao sredstvo za bubrenje, koje olakšava prodiranje reagensa u strukturu celuloze. Sljedeći korak je eterifikacija, gdje se dodaje natrijev kloroacetat za dobivanje čvrste suspenzije CMC-a. Slijede procesi pročišćavanja, poliranja, neutraliziranja te konačnog sušenja [34].



Slika 12. Kemijska reakcija sinteze karboksimetil celuloze iz celuloze [34]

Kod derivata celuloze važno je istaknuti tzv. stupanj supstitucije (engl. *degree of substitution*, DS). DS vrijednost je definirana kao prosječni broj supstituenata po jedinici u polimernom lancu. Tijekom sinteze CMC iz celuloze, vrijednost DS određena je brojem karboksimetilnih skupina vezanih za svaku anhidroglukoznu jedinicu. DS igra ključnu ulogu u svojstvima, kao što su topljivost, emulzibilnost, zgušnjavanje, otpornost na kiseline, viskoznost, stabilnost, stvaranje kompleksa. Veći DS CMC-a kao i jednolikost supstitucije rezultira boljom topljivošću u vodi [34]. Vrlo neravnomjerno supstituirani CMC je tiksotropan, odnosno miješanjem gubi viskoznost [6]. Pri niskom DS-u može doći do agregiranja nesupstituiranih jedinica koji čine vrlo nabubrene makrogelove i mogu dovesti do neželjenih svojstava [36].

CMC je polimerni materijal te otopljen u vodi čini viskoznu otopinu tako da parametar viskoznosti igra ključnu ulogu u opisivanju ponašanja tekućine, svojstava (zgušnjavanje, emulgiranje) i primjene. Stupanj viskoznosti ovisi o veličini čestica, molekularnoj težini i uvjetima sinteze. Tip niske viskoznosti koristi se kao vezivo vlage u prehrambenoj industriji, dok se tip visoke viskoznosti koristi kao sredstvo za geliranje [34].

2.6.2. Primjena CMC

Zbog svoje mehaničke čvrstoće, hidrofилности, viskoznosti, biokompatibilnosti, jeftine sinteze i lake dostupnosti, CMC nalazi primjenu u mnogim industrijama. U prehrambenoj kao emulgator, zgušnjivač i za vezivanje vlage, u tekstilnoj za tkanje tekstila i završnu obradu, dok se u farmaceutskoj industriji CMC hidrogelovi i filmovi koriste u sustavima za isporuku

lijekova ili kao upijajuće podloge. U biomedicini nalazi primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva, oblogama za rane i izradi implatanata. U procesima obrade vode, hibridni kompozit na bazi CMC-a, koriste se za uklanjanje zagađivala i metalnih kationa [34]. Primjer upotrebe celuloze kao senzora je film polivinil alkohola/ natrij karboksimetil celuloze dopirana antocijaninom crvenog kupusa. Također imobiliziran antocijanin na bakterijskoj celulozi u jestvom pH senzoru. Sama celuloza može biti kemijski modificirana, te se koristi kao senzor plina i vlage, UV senzor, kapacitivni senzor [37].

3. Eksperimentalni dio

Obzirom da antocijanini mijenjaju boju u širokom području pH, ispitana je njihova mogućnost korištenja kao senzora načinjenog od prirodnih, biokompatibilnih i razgradivih materijala. Antocijanini su ekstrahirani iz crvenog kupusa, određena im je koncentracija u ekstrahiranoj otopini te su konačno imobilizirani u filmove. Prvotno je provedena spektroskopska analiza antocijanina u otopini, potom i antocijanina imobiliziranih u karboksimetilceluloznim filmovima (u daljnjem tekstu CMC) izrezanim u trakice ili nanesenih na pokrovna stakalca.

Kiselo-bazna svojstva filmova izrezanima u trakice okarakterizirana su UV-Vis spektroskopijom, dok su filmovima nanesenim na pokrovna stakalca okarakterizirana reflektancijskom analizom.

3.1. Potrebne kemikalije, posude i instrumentacija

Ekstrakcija:

- kemikalije – etanol 96%, destilirana voda, crveni kupus
- posude - daska za rezanje, nož, laboratorijska čaša
- instrumenti – mehanička mješalica Nutribullet

Filtracija:

- kemikalije - 0,1 M HCl, NaOH, EtOH: H₂O, v/v = 1:1, smjesa antocijanin/EtOH/H₂O
- posude - Büchnerov lijevak, kapalica
- instrumenti – aparatura s Büchnerovim lijevkom za vakuumsku filtraciju, centrifuga MLW T23D

UV-Vis spektroskopija:

- kemikalije - puferske otopine, smjesa antocijanin/EtOH/H₂O (v/v = 1:1), destilirana voda, tetraetilortosilikat (TEOS)
- posude - kvarcna kiveta l = 1 cm, automatska mikropipeta, kapalica
- instrumenti - Shimadzu spektrofotometar, pH-metar Iskra MA 5740, pH gel elektroda, Laboxaet rotavapor

Imobilizacija:

- kemikalije – karboksimetilceluloza (CMC), smjesa antocijanin/EtOH/H₂O, puferske otopine, destilirana voda
- posude - špahtlica, ravnalo, Petrijeve zdjelice, kvarcna kiveta l = 1 cm, pokrovna stakalca 18 × 18 mm
- instrumenti - Shimadzu spektrofotometar, magnetska mješalica Heidolph MR Hei- Standard, ultrazvučna kupelj Transsonic 460/H, Oceans Optics Flame spektrofotometar

3.2. Ekstrakcija crvenog kupusa

Kao izvor antocijanina poslužio je crveni kupus, kupljen u lokalnom Spar dućanu. Od kupusa očišćenog od prvih listova, na dasci za rezanje izrezano je i na analitičkoj vagi izvagano 50,35 g listova. Izvagana količina stavljena je u laboratorijsku čašu i u nju je dodana otopina etanola i vode u omjeru $V/V = 1:1$. Tako pripremljena smjesa usitnjavana je u multipraktiku Nutribullet 1 minutu. Ljubičasta otopina je smještena na magnetsku miješalicu pri čemu je u nju uronjena gel pH elektroda, spojena na pH metar Iskra MA 5740. Otopina 1 M HCl je dokapavana u otopinu antocijanina do $pH \approx 2$, pri čemu ona promijeni boju u jarko crvenu. Ekstrakcija u kiseloj mješavini alkohola i vode te mehaničko usitnjavanje listova u Nutribulletu provodi se radi efikasnijeg i bržeg izdvajanja antocijanina cijanidin-3-glukozida [6]. Kako bi se dodatno homogenizirala, takva zakiseljena otopina stavljena je u ultrazvučnu kupelj na 90 minuta. Praćena je temperatura pomoću termometra, zbog mogućnosti raspada antocijanina u otopini pri temperaturama višim od 100°C [39], te je po potrebi u kupelj dodavan led. Nakon homogeniziranja, otopina je skladištena u hladnjaku.

3.3. Filtracija matične otopine antocijanina

Idući dan dobivena smjesa usitnjenih listova crvenog kupusa prvo je filtrirana preko Büchnerovog lijevka. Zaostali talog crvene boje na filter papiru ispiran je otopinom za ekstrakciju (EtOH: H₂O, v/v = 1:1), do bijele boje. Nakon prvog filtriranja, filtrat se stavi u bočice za centrifugiranje, na brzinu 1500 okretaja po minuti, 15 min. Nakon centrifugiranja,

automatskom mikropipetom izvađen je supernatant iznad zaostalog taloga. Provedena je dodatna filtracija preko lijevka s poroznim dnom te se taj filtrat skladišti u hladnjaku za daljnu uporabu.



Slika 13. Prikaz zakiseljene otopine antocijanina nakon ekstrakcije i filtracije

3.4. Postupak koncentriranja matične otopine antocijanina

U svrhu povećanja koncentracije matične otopine antocijanina korišten je rotavapor Laboxaet. Temperatura je iznosila 85 °C te tlak 500 - 550 mbar. Uparavanje je trajalo 4 sata, zbog nastojanja da se temperatura drži što nižom, kako se antocijanin ne bi razgradio [30]. Nakon uparavanja, koncentracija je određena prema postupku opisanom u dijelu 3.6. pod a).

3.5. Izrada pH senzora s imobiliziranim antocijaninom

U svrhu izrade pH senzora, antocijanin je imobiliziran u film na bazi CMC i tetraetilortosilikata (TEOS). Zbog zamućenosti filmova i otežane spektroskopske karakterizacije, antocijanin je naknadno imobiliziran u CMC, bez uključivanja TEOS-a, kako bi se dobili transparentni i intenzivnije obojeni filmovi. Korištena je otopina antocijanina čija je priprema opisana u dijelu 3.2. i 3.3.

3.5.1. Imobilizacija antocijanina u film na bazi CMC i TEOS-a

Pripremljene su dvije otopine – A i B. Za pripremu otopine A izvagan je 1 g CMC te, zbog sporog otapanja, u obrocima dodan u prethodno zagrijanih 10 mL destilirane vode na magnetskoj miješalici. Otopina je zagrijavana na magnetskoj miješalici oko 1 sat uz snažno miješanje špahtlicom do potpunog otapanja CMC. Otopina B je sol-gel na bazi TEOS-om,

pripremljena prema tablici. U Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 5 mL TEOS-a i 1,5 mL 0,1 M HCl te miješano na magnetskoj mješalici 1 sat. Nakon što je smjesa ohlađena na sobnu temperaturu, dodano je 5,5 ml matične otopine antocijanina. Otopine A i B su potom sjedinjenje te je miješanje nastavljeno je na magnetskoj mješalici, a kasnije i na ultrazvučnoj kupelji. Konačna koncentracija antocijanina u smjesi procijenjena je na 90 mg/L. Nakon sat vremena homogeniziranja dobivena ljubičasta sol-gel smjesa pažljivo je prelivena u Petrijevu zdjelicu, pazeći pritom na ravnomjernost po cijeloj podlozi. Petrijeva zdjelica s filmom skladištena je u hladnjaku na 4 °C.

Tablica 1. Priprema smjese CMC i sol-gel otopine TEOS-a

Otopina A	Otopina B
1 g CMC	5 mL TEOS
10 mL H ₂ O	1,5 mL 0,1 M HCl
	5,5 mL matične otopine antocijanina

3.5.2. Imobilizacija antocijanina u film na bazi CMC

Priređene su dvije smjese različitih masenih udjela antocijanina prema tablici. Na analitičkoj vagi izvagana je određena masa CMC i u obrocima dodana u prethodno zagrijani određen volumen destilirane vode, odnosno izravno u matičnu otopinu antocijanina za **smjesu 2**, na magnetskoj mješalici na 1 sat. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu u **smjesu 1** dodan je volumen matične otopine antocijanina. Obje smjese su potom homogenizirane na ultrazvučnoj kupelji. Ukupan volumen **smjese 1** pažljivo je preliven u Petrijevu zdjelicu i skladišten u hladnjaku na 4 °C. Priređena je dodatna količina **smjese 1** prema tablici 2 za nanošenje na stakalca. Maseni udjeli antocijanina u smjesama izračunati su prema tablici 3.

Tablica 2. Postupak pripreme smjese 1 i 2 kod pripreme filma Acy/ CMC

	Smjesa 1	Smjesa 2
Masa CMC / g	1	1
Volumen vode / mL	10	-
Volumen matične otopine antocijanina / mL	3,3	30

Tablica 3. Posupak računanja masenog udjela antocijanina iz masene koncentracije

	Smjesa 1	Smjesa 2
γ (otopine antocijanina) / mg/L	312,27	369,88
Izraz za izračun masenog udjela antocijanina	$w = \frac{\gamma(\text{Acy}) * V(\text{ot.})}{m(\text{ot.}) + m(\text{CMC}) + m(\text{H}_2\text{O})}$	
w (antocijanina) / %	0,0073	0,0358

3.5.3. Priprema stakalca s otopinom antocijanina

Za usporedbu optičkih svojstava u različitim pH, priređena su stakalca s antocijaninom koji nije imobiliziran u CMC filmu. Po tri obroka od 0,05 mL (ukupni volumen, 0,15 mL) otopina antocijanina koncentracije 369,88 mg/L, pripremljena po postupku opisanom u 3.3. i 3.4. nakapana je na sredinu pokrovnih stakalca dimenzija 18 × 18 mm. Stakalca su sušena preko noći na zraku, pri sobnoj temperaturi. Prosječna masa antocijanina izračunata je prema tablici 4.

Tablica 4. Postupak računanja mase antocijanina iz volumena otopine i masene koncentracije

Ukupni volumen otopine antocijanina / mL	0,15
γ (otopine antocijanina) / mg/L	369,88 ≈ 370
Izraz za izračun mase antocijanina	$m = \gamma(\text{otopine}) \times V(\text{otopine})$
m (antocijanina) / mg	0,0555

3.5.4. Priprema stakalaca s imobiliziranim antocijaninom u CMC filmu

Smjese priređene prema postupku opisanom u dijelu 3.5.2. nanosene su na sredinu pokrovnih stakalca dimenzija 18 × 18 mm pomoću špahtlice. U svrhu pripreme različitih debljina filmova, a ujedno i različitog udjela antocijanina, pripremljeno je tri seta stakalaca s tri različite mase smjesa, prema tablici 5. U Tablici 5 je prikazan i izračun prosječne mase antocijanina na setovimastakalca.

Tablica 5. Postupak dobivanja različitih masa antocijanina na stakalcima

	Niža količina	Srednja količina	Visoka količina
Smjesa	Smjesa 1	Smjesa 2	Smjesa 2
Prosječna masa smjese / g	0,12	0,15	0,40
Maseni udio antocijanina u smjesi / %	0,0073	0,0358	0,0358
Izraz za izračun mase antocijanina na stakalcu	$m(\text{antocijanin}) = w(\text{antocijanin}) * m(\text{smjesa})$		
Prosječna masa antocijanina na stakalcu / mg	0,8478	5,5844	14,3179
Omjer masa antocijanina na stakalcu	1 : 7 : 17		

Stakalca s antocijaninom osušena su u hladnjaku na 4 °C preko noći.

3.6. UV-Vis spektroskopska karakterizacija

a) Određivanje koncentracije antocijanina u otopini

U svrhu određivanja koncentracije antocijanina u filtratu nakon ekstrakcije, kao i nakon uparavanja matične otopine, snimljeni su UV-Vis spektri u puferkim otopinama pH = 1,47 i pH = 4,81. Otopina je razrijeđena 50 puta u kiveti od 3 mL.

Spektroskopska karakterizacija otopine antocijanina UV-Vis spektri antocijanina u puferkim otopinama snimljeni su za raspon pH od 1,47 do 13,5. Za raspon od 1,0 do 5,0 korišten je citratni pufer, za raspon od 5,0 do 8,0 korišten je fosfatni pufer te je za raspon od 8,0 do 13,5 korišten univerzalni pufer. Priprema pufera opisana je u tablici 6. Konačna koncentracija antocijanina u puferkim otopinama iznosila je $2,7 * 10^{-2}$ M. Po razrjeđenju matične otopine u kvarcnoj kiveti od 3 mL, vrijeme stabilizacije trajalo je 3 min.

Tablica 6. Prikaz sheme pripreme puferских otopina

Citratni pufer (pH raspon 1 – 5)		
A	B	Formula
21,01 g/L monohidrata citratne kiseline + 200 mL NaOH (1,0 M)	HCl (0,1 M)	$xA + (100-x) B$
Fosfatni pufer (pH raspon 5 – 8)		
KH_2PO_4 (9,073 g/L)	Na_2PO_4 (0,067 M) ili $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ (11,87 g/L)	$xA + (100-x) B$
Univerzalni pufer (pH raspon 8 – 13,5)		
100 mL citratne kiseline (0,33 mol/dm ³) + 100 mL H_3PO_4 , (0,33 mol/dm ³) + 3,54 g borne kiseline + 343 mL NaOH (1 M) u 1 L	HCl (0,1 M)	20 mL A + x mL B u 100 mL

b) Spektroskopska karakterizacija antocijanina imobiliziranog u filmu

Filmovi s imobiliziranim antocijaninom (priprema opisana u dijelu 3.5.) izliveni u Petrijeve zdjelice te ohlađeni 72 h u hladnjaku, izrezani su na trakice dimenzija otprilike 1 × 3 cm. Svakaje trakica pomoću pincete položena na stijenu kvarcne kivete u kojoj se nalazi 3 mL otopine pufera. Vrijeme stabilizacije iznosilo je 30 min, nakon čega je snimljen UV-Vis spektar trakice u kiveti, položenom na način da pobudna svjetlost prolazi okomito na površinu trakice.

3.7. Mjerenje reflektancije antocijanina imobiliziranog u CMC filmovima na stakalcima

Kako bi se ispitala mogućnost korištenja biorazgradivih materijala u pH sensorima, promjena boje antocijanina imobiliziranog u CMC filmovima praćena je mjerenjem reflektancije. Na 3 seta stakalca, priređenih prema postupku opisanom u dijelu 3.5.4., nakapano je 8 kapi (oko 0,4 mL) puferских otopina te su stakalca osušena preko noći na zraku, pri sobnoj temperaturi. Mjerenje je provođeno *Ocean Optics Flame* spektrofotometrom, gdje je kao izvor pobudne svjetlosti korištena lampa *Ocean*

Optics DH-2000-BAL. Korišten je slit od 25 nm te optička vlakna od 600 mikrona s nastavkom za snimanje reflektancije čvrstih uzoraka, namještenom na držač, kako bi snimanje uvijek bilo pod istim kutom. Dijelovi potrebni za snimanje reflektancije spojeni su kako je prikazano na slici 14.



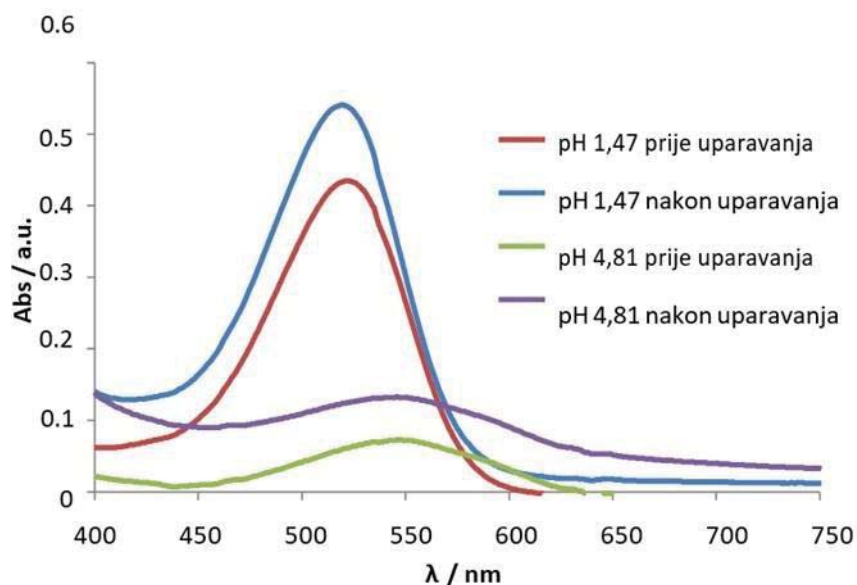
Slika 14. Prikaz instrumenta Ocean Optics Flame za mjerenje reflektancije

Kako bi se poboljšao omjer signala i pozadinskog šuma, uvjeti snimanja namješteni su pomoću standarda na prosječno skeniranje (engl. *scan average*) od 35, dok je širina grafa namještena na 5. U postavkama sprema se reference žutog i tamnog svjetla radi preglednijih šumova. Snimanje je provođeno na način da je uzorak (osušeno stakalce) postavljen ispod držača te je snimljen spektar od 300 do 800 nm. Za snimanje signala korišten je softver *Ocean View 2.0.8.* na računalu. Na isti način su snimljeni i spektri stakalca s osušenom otopinom antocijanina, priređeni prema postupku opisanom u dijelu **3.4.3.**

4. Rezultati i rasprava

4.1. Određivanje koncentracije antocijanina u otopini

Koncentracije otopina antocijanina prije i nakon uparavanja izračunate su pomoću UV-Vis spektara snimljenim pri pH 1,47 i pH 4,81 (slika 15). Isparavanjem etanola iz smjese povećan je udio koncentracije antocijanina, čime se prema Lamber Beerovom zakonu povećava intenzitet apsorbancije [4]. Taj se takozvani hiperkromni pomak može uočiti na grafu, usporedbom intenziteta apsorbancije otopine prije i nakon uparavanja za obje pH vrijednosti.



Slika 15. Grafički prikaz maksimuma apsorbancije antocijanina prije i nakon uparavanja kod pH 1,47 i 4,81

Za izračun koncentracije korištena je jednačba [38]:

$$\gamma(\text{Acy})(\text{mg/L}) = \frac{(A * M_w * DF * 1000)}{(s * l)} \quad (8)$$

gdje je M_w molarna masa antocijanina 449,2 g/mol, DF faktor razrjeđenja 50, ϵ koeficijent ekstinkcije cijanidin-3-glukozida 26 900 L/cm mol te l širina kivete 1 cm. Apsorbancija A računa se prema izrazu:

$$A = (A_{530} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{530} - A_{700})_{pH\ 4,5} \quad (9)$$

Parametri očitani s grafa na slici potrebni za izračun te dobivene koncentracije prikazane su u tablici 7. Koncentracija dobivena nakon ekstrakcije većeg je iznosa u usporedbi s literaturnim podacima od 261,02 mg na 100 g suhog crvenog kupusa [39]. Moguće obrazloženje je isključivanje sušenja u postupku koje može uzrokovati

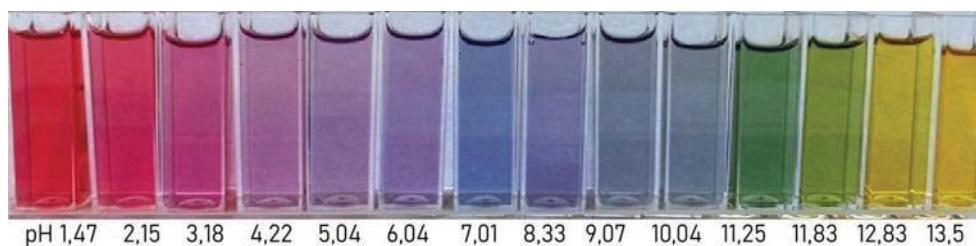
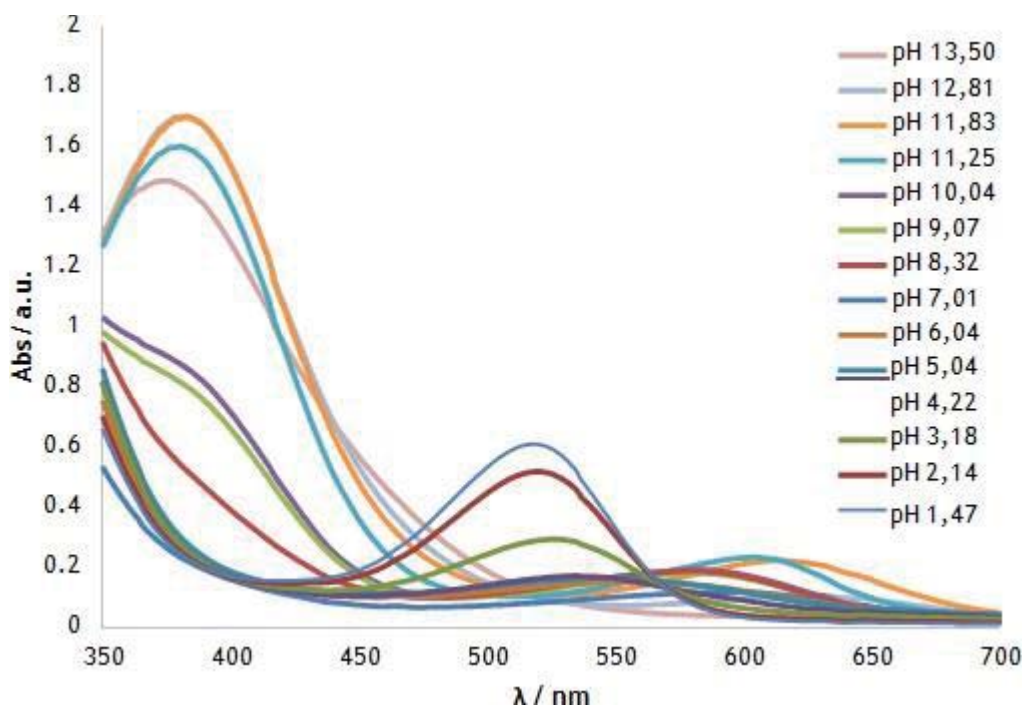
gubitak mase spoja uslijed raspada antocijanina na povišenim temperaturama [28,39]. Višesatnim uparavanjem je koncentracija povećana za svega 18%, zbog nastojanja da se uparavanje provodi pri blažim uvjetima iz spomenutih razloga.

Tablica 7. Koncentracije antocijanina sa pripadajućim apsorbancijama prije i poslije uparavanja otopine

	Prije uparavanja		Nakon uparavanja	
	pH 1,47	pH 4,81	pH 1,47	pH 4,81
A_{530}	0,434	0	0,541	0,124
A_{700}	0,06	0	0,014	0,04
A	0,374		0,443	
γ (otopine antocijanina) / mg/L	312,27		369,88	
c (otopine antocijanina) / mol/L	0,69		0,82	

4.2. Spektroskopska karakterizacija otopine antocijanina

Kako bi se ispitala mogućnost korištenja antocijanina iz crvenog kupusa kao potencijalne pH probe u imobiliziranom obliku, najprije su ispitana optička svojstva u otopini. Na slici 16 prikazan je grafički prikaz UV-Vis spektra otopina antocijanina ($c = 2,7 \times 10^{-2}$ M) u rasponu pH od 1,47 do 13,5, u valnom području 350 nm do 650 nm. Ispod grafa prikazana je promjena boje otopina antocijanina.



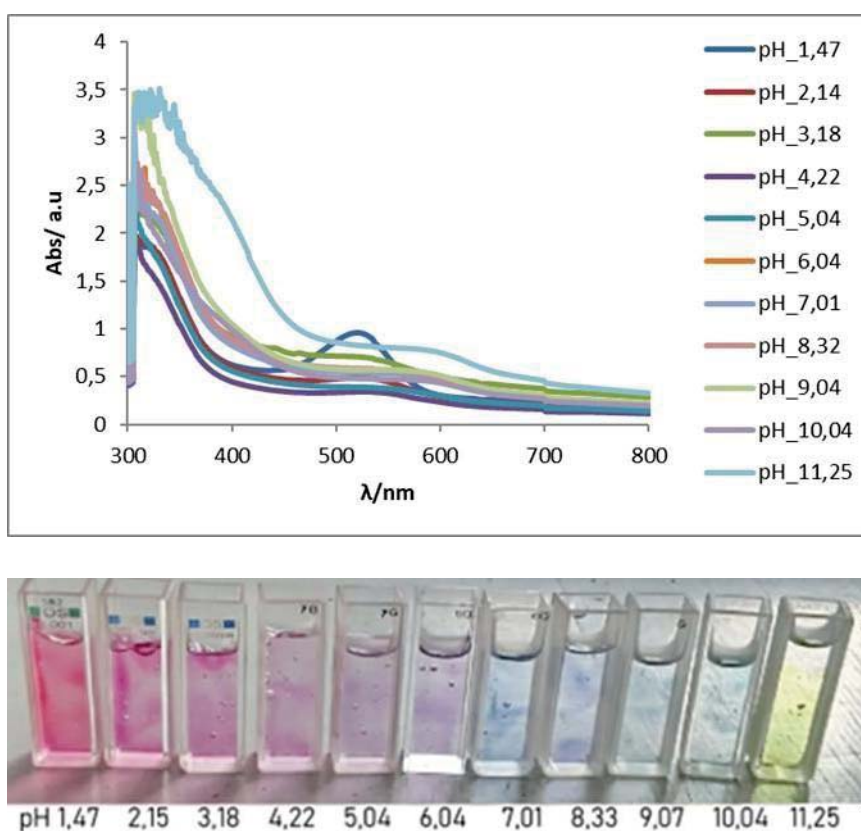
Slika 16. Grafički prikaz UV-Vis spektra otopine antocijanina ($c = 2,7 \times 10^{-2}$ M) pri različitim pH (iznad). Boja ispitivanih otopina antocijanina pri različitim pH (ispod).

Počevši od najnižeg $\text{pH} = 1,47$, maksimum apsorpcije je na 520 nm, što odgovara crvenoj boji otopine. Antocijanin je nastabilniji u kiselom području zbog proširenog π -konjugiranog sustava, a takav se oblik naziva flavilijev kation [15]. Idući prema višim pH vrijednostima njegova stabilnost pada te je uočeno snižavanje inteziteta, kao i batokromni pomak maksimuma apsorpcije od 520 do 590, što odgovara promjeni boje otopine od crvene, preko ljubičaste do modre. Prema literaturi, na $\text{pH} 2 - 6$ dolazi do prelaska crvenog kationskog flavion oblika antocijanina u bezbojni poluketalni oblik, koji dominira pri $\text{pH} = 5$. Između $\text{pH} 7 - 10$ prisutan je neutralni kinoidni oblik, koji apsorbira u području oko 590 nm, što odgovara slabom modrom obojenju [15]. U lužnatim uvjetima, pri $\text{pH} = 11$, uz pik na 603 nm, pojavljuje se pik visokog intenziteta u valnom području na ~ 380 nm, pri čemu kombinacija pikova u dva valna područja rezultira zelenom bojom. Pik u bliskom UV području pripada žutom cis- i trans-halkon obliku antocijanina. Pri $\text{pH} > 12$, pik na 620 nm je

vrlo niskog intenziteta, dok dominira pik na 380 nm te je otopina žute boje. Prethodno je otopina na pH 12,81 bila zelene boje koja je u kratkom vremenu se obojila u žuto, što dokazuje izomerizaciju cis- halkona u trans-halkon [5].

4.3. Spektroskopska karakterizacija antocijanina imobiliziranog u CMC/TEOS filmu

Prema spektru na slici, UV-Vis spektroskopija nije se pokazala pogodnom metodom za ispitivanje antocijanina imobiliziranog u CMC/TEOS filmovima. Jedini prominentni maksimum je na 520 nm, što odgovara crvenoj boji filma pri pH 1,47, gdje prevladava flavilijev kation [15]. Pri ostalim pH pikovi nisu jasno vidljivi uslijed zamućenja filmova, vjerojatno uzrokovano umreženjem TEOS-a i CMC.

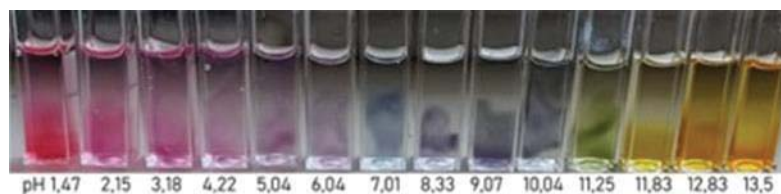
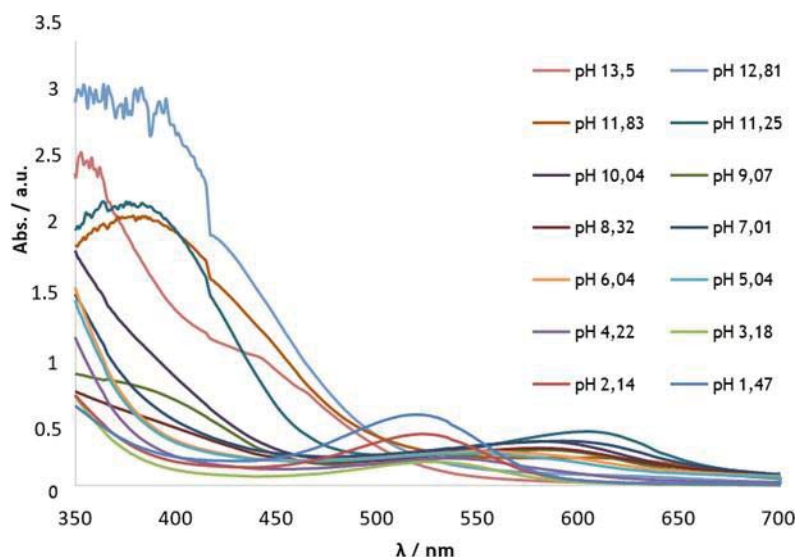


Slika 17. Grafički prikaz UV-Vis spektra antocijanina ($c = 2,3 \times 10^{-2}$ M) imobiliziranog u CMC/TEOS filmu pri različitim pH (iznad). Boja ispitivanih CMC/TEOS filmova s imobiliziranim antocijaninom pri različitim pH (ispod).

4.4. Spektroskopska karakterizacija antocijanina imobiliziranog u CMC filmu

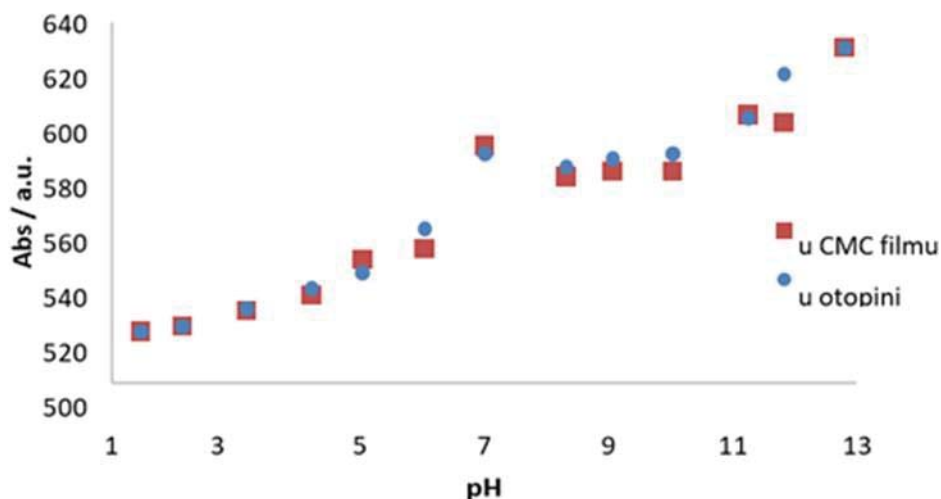
Obzirom da je antocijanin imobiliziran u filmu CMC/TEOS pokazivao nepovoljna optička svojstva za pH senzor, ispitana su optička svojstva antocijanina imobiliziranog u CMC filmu, bez prisutstva TEOS-a. UV-Vis spektar kao i promjena boje filmova u

otopinama različitih pH prikazani su na slici 18. Filmovi su transparentni i pokazuju konačnu promjenu boje nakon nekoliko minuta.

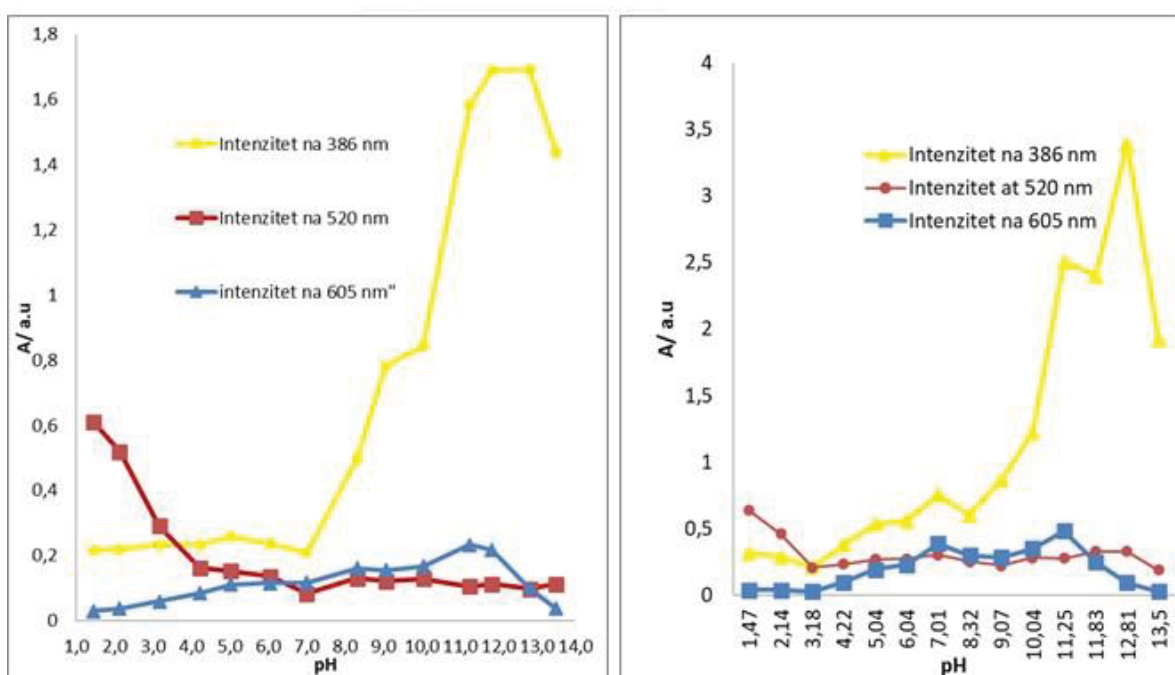


Slika 18. Grafički prikaz UV-Vis spektra antocijanina ($w = 0,0073\%$) imobiliziranog u CMC filmu pri različitim pH (iznad). Boja ispitivanih CMC filmova s imobiliziranim antocijaninom pri različitim pH (ispod).

Spektar antocijanina imobiliziranog u CMC filmu pokazivao je slično ponašanje kao i u otopini (slika). U kiselom mediju maksimum apsorbancije filma je na 520 nm, što se pripisuje prisutnosti flavilijevog kationa [15]. Povećavanjem pH smanjuje se intenzitet, dolazi do promjene boje od crvene, ljubičaste do modre [15]. Pri pH 5 dominira transparentni oblik karbinol pseudobaze. Između pH 7-10 je prisutan kinoidni oblik. Pojavljuje se batokromni pomak od 520 nm do 600 nm. U lužnatim mediju kod pH 11, uz pik na 610 nm, pojavljuje se pik visokog intenziteta u valnom području na 380 nm, pri čemu kombinacija pikova u dva valna područja rezultira zelenom bojom [5]. Na slici 19 prikazana je usporedba batokromnog pomaka antocijanina u otopini i imobiliziranog u CMC filmu, s povećanjem pH vrijednosti. U kiselom području apsorbancija je identična, dok u lužnatom varira. Uočava se odstupanje pri pH = 7, zbog mogućnosti hidratacije i nastanka bezbojne kinoidalne baze [40].



Slika 19. Usporedba batokromnog pomaka UV-Vis spektra antocijanina u otopini ($c = 2,7 \times 10^{-2}$ M) i imobiliziranog antocijanina u CMC filmu ($w = 0,0073\%$) s povećanjem pH



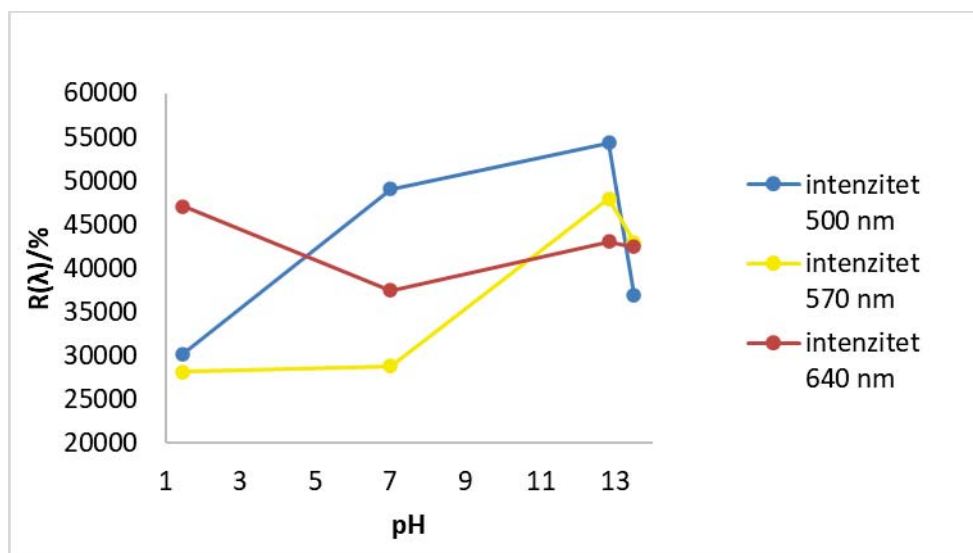
Slika 20. Promjena intenziteta triju pikova UV-Vis spektra antocijanina u otopini (lijevo) i imobiliziranog u CMC filmu (desno) pri različitim pH.

Usporedbom batokromnih pomaka UV- Vis spektara, kao i usporedbom promjene intenziteta triju pikova koji dominiraju u UV-Vis spektrima antocijanina (slika 20) u oba slučaja, može se zaključiti da su optička svojstva antocijanina sačuvana i nakon imobilizacije u CMC filmu. Uočeno je da je intenzitet pri 386 nm (lužnati medij) duplo veći kod imobiliziranog antocijanina. To se može pripisati boljoj adsorpciji antocijanina u celuloznu strukturu u lužnatom pH, jer je na kiselom pH antocijanin stabilan, te teži izaći iz celulozne strukture u pogodan kiseli medij [7].

4.5. Reflektancija antocijanina imobiliziranog u CMC filmovima na stakalcima

Kako bi se utvrdila mogućnost korištenja antocijanina imobiliziranog u filmu na nosivoj podlozi, kao što je satno stakalce, te uslijed neprozirnosti takvih filmova nakon sušenja, za praćenje promjene boje s promjenom pH izabrana je metoda mjerenja reflektancije. Uspoređeno je ponašanje s neimobiliziranim antocijaninom, odnosno osušenom matičnom otopinom na satnom stakalcu te su ispitane različite koncentracije antocijanina imobiliziranog u CMC filmovima.

4.5.1. Reflektancija matične otopine antocijanina osušene na stakalcu



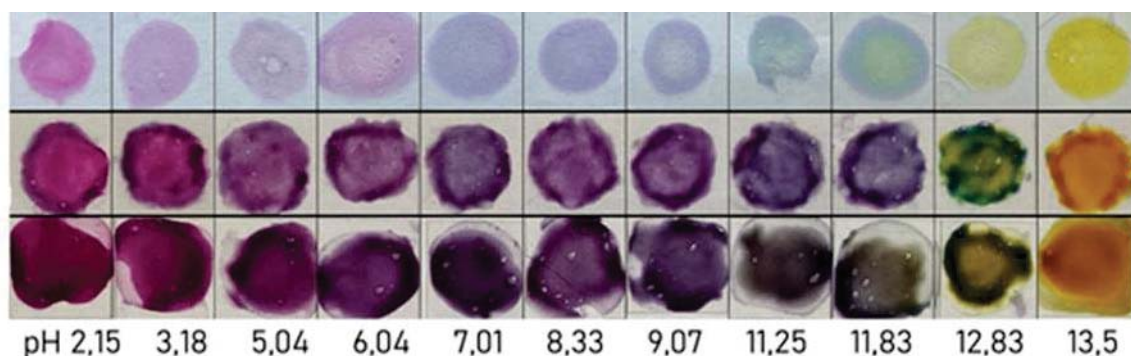
Slika 21. Promjena intenziteta triju pikova reflektancijskog spektra osušene otopine antocijanina pri različitim pH ($m = 0,055$ mg)

Snimljeni su reflektancijski spektri neimobiliziranog antocijanina, osušene matične otopine ($c = 0,82$ mol dm⁻³) na satnom stakalcu, čija je procijenjena masa 0,055

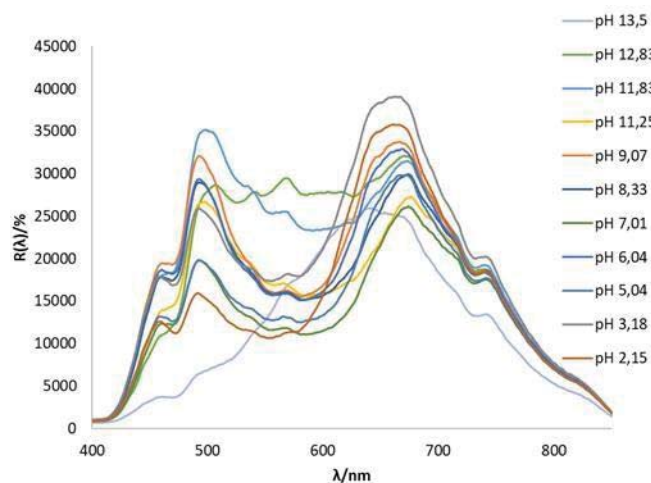
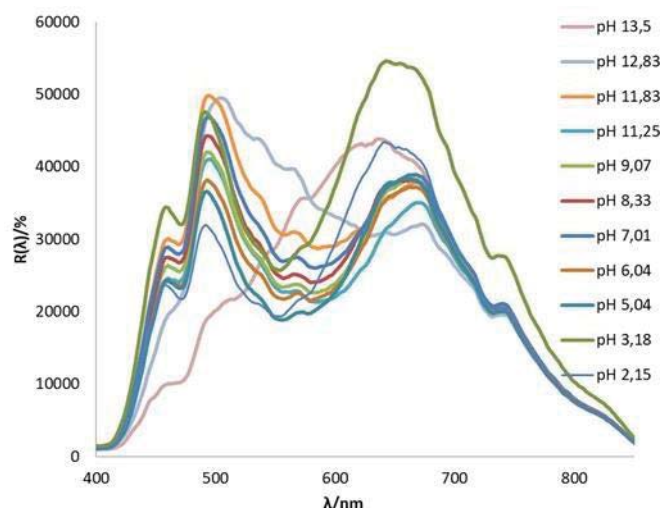
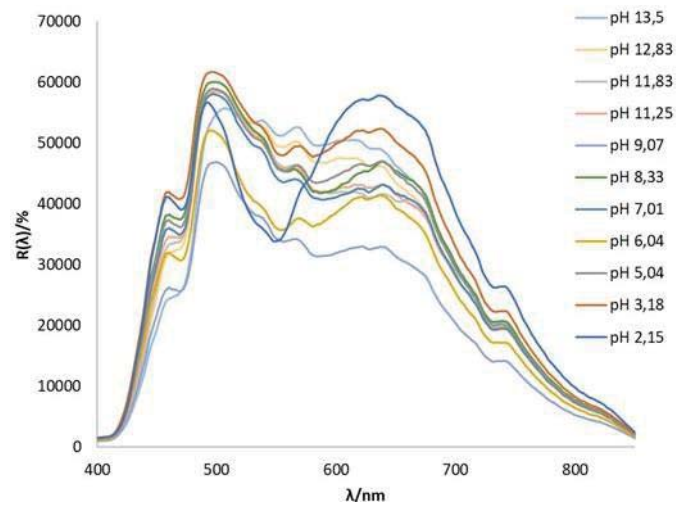
mg, u kiselim, neutralnim i bazičnim uvjetima. Pri pH = 1,47 najveći intenzitet je na 640 nm, što odgovara crvenoj boji. Pri pH = 7,01 najveći intenzitet ima maksimum pri 500 nm, što odgovara modroj boji. Pri pH 12,81 intenziteti na 500 nm te 570 nm su bliski, što rezultira zelenom bojom antocijanina. U ekstremno bazičnim uvjetima, pri pH = 13, intenzitet pika pri 500 nm drastično pada, dok su intenziteti pri 570 nm i 640 nm podjednaki te je boja žuto narančasta. Mjerenja reflektancije čistog antocijanina pokazuju rezultate koji su u skladu s UV-Vis spektroskopskim mjerenjima otopine antocijanina u vidu praćenja promjene boje, čime je reflektancija pogodna metoda za analizu antocijanina u neprozirnim filmovima.

4.5.2. Reflektancija imobiliziranog antocijanina u CMC filmu na stakalcima

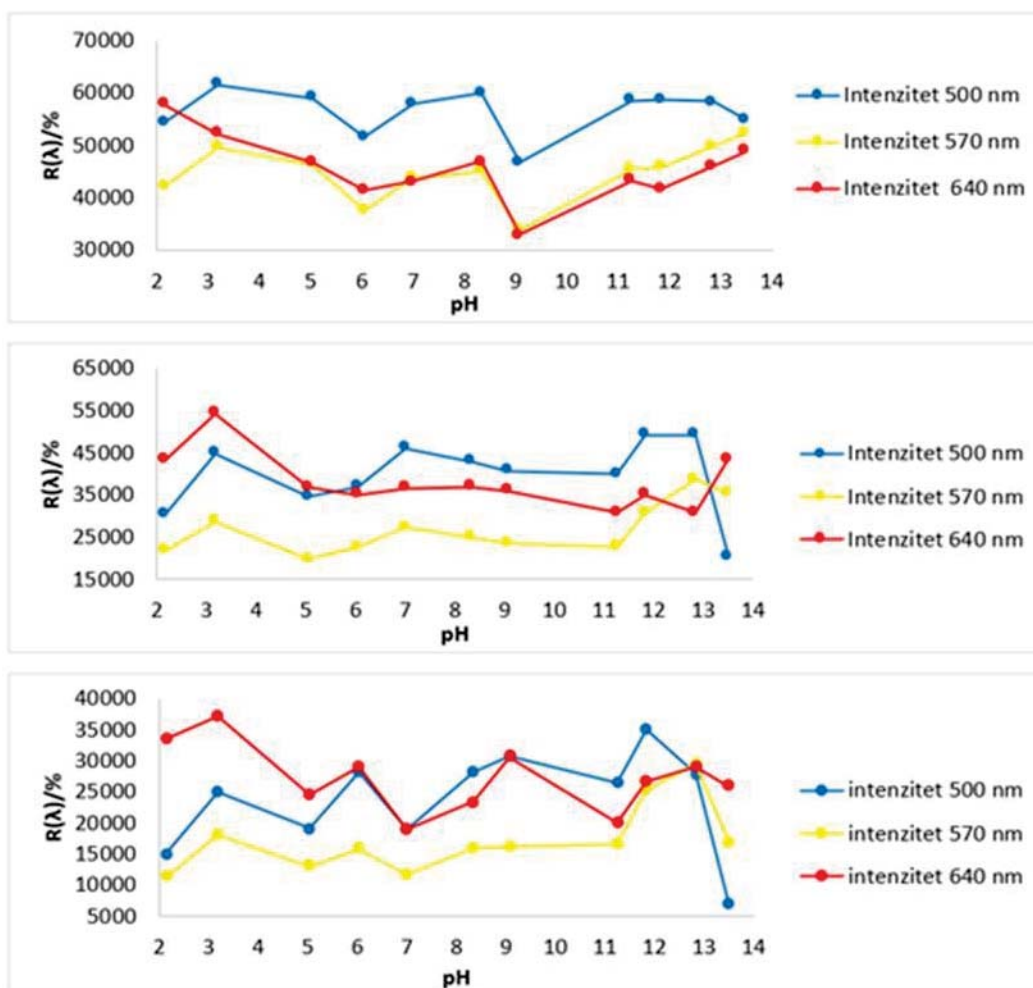
Na slici prikazani su reflektancijski spektri antocijanina imobiliziranog u CMC filmu nanesenih na satna stakalca, za tri različite količine, koje se međusobno odnose u omjerima 1x:7x:17x, gdje je $x = 0,85$ mg (slika 22). Za lakše razumijevanje i detaljniju analizu, za sva tri grafa odabrana su ista tri prominentna maksimuma, pri 500 nm (modra boja), 570 nm (žuta boja) i 640 nm (crvena boja). Promjena intenziteta tih triju pikova s promjenom pH za sva tri filma prikazana je na slici 24.



Slika 22. Prikaz pripremljenih filmova antocijanina imobiliziranog u CMC filmovima u različitim koncentracijama, idući s vrha prema dnu: niža koncentracija (1x) srednja koncentracija (7x), visoka koncentracija (17x) ; $x = 0,85$ mg



Slika 23. Reflektancijski spektri antocijanina imobilizirani u CMC filmu pri različitim pH, za različite masene udjele antocijanina idući s vrha prema dnu: niža koncentracija (1x) srednja koncentracija (7x) visoka koncentracija (17x); x = 0,85 mg



Slika 24. Promjena intenziteta triju pikova reflektancijskog spektra pri različitim pH, za različite masene udjele antocijanina idući s vrha prema dnu: niža koncentracija (1x) srednja koncentracija (7x) visoka koncentracija (17x); $x = 0,85 \text{ mg}$

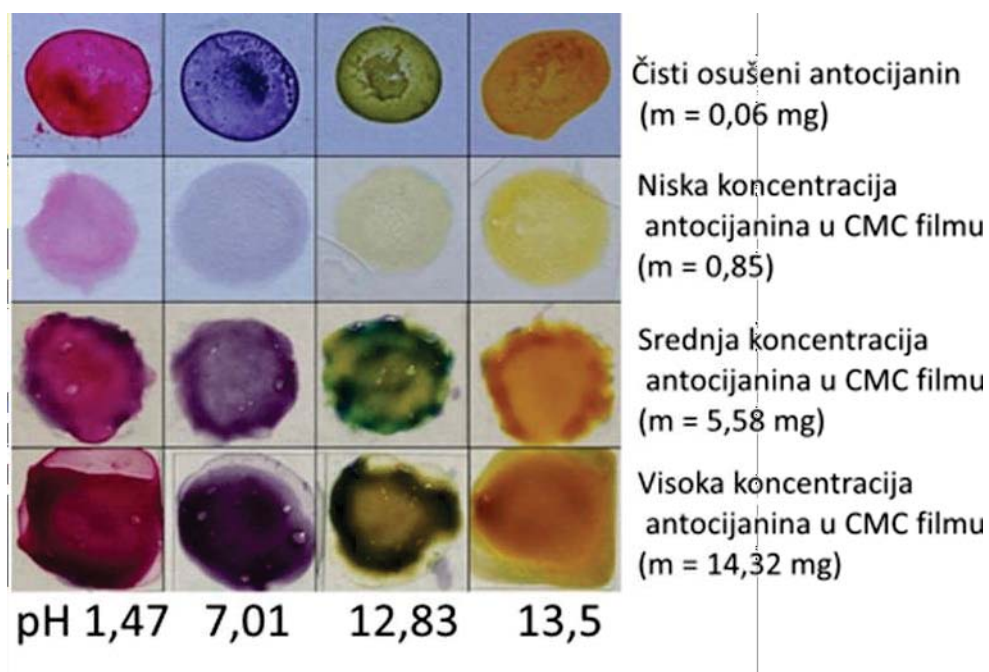
Za nižu koncentraciju antocijanina (1x), pri $\text{pH} = 1,47$ intenzitet na 640 nm je viši od intenziteta na 500 nm te je film crvene boje. U području $\text{pH} = 3 - 13$ dominira pik na 500 nm te je boja filmova modra. Tek prvi vrlo bazičnim uvjetima uočava se porast intenziteta pika na 570 nm i 640 nm, rezultirajući žuto narančastom bojom filma.

Za srednju koncentraciju otopine antocijanina (7x) u kiselom području $\text{pH} < 5$ dominira intenzitet na 640 nm kojeg slijedi rast intenzieta na 500 nm, što mijenja boju filmova od crvene do ljubičaste. Nakon $\text{pH} = 9$, intenzitet na 640 nm pada te su filmovi pretežno modre boje. Nakon $\text{pH} = 12,81$ dolazi do porasta intenziteta na 570 nm te filmovi postepeno mijenjaju boju iz zelene do žute. Pri $\text{pH} = 14$ film je žuto narančaste boje – dominira pik na 640 nm uz pik na 570 nm.

Za najveću koncentraciju otopine antocijanina (17x) najviši intenzitet ima pik na 640 nm u području pH = 2 – 5 te prevladava crvena boja. Pri pH = 6 – 9 intenziteti na 500 nm i 640 nm su sličnih vrijednosti te je boja filma ljubičasta. Pri pH = 10 – 11 intenzitet na 640 nm pada te prevladava pik na 500 nm te su filmovi modre boje. Pri pH = 12,81 sva su tri pika jednakog intenziteta, nakon čega intenzitet na 500 nm drastično pada, mijenjajući boju filma od zelene do žuto narančaste.

4.5.3 Usporedba reflektancije za pojedine pH vrijednosti

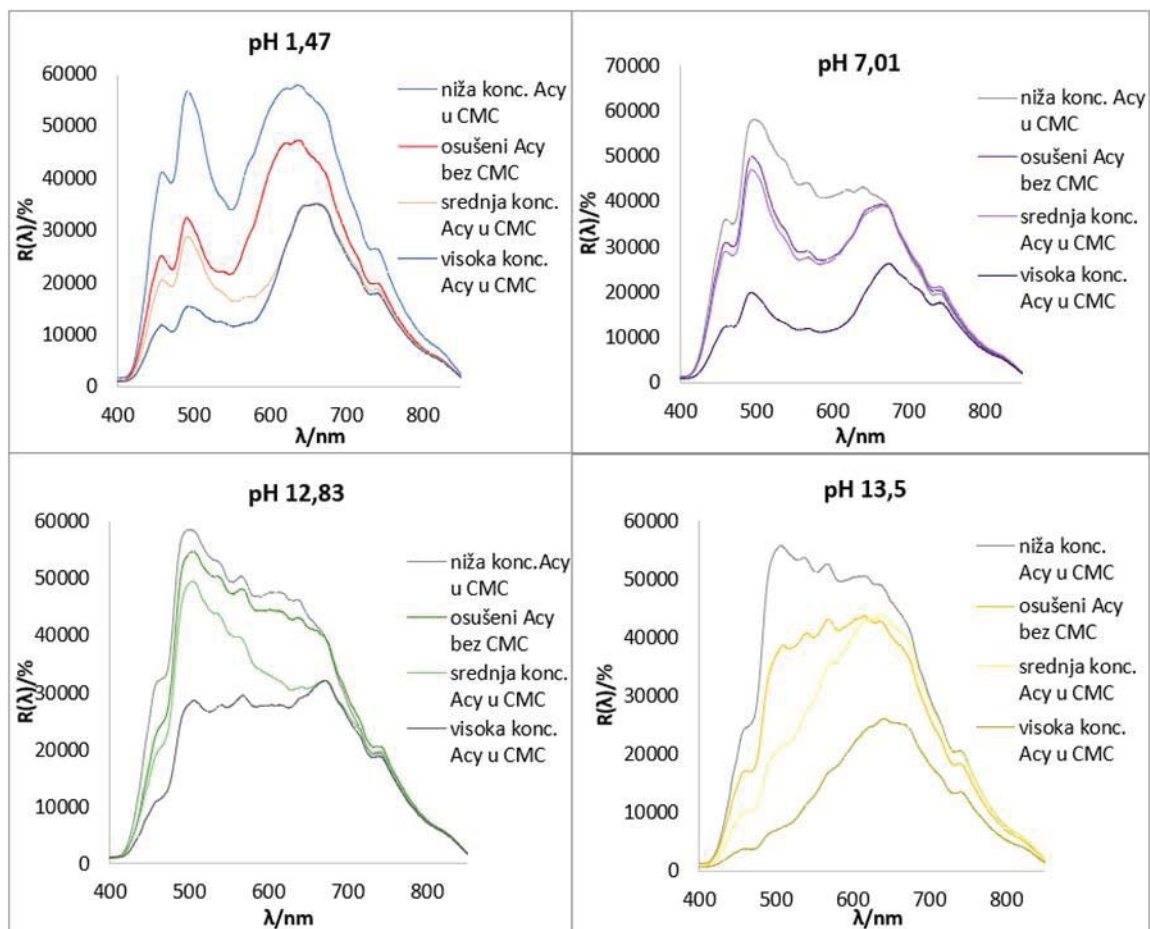
Na slici 25 je prikazana usporedba pripremljenih filmova za snimanje reflektancije pri određenim pH vrijednostima. Uočljivo je da je najpogodnija konzistencija filma s najizraženijom promjenom boje ostvarena kod filma najviše koncentracije antocijanina.



Slika 25. Usporedba pripremljenih filmova antocijanina imobiliziranog u CMC različitih koncentracija kao i čistog antocijanina osušenog na stakalu, pri određenim pH vrijednostima.

Na slici su prikazani reflektancijski spektri za pojedine pH vrijednosti antocijanina osušenog na staklu i imobiliziranog u CMC filmu pri različitim koncentracijama (omjer 1:7:17). Na svim se pH vrijednostima može uočiti trend pada intenziteta s

povećanjem koncentracije otopine antocijanina. Stakalca s najvećom koncentracijom pokazuju sveukupno namjanji intenzitet reflektancije. Maksimum reflektancije je za najnižu koncentraciju otopine antocijanina oko 60000%, zatim za srednju koncentraciju antocijanina oko 50500%, dok je za otopinu visoke koncentracije antocijanina oko 40000%. Veća koncentracija odgovara i većoj mogućnosti apsorpcije, što rezultira manjom reflektancijom [40]. Kod najveće koncentracije (17x) pikovi koji odgovaraju boji filma su najdefiniraniji te je identifikacije boje najintuitivnija.



Slika 26. Usporedba reflektancijskih spektara antocijanina osušenog na staklu i imobiliziranog u CMC filmu pri različitim koncentracijama (1:7:17) pri četiri različita pH.

5. Zaključak

Antocijanini ekstrahirani iz crvenog kupusa pokazali su kiselo-bazna svojstva mjerenjem UV-Vis spektra. Dobiveni spektar bio je u skladu s literaturom, gdje je u kiselom području prevadavala crvena boja, kao dokaz stabilnog flavilijevog kationa. Prema neutralnom području došlo je do vrlo slabog plavog obojenja, kao dokaz prisutnosti bezbojne karbinol pseudobaze. Povećanjem pH dolazi do stvaranja plave kinoidne baze, potom do cis-halkona zelene boje, koji nije stabilan te prelazi u žutu boju, što je uočeno tijekom eksperimenta.

Ispitivanjem imobiliziranog antocijanina na CMC u usporedbi sa otopinom antocijanina kiselo-bazna svojstva su ostala očuvana. Trakice CMC su duljim stajanjem u kivetama postaju gelaste strukture zbog svojstva bubrenja i adsorpcije celuloze. U kiselom mediju trakice se ne raspadaju, zbog očuvanosti celulozne strukture, te se primjećuje i veća obojanost filma zbog stabilnosti antocijanina. Usporedbom UV-Vis spektara u lužnatom mediju primjećena je skoro dvostruko veća apsorbancija imobiliziranog antocijanina na celulozi nego u puferskoj otopini. Celuloza zbog svoje mikrofibrilne strukture ima veću površinu time i adsorpciju čime antocijanin ostaje adsorbiran tj. koncentriran u celulozi. Apsorbancija u neutralnom području ima odstupanje zbog hidratacije, dolazi do gubitka protona te nastaje bezbojna karbilnolna forma.

Mjerenje reflektancije za različite koncentracije otopine antocijanina imobiliziranog u CMC filmovima na stakalcima pokazalo je obrnuto proporcionalna svojstva u usporedbi sa apsorbancijom UV-Vis spektra. Što je veća apsorbancija otopine tj. koncentracija to je manja reflektancija. Reflektancija kao nedestruktivna metoda, kojom se može uzastopno više puta vršiti mjerenje može poslužiti kao metoda za praćenje promjene boje pigmenta u neprozirnim filmovima.

Prema dobivenim eksperimentalnim podacima antocijanin imobiliziran u CMC i otopini pokazuje promjene boja u različitim pH područjima i time bi se mogao koristiti kao kolorimetrijski indikator u funkciji senzora za praćenje promjene pH. Najbolji pH senzor u eksperimentu se pokazao imobilizirani antocijanin najveće koncentracije na CMC filmu nanesen na stakalce. Ispitana optična svojstva apsorbancije i reflektancije CMC filma sa antocijaninom pokazala su se povoljnija u odnosu na otopinu antocijanina. Imobilizirani antocijanin može biti na stakalcu ili nekoj drugoj podlozi koja omogućuje transport. Prednosti korištenja prirodnih materijala je njihova netoksičnost, biorazgradivost, kompatibilnost i dostupnost u prirodi.

6. Literatura

- [1] Lee, W. S., Jeon, S., & Oh, S. J., Wearable sensors based on colloidal nanocrystals. *Nano Convergence*, (2019.), 6(1).
- [2] Ahmadiani, N., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M., Anthocyanins Contents, Profiles, and Color Characteristics of Red Cabbage Extracts from Different Cultivars and Maturity Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2014.), 62(30), 7524– 7531.
- [3] Riaz, R. S., Elsherif, M., Moreddu, R., Rashid, I., Hassan, M. U., Yetisen, A. K., & Butt, H., Anthocyanin-Functionalized Contact Lens Sensors for Ocular pH Monitoring, *ACS Omega*, (2019.), 21792–21798
- [4] Alappat, B., & Alappat, J., Anthocyanin Pigments: Beyond Aesthetics. *Molecules*, (2020), 25(23), 5500.
- [5] Berland, H., & Andersen, Ø. M., Characterization of a Natural, Stable, Reversible and Colourful Anthocyanidin Network from Sphagnum Moss Based Mainly on the Yellow Trans-Chalcone and Red Flavylum Cation Forms. *Molecules*, (2021.), 26(3), 709.
- [6] Heinze, T., Cellulose: Structure and Properties. *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials*, (2015), 1–52.
- [7] Al-Qahtani, S. D., Azher, O. A., Felaly, R., Subaihi, A., Alkabli, J., Alaysuy, O., & El-Metwaly, N. M., Development of sponge-like cellulose colorimetric swab immobilized with anthocyanin from red-cabbage for sweat monitoring. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2021.), 182, 2037–2047.
- [8] Al-Qahtani, S. D., Alzahrani, H. K., Azher, O. A., Owidah, Z. O., Abualnaja, M., Habeebullah, T. M., & El-Metwaly, N. M., Immobilization of anthocyanin-based red-cabbage extract onto cellulose fibers toward environmentally friendly biochromic diagnostic biosensor for recognition of urea. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, (2021.), 9(4), 105493.
- [9] Gründler, P., Chemical sensors. *ChemTexts*, (2017.), 3(4).

- [10] A.Hulanicki, S.Glab, F.Ingman, Chemical sensors definitions and classification, IUPAC, Pure&App/. Chern., (1991), No. 9, pp. 1247-1250.
- [11] P. Kassal, M.D. Steinberg & I.M. Steinberg, Wireless chemical sensors and biosensors: A review. Sensors and Actuators B: Chemical, (2018), 266, 228–245.
- [12] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, 6. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 1999. str 492- 493
- [13] F. Rouessac, A. Rouessac, Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques, Wiley and Sons, LTD, Chichester, 2000. Str 176
- [14] L.G.Wade, ml., Oraganska kemija, 1. Izadnje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, 2017. Str 696- 697
- [15] Março, P. H., & Scarminio, I. S., Q-mode curve resolution of UV–vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions. Analytica Chimica Acta, (2007.), 583(1), 138–146.
- [16] Yao, Y., Bing, H., Feifei, X., & Xiaofeng, C., Equilibrium and kinetic studies of methyl orange adsorption on multiwalled carbon nanotubes. Chemical Engineering Journal, (2011.), 170(1), 82–89.
- [17] Shreya R. Patil , Prabhakar R. Pawar , Rahul B. Patil, Plant Polyphenols as Natural pH Indicators: A Reliable Alternative to Synthetic Indicators , International Multidisciplinary Refereed Peer Reviewed Indexed Research Journal, (2020.), ISSN: Print: 2347-5021
- [18] Kortüm, G., Reflectance Spectroscopy. Springer- Verlag, New York, (1969),str 106
- [19] Iriel, A., & Lagorio, M. G., Biospectroscopy of Rhododendron indicum flowers. Non-destructive assessment of anthocyanins in petals using a reflectance-based method. Photochemical & Photobiological Sciences, (2009.), 8(3), 337.

[20] Hébert, M., & Becker, J.-M., Correspondence between continuous and discrete two-flux models for reflectance and transmittance of diffusing layers. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, (2008.), 10(3), 035006.

[21] Picollo, M., Aceto, M., & Vitorino, T., UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*, (2018.), 0(0).

[22] Alcaraz de la Osa, R., Iparragirre, I., Ortiz, D., & Saiz, J. M., The extended Kubelka–Munk theory and its application to spectroscopy. *ChemTexts*, (2019.), 6(1).

[23] Terci, D. B. L., & Rossi, A. V., Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? *Química Nova*, (2002.), 25(4), 684–688.

[24] Bharath, K. N., & Basavarajappa, S., Applications of biocomposite materials based on natural fibers from renewable resources: a review. *Science and Engineering of Composite Materials*, (2016.), 23(2).

[25] Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S., Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, (2012.), 90(4), 615–623.

[26] Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczyńska-Świgło, A., Rietjens, I. M. C. M., & Tyrakowska, B., Radical Scavenging Capacity of Wine Anthocyanins Is Strongly pH-Dependent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2005.), 53(14), 5526–5534.

[27] Zhang, C., Jia, H., Wu, W., Wang, X., Fang, J., & Wang, C., Functional conservation analysis and expression modes of grape anthocyanin synthesis genes responsive to low temperature stress. *Gene*, (2015.), 574(1), 168–177.

[28] Moldovan, B., & David, L., Influence of Temperature and Preserving Agents on the Stability of Cornelian Cherries Anthocyanins. *Molecules*, (2014.), 19(6), 8177–8188.

[29] Vaknin, H., Bar-Akiva, A., Ovadia, R., Nissim-Levi, A., Forer, I., Weiss, D., & Oren-

Shamir, M. (2005). Active anthocyanin degradation in *Brunfelsia calycina* (yesterday–today–tomorrow) flowers. *Planta*, (2005.), 222(1), 19–26.

[30] Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K., Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, (2010.), 21(1), 3–11.

[31] Xu, P., Zawora, C., Li, Y., Wu, J., Liu, L., Liu, Z., Lian, H., Transcriptome sequencing reveals role of light in promoting anthocyanin accumulation of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, (2018.), 86(1), 121–132.

[32] Neill, S., & Gould, K. S., Optical properties of leaves in relation to anthocyanin concentration and distribution. *Canadian Journal of Botany*, (2000.), 77(12), 1777–1782.

[33] Ahliha, A. H., Nurosyid, F., Supriyanto, A., & Kusumaningsih, T., Optical properties of anthocyanin dyes on TiO₂ as photosensitizers for application of dye-sensitized solar cell (DSSC). *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, (2018.), 333, 012018.

[34] Rahman, M.S.; Hasan, M.S.; Nitai, A.S.; Nam, S.; Karmakar, A.K.; Ahsan, M.S.; Shiddiky, M.J.A.; Ahmed, M.B. Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. *Polymers* (2021.), 13, 1345.

[35] Kanikireddy, V., Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Karthikeyan, C., & Sadiku, R., Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules.*, (2020.), 963-975

[36] Almlöf, H., Kreutz, B., Jardeby, K., & Germgård, U., The influence of extended mercerization on some properties of carboxymethyl cellulose (CMC). *Holzforschung*, (2012.), 66(1).

[37] Ummartyotin, S., & Manuspiya, H. ,A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (2015.),

41, 402–412.

[38] Ebrahimi Tirtashi, F., et al., Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019. p. 920-926.

[39] Bernstein, A., & Noreña, C. P. Z., Encapsulation of Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L. f. rubra) Anthocyanins by Spray Drying using Different Encapsulating Agents. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, (2015.), 58(6), 946-948

[40] Da Silva, H. M., Mageste, A. B., e Silva, S. J. B., Dias Ferreira, G. M., & Dias Ferreira, G. M., Anthocyanin immobilization in carboxymethylcellulose/starch films: a sustainable sensor for the detection of Al(III) ions in aqueous matrices. *Carbohydrate Polymers*, (2019.), 115679.

7. Životopis

Rafaela Kovačević [REDACTED] Nakon završene srednje škole Zdravstveno učilište Zagreb, smjer zdravstveno laboratorijski tehničar 2018. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković u Fizikalno- organskom laboratoriju. Sudjelovala je u XIV. Susretu mladih kemijskih inženjera i u radionici CeSaR, koji su se provodili na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Članica je Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa, te je sudjelovala u nekoliko projekata. Među projektima su i Boje inženjerstva, u kojem postaje voditeljica za narednu akademsku godinu. Prije je radila kao laboratorijski tehničar u laboratoriju za citologiju i patologiju, te ove godine kao tehničar u Kontrolu kvalitete u Atlantic Cedeviti.