

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

Marko Zubak

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

Marko Zubak

**RAZVOJ BEŽIČNOG OPTIČKOG KEMIJSKOG SENZORA
ZA PRAĆENJE STANJA RANA**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

Ivana Murković Steinberg, izv. prof. dr. sc.

Petar Kassal, dr. sc.

Sanja Lučić Blagojević, prof. dr. sc.

Zagreb, srpanj, 2017.

Zahvala:

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Murković Steinberg i neposrednom voditelju rada dr. sc. Petru Kassalu koji su svojim stručnim i znanstvenim savjetima oblikovali ideju i pomogli mi u izradi diplomskog rada. Hvala svim djelatnicima Zavoda za opću i anorgansku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na pruženoj pomoći i savjetima.

SAŽETAK:

Bežični optički kemijski senzori omogućavaju olakšanu analizu bioloških uzoraka. Neinvazivnost postupka i kontinuirano praćenje u realnom vremenu samo su neke od prednosti nosivih kemijskih senzora u odnosu na klasične laboratorijske instrumente. Idealna primjena takvih senzora je bezbolno praćenje stanja rana. U tu svrhu razvijeno je pH osjetljivo bojilo 4-[4-(2-hidroksietansulfonil)-fenilazo]-2,6-dimetoksifenol, GJM-534, čija konstanta disocijacije odgovara području pH vrijednosti akutnih i kroničnih rana. U radu je provedena spektrofotometrijska karakterizacija imobiliziranog pH osjetljivog bojila na klasični zavoj i poliestersku foliju. Razvijen je pametni zavoj integriranjem imobiliziranog bojila i bežične platforme temeljene na radiofrekvencijskoj identifikaciji (RFID). Ovakva vrsta kemijskih senzora olakšava život oboljelima od kroničnih oblika bolesti koje zahtijevaju kontinuirano praćenje.

KLJUČNE RIJEČI: rane, bežične tehnologije, kemijski senzori, optički senzori, pH indikatori

SUMMARY:

Wireless optical chemical sensors allow easier analysis of biological samples. Non-invasiveness of the procedure and continuous monitoring in real-time are only some of the advantages of wearable chemical sensors compared to conventional laboratory instruments. An ideal application of such sensors is painless monitoring of wounds. For that purpose it has been developed a pH sensitive dye 4- [4- (2-hidroksietansulfonil) -phenylazo]-2,6-dimethoxyphenol, GJM-534, which has an acid dissociation constant in the range of pH values of acute and chronic wounds. In this work, the spectrophotometric characterization of the immobilized pH sensitive dye on the classic bandage and polyester foil was performed. A smart bandage has been developed by integrating the immobilized dye with a radio-frequency identification (RFID) based wireless platform. This type of sensor improve lives of people suffering from chronic forms of diseases which require continuous monitoring.

KEYWORDS: *wounds, wireless technology, chemical sensors, optical sensors, pH indicators*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. RANE.....	3
2.1.1. Proces zacjeljenja rane	3
2.1.2. Akutne i kronične rane	4
2.2. METODE PRAĆENJA STANJA RANE	5
2.2.1. Bakterije kao potencijalni markeri	6
2.2.2. Temperatura rane kao potencijalni marker	7
2.2.3. Vlažnost rane kao potencijalni marker	7
2.2.4. pH vrijednost tekućine rane kao potencijalni marker	7
2.2.5. Konvencionalne metode praćenja stanja rane	8
2.3. ELEKTROKEMIJSKI SENZORI ZA PRAĆENJE pH RANE.....	9
2.4. OPTIČKI SENZORI ZA PRAĆENJE pH VRIJEDNOSTI RANE	10
2.5. OSJETILNI DIO OPTIČKOG SENZORA ZA PRAĆENJE pH VRIJEDNOSTI	12
2.6. INTEGRACIJA OSJETILNOG DIJELA OPTIČKOG SENZORA I BEŽIČNE	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJALI I KEMIKALIJE	16
3.2. INSTRUMENTI.....	17
3.3. TIJEK RADA	17
3.3.1. Priprema pufera	17
3.3.2. Izrada osjetilnog dijela senzora	19
3.3.3. Određivanje maksimuma reflektancije pH osjetljivog bojila, GJM-534.....	19
3.3.4. Snimanje kalibracijske krivulje	20
3.3.5. Određivanje ponovljivosti	22
3.3.6. Integracija radiofrekvencijske identifikacijske (RFID) platforme	22
4. REZULTATI.....	25
4.1. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE GJM-534 pH.....	25
4.1.1. Rezultati određivanja maksimuma reflektancije pH osjetljivog bojila , GJM-534	25
4.1.2. Rezultati snimanja kalibracijskih krivulja	27
4.1.3. Rezultati određivanja ponovljivosti.....	33
4.2. REZULTATI ANALIZE POMOĆU RADIOFREKVENCIJSKE.....	35
5. RASPRAVA.....	44
5.1. USPOREDBA REFLEKSIJSKIH SPEKTARA BOJILA IMOBILIZIRANOG NA	44

5.2. USPOREDBA KALIBRACIJSKIH KRIVULJA SUSTAVA S BOJILOM	45
5.3. USPOREDBA REZULTATA PONOVLJIVOSTI I VREMENA ODZIVA ZA BOJILO IMOBILIZIRANO	46
5.4. USPOREDBA RAZLIČITIH NAČINA MODIFICIRANJA IZLAZNOG SIGNALA.....	47
6. ZAKLJUČAK	49
7. POPIS SIMBOLA	50
8. LITERATURA	51

1. UVOD

Cilj rada je razvoj senzora za kontinuirano praćenje stanja rana neinvazivnom metodom u realnom vremenu. Ovakav bi sensor omogućio dugotrajno praćenje zdravstvenog stanja pacijenta bez posjeta liječniku, a podatci bi se pomoću integrirane bežične platforme jednostavno prenosili na osobna računala ili mobilne uređaje. Osim što ovakva vrsta kemijskog senzora uvelike olakšava život ljudi oboljelih od kroničnih rana, također omogućava smanjivanje troškova koje se izdvajaju za liječenje oboljelih. Primjerice u SAD-u se na godišnjoj bazi izdvaja oko \$25 milijardi za njegu pacijenata s kroničnim ranama [1].

Naime dokazano je kako tijek zacjeljivanja rane ovisi o brojnim čimbenicima kao što su posebne vrste bakterija, temperatura rane, vlažnost te o njenoj pH vrijednosti. Kroz opis potencijalnih markera za analizu rane dani su i najznačajniji primjeri senzora koji omogućuju praćenje stanja. Jedan od najpogodnijih markera za praćenje stanja rana je upravo njena pH vrijednost. pH vrijednosti niže od 7 sprječavaju razvoj bakterija na rani dok pH iznad 7,15 pogoduje njihovom razvoju te se stvaraju uvjeti za nastanak kronične rane. Također, veliku ulogu u praćenju stanja rane ima i sama faza zacjeljenja u kojoj se rana nalazi [2]. Tako je primjerice upalna faza normalna pojava kod novonastalih rana, ali ukoliko se upala produži na duže vrijeme tada predstavlja ozbiljan problem. Stoga je potrebno omogućiti kontinuirano i neinvazivno praćenje pH vrijednosti rane pomoću adekvatnog osjetila koje će zadovoljiti sve potrebe koje zahtjeva takva analiza. Selektivnost, osjetljivost, stabilnost, točnost, preciznost, mjerno područje, granica detekcije i vrijeme odziva su značajke koje su potrebne kako bi sensor dao precizan, pouzdan i točan analitički signal. Sve navedene značajke zadovoljava nosivi bežični optički kemijski senzor koji se sastoji se od osjetilnog dijela s imobiliziranim bojilom, a promjena stanja rane detektira se pomoću optoelektroničkog sustava integriranog na radiofrekvencijsku identifikacijsku (RFID) platformu. Dobiveni podaci se prenose preko čitača na osobno računalo. Prednosti optičkih bežičnih kemijskih senzora u odnosu na elektrokemijske senzore za praćenje stanja rane je što elektrokemijski senzori ne mogu dati oku vidljivu promjenu, a optički senzori mogu, te tako na jednostavan način ukazuju na tijek zacjeljenja [3] i [4].

U radu je provedena karakterizacija pH osjetljivog bojila imobiliziranog na različite materijale (zavoj, poliesterska folija) pomoću spektrometra, kako bi se na temelju dobivenih rezultata mogao odabrati sustav koji pokazuje bolja primjenska svojstva, kao što su brzina

odziva i ponovljivost. Temeljem rezultata analize dan je opis konačne izvedbe optičkog senzora koji zadovoljava sve potrebne zahtjeve.

2. OPĆI DIO

2.1. RANE

Koža je najveći ljudski organ te omogućava zaštitu organizma od vanjskog utjecaja. Kao takva izložena je utjecaju temperature, zračenju te traumama. Taj štetni utjecaj može izazvati deformacije kao što su primjerice rane [5]. Rana predstavlja ozljedu nastalu fizičkim, kemijskim ili mehaničkim utjecajem na kožu (tkivo) ili sluznicu pri čemu se stvara prekid kontinuiteta kože (tkiva) ili sluznice [6].

2.1.1. Proces zacjeljenja rane

Zacjeljenje rane je proces koji slijedi netom nakon njenog stvaranja. Navedeni proces odvija se u pet osnovnih faza, a cilj zacjeljenja je uklanjanje oštećenih stanica i stranih tijela te stvaranje novog tkiva.

1. Vaskularna faza: jest prva faza koja započinje netom nakon ozljeđivanja kože (tkiva). U toj fazi krv i limfa iz krvnih i limfnih žila 'čisti ranu' od stranih tijela. Zbog vazokonstrikcije dolazi do prestanka krvarenja. Potom započinje proces vazodilatacije koju potiču histamin, kinini, prostaglandini i čimbenici sustava komplemenata. Krvni ugrušak u rani stvaraju trombociti, a u prisutnosti monomera fibrina i čimbenika zgrušavanja XII stvara se provizorni izvanstanični matriks koji štiti ranu od infekcije.

2. Upalna faza: nastaje izlaskom leukocita u ranu. Proces se može zapaziti prisutnošću nekrotičnog tkiva i enzima proteaze. Procesom zacjeljenja ekstravazacija krvnih stanica se smanjuje, a nakon ekstravazacije matriks rane se ojačava glikoproteinima osteonektinom i tenascinom, dok je primarno sadržavao samo fibronektin.

3. Proliferacijska faza: se sastoji od tri faze: angiogeneze, fibroplazije i epitelizacije. Angiogeneza podrazumjeva stvaranje novih kapilara koje se s vremenom oblikuju u arteriole i venule.

Fibroplazija započinje kada i angiogeneza, a karakterizira ju nastanak granulacijskog tkiva koji štiti od vanjskog utjecaja unutarnje tkivo. Granulacijsko tkivo se u dubini rane pretvara u kolageno vezivno tkivo, a njegovim zgušnjavanjem nastaje ožiljkasto tkivo.

Epitelizacija je proces zatvaranja rane rastom epitela, a kontrakcija ožiljkastim tkivom ubrzava proces epitelizacije.

4. Faza kontrakcije rane: proces smanjivanja površine rane. Posljedica je migracije miofibroblasta u ranu.

5. Faza cikatrizacije: jest proces reorganizacije izvanstaničnog matriksa pri čemu se rana trajno zatvara. Pretvorba granulacijskog tkiva u vlaknasto ožiljkasto tkivo kao posljedicu izaziva ožiljak [6].

2.1.2. Akutne i kronične rane

Dva osnovna načina za podjelu rana je prema njihovom vremenu zacjeljenja. Akutne rane za razliku od kroničnih imaju znatno kraće vrijeme zacjeljenja te se nijedna od prethodno spomenutih faza značajno ne produžuje. Naime, nekoliko je čimbenika koji utječu na tijek zacjeljenja rane.

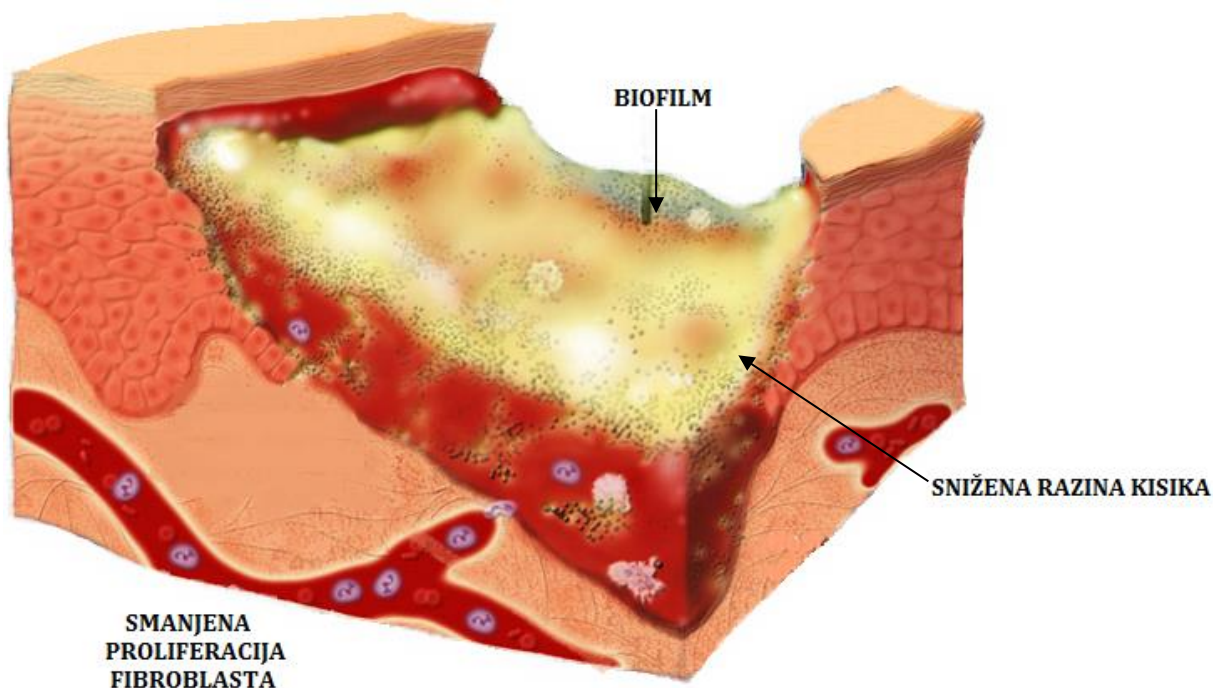
Infekcija rane: Bakterije proizvode enzime i produkte staničnog metabolizma koji smanjuju koncentraciju faktora rasta te degradacijom fibrina smanjuju tendenciju rane ka zacjeljenju. Bakterije također produžuju upalni proces, a kronične rane imaju vrlo visoku koncentraciju bakterija. Stoga, smanjenje koncentracije bakterija u rani može pospješiti postupak zacjeljenja.

Upalni medijatori: Poznato je kako upalni medijatori utječu na smanjenje faktora rasta i izvanstanične matrice koji su nužni za pravilno zacjeljenje rane.

Hipoksija (smanjena koncentracija kisika u tkivu i stanicama): Hipoksija uzrokuje smanjenu tendenciju zacjeljenja rane tako što ometa proliferaciju fibroblasta te proizvodnju kolagena koji su ključni u procesu zacjeljenja. Neki od češćih uzroka hipoksije su: pušenje, bolesti perifernih žila te plućne bolesti.

Biofilm (složena struktura mikroorganizama na površini): Biofilm također ima veliku ulogu na tijek zacjeljenja rane, Slika 1. Vrlo često dovodi do hipoksije zbog smanjenja proliferacije fibroblasta.

Nizak unos proteina: Pravilna i raznovrsna prehrana nužna je za optimalno funkcioniranje organizma. Ukoliko postoji smanjeni unos proteina to će štetno utjecati na tijek zacjeljenja. Naime, rana će biti u upalnoj fazi sve dok je organizam u kataboličkom stanju jer nedovoljan unos proteina uzrokuje razgradnju proteina iz tkiva kako bi se oslobodila energija, a posljedica toga je smanjeno formiranje fibroblasta potrebnog za pravilno zacjeljenje rana [7].



Slika 1. Utjecaj biofilma na tijek zacjeljenja rane [8].

2.2. METODE PRAĆENJA STANJA RANE

Rane uveliko utječu na ljudski život i njegovu kvalitetu, stoga se pokušavaju pronaći potencijalni markeri koji će omogućiti praćenje stanja rane te tako osigurati prevenciju komplikacija povezanih uz njihovo nepravilno zacjeljenje kao što su odstranjivanje tkiva i amputacije [9]. Neki od potencijalnih markera su: posebne vrste bakterija, ispuštanje citokina kao odgovor na prisutnost određenih mikrobnih antigena, genski polimorfizmi koji ukazuju na sporo zacjeljenje rana, enzimi i njihovi supstrati (metaloproteinaza i izvanstanični matriks), faktori rasta i hormoni (androgeni, estrogen, hormoni štitnjače), imunohistokemijski biljezi (integrini, receptori kemokina i transformirajući faktor rasta beta II receptori), upalni medijatori (citokini i interleukini), dušikov (II) oksid, nutritivni čimbenici (cink, glutamin, vitamini), reaktivni metaboliti kisika, temperatura, transepidermalni gubitak vode iz područja oko rane te pH vrijednost tekućine u rani [10]. Nepravilno zacjeljenje rana može izazvati neke od sljedećih neželjenih pojava: infekcije rane, crvenilo, toplina rane, oteklina, pojava gnojenja, neugodan miris, bol, granulaciju tkiva, krvarenje u kasnoj fazi zacjeljenja, odumiranje tkiva i premošćivanje epitela [11]. Naravno, prethodno navede pojave potrebno je preventivno spriječiti, a to je moguće upravo kontinuiranim praćenjem stanja rane.

2.2.1. Bakterije kao potencijalni markeri

Kao potencijalni marker za praćenje stanja rane našle su se bakterije, odnosno produkti njihovog metabolizma. Tako primjerice bakterija *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa* oslobađa pigment piocianin koji je žuto-zelene boje. U tu svrhu razvijena je elektroda od ugljičnog vlakna koja je omogućila oksidaciju i redukciju pigmenta piocianina pomoću pravokutnovalne voltometrije stoga bi takva vrsta senzora zahtjevala izvor te vanjski elektrokemijski detektor iako bi se elektroda mogla inkorporirati u zavoj ili flaster [12].

Također, koloniziranje bakterija *Pseudomonas aeruginosa* i *Streptococcus aureus* moguće je indicirati naglim padom koncentracije mokraćne kiseline u rani. Naime, navedene bakterije metaboliziraju mokraćnu kiselinu pomoću enzima urikaze. Senzor koji bi omogućio praćenje stanja rane na temelju mokraćne kiseline se sastoji od elektrode od ugljikovih vlakana, a metoda se zasniva na detekciji mokraćne kiseline oksidacijom pri +0,23 V pomoću pravokutnovalne voltometrije [13]. Takav senzor koji bi detektirao mokraćnu kiselinu moguće je primijeniti i na praćenju stanja neinficiranih venskih ulkusa pri čemu bi tada razina mokraćne kiseline u ulkusu bila u porastu jer su bakterije koje metaboliziraju mokraćnu kiselinu odsutne [14].

Koncentracija neutrofilnih granulocita u rani također može upućivati na povećano razmnožavanje bakterija. Pri ozljeđivanju neutrofilni granulociti vrlo se brzo regrutiraju na mjestu ozljede i započinju proces čišćenja rane od nekrotičnog tkiva. Stoga, kada se rana očisti od bakterija neutrofilni granulociti prestaju sa svojom aktivnošću [15].

Jednostavno rješenje za detekciju gram negativnih (*P. aeruginosa*) i gram pozitivnih (*S. aureus*) bakterija našlo se u vidu razgranatog poli(N-isopropilakrilamida) (HB-PNIPAM) modificiranog polimiksinom ili vankomicinom (antibiotici) koji imaju sposobnost vezanja za staničnu membranu spomenutih bakterija. HB-PNIPAM-polimiksin [16] i HB-PNIPAM-vankomicin [17] u prisustvu bakterija mijenjaju strukturu, iz otvorene spiralne strukture prelaze u aglomerate loptičaste strukture. Takvi materijali imaju potencijalnu primjenu u zavojima za rane kako bi pospješili zacjeljivanje ili detektirali stanje rane ugradnjom fluorescentne probe [7].

Bakterijske metaboličke produkte također je moguće signalizirati olfaktivnim osjetilom [18]. Naime, neugodan miris je čest pokazatelj inficiranih i kroničnih rana.

2.2.2. Temperatura rane kao potencijalni marker

Povišena temperatura često ukazuje na upalne procese u organizmu ili razvoj infekcije. Stoga se kao potencijalni marker kronične rane ili venskog ulkusa može koristiti njena temperatura. Primjerice, ukoliko je razlika izmjerene temperature između zdravog stopala i stopala zahvaćenog ranom viša od 4°F (2,23°C) tada je to znak kako se radi o venskom ulkusu. Mjerenje temperature rane zgodan je proces iz razloga što je metoda neinvazivna i vrlo brza. Primjerice, ručni infracrveni termometri pogodni su senzori za određivanje temperature rane [19]. Otežavajuća okolnost je ta što infracrveni termometri nisu pogodni za kontinuirana mjerenja temperature te nisu minijaturizirani što otežava njihovu primjenu u svrhu praćenja stanja rana. Stoga bi idealno bilo inkorporirati osjetilo temperature u zavoj kako bi se podaci o stanju rane mogli dobivati kontinuirano. Za kontinuirano praćenje temperature u realnom vremenu moguće je iskoristiti termo osjetljive polimere kao što je poli(N-isopropilacrilamid) (PNIPAM) graftiran na porozni silicij, pSi, kako bi nastao kompozitni anorgansko-organski film čija se optička svojstva mijenjaju promjenom temperature [20].

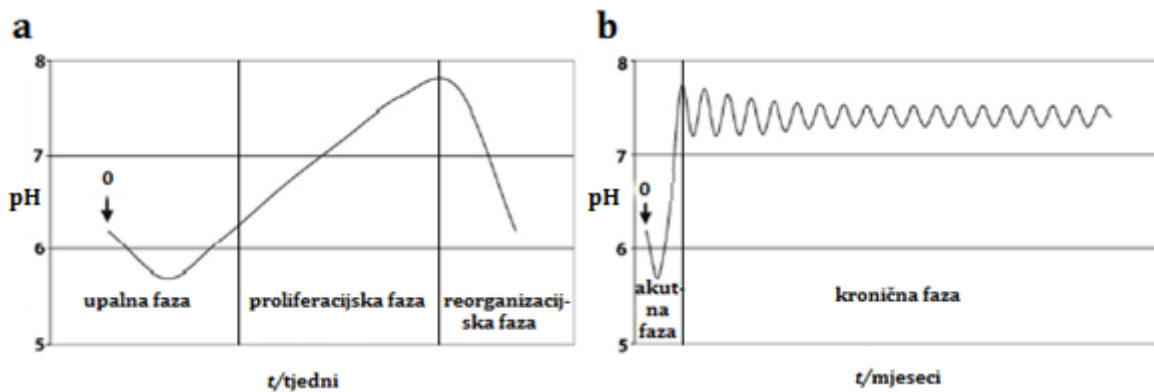
2.2.3. Vlažnost rane kao potencijalni marker

Vlažnost rane je vrlo bitan čimbenik u procesu zacjeljenja. Stoga je potrebna optimalna vlažnost kako bi pospješila tijek zacjeljenja. Razvijeni su brojni materijali od kojih je moguće načiniti zavoje koji će omogućiti zadovoljavajuću vlažnost rane. To su primjerice: alginati, hidrogelovi, hidrokoloide i pjene [21] i [22]. Kako bi se omogućilo kontinuirano praćenje stanja rana na temelju vlažnosti, potrebno je u zavoj implementirati senzor za vlagu. Primjer takvog senzora je električni impedancijski senzor kojim je moguće pratiti vlažnost rane u realnom vremenu. Senzor određuje volumen kapljevine u rani mjereći impedanciju koristeći izmjeničnu struju različitih frekvencija, a sastoji se od osam nezavisnih Ag/AgCl elektroda. Tako se došlo do zaključka kako impedancija iznad 200 Ω upućuje na prekomjerni gubitak vlažnosti rane [23].

2.2.4. pH vrijednost tekućine rane kao potencijalni marker

Većina biokemijskih procesa u organizmu povezana je s njegovom pH vrijednošću. Kako bi se organizam zaštitio od bakterija pH vrijednost kože je uglavnom blago kisela (4-6) [6]. Jednako tako i pH vrijednost rana povezana je s procesom njenog zacjeljenja, Slika 2. Kod akutnih rana pri upalnoj fazi pH rane je ispod vrijednosti 7, oko 6,5. Kako rana prelazi u fazu proliferacije tako joj se povećava i pH vrijednost te dostiže svoj maksimum, 7,8. Faza reorganizacije je posljednja faza u stadiju zacjeljenja rane i tada se pH rane snižava i postiže

vrijednost između 6 i 7. Vrijeme zacjeljenja akutne rane iznosi svega nekoliko tjedana. Za razliku od akutnih rana kod kroničnih, nakon proliferacijske faze ne odvija se faza reorganizacije već pH vrijednost oscilira oko vrijednosti 7,4 i ne snižava se ispod vrijednosti 7,15. To je ujedno glavni pokazatelj kako rana ne zacjeljuje pravilnim tijekom. Vrijeme zacjeljenja kroničnih rana traje i do nekoliko mjeseci, a kao posljedicu često uzrokuje potrebu za odstranjivanjem tkiva.



Slika 2. Prikaz promjene pH vrijednosti rane u ovisnosti o vremenu i fazi zacjeljenja u slučaju a) akutne rane i b) kronične rane.

Kao potencijalno rješenje za kontinuirano praćenje pH vrijednosti rana moguće je u zavoj inkorporirati pH osjetilo koje će neinvazivnom metodom davati podatke o stanju rane.

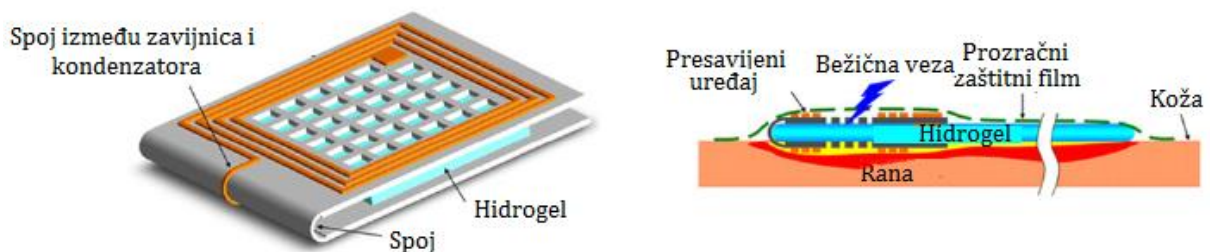
2.2.5. Konvencionalne metode praćenja stanja rane

U principu danas je najrazvijenija metoda vizualnog praćenja stanja rane. Ta metoda iako je najraširenija zahtjeva dugogodišnje iskustvo u radu s ranama, odnosno stručne osobe poput medicinskih sestara i liječnika. Svi pregledi rana obavljaju se u ambulantama ili bolnicama što pacijentima stvara dodatni napor. Svaki vizualni pregled rane iziskuje ponovno previjanje i čišćenje koje je izuzetno bolno, a u nekim slučajevima nepotrebno. Previjanje stvara poseban rizik jer se u uvjetima otkrivene rane može pojaviti naknadna infekcija, stoga se taj proces odvija što je moguće rjeđe [24]. Već su opisani svi markeri koji omogućuju neposredno praćenje stanja rane pomoću neinvazivnih senzora. Zbog svih navedenih razloga idealnu ulogu u praćenju stanja rana imali bi nosivi senzori. Oni omogućuju nesmetano kretanje pacijenata dok obavljaju kontinuiranu analizu neinvazivnim metodama u realnom vremenu. Također sprječavaju nepotrebne posjete liječnicima i bolna previjanja kada ona nisu potrebna. Bežične platforme u ovom slučaju mogu doprinijeti olakšanom prijenosu podataka direktno liječnicima ili medicinskom osoblju. Kako bi se spriječilo uzrokovanje bola kod

pacijenata, tijekom mjerenja, idealno je senzor inkorporirati u sam zavoj te se tako sprječava dodatno opterećenje pacijenata [25]. Stoga, kako bi se pospješio život oboljelih radi se na razvoju senzora koji omogućavaju praćenje tijeka zacjeljenja.

2.3. ELEKTROKEMIJSKI SENZORI ZA PRAĆENJE pH RANE

Praćenje pH vrijednosti rane pokazalo se kao jednostavna metoda detekcije kroničnih ili inficiranih rana. Korist takvog postupka objašnjena je u poglavlju 2.2.4. Kao potencijalni senzor za praćenje stanja rane moguće je u klasični zavoj inkorporirati osjetilo koje će kontinuirano pratiti pH vrijednost fluida rane. Takav primjer je uređaj koji se sastoji od para zavojnica u čijem je središtu pH osjetljivi hidrogel, poli(vinil alkohol)-poli(akrilna kiselina), Slika 3. Princip se temelji na promjeni udaljenosti između para zavojnica u ovisnosti o pH vrijednosti rane. Kao rezultat toga promjenom udaljenosti između zavojnica mijenja se i elektromagnetska indukcija. Senzor omogućava i bežični prijenos podataka [26]. No problem nastaje ukoliko dođe do promjene vlažnosti u rani, stoga je potrebno inkorporirati i pH neosjetljivi hidrogel koji će mjeriti isključivo vlažnost rane te spriječiti unos pogreške tijekom određivanja pH vrijednosti. Također, senzor omogućava praćenje pH vrijednosti u rasponu od 2 do 7 te je samim time otežana detekcija kroničnih rana.

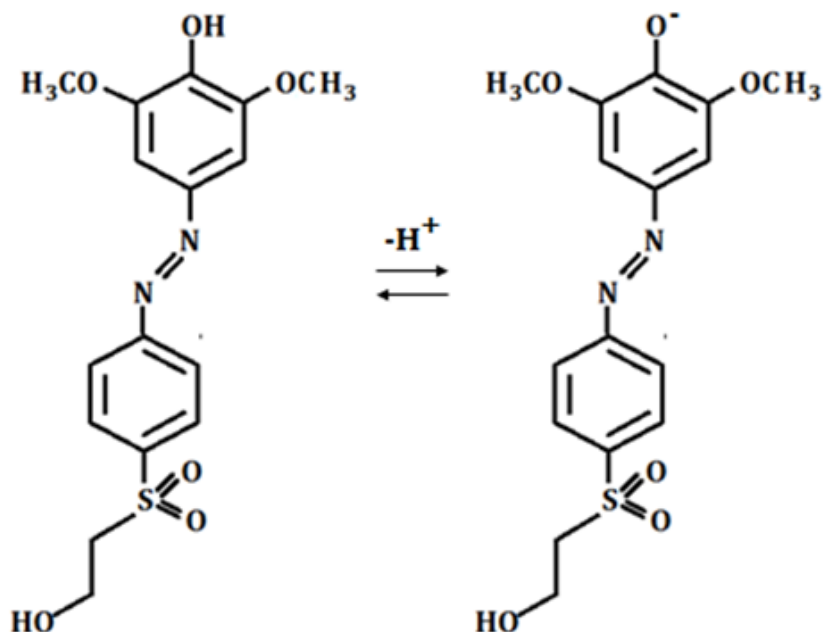


Slika 3. Prikaz indukcijskog pH osjetila [24].

Još jedan primjer elektrokemijskog senzora sastoji se od planarnih elektroda isprintanih na celuloznom filter papiru, a omogućava praćenje pH vrijednosti preko promjene oksidacijskog potencijala mokraćne kiseline u rani. U ovom slučaju senzor je pogodan za određivanje pH vrijednosti u rasponu od 3,7 do 8 što je pogodno područje za detekciju kroničnih rana [27]. Dodatni problem kod primjene senzora je nemogućnost kontinuiranog praćenja jer tijekom vremena dolazi do stvaranja naslaga na planarnoj elektrodi te potrošnje mokraćne kiseline u rani, stoga je senzor moguće koristiti za jednokratnu upotrebu.

2.4. OPTIČKI SENZORI ZA PRAĆENJE pH VRIJEDNOSTI RANE

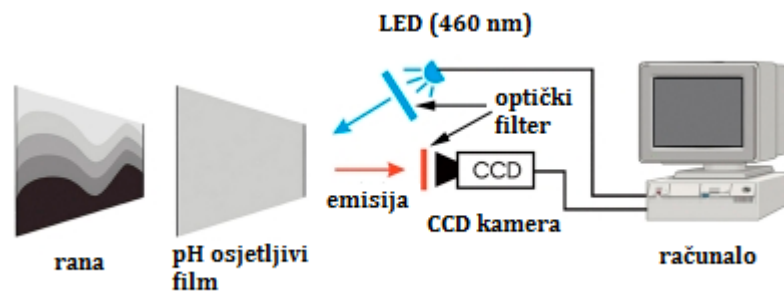
Jedan od najpogodnijih načina praćenja pH vrijednosti tekućine rane je pomoću pH osjetljivog bojila koje je moguće imobilizirati na klasične zavoje. Takav sustav kolokvijalno zvan 'pametni zavoj' omogućava promjenu boje imobiliziranog bojila u ovisnosti o pH vrijednosti rane, odnosno tijekom njenog zacjeljenja. Primjeri bojila čija konstanta disocijacije odgovara pH vrijednosti akutnih i kroničnih rana su derivati azobenzena sa supstituiranim hidroksilnim skupinama [28] i [29]. Bojila imobilizirana na celulozi koja prema pK_a vrijednosti pokazuju potencijalnu primjenu u praćenju rana su: 4-[4-(2-hidroksietansulfonil)-fenilazo]-2,6-dimetilfenol, GJM-503, pK_a (na Innovia celulozi)= 7,71, 4-[4-(2-hidroksietansulfonil)-fenilazo]-2,6-dimetoksifenol, GJM-534, pK_a (na Innovia celulozi)= 7,61 [28] te 4-bromo-2-((4-(2-hidroksietilsulfonil) fenil) diazenil)fenol s $pK_a= 7,5$, 4-hidroksi-3-((4-(2-hidroksietilsulfonil) fenil) diazenil)benzonitril s $pK_a= 6,2$. U ovom radu na klasični zavoj metodom premazivanja nanoseno je pH osjetljivo bojilo 4-[4-(2-hidroksietansulfonil)-fenilazo]-2,6-dimetoksifenol, GJM-534, Slika 4. Imobilizirano pH osjetljivo bojilo omogućava kvantitativnu analizu. Odnosno, promjena boje zavoja ukazuje na stanje rane.



Slika 4. pH osjetljivo bojilo 4-[4-(2-hidroksietansulfonil)-fenilazo]-2,6-dimetoksifenol, GJM-534, korišteno u izradi pametnog zavoja.

Već je spomenuto kako je vizualna metoda pregleda rana najzastupljenija, ali iziskuje pregled od strane stručne osobe. Kako bi oboljele osobe mogle vršiti analizu rane bez posjeta liječniku razvijen je algoritam koji na temelju digitalne fotografije detektira stanje rane. Za detekciju rane koristi se klasična digitalna kamera s polarizirajućim filterom za reduciranje reflektirane svjetlosti. Fotografija se obrađuje u programu MATLAB gdje se detektira zona rane te se na temelju slike određuje stanje rane [30].

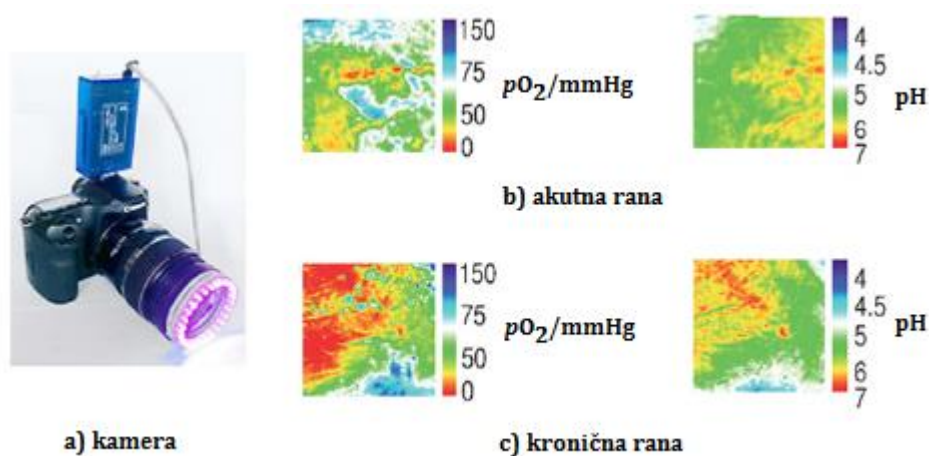
Još jedan optički senzor za praćenje stanja rana sastoji se od osjetilnog filma za detekciju pH koji se sastoji od fluorescein izotiocijanata, FITC, kao pH luminofora i referentnog fosforescirajućeg bojila rutenij(II)tris-(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) čija fosforescencija ne ovisi o pH vrijednosti. Oba bojila moguće je pobuditi LED diodom koja emitira valnu duljinu 460 nm, a emitirano zračenje detektira se pomoću CCD kamere s optičkim filterom (530 nm), Slika 5. Osjetilni film nastao je kovalentnim vezanjem FITC-a preko amino skupina na mikro čestice hidrofilnog polimera aminoceluloze. Zbog hidrofilnosti film pruža brz odziv i brzu difuziju protona do molekule FITC-a. Referentno bojilo u ovom slučaju je vezano za mikro čestice poliakrilonitrila fizičkim zarobljavanjem. Tako vezana bojila imobilizirana su u poliuretanskom hidrogelu na prozirnoj poli(viniliden-kloridnoj) foliji [31]. Nažalost, senzor nije nosiv jer nema bežični prijenos podataka stoga je kontinuirano praćenje rana onemogućeno.



Slika 5. Shematski prikaz sustava za određivanje pH vrijednosti rane pomoću osjetilnog filma na bazi FITC-a [31].

Sličan senzor s FITC osjetilom integriran je s digitalnom kamerom nadograđenom LED prstenom koji emitira valnu duljinu 405 nm, Slika 6. Senzor omogućava praćenje pH vrijednosti rane, ali i parcijalni tlak kisika, pO_2 . Osjetilni film baziran je na kopolimeru stirena i akrilonitrila (SAN) s paladij(II)-porfirin kompleksom za detekciju O_2 [32] ili fluorescein izotiocijanata, FITC, kao pH luminofora [31] te difenilantracen kao referentno bojilo koji su u

kontakta s ranom. Mehanizam detekcije kisika temelji se na gašenju luminiscencije imobiliziranog porfirina u prisutnosti kisika. Senzor kao rezultat daje digitalnu sliku koja prikazuje ovisnost boje (crvene, zelene i plave) o pO_2 i pH vrijednosti. Senzor omogućava nešto jednostavniju analizu rane u odnosu na prethodni jer je integriran s digitalnom kamerom, ali također ne omogućava kontinuiranu analizu [33].

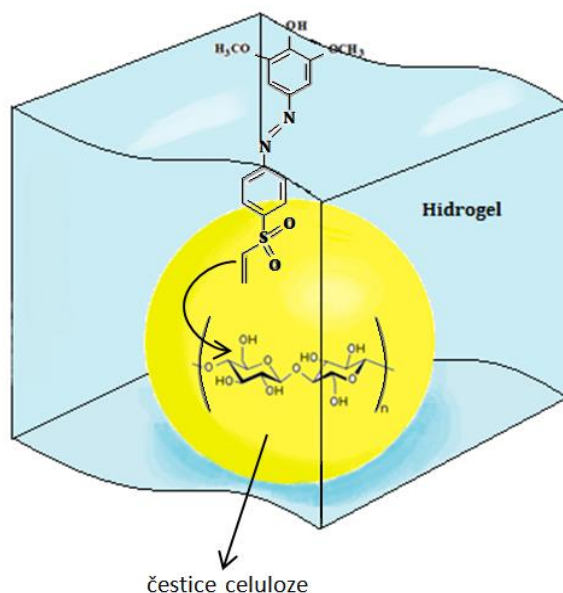


Slika 6. Prikaz a) kamere i zona b) akutne i c) kronične rane u ovisnosti o pO_2 i pH vrijednosti [33].

2.5. OSJETILNI DIO OPTIČKOG SENZORA ZA PRAĆENJE pH VRIJEDNOSTI RANA

Cilj ovog rada je razviti nosivi optički senzor koji će omogućiti kontinuirano i neinvazivno praćenje pH vrijednosti tekućine rane. U tom slučaju posebnu ulogu ima osjetilni dio senzora koji mora biti pH osjetljiv. Za tu svrhu kao idealno osjetilo našlo se već spomenuto pH bojilo 4-[4-(2-hidroksietansulfonil)-fenilazo]-2,6-dimetoksifenol, GJM-534, s eksperimentalno određenom vrijednosti pK_a (na Innovia celulozi)= 7,61 koja idealno odgovara za praćenje stanja akutnih i kroničnih rana [28]. Navedeno bojilo sadrži metoksilne skupine u orto položaju, u odnosu na hidroksilnu skupinu, koje dodatno stabiliziraju benzenski prsten te je time smanjena tendencija vodika hidroksilne skupine za reakciju što uzrokuje povećanje pK_a vrijednosti molekule. Kako bi se olakšala analiza pH vrijednosti rane idealno je pH osjetljivo bojilo imobilizirati na klasične celulozne ili sintetičke zavoje kako bi sama analiza bila neinvazivna. Prednost bojila GJM-534 je u tome što sadrži hidroksietilsulfonilnu skupinu koja omogućava kovalentno vezanje na celulozu preko

hidroksilnih skupina molekula celuloze, Slika 7. Proces imobilizacije bojila GJM-534 moguće je izvršiti tako da se bojilo izloži utjecaju koncentrirane sulfonske kiseline na sobnoj temperaturi 30 minuta pri čemu hidroksietilsulfonilna skupina prelazi u sulfonatnu skupinu te se smjesa dodaje u destiliranu vodu koja sadrži mikročestice celuloze. Potom se vrši neutralizacija 30 %- tnom otopinom natrijevog hidroksida i dodaje se natrijev karbonat zajedno s 30%- tnim natrijevim hidroksidom kako bi se sulfonatna skupina prevela u vinilsulfonilnu koja jednostavno može reagirati s hidroksilnom skupinom molekula celuloze. Tako nastale obojane čestice dispergiraju se u biokompatibilnom hidrogelu HydroMed D4 na bazi poliuretana [28]. Kovalentno imobiliziranje sprječava ispiranje bojila i njegovu migraciju u ranu čime je onemogućeno izazivanje alergijskih reakcija ili sličnih nuspojava, a dispergiranje obojanih čestica celuloze u biokompatibilne filmove omogućava imobilizaciju bojila i na sintetičke materijale uz onemogućeno ispiranje.



Slika 7. pH osjetljivo bojilo GJM-534 se preko vinilsulfonilne skupine veže na mikro čestice celuloze dispergirane u biokompatibilnom hidrogelu.

Optičko pH osjetilo imobilizirano na klasične zavoje omogućava kvantitativnu analizu golim okom što nije moguće elektrokemijskim osjetilima. Međutim, već je spomenuto kako se u ranama radi o malim promjenama pH vrijednosti te je tu promjenu teško vizualno detektirati. Stoga se javlja potreba za integracijom mjernog pretvornika koji će omogućiti precizniju kvantitativnu analizu. Nosivost senzora može omogućiti mjerni pretvornik koji sadrži bežičnu platformu za prijenos podataka.

2.6. INTEGRACIJA OSJETILNOG DIJELA OPTIČKOG SENZORA I BEŽIČNE PLATFORME ZA PRAĆENJE pH RANE

Kako bi senzor zadovoljio sve zahtjeve primjene kao što su primjerice nosivost i kontinuirano mjerenje potrebno je u senzor integrirati bežični protokol. Najčešće korištene bežične tehnologije u kemijskim senzorima su: Radiofrekvencijska identifikacija (RFID), Komunikacija bliskog polja (eng. *Near field communication, NFC*), Bluetooth i ZigBee.

Bluetooth standard je jedan od najčešće upotrebljavanih bežičnih tehnologija (od gore navedenih). Prvotno je razvijen za primjenu u mobilnim uređajima i prijenosnim računalima. Omogućava prijenos podataka putem radio valova na frekvenciji u području od 2,4 GHz između fiksnog odašiljača (antene) i nosivog uređaja (npr. senzora, mobilnih uređaja...). Maksimalni domet koji Bluetooth omogućava je 100 m, iako je optimalan način rada uz domet od 10 m te se može ostvariti prijenos podataka od 3 Mb/s (uz poboljšani način rada).

ZigBee bežična tehnologija razvijena je kako bi zadovoljila potrebe za prijenosom male količine podataka između velikog broja uređaja. ZigBee protokol iziskuje vrlo malu potrošnju energije što je prednost prilikom primjene u kemijskim senzorima. Navedena bežična tehnologija može djelovati na 16 kanala i frekvenciji od 2,4 GHz uz brzinu prijenosa podataka od 250 kb/s, u 10 kanala te frekvenciji 915 MHz uz brzinu prijenosa podataka od 40 kb/s i u 1 kanalu na frekvenciji od 868 MHz te brzinu prijenosa podataka 20 kb/s. Maksimalni domet za primjenu ZigBee protokola je 75 m, a sigurnost podataka jamči AES (eng. *Advanced Encryption Standard*) algoritam koji koristi 128-bitni ključ [34].

Radiofrekvencijska identifikacija ima najrašireniju upotrebu u detekciji i identifikaciji proizvoda. Moguć je rad na trima područjima frekvencija. Jako visokoj od 860 do 960 MHz, visokoj frekvenciji od 13,56 MHz te na niskoj frekvenciji u području od 128 do 135 kHz. Navedeni protokol ima vrlo malu potrošnju energije, a dodatnu uštedu moguće je ostvariti radom u pasivnom načinu pri čemu se pod utjecajem elektromagnetskog zračenje u spiralnoj anteni na platformi inducira struja koja se može iskoristiti za napajanje, primjerice, mjernog pretvornika kemijskog senzora. Također, moguć je rad u polu pasivnom te aktivnom načinu pri čemu je potreban dodatan izvor energije, najčešće baterija, ali u tim uvjetima se ostvaruje nešto veći domet [35].

Komunikacija bliskog polja, NFC (eng. *Near field communication*) danas se ponajviše koristi u svrhe beskontaktnog plaćanja te validaciju karata (javni prijevoz, manifestacije...).

Radi na frekvenciji 13,56 MHz. Komunikacija bliskog polja razvijena je iz radiofrekvencijske komunikacije te je moguće kombinirati RFID senzor i NFC čitač i obrnuto. Također prijenos podataka je osiguran vrlo kratkim dometom od 20 cm [36]. Posebna pogodnost NFC protokola kod primjene u kemijskim sensorima jest što novi mobilni uređaji (Smartphone) sadrže NFC tehnologiju pa se dobiveni podatci mogu prenositi i na mobilne uređaje.

Iz navedenih karakteristika pojedinih bežičnih tehnologija, u svrhu kontinuiranog i neinvazivnog praćenja stanja rana, najpogodniji su radiofrekvencijska identifikacija i komunikacija bliskog kontakta (eng. *Near field communication*) jer oba protokola imaju kratak domet što osigurava siguran prijenos podataka te vrlo nisku potrošnju energije što je posebno pogodno u svrhu kontinuiranog i dugotrajnog praćenja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U radu je provedena spektrofotometrijska karakterizacija pH osjetljivog bojila imobiliziranog na pamučnom zavoju i poliesterskoj foliji. Pomoću modularnog spektrometra Flame uz izvor DH-2000-BAL (Ocean Optics, Dunedin, SAD) određena je valna duljina maksimuma reflektancije pH osjetljivog bojila, GJM-534. Također je određena kalibracijska krivulja te ponovljivost pH osjetljivog bojila za oba slučaja te su rezultati međusobno uspoređeni. Snimljena je i kalibracijska krivulja za bojilo imobilizirano na zavoj pomoću integrirane radiofrekvencijske identifikacijske platforme.

3.1. MATERIJALI I KEMIKALIJE

Kemikalije potrebne za pripravu pufera dane su u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz kemikalija za pripravu citratnih pufera.

A	B
Citratna kiselina (Kemika d.d., Zagreb) Fosfatna kiselina (Kemika d.d., Zagreb) Destilirana voda Borna kiselina (Sigma Aldrich) Natrijev hidroksid (Kemika d.d., Zagreb)	Klorovodična kiselina (0,1 mol/dm ³)

Materijali potrebni za izradu osjetilnog dijela senzora:

- koktel (pH osjetljivo bojilo 4-[4-(2-hidroksietansulfonil)-fenilazo]-2,6- dimetoksifenol, GJM-534 kovalentno vezano na mikro čestice celuloze + 10 %- tna vodena otopina etanola + HydroMed D4 (poliuretanski hidrogel))
- poliesterski film (HiFi INDUSTRIAL FILM), debljina= 100 μm
- celulozni zavoj (VIVAPORE TOSAMA, Domžale, Slovenija)
- protočna ćelija

3.2. INSTRUMENTI

- Modularni spektrometar Flame uz izvor DH-2000-BAL (Ocean Optics, Dunedin, SAD)
- Homogenizator Stuart SA8 (Cole-Parmer, Stone, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- pH-metar Iskra MA 5740
- RFID platforma (GoSense Wireless Ltd, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)

3.3. TIJEK RADA

3.3.1. Priprema pufera

Pripremljeni su puferi različitih pH vrijednosti (5,0 – 10,0). Potrebna vrijednost pH pufera dobije se miješanjem komponente **A** s 0,1 mol/dm³ klorovodične kiseline, komponenta **B**, vidi Tablicu 1, prema izrazu 1.

20 ml **A** + X ml **B** + (80-X) ml H₂O

(1)

Pri čemu volumen potrebne 0,1 mol/dm³ klorovodične kiseline (**B**) ovisi o potrebnoj vrijednosti pH [$V(B) = f(pH)$].

- Priprema komponente **A** citratnog pufera

Za pripravu komponente **A** citratnog pufera potrebno je 100 ml citratne kiseline (0,33 mol/dm³), 100 ml fosfatne kiseline (0,33 mol/dm³), 3,54 g borne kiseline i 343 ml natrijevog hidroksida (1 mol/dm³). Navedene kemikalije dodaju se u odmjernu tikvicu od 1000 ml te se do oznake dopuni deioniziranom vodom.

Korištenjem formule 1 pripremljeni su puferi u tikvicama od 100 ml na sljedeći način, Tablica 2.

Tablica 2. Prikaz potrebnih volumena pojedine komponente za pripremu pufera određene pH vrijednosti.

pH= 5,0	20 ml A + 50,7 ml B + 29,3 ml dest. vode
pH= 5,5	20 ml A + 46,3 ml B + 33,7 ml dest. vode
pH= 6,0	20 ml A + 42,7 ml B + 37,3 ml dest. vode
pH= 6,5	20 ml A + 38,4 ml B + 41,6 ml dest. vode
pH= 7,0	20 ml A + 34,2 ml B + 45,8 ml dest. vode
pH= 7,5	20 ml A + 29,6 ml B + 50,4 ml dest. vode
pH= 8,0	20 ml A + 28,0 ml B + 52,0 ml dest. vode
pH= 8,5	20 ml A + 27,6 ml B + 52,4 ml dest. vode
pH= 9,0	20 ml A + 24,0 ml B + 56,0 ml dest. vode
pH= 9,5	20 ml A + 19,7 ml B + 60,3 ml dest. vode
pH= 10,0	20 ml A + 16,5 ml B + 63,5 ml dest. vode

Konačne pH vrijednosti pufera određene su pH-metrom ISKRA MA 5740 i one iznose:

pH1= 4,986; pH2= 5,539; pH3= 6,029; pH4= 6,520; pH5= 6,994; pH6= 7,488; pH7= 8,000;
pH8= 8,502; pH9= 9,047; pH10= 9,478 te pH11= 10,005.

3.3.2. Izrada osjetilnog dijela senzora

1.) Poliesterska matrica s imobiliziranim pH osjetljivim bojilom

Na poliestersku foliju dimenzija 3,5 cm x 3,5 cm nanoseno je 100 μ l koktela (pH osjetljivo bojilo kovalentno vezano na mikro čestice celuloze i dispergirano u biokompatibilnom hidrogelu HydroMed D4 u 10%- tnom etanolu kao otapalu), prethodno homogeniziranog 2 min u homogenizatoru. Koktel je nanosen postupkom premazivanja (eng. *knife-coating*) na površinu poliesterske folije (HiFi INDUSTRIAL FILM) na dimenzije 1,5 cm x 1,5 cm.

2.) Zavoj s imobiliziranim pH osjetljivim bojilom

Na zavoju VIVAPORE TOSAMA u središtu izrezan je i uklonjen gornji hidrofobni sloj dimenzija 1,5 cm x 1,5 cm te je na to područje nanoseno 100 μ l koktela s bojilom (pH osjetljivo bojilo kovalentno vezano na mikro čestice celuloze i dispergirano u biokompatibilnom hidrogelu HydroMed D4 u 10 %- tnom etanolu kao otapalu), prethodno homogeniziranog 2 min u homogenizatoru. Koktel je kao i u prethodnom slučaju nanosen postupkom premazivanja (eng. *knife-coating*).

3.3.3. Određivanje maksimuma reflektancije pH osjetljivog bojila, GJM-534

Cilj određivanja maksimuma intenziteta reflektirane zrake protoniranog i deprotoniranog oblika imobiliziranog pH osjetljivog bojila GJM-534 je odrediti valnu duljinu pri kojoj bojilo (osjetilni dio senzora) pokazuje najveću osjetljivost. Pri toj valnoj duljini potrebno je u slijedećem koraku snimiti kalibracijsku krivulju kako bi se našla ovisnost izlaznog signala senzora (intenziteta reflektirane zrake) o pH vrijednosti.

POSTUPAK:

Maksimumi reflektancije pH osjetljivog bojila imobiliziranog na poliestersku foliju i na zavoj određeni su pomoću Ocean Optics spektrometra. Snimajući refleksijske spektre dobivena je ovisnost intenziteta reflektirane zrake o valnoj duljini, λ /nm, za svaku pH vrijednost. Na način da se osjetilni dio (flaster s imobiliziranim bojilom i poliesterska folija s imobiliziranim bojilom) drži u kontaktu $t= 3$ min s $V= 500$ μ l pufera različitih pH vrijednosti u rasponu od 5 do 10 (pH1= 4,986; pH2= 5,539; pH3= 6,029; pH4= 6,520; pH5= 6,994; pH6= 7,488; pH7= 8,000; pH8= 8,502; pH9= 9,047; pH10= 9,478; pH11= 10,005) kako bi se dobili maksimumi intenziteta reflektirane zrake protoniranog i deprotoniranog oblika pH osjetljivog bojila za oba sustava: bojilo imobilizirano na zavoj i poliestersku foliju.

3.3.4. Snimanje kalibracijske krivulje

Cilj snimanja kalibracijske krivulje je dobivanje ovisnosti intenziteta reflektirane zrake (pri valnoj duljini na kojoj bojilo pokazuje najveću osjetljivost) GJM-534 pH osjetljivog bojila o pH vrijednosti i određivanje pK_a vrijednosti sustava sa zavojem i poliesterskom folijom.

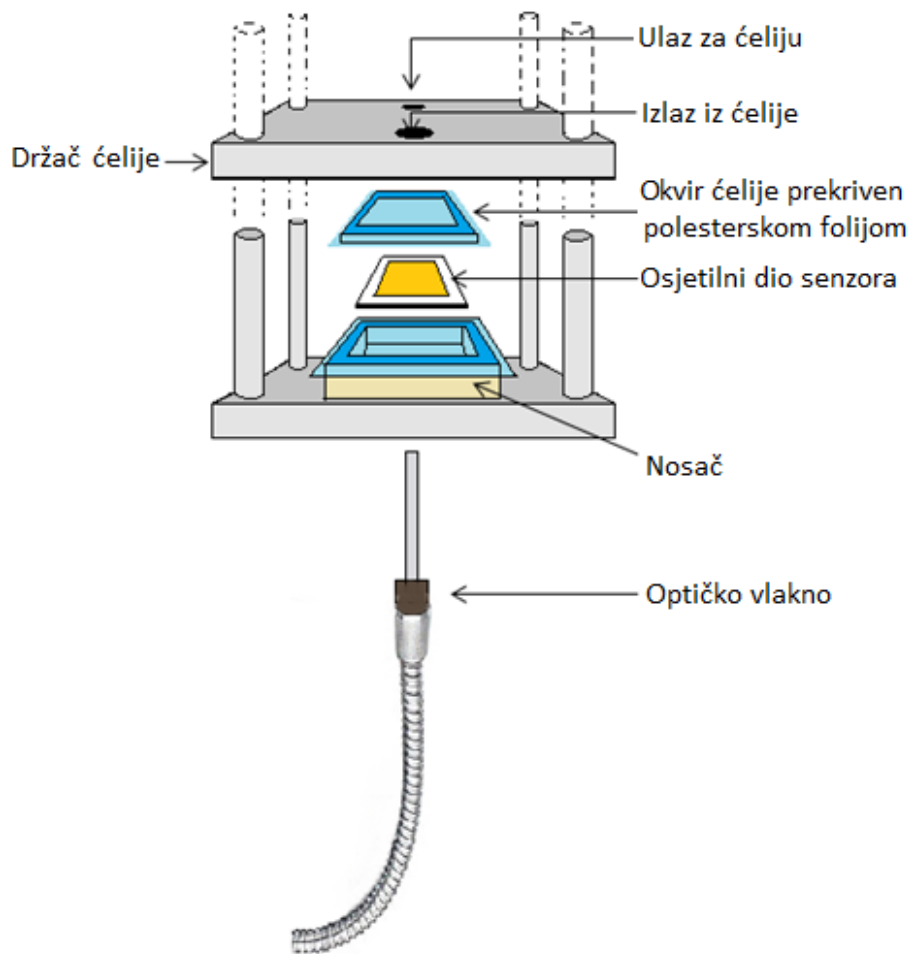
POSTUPAK:

1.) Bojilo imobilizirano na poliestersku foliju

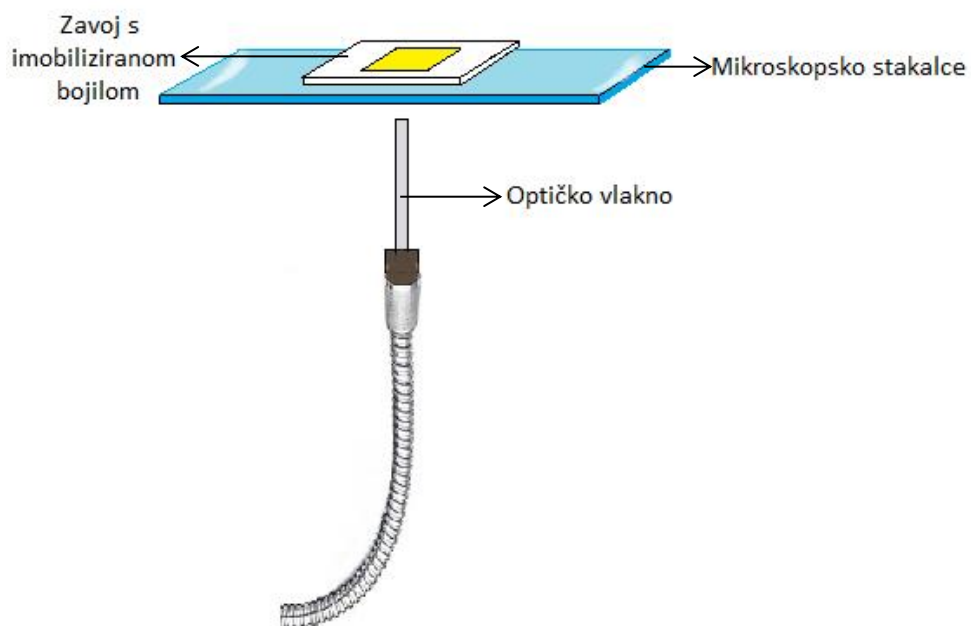
Za potrebe snimanja kalibracijske krivulje korištena je protočna ćelija dimenzija 25 mm x 10 mm x 1 mm u kojoj se nalazio osjetilni dio senzora (poliesterska folija s imobiliziranim bojilom), Slika 8. Na stakleni dio ćelije spojeno je optičko vlakno spektrometra Ocean Optics koji emitira svjetlost valne duljine 546 nm (maksimum intenziteta reflektirane zrake protoniranog oblika imobiliziranog bojila na poliesterskoj foliji). U protočnu ćeliju ubrizgavani su puferi, $V = 300 \mu\text{l}$ čije su pH vrijednosti: pH1= 4,986; pH2= 5,539; pH3= 6,029; pH4= 6,520; pH5= 6,994; pH6= 7,488; pH7= 8,000; pH8= 8,502; pH9= 9,047; pH10= 9,478; pH11= 10,005. Između svakog ubrizgavanja pufera ćelija je isprana deioniziranom vodom.

2.) Bojilo imobilizirano na zavoj

Kako bi se snimila kalibracijska krivulja za bojilo GJM-534 imobilizirano na zavoj umjesto protočne ćelije korišteno je mikroskopsko stakalce na koje je spojeno optičko vlakno Ocean Optics spektrofotometra koji emitira valnu duljinu 546 nm, Slika 9. Na gornju površinu mikroskopskog stakalca iznad optičkog vlakna pozicioniran je zavoj s imobiliziranim bojilom na način da je bojilo u izravnom kontaktu sa stakalcem. Na zavoj se nanosi 300 μl pufera pH vrijednosti: pH1= 4,986; pH2= 5,539; pH3= 6,029; pH4= 6,520; pH5= 6,994; pH6= 7,488; pH7= 8,000; pH8= 8,502; pH9= 9,047; pH10= 9,478; pH11= 10,005. Prije svakog sljedećeg nanošenja pufera zavoj je detaljno ispran u deioniziranoj vodi te osušen.



Slika 8. Shematski prikaz protočne ćelije korištene u eksperimentu.



Slika 9. Shematski prikaz instalacije za karakterizaciju bojila GJM-534 imobiliziranog na zavoj.

3.3.5. Određivanje ponovljivosti

Cilj provedbe eksperimenta je odrediti ponovljivost osjetilnog dijela senzora pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije protoniranog oblika pH osjetljivog bojila, GJM-534 imobiliziranog na poliestersku foliju i pamučni zavoj.

POSTUPAK:

1.) Bojilo imobilizirano na poliesterskoj foliji

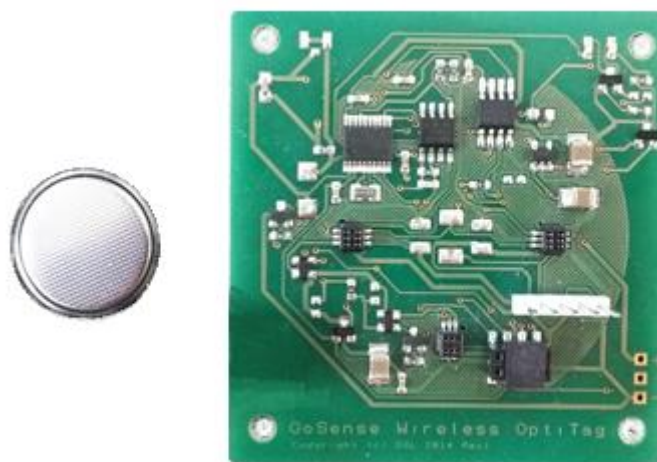
Za određivanje ponovljivosti odziva imobiliziranog bojila na poliesterskoj foliji korištena je protočna ćelija, kao i pri određivanju kalibracijske krivulje, Slika 8. Ponovljivost je određena pomoću spektrometra Ocean Optics pri uzastopnoj promjeni pH između dviju vrijednosti (pH= 6,520 i pH= 8,502) dinamičkog područja pH osjetljivog bojila GJM-534. Eksperiment se provodio pri valnoj duljini 546 nm (maksimum intenziteta reflektirane zrake protoniranog oblika bojila GJM-534). Tijekom postupka u ćeliju su se naizmjenično ubrizgavali puferi pH= 6,520 i pH= 8,502 volumena 300 μ l. Postupak je ponovljen 11 puta, a ćelija je prekrivena zaštitnom kutijom kako bi se spriječilo dopiranje vanjskog svjetla.

2.) Bojilo imobilizirano na zavoj

Kako bi se odredila ponovljivost odziva bojila imobiliziranog na zavoj korišteno je mikroskopsko stakalce kao i za određivanje kalibracijske krivulje za isti sustav, Slika 9. Eksperiment je proveden Ocean Optics spektrometrom pri valnoj duljini maksimuma intenziteta reflektirane zrake protoniranog oblika GJM-534 bojila (546 nm). Korišteni su puferi pH= 6,520 i pH= 8,502 volumena, V= 300 μ l. Puferi se nanose mikro-pipetom izravno na površinu zavoja. Nakon svakog nanošenja zavoj je ispran te osušen. Postupak je proveden 9 puta, a radi sprječavanja dopiranja dnevnog svjetla do optičkog vlakna instalacija je prekrivena zaštitnom kutijom.

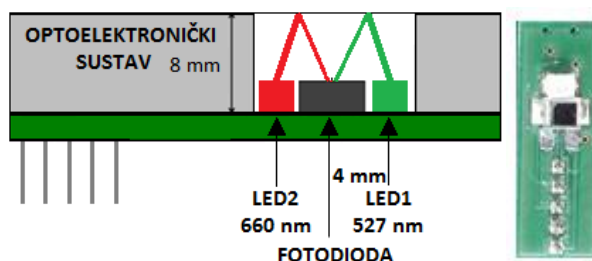
3.3.6. Integracija radiofrekvencijske identifikacijske (RFID) platforme

Kako je navedeno u poglavlju 2.6. radi nosivosti senzora potrebno je u osjetilni dio (bojilo imobilizirano na zavoj) integrirati bežičnu platformu kako bi se mogla provesti kvantitativna analiza pH vrijednosti. RFID platforma je minijaturizirani sustav dimenzija 60 mm x 60 mm x 10 mm na kojem se nalazi spiralno namotana antena s koje se podaci bežično šalju preko čitača na računalo. U ovom slučaju radi se o polu-pasivnoj platformi te se za napajanje koristi standardna baterija, napona 3 V, CR 2032, Slika 10.



Slika 10. Radiofrekvencijska identifikacijska platforma.

Platformi je moguće zadati koliko mjerenja će obaviti i u kojem vremenskom rasponu. Bežična (RFID) platforma integrirana je na osjetilni dio (imobilizirano bojilo na zavoj) preko optoelektroničke probe koja se sastoji od svjetleće diode (LED1) koja emitira valnu duljinu blisku maksimumu apsorpcije deprotoniranog oblika pH osjetljivog bojila GJM-534, $\lambda = 527$ nm, LED2 (referentna svjetleća dioda) koja emitira valnu duljinu 660 nm te fotodiode koja detektira reflektiranu zraku te ju pretvara u analogni signal (električnu struju), Slika 11. Potom analogno-digitalni pretvornik analogni signal pretvara u digitalni zapis (ADC kod).

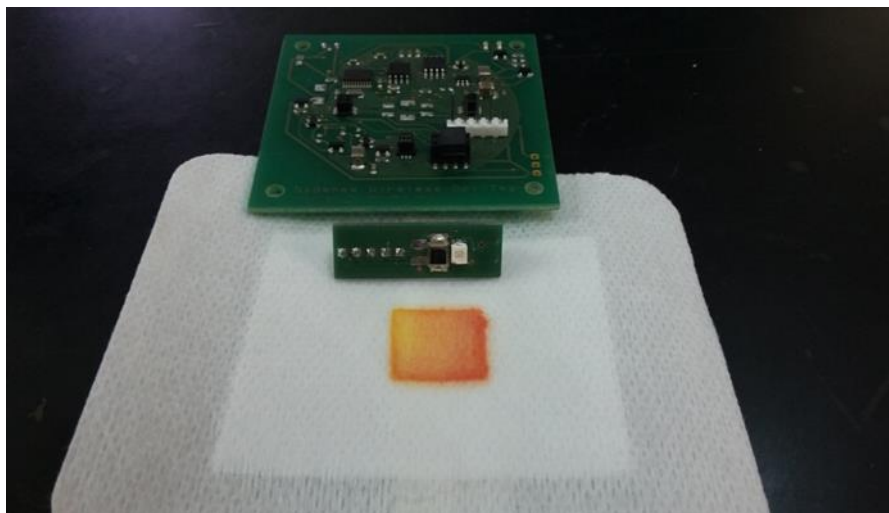


Slika 11. Prikaz poprječnog presjeka optoelektroničkog sustava.

POSTUPAK:

Pomoću RFID platforme snimljena je kalibracijska krivulja i određena je pK_a vrijednost bojila imobiliziranog na zavoj. Autonomnoj platformi zadani su broj mjerenja ($n = 40$) te vrijeme između mjerenja ($t = 3$ s). Kalibracijska krivulja se snima na način da se za svaku pH vrijednost ($pH_1 = 4,986$; $pH_2 = 5,539$; $pH_3 = 6,029$; $pH_4 = 6,5207$; $pH_5 = 6,994$; $pH_6 = 7,488$; $pH_7 = 8,000$; $pH_8 = 8,502$; $pH_9 = 9,047$; $pH_{10} = 9,478$; $pH_{11} = 10,005$) snimi

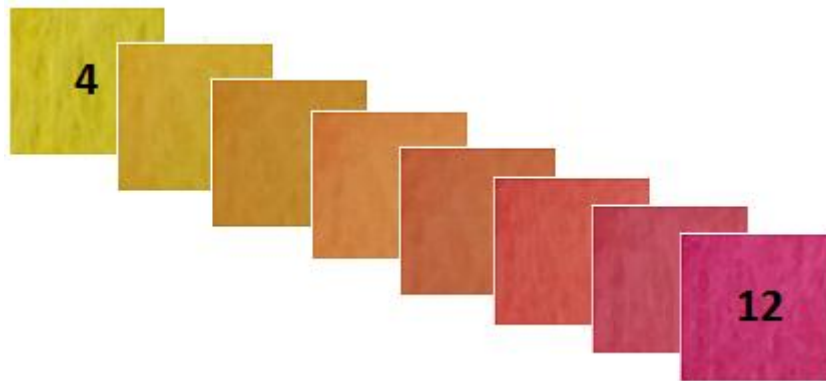
odziv (30 točaka) u rasponu od 3 s. Nakon svake promjene pH vrijednosti zavoj se detaljno ispere u deioniziranoj vodi i osuši papirnim ubrusom te se pozicionira na mikroskopsko stakalce osjetilnim dijelom prema optoelektroničkoj probi koja je zatvorena u crno zaštitno kućište kako bi se spriječilo dopiranje ambijentalnog svjetla do fotodiode.



Slika 12. Prikaz sustava za bežično određivanje pH vrijednosti.

4. REZULTATI

Kako bi senzor davao relevantne podatke o stanju rane najveću pažnju potrebno je posvetiti osjetilnom dijelu. pH osjetljivo bojilo GJM-534 imobilizirano je na poliestersku foliju i zavoj kako bi se mogla izvršiti spektrofotometrijska karakterizacija bojila i optimirala izvedba senzora. Moguće je uočiti promjenu boje receptora senzora iz žute u kiselom mediju pH= 4, do ljubičaste u lužnatom mediju pH= 12, Slika 13.



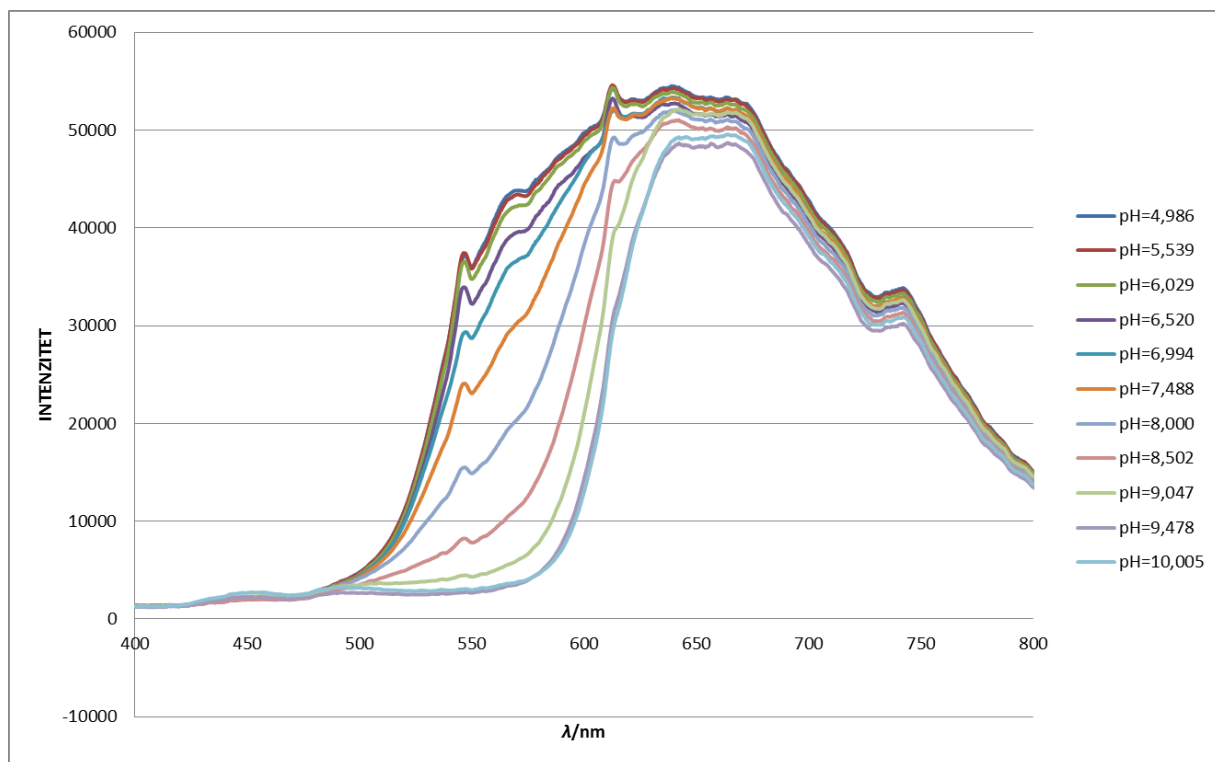
Slika 13. Prikaz promjene boje osjetilnog dijela senzora u različitim puferima pH vrijednosti od 4 do 12.

4. 1. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE GJM-534 pH OSJETLJIVOG BOJILA

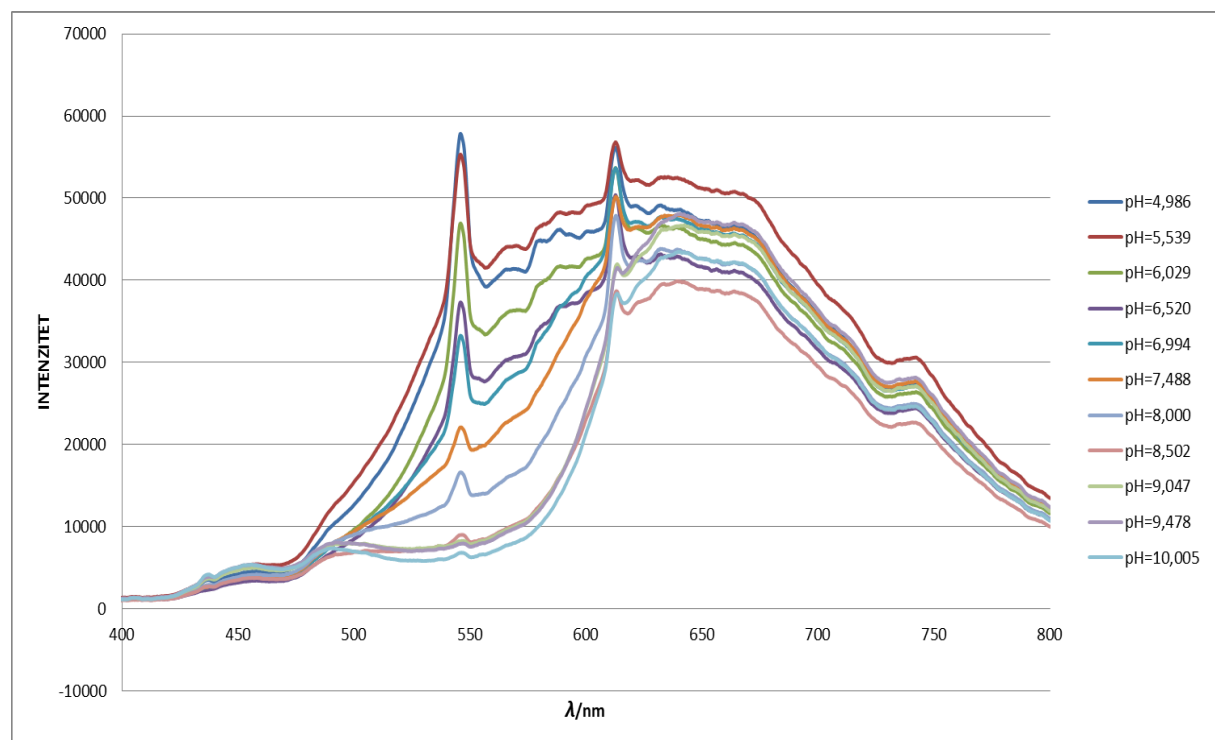
Spektrofotometrijska analiza bojila provedena je na bojilu imobiliziranom na poliestersku foliju i bojilu imobiliziranom na zavoj. Karakterizacija je provedena na dva sustava kako bi se temeljem rezultata mogla izvršiti usporedba te optimirala izvedba senzora

4.1.1. Rezultati određivanja maksimuma reflektancije pH osjetljivog bojila , GJM-534

Spektrofotometrijsko određivanje maksimuma reflektancije izvršeno je kako bi se odredilo područje najveće osjetljivosti pH bojila GJM-534 imobiliziranog na poliestersku foliju i zavoj. Literaturni podaci daju vrijednosti maksimuma apsorbancije protoniranog i deprotoniranog oblika GJM-534 pH osjetljivog bojila. Međutim, zbog netransparentnosti osjetilnog filma snimljeni su refleksijski spektri na poliesterskoj foliji, Slika 14 i bojila imobiliziranog na pamučni zavoj, Slika 15.



Slika 14. Refleksijski spektri GJM-534 pH osjetljivog bojila imobiliziranog na poliestersku foliju.



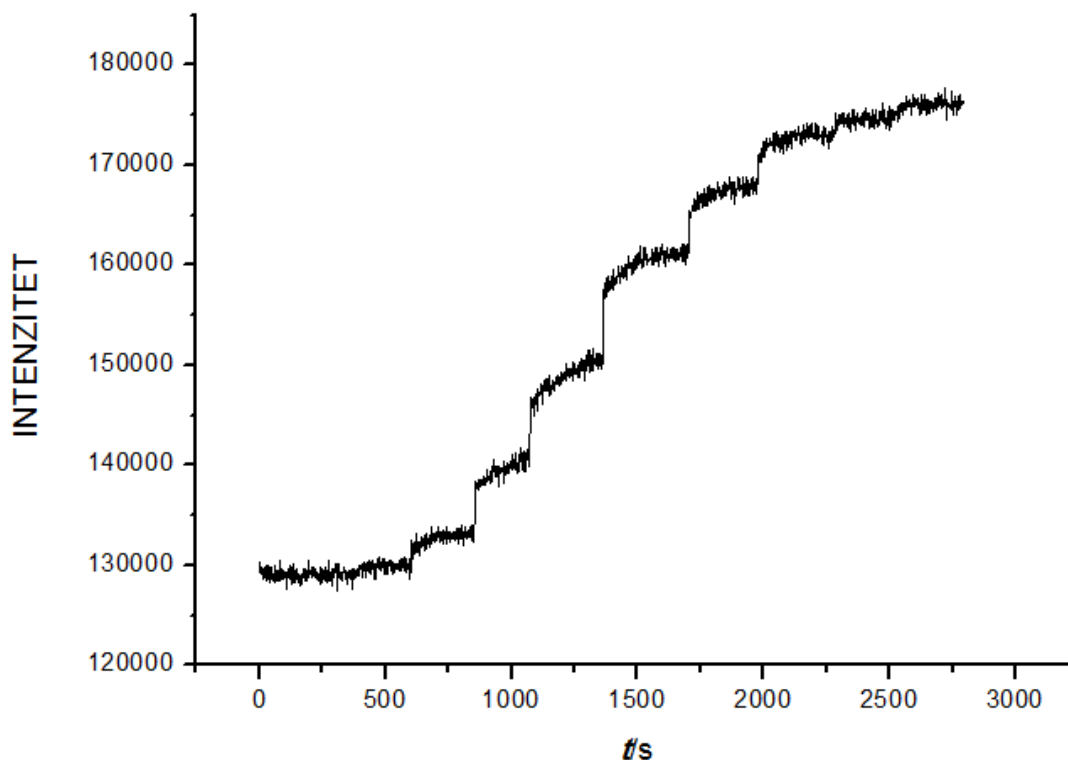
Slika 15. Refleksijski spektri GJM-534 pH osjetljivog bojila imobiliziranog na zavoju.

Iz prikazanih refleksijskih spektara za oba sustava (GJM-534 imobiliziran na poliestersku foliju i GJM-534 imobiliziran na zavoj) maksimumi intenziteta reflektirane zrake protoniranog oblika GJM-534 bojila su pri valnoj duljini 546 nm, dok su maksimumi intenziteta reflektirane zrake deprotoniranog oblika bojila pri valnoj duljini 455 nm. Zbog visoke osjetljivosti bojila pri valnoj duljini maksimuma reflektancije protoniranog oblika, za sva ostala ispitivanja korištena je valna duljina od 546 nm. Radi veće neprozirnosti sustava kada je bojilo imobilizirano na zavoj pikovi maksimuma reflektancije su značajno veći nego kod sustava kada je bojilo imobilizirano na poliestersku foliju.

4.1.2. Rezultati snimanja kalibracijskih krivulja

1.) Bojilo imobilizirano na poliestersku foliju

Prema dobivenim rezultatima prethodne analize odlučeno je pri valnoj duljini maksimuma intenziteta reflektirane zrake protoniranog oblika pH osjetljivog bojila, $\lambda = 546$ nm, snimiti kalibracijsku krivulju u protočnoj ćeliji za bojilo imobilizirano na poliesterskoj foliji. Pri kontinuiranoj promjeni pufera od: pH11= 10,005; pH10= 9,478; pH9= 9,047; pH8= 8,502; pH7= 8,000; pH6= 7,488; pH5= 6,994; pH4= 6,520; pH3= 6,029; pH2= 5,539; pH1= 4,986 dobivena je ovisnost intenziteta reflektirane zrake o vremenu za svaku pH vrijednost, Slika 16.



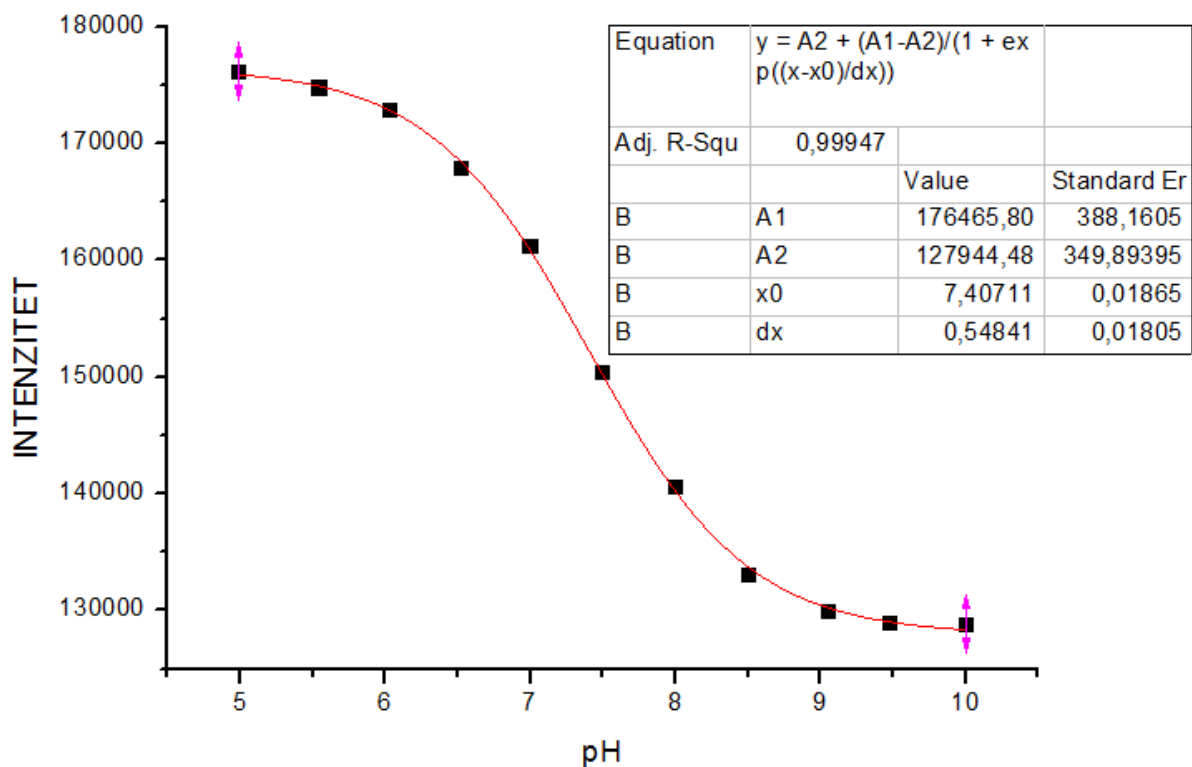
Slika 16. Ovisnost intenziteta reflektirane zrake pri valnoj duljini, $\lambda = 546$ nm, o vremenu i pH vrijednosti za bojilo GJM-534 imobilizirano na poliestersku foliju.

Ukoliko za svaku pH vrijednost iz linearnog područja rezultata (posljednjih 30 točaka skupa podataka) izračunamo aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju moguće je odrediti mjerni šum izražen u postotcima intenziteta, Tablica 3. Obradom podataka je dobivena kalibracijska krivulja, odnosno ovisnost intenziteta reflektirane zrake pri valnoj duljini 546 nm o pH vrijednosti uz standardno odstupanje, Slika 17. Dobivene vrijednosti aproksimirane su Boltzmanovom aproksimacijskom krivuljom uz $R^2 = 0,99947$. Iz kalibracijske krivulje dobivena je pK_a vrijednost GJM-534 pH osjetljivog bojila imobiliziranog na poliesterskoj foliji, a ona iznosi 7,407, što je ujedno područje izmjene ekstrema Boltzmanove aproksimacijske funkcije, odnosno točka infleksije. Krivulja koja opisuje eksperimentalno dobivene vrijednosti $pH = f(\text{INTENZITET})$ glasi:

$$pH = 0,5484 * \ln \left(\frac{176465,8 - 127944,5}{\text{INTENZITET} - 127944,5} - 1 \right) + 7,4071$$

Tablica 3. Prikaz rezultata analize mjernog šuma prilikom snimanja kalibracijske krivulje pri svim pH vrijednostima za sustav bojilo imobilizirano na poliestersku foliju.

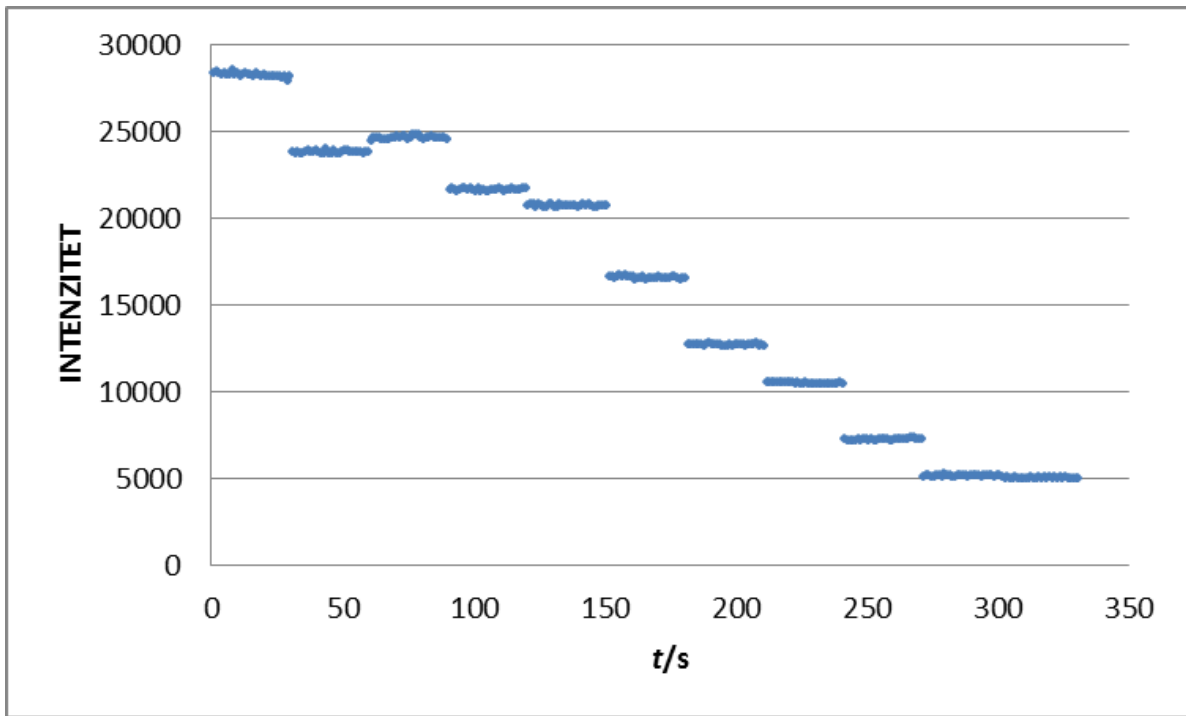
pH	Ar. sr. intenziteta	St. dev.intenziteta	Mjerni šum intenziteta/ %
4,986	176183	459,86	0,26
5,539	174811	596,44	0,34
6,029	172856	550,03	0,32
6,520	167873	575,82	0,34
6,994	161264	525,83	0,33
7,488	150395	608,97	0,40
8,000	140674	651,56	0,46
8,502	133123	423,46	0,32
9,047	129993	566,19	0,44
9,478	128999	427,32	0,33
10,005	128879	459,77	0,36



Slika 17. Prikaz kalibracijske krivulje snimane pri valnoj duljini 546 nm za bojilo imobilizirano na poliestersku foliju.

2.) Bojilo imobilizirano na zavoj

Radi usporedbe sustava bojilo imobilizirano na poliestersku foliju i bojilo imobilizirano na zavoj snimljena je kalibracijska krivulja osjetilnog dijela pri čemu je bojilo nanoseno na zavoj, Slika 18. Kao rezultat eksperimenta dobivena je ovisnost intenziteta reflektirane zrake pri valnoj duljini 546 nm o vremenu za svaku pH vrijednost u iznosu: pH1= 4,986; pH2= 5,539; pH3= 6,029; pH4= 6,520; pH5= 6,994; pH6= 7,488; pH7= 8,000; pH8= 8,502; pH9= 9,047; pH10= 9,478; pH11= 10,005.



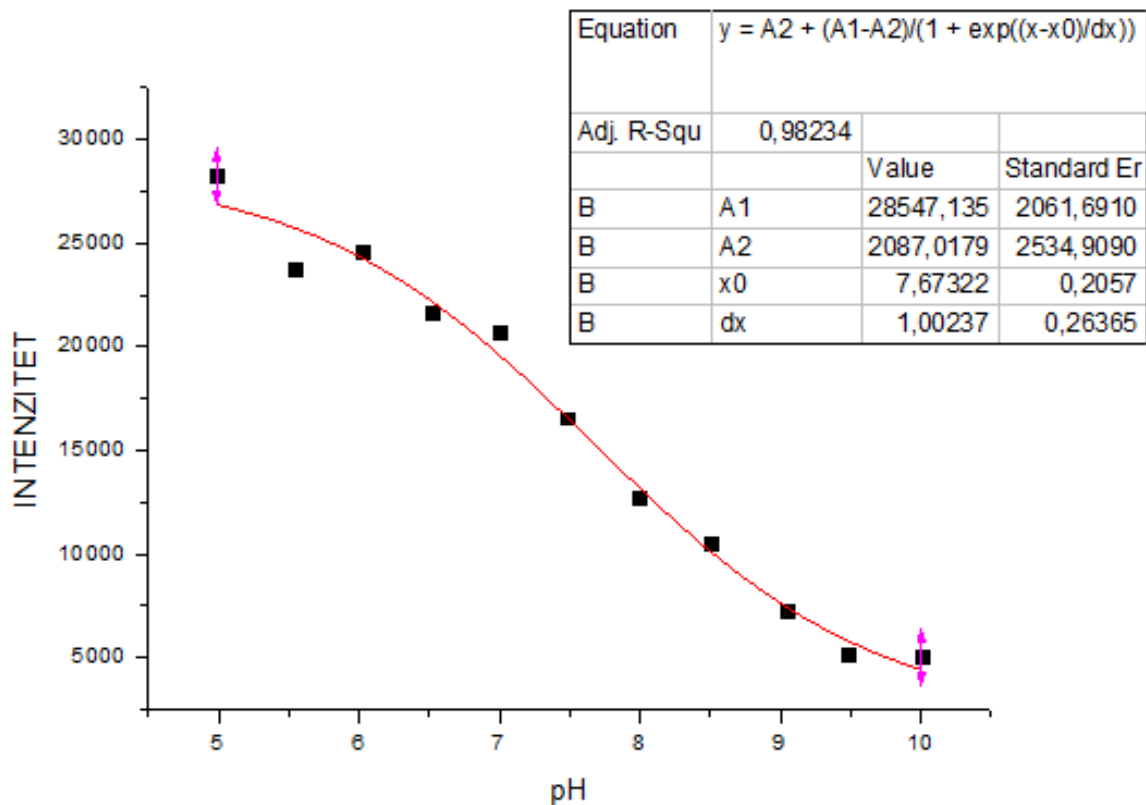
Slika 18. Ovisnost intenziteta reflektirane zrake pri valnoj duljini, $\lambda = 546 \text{ nm}$, o vremenu i pH vrijednosti za bojilo GJM-534 imobilizirano na zavoj.

I u ovom slučaju za svaku pH vrijednost iz linearnog područja rezultata (posljednjih 30 točaka skupa podataka) izračunate su aritmetičke sredine i standardne devijacije pomoću kojih je moguće odrediti mjerni šum izražen u postotcima intenziteta, Tablica 4. Međutim, u slučaju kada je bojilo imobilizirano na zavoj do odziva dolazi znatno brže, što je vidljivo iz toga da pri istoj pH vrijednosti nema promjene intenziteta s vremenom. Nadalje, određena je kalibracijska krivulja koja daje ovisnost intenziteta reflektirane zrake pri 546 nm o pH vrijednosti, Slika 19. Iz grafa je očitana pK_a vrijednost bojila imobiliziranog na zavoj u iznosu 7,67 uz vrijednost $R^2 = 0,98234$. Funkcija koja opisuje ovisnost $pH = f(\text{INTENZITET})$ glasi:

$$pH = 1,00237 * \ln \left(\frac{28547,13 - 2087,017}{\text{INTENZITET} - 2087,017} - 1 \right) + 7,67322$$

Tablica 4. Prikaz rezultata analize mjernog šuma prilikom snimanja kalibracijske krivulje pri svim pH vrijednostima za sustav bojilo imobilizirano na zavoj.

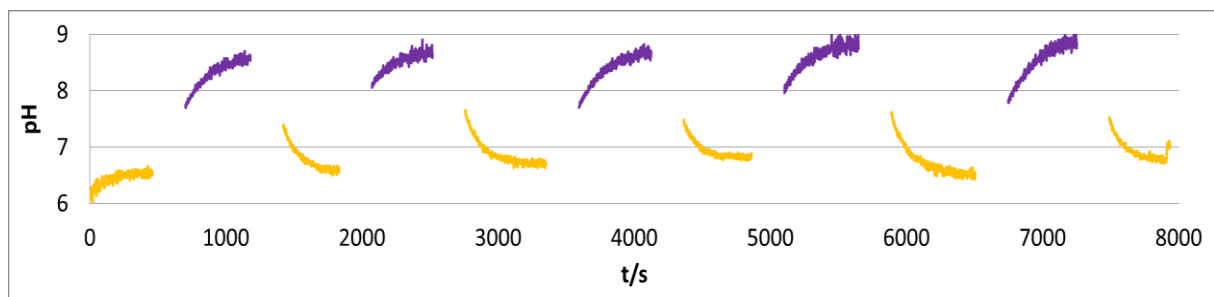
pH	Ar. sr. intenziteta	St. dev. intenziteta	Mjerni šum/ %
4,986	28225,35	112,19	0,39
5,539	23783,58	62,29	0,26
6,029	24609,33	86,39	0,35
6,520	21630,70	68,13	0,31
6,994	20713,11	55,78	0,27
7,488	16573,12	61,01	0,37
8,000	12698,15	47,66	0,37
8,502	10560,00	52,25	0,49
9,047	7249,89	48,30	0,67
9,478	5154,18	30,42	0,59
10,005	5039,71	27,15	0,54



Slika 19. Prikaz kalibracijske krivulje snimane pri valnoj duljini 546 nm za bojilo imobilizirano na zavoju.

4.1.3. Rezultati određivanja ponovljivosti

Dinamički odziv na uzastopnu promjenu pH vrijednosti između 6,520 i 8,502 snimanom u protočnoj ćeliji pri valnoj duljini maksimuma reflektancije protoniranog oblika GJM-534 pH osjetljivog bojila imobiliziranog na poliesterskoj foliji (546 nm) dan je na slici 20.



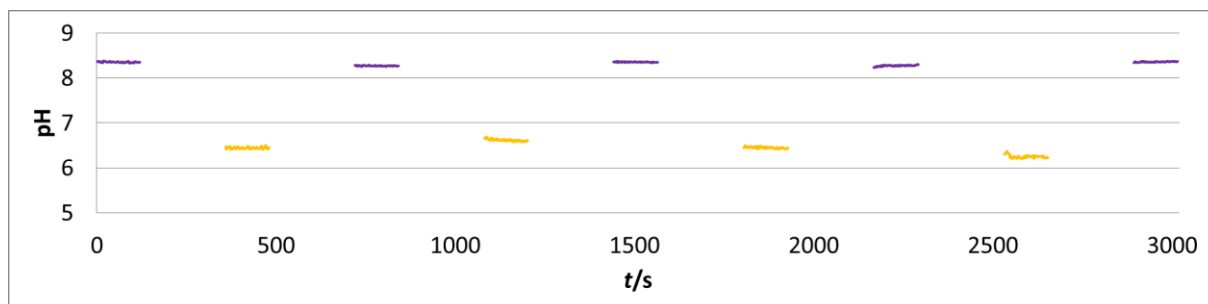
Slika 20. Dinamički odziv GJM-534 pH osjetljivog bojila imobiliziranog na poliestersku foliju na uzastopnu promjenu pH između 6,5 i 8,5 snimanog pri valnoj duljini 546 nm.

Statistička obrada rezultata izvršena je na temelju posljednjih trideset točaka svakog skupa podataka (linerno područje). Iz rezultata obrade podataka moguće je uočiti kako je senzor ponovljiv uz relativnu standardnu devijaciju, RSD= 1,95% za protonirani oblik bojila (pH= 6,520), dok je za deprotonirani oblik bojila (pH= 8,502) ponovljivost nešto veća uz relativnu standardnu devijaciju, RSD= 1,40%, Tablica 5.

Tablica 5. Prikaz rezultata statističke analize ponovljivosti bojila imobiliziranog na poliestersku foliju.

n= 30	Ar. sr. pH protoniranog oblika	Ar. sr. pH deprotoniranog oblika
	6,54	8,54
	6,58	8,84
	6,71	8,82
	6,84	8,66
	6,55	8,69
	6,78	/
Ar. sr. pH	6,67	8,71
St. dev. pH	0,13	0,12
RSD/ %	1,95	1,40

Također je određena ponovljivost osjetilnog dijela (bojilo imobilizirano na zavoj) senzora, Slika 21. I u ovom slučaju izvršena je statistička analiza rezultata na temelju posljednjih 30 vrijednosti za svaki skup podataka. Utvrđena je reverzibilnost uz relativnu standardnu devijaciju procesa protoniranja, RSD= 3,75 % te deprotoniranja, RSD= 0,51 %, Tablica 6.



Slika 21. Dinamički odziv GJM-534 pH osjetljivog bojila imobiliziranog na zavoj uz uzastopnu promjenu pH između 6,5 i 8,5 snimanog pri valnoj duljini 546 nm.

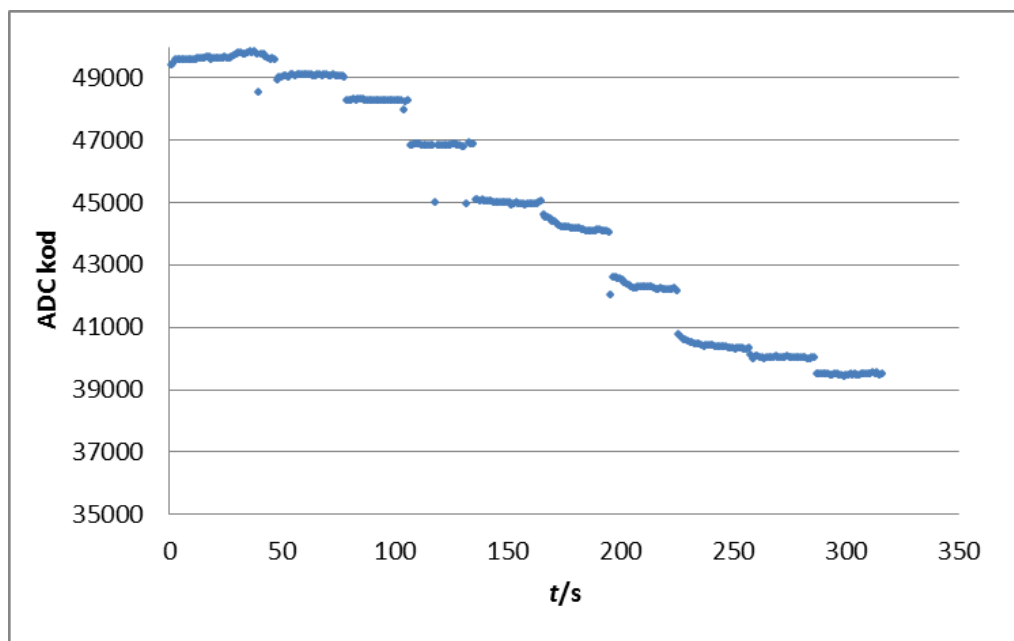
Tablica 6. Prikaz rezultata statističke analize ponovljivosti bojila imobiliziranog na zavoj.

n= 30	Ar. sr. pH protoniranog oblika	Ar. sr. pH deprotoniranog oblika
	/	8,35
	6,44	8,27
	6,62	8,35
	6,45	8,27
	6,25	8,36
Ar. sr. pH	6,44	8,32
St. dv. pH	0,15	0,05
RSD/ %	2,33	0,55

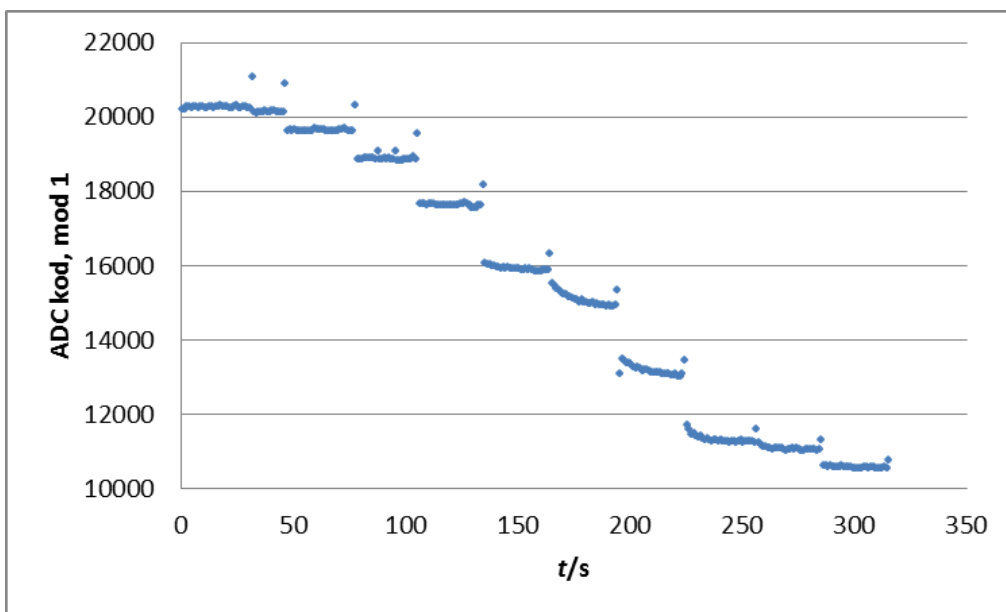
4.2. REZULTATI ANALIZE POMOĆU RADIOFREKVENCIJSKE IDENTIFIKACIJSKE (RFID) PLATFORME

Snimljena je i kalibracijska krivulja pomoću radiofrekvencijske identifikacijske (RFID) platforme. U prvom slučaju prikazana je ovisnost signala nemodificiranog ADC koda LED1 diode o vremenu, Slika 22. LED1 u ovom slučaju predstavlja odziv (digitalni zapis) fotodiode uzrokovan reflektiranom zrakom valne duljine 527 nm. Radi usporedbe prikazana je i ovisnost modificiranog ADC koda, LED1 signala umanjenog za pozadinsko zračenje te je dobivena ovisnost ADC kod, mod 1= f(t), Slika 23. Također je dan prikaz ovisnosti modificiranog ADC koda pri čemu je u funkciju ovisnosti ADC kod, mod 2= f(t) uvršten i

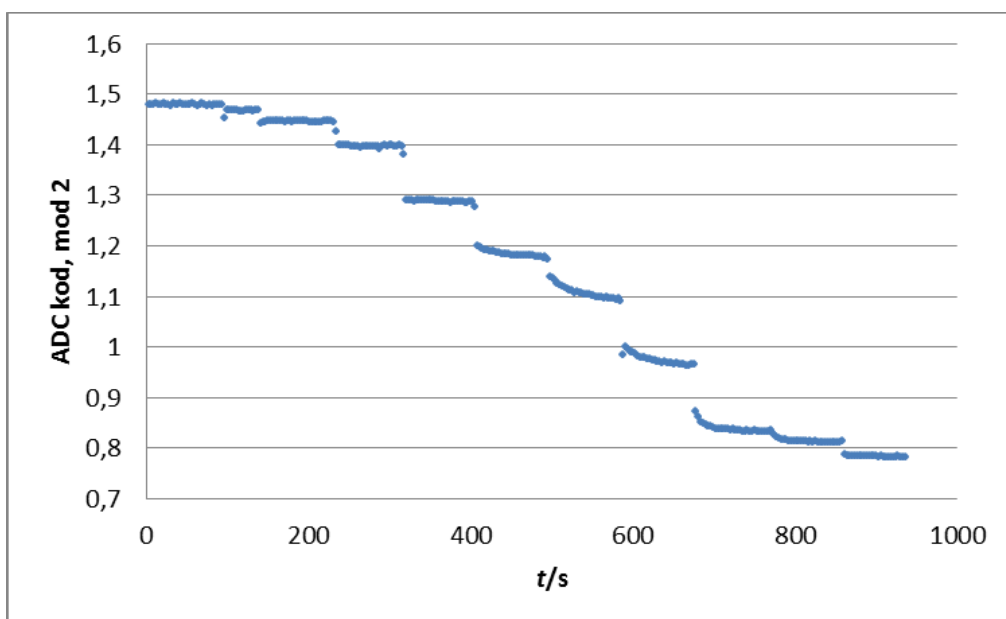
signal LED2 diode ($\lambda = 660 \text{ nm}$) na način da je razlika signala LED1 diode i pozadinskog zračenja podijeljen s razlikom signala referentne LED2 diode i pozadinskog zračenja. Rezultati su prikazani za svaku pH vrijednost u iznosima: pH1= 4,986; pH2= 5,539; pH3= 6,029; pH4= 6,520; pH5= 6,994; pH6= 7,488; pH7= 8,000; pH8= 8,502; pH9= 9,047; pH10= 9,478; pH11= 10,005, Slika 24.



Slika 22. Prikaz rezultata nemodificiranog ADC koda, LED1 kao funkcija vremena određene pomoću RFID platforme.



Slika 23. Prikaz rezultata modificiranog ADC koda, (LED1-P), kao funkcija vremena određene pomoću RFID platforme.



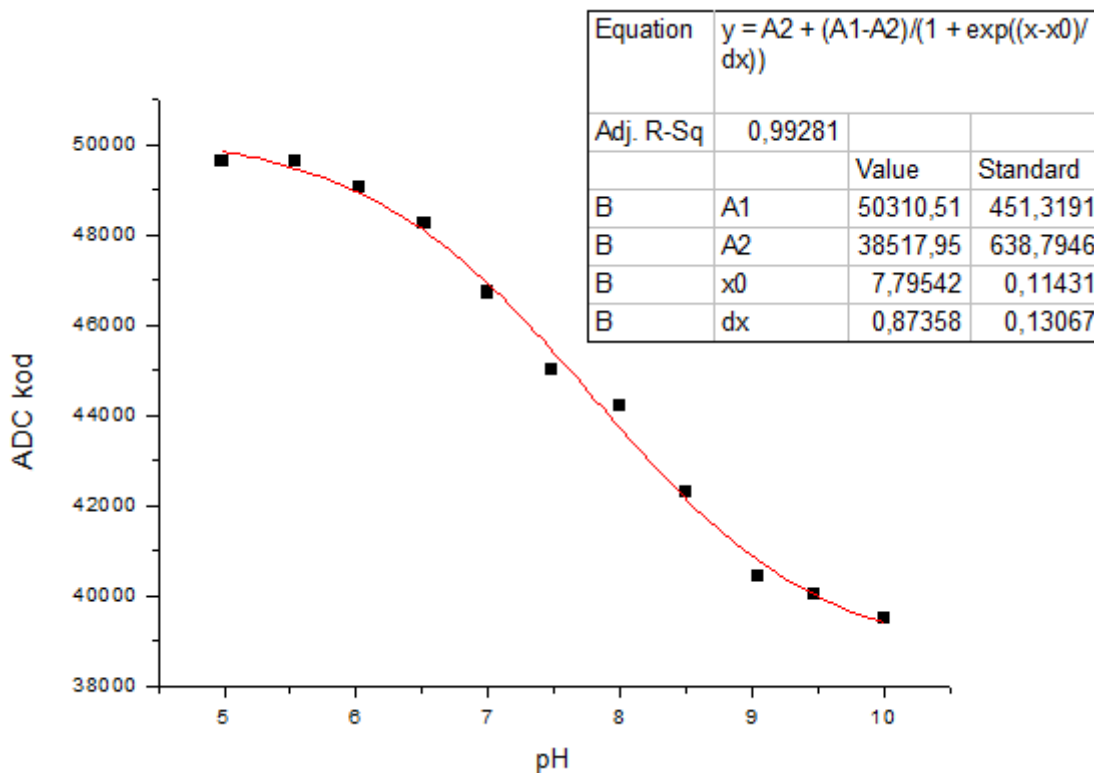
Slika 24. Prikaz rezultata modificiranog ADC koda, (LED1-P)/(LED2-P), kao funkcija vremena određene pomoću RFID platforme.

Ukoliko se za prethodno prikazane rezultate, za svaku pH vrijednost, izračuna aritmetička sredina dobiti ćemo kalibracijske krivulje. U prvom slučaju prikazana je ovisnost $ADC\ kod = f(pH)$ pri čemu je ADC kod nemodificiran, a eksperimentalni rezultati aproksimirani su

Boltzmanovom krivuljom, Slika 25. Aproksimacijska funkcija ovisnosti pH o nemodificiranom ADC kodu, LED1 glasi:

$$\text{pH} = 0,87358 * \ln\left(\frac{50310,5 - 38517,9}{\text{ADC kod} - 38517,9} - 1\right) + 7,79542$$

Uz pK_a vrijednost 7,795 te vrijednost $R^2 = 0,993$.



Slika 25. Kalibracijska krivulja ovisnosti nemodificiranog ADC koda, LED1 diode, kao funkcija pH vrijednosti snimljena RFID platformom.

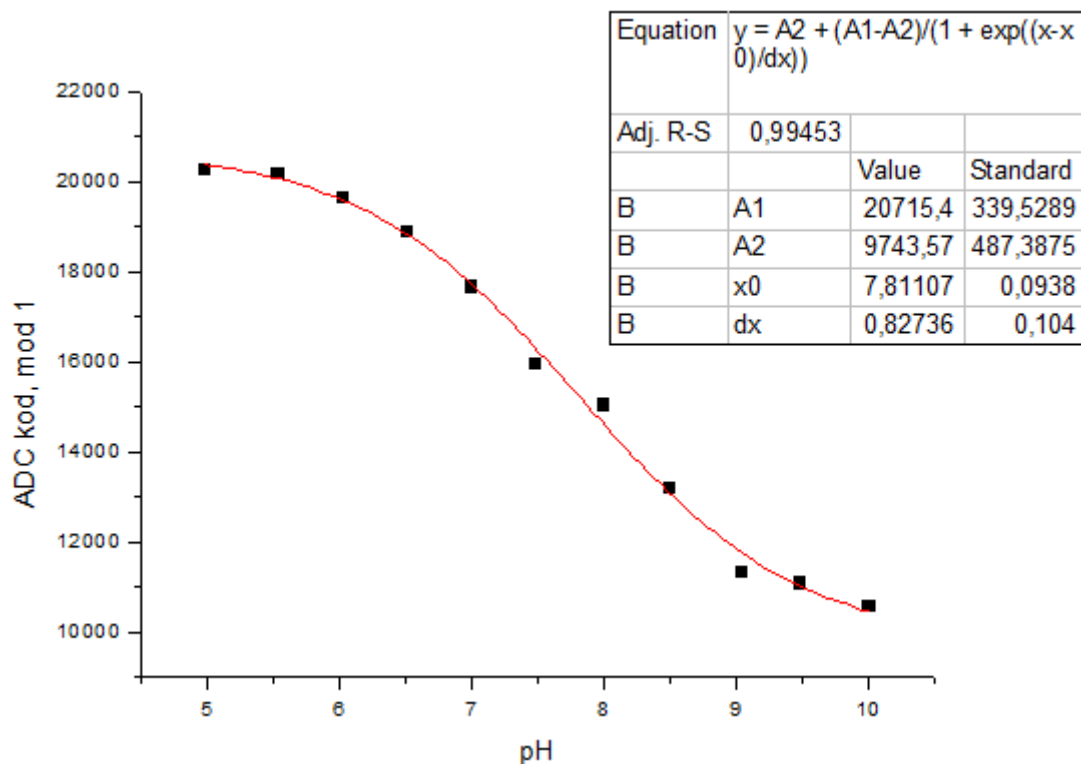
Statističkom obradom rezultata snimljene kalibracijske krivulje koja prikazuje ovisnost nemodificiranog ADC koda, LED1, kao funkcije pH vrijednosti dobivene su aritmetičke sredine i standardne devijacije za svaku pH vrijednost te je na temelju toga izračunat mjerni šum izražen u postotcima, Tablica 7.

Tablica 7. Prikaz rezultata statističke obrade kalibracijske krivulje ovisnosti nemodificiranog ADC koda, LED1 diode, kao funkcije pH vrijednosti snimljene RFID platformom.

pH	Ar. sr. ADC koda	St. dev. ADC koda	Mjerni šum/ %
4,986	49637	69	0,14
5,539	49084	320	0,64
6,029	48655	39	0,08
6,520	47351	59	0,12
6,994	45720	482	1,03
7,488	44566	42	0,09
8,000	43008	78	0,18
8,502	41247	137	0,33
9,047	40176	115	0,29
9,478	39704	25	0,06
10,010	39501	27	0,07

U drugom slučaju prikazana je ovisnost modificiranog ADC koda, (LED1 - P)= f(pH) eksperimentalni rezultati aproksimirani su Boltzmanovom krivuljom, uz $pK_a = 7,811$ te vrijednost $R^2 = 0,995$, Slika 26. Funkcija ovisnosti $pH = f(\text{ADC kod, mod } 1)$ glasi:

$$pH = 0,82736 * \ln \left(\frac{20715,4 - 9743,57}{\text{ADC kod, mod } 1 - 9743,57} - 1 \right) + 7,81107$$



Slika 26. Kalibracijska krivulja ovisnosti modificiranog ADC koda, (LED1-P) , kao funkcija pH vrijednosti snimljena RFID platformom.

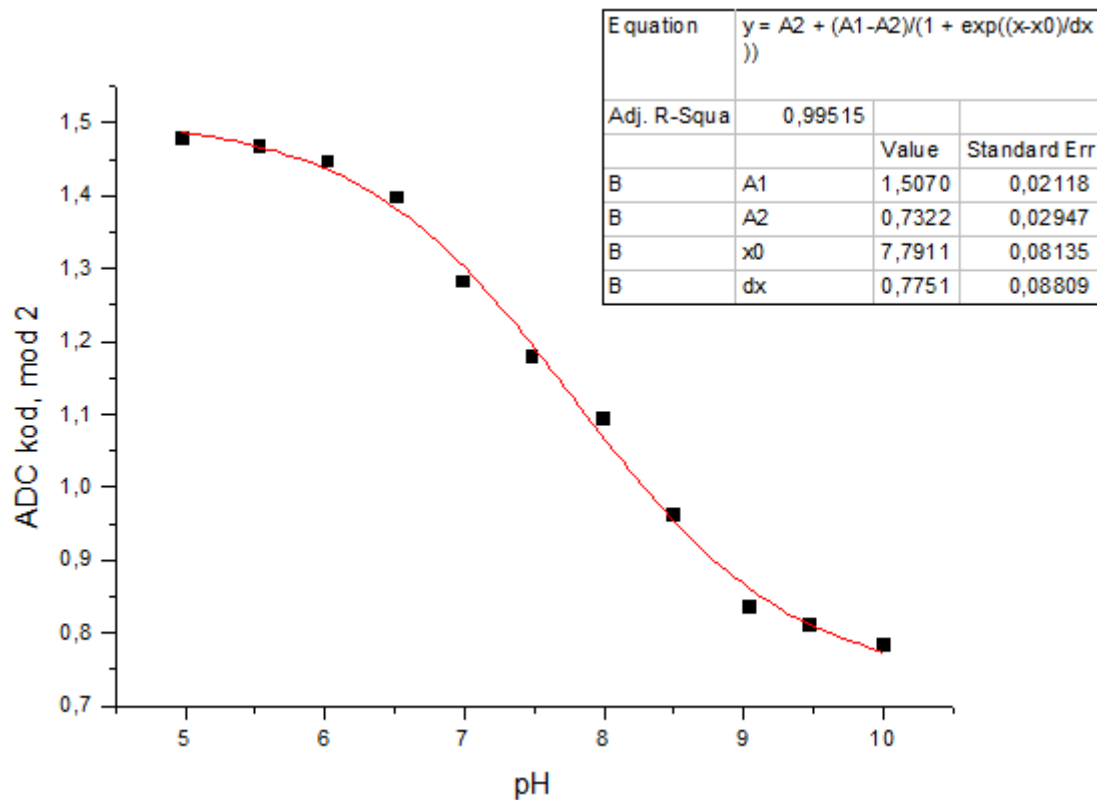
Statističkom obradom rezultata snimljene kalibracijske krivulje koja prikazuje ovisnost modificiranog ADC koda, (LED1-P), kao funkcije pH vrijednosti dobivene su aritmetičke sredine i standardne devijacije za svaku pH vrijednost na temelju kojih je određen mjerni šum izražen u postocima, Tablica 8.

Tablica 8. Prikaz rezultata statističke obrade kalibracijske krivulje ovisnosti modificiranog ADC koda, (LED1-P), kao funkcije pH vrijednosti snimljene RFID platformom.

pH	Ar. sr. ADC koda, mod 1	St. dev. ADC koda, mod 1	Mjerni šum/ %
4,986	20261	28	0,14
5,539	20142	191	0,95
6,029	19643	19	0,10
6,520	18889	60	0,32
6,994	17652	105	0,59
7,488	15930	85	0,54
8,000	15032	98	0,65
8,502	13191	92	0,69
9,047	11343	71	0,63
9,478	11085	20	0,17
10,010	10582	43	0,41

U posljednjem slučaju prikazana je ovisnost modificiranog ADC koda pri čemu je u funkciju uvršten i signal referentne diode LED2 prema izrazu ADC kod, (LED1 - P)/(LED2 - P)= f(pH). Eksperimentalni rezultati aproksimirani su Boltzmanovom krivuljom, uz pK_a= 7,791 te vrijednost R²= 0,995, Slika 27. Funkcija ovisnosti pH= f(ADC kod, mod2) glasi:

$$\text{pH} = 0,7751 * \ln \left(\frac{1,5070 - 0,7322}{\text{ADC kod, mod2} - 0,7322} - 1 \right) + 7,7911$$



Slika 27. Kalibracijska krivulja ovisnosti modificiranog ADC koda, (LED1-P)/(LED2-P), kao funkcija pH vrijednosti snimljena RFID platformom.

Statističkom obradom rezultata snimljene kalibracijske krivulje, koja prikazuje ovisnost modificiranog ADC koda, (LED1-P)/(LED2-P), kao funkcije pH vrijednosti dobivene su aritmetičke sredine i standardne devijacije za svaku pH vrijednost na temelju kojih je određen mjerni šum izražen u postocima izlaznog signala fotodiode, Tablica 9.

Tablica 9. Prikaz rezultata statističke obrade kalibracijske krivulje ovisnosti modificiranog ADC koda, (LED1-P)/(LED2-P), kao funkcije pH vrijednosti snimljene RFID platformom.

pH	Ar. sr. ADC koda, mod 2	St. dev. ADC koda, mod 2	Mjerni šum/ %
4,986	1,48	0,0013	0,086
5,539	1,47	0,0006	0,043
6,029	1,45	0,0012	0,080
6,520	1,39	0,0017	0,124
6,994	1,29	0,0029	0,222
7,488	1,18	0,0048	0,408
8,000	1,10	0,0070	0,632
8,502	0,97	0,0031	0,318
9,047	0,84	0,0033	0,392
9,478	0,81	0,0013	0,160
10,010	0,78	0,0015	0,193

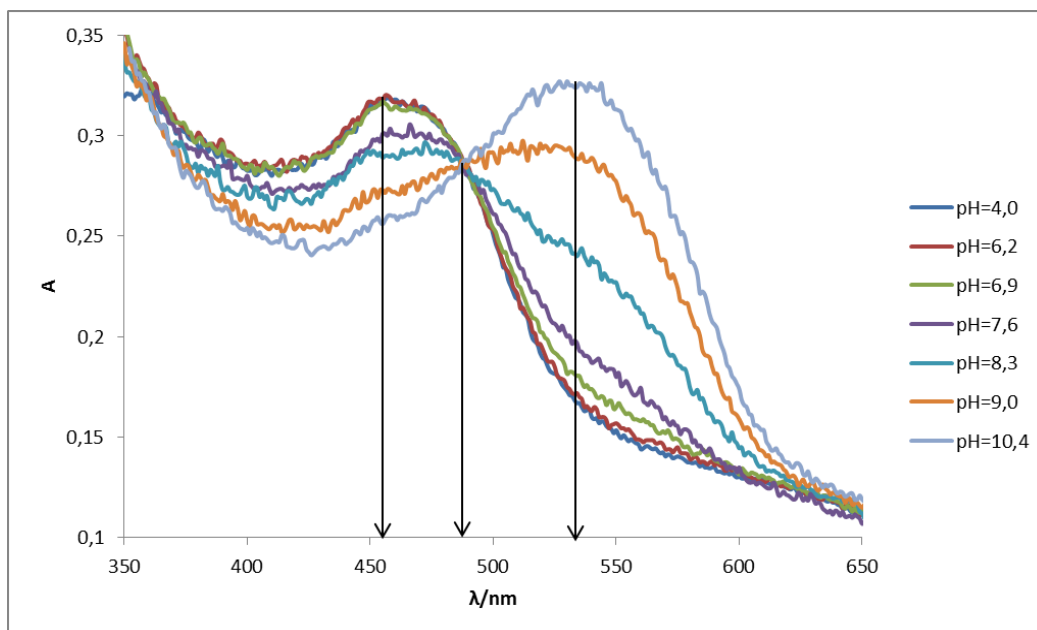
5. RASPRAVA

5.1. USPOREDBA REFLEKSIJSKIH SPEKTARA BOJILA IMOBILIZIRANOG NA POLIESTERSKU FOLIJU I ZAVOJ

Na temelju snimljenih spektara intenziteta reflektirane zrake utvrđena je valna duljina pri kojoj bojilo pokazuje najveću osjetljivost, $\lambda_p = 546$ nm, Slika 14. To je ujedno i valna duljina maksimuma intenziteta reflektirane zrake protoniranog oblika pH osjetljivog bojila GJM-534. Maksimum reflektancije deprotoniranog oblika bojila je $\lambda_d = 455$ nm, ali bojilo u tom području pokazuje znatno manju osjetljivost. Također je utvrđena i valna duljina isosbestičke točke, $\lambda_i = 475$ nm i pri toj valnoj duljini nema promjene intenziteta u ovisnosti o pH vrijednosti, Tablica 10. Za oba sustava, kada je bojilo immobilizirano na zavoj i kada je bojilo immobilizirano na poliestersku foliju, valne duljine maksimuma intenziteta reflektirane zrake i isosbestičke točka su iste. Na temelju rezultata može se zaključiti kako materijal na koji se nanosi bojilo ne utječe značajno na optička svojstva pH osjetljivog bojila GJM-534. Također, snimljeni refleksijski spektri za razliku od apsorpcijskih spektara nemaju šumove, Slika 28. Zbog netransparentnosti bojila koje je immobilizirano na mikro čestice celuloze karakterizacija na temelju refleksijskih spektara dala je znatno bolje rezultate.

Tablica 10. Usporedba valnih duljina maksimuma intenziteta reflektirane zrake protoniranog oblika bojila, λ_p , deprotoniranog oblika bojila, λ_d i isosbestičke točke, λ_i .

	GJM-534 na poliesterskoj foliji	GJM-534 na zavoju
λ_p / nm	546	546
λ_d / nm	455	455
λ_i / nm	475	475



Slika 28. Šumoviti apsorpcijski spektri pH osjetljivog bojila imobiliziranog na poliestersku foliju [37].

5.2. USPOREDBA KALIBRACIJSKIH KRIVULJA SUSTAVA S BOJILOM IMOBILIZIRANIM NA POLIESTERSKU FOLIJU I ZAVOJ

Dobiveni refleksijski spektri su omogućili određivanje valne duljine pri kojoj će se snimati kalibracijske krivulje. Nadalje, dobivene kalibracijske krivulje omogućuju određivanje ponovljivosti pH osjetljivog bojila GJM-534 imobiliziranog na poliestersku foliju i zavoj. Funkcije $INTENZITET = f(pH)$ daju ovisnost izlaznog signala, intenziteta reflektirane zrake, o pH vrijednosti. Osim konverzije intenziteta u pH vrijednost, kalibracijske krivulje omogućuju određivanje pK_a vrijednosti bojila GJM-534. Kako je provedena analiza dva sustava, bojilo imobilizirano na poliestersku foliju i bojilo imobilizirano na zavoj moguće je izvršiti usporedbu, Tablica 11. Na temelju prikazane usporedbe uočljiva je mala razlika u vrijednostima pK_a , a rezultat tomu je što se kalibracijska krivulja za sustav bojilo imobilizirano na zavoj nije mogla snimiti u protočnoj ćeliji zbog nemogućnosti dobivanja željene pH vrijednosti. Također su uspoređene vrijednosti aritmetičkih sredina mjernih šumova za oba sustava. Jasno je vidljivo kako su mjerni šumovi, izraženi u postocima intenziteta, vrlo niski. Međutim, mjerni šum za bojilo imobilizirano na zavoj je nešto veći radi nesavršenosti izvedbe aparature za provedbu karakterizacije.

Tablica 11. Usporedba pK_a vrijednosti i ukupnog mjernog šuma za sustave: bojilo imobilizirano na poliestersku foliju i bojilo imobilizirano na zavoj.

	GJM-534 na poliesterskoj foliji	GJM-534 na zavoju
pK_a	7,407	7,670
Mjerni šum/ % intenziteta	0,354	0,421

5.3. USPOREDBA REZULTATA PONOVLJIVOSTI I VREMENA ODZIVA ZA BOJILLO IMOBILIZIRANO NA POLIESTERSKOJ FOLIJI I ZAVOJU

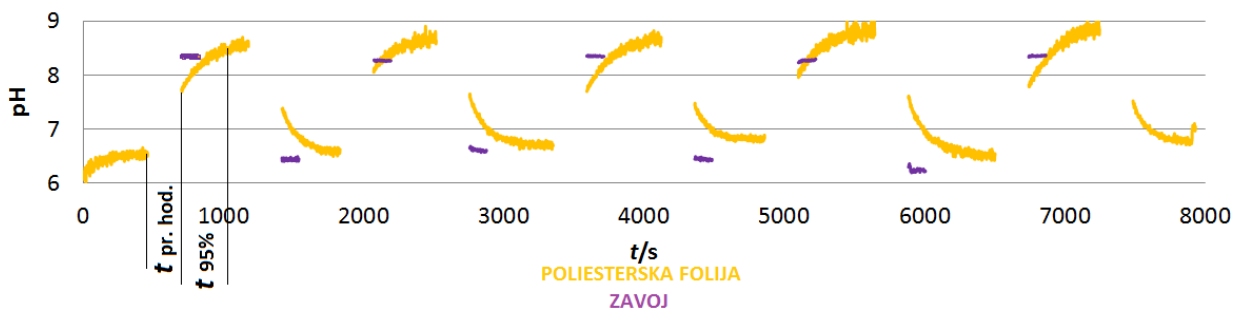
Ponovljivost i vrijeme odziva su vrlo bitne karakteristike senzora za praćenje stanja rana. Stoga je u ovom radu uspoređena reverzibilnost i vrijeme odziva bojila GJM-534 imobiliziranog na poliesterskoj foliji i na zavoju, Tablica 12. Na temelju relativnih standardnih devijacija, RSD i maksimalno mogućeg vremena odziva, t_{max} , potrebno je odrediti koji je sustav bolji za primjenu.

Tablica 12. Usporedba relativnih standardnih devijacija i maksimalno mogućeg vremena odziva za bojilo imobilizirano na poliestersku foliju i bojilo imobilizirano na zavoj u protoniranom i deprotoniranom obliku.

	GJM-534 na poliesterskoj foliji		GJM-534 na zavoju	
	Protoniran	Deprotoniran	Protoniran	Deprotoniran
RSD/ %	1,95	1,40	2,33	0,55
t_{max}/ min	7,275	7,595	4	4

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je ponovljivost sustava, bojilo imobilizirano na poliester, nešto veća prilikom protoniranja dok je manja tijekom procesa deprotoniranja u usporedbi sa sustavom, bojilo imobilizirano na zavoj. Točno vrijeme odziva

senzora nije bilo moguće odrediti jer sustav nije bio u potpunosti protočan te je nakon nanošenja pufera na zavoj instalaciju bilo potrebno pokriti zaštitnom kutijom, a za to vrijeme spektrofotometar nije mjerio izlazni signal. Radi toga je dano ukupno vrijeme, t_{\max} , koje uključuje vrijeme praznog hoda (prebacivanje podataka, pranje i sušenje sustava, nanošenje pufera te prekrivanje zaštitnom kutijom) i vrijeme potrebno za postizanje 95 % ukupnog odziva, Slika 29. Kako je za bojilo immobilizirano na zavoj vrijeme odziva gotovo trenutno tada vrijedi izraz $t_{\max} = t_{\text{prazan hod}}$ odnosno $t_{95\%} = 0$ s, dok je odziv za bojilo immobilizirano na poliestersku foliju znatno sporije, stoga vrijedi izraz $t_{\max} = t_{\text{prazan hod}} + t_{95\%}$. Razlog tome je što pamučni zavoj ima znatno veću poroznost od poliesterske folije, stoga se prilikom imobilizacije na pamučni zavoj dobije znatno veća specifična površina. Kako se u osjetilnom dijelu senzora odvija heterogena kemijska reakcija specifična površina ima veliku ulogu, na način da se povećanjem površine krute faze znatno povećava i brzina kemijske reakcije [38]. Veliku ulogu u brzini reakcije ima i visoka hidrofilnost zavoja koja omogućava brzu difuziju kroz pore osjetilnog dijela senzora [31]. Naposljetku, nužno je napomenutu kako je vrijeme odziva senzora znatno manje od vrijednosti t_{\max} , Tablica 12.



Slika 29. Usporedba ponovljivosti i brzine odziva bojila immobiliziranog na zavoj i poliestersku foliju.

5.4. USPOREDBA RAZLIČITIH NAČINA MODIFICIRANJA IZLAZNOG SIGNALA DOBIVENOG POMOĆU RFID PLATFORME

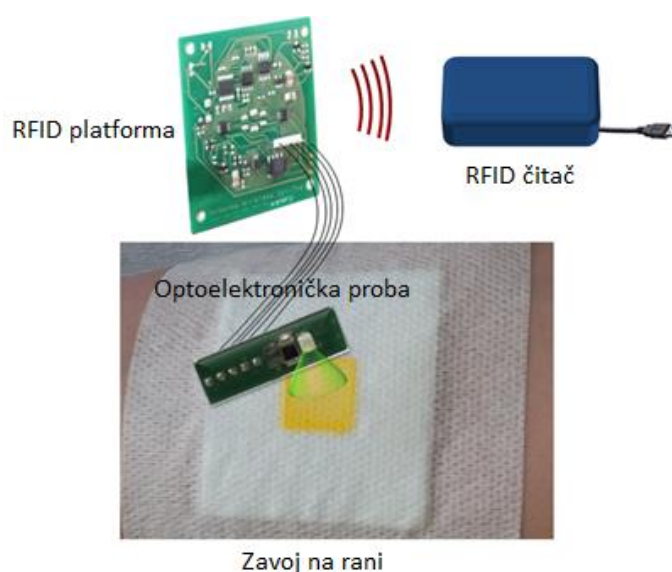
U radu je snimljena kalibracijska krivulja i pomoću radiofrekvencijske identifikacijske (RFID) platforme pri čemu je korištena i dodatna referentna LED2 dioda koja emitira valnu duljinu 660 nm. U svrhu smanjenja pogreške prilikom mjerenja isprobane su različite metode modifikacije izlaznog signala. Na temelju ukupne relativne standardne devijacije i pK_a vrijednosti u slučaju kada se koristi samo LED1= 527 nm i kada se koriste obje LED diode,

LED1= 527 nm i LED2= 660 nm, napravljena je usporedba rezultata, Tablica 13. Ukupne relativne standardne devijacije su vrlo slične, iako je RSD kada se ne koristi referentna dioda nešto veća u odnosu kada se koristi i referentna dioda LED2= 660 nm. Stoga se može zaključiti kako se korištenjem referentnog signala LED2 diode dobiju poboljšani rezultati.

Tablica 13. Usporedba ukupnih relativnih standardnih devijacija i pK_a vrijednosti u slučajevima kada se koristi samo signal LED1= 527 nm te kada se koristi i referentna dioda, LED2= 660 nm

	ADC kod	ADC kod, mod 1	ADC kod, mod 2
RSD/ %	0,28	0,48	0,24
pK_a	7,80	7,81	7,79

Na temelju provedene usporedbe RSD i pK_a vrijednosti može se zaključiti kako je pK_a bojila imobiliziranog na zavoj određene pomoću RFID platforme, bez obzira na obradu signala, gotovo identična. Odnosno senzor pokazuje odlične rezultate i bez referentne diode, koja može detektirati ispiranje bojila, kojeg u ovom slučaju nije bilo. Također je predložena optimalna izvedba senzora s inkorporiranom RFID platformom u zavoj s imobiliziranim pH osjetljivim bojilom GJM-534, Slika 30.



Slika 30. Konačna izvedba bežičnog optičkog kemijskog senzora za praćenje stanja rane

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu dan je pregled mogućih markera za praćenje stanja rana te senzori koji omogućuju analizu istih. Spektrofotometrijskom karakterizacijom pH osjetljivog bojila 4-[4-(2-hidroksietan-sulfonil)-fenilazo]-2,6-dimeoksifenol, GJM-534, imobiliziranog na poliestersku foliju i zavoj utvrđena je njegova primjena u praćenu stanja rana. Naime pK_a bojila imobiliziranog na oba sustava idealno odgovara u svrhu praćenja tijekom zacjeljivanja kroničnih i akutnih rana. Međusobno su uspoređeni rezultati dobiveni imobilizacijom bojila na foliju i zavoj te je predložena izvedba senzora u primjeni. Također je ustanovljena visoka ponovljivost oba ispitana osjetilna dijela te vrlo kratko vrijeme odziva s obzirom da se u ranama ne očekuje nagla promjena pH. Ovakva vrsta optičkih senzora omogućava i vrlo jednostavnu kvantitativnu analizu i to vizualnim pregledom. Zavoj ovisno o pH vrijednosti rane mijenja boju. Tako će, ukoliko je rana akutna zavoj biti žute boje, a ako je kronična zavoj će poljubičastiti. Radi poboljšanja izvedbe optičkog senzora u njegov osjetilni dio je, preko optoelektroničke probe, integrirana i bežična RFID platforma koja omogućava nesmetano kretanje pacijenata uz omogućenu kontinuiranu kvalitativnu analizu u realnom vremenu. Pomoću radiofrekvencijske identifikacijske platforme snimljene su kalibracijske krivulje u pH rasponu od 5 do 10. Kako je poznato kronične rane predstavljaju veliki problem, a dosadašnje analize bile su izuzetno bolne i neugodne za pacijente. Ovakva vrsta sustava za praćenje pH rana je neinvazivna i bezbolna. Također je bitna činjenica kako ovakav senzor smanjuje troškove potrebne za njegu i skrb o pacijentima oboljelim od kroničnih rana a integracija bežične platforme omogućava i prijenos podataka liječnicima te su time izbjegnute posjete ambulantama. U daljnjem radu potrebno je dodatno minijaturizirati cjelokupni sustav te osigurati prijenos rezultata na pametne telefone. Slične nosive senzore moguće je primijeniti i na druge oblike kroničnih bolesti poput dijabetesa te tako olakšati život oboljelima.

7. POPIS SIMBOLA

ADC kod- digitalni zapis fotodiode

Ar. sr.- aritmetička sredina

pH- negativan logaritam koncentracije H^+ iona

pK_a - logaritam konstante disocijacije kiseline

pO_2 - parcijalni tlak kisika

RSD- relativna standardna devijacija (%)

t - vrijeme (s)

λ - valna duljina (nm)

Kratice

FITC- fluorescein izotiocijanat

GJM-534- pH osjetljivo bojilo 4-[4-(2-hidroksietan-sulfonil)-fenilazo]-2,6-dimeoksifenol

HB- PNIPAM- razgranati poli(N-isopropilakrilamida)

LED1- dioda 527 nm

LED2- dioda 650 nm

NFC- komunikacija bliskog polja

RFID- radiofrekvencijska identifikacija

SAN- kopolimer stirena i akrilonitrila

8. LITERATURA

- 1 . Brem, H., Stojadinovic , O., Diegelmann, R. F., Entero, H., Lee, B., Pastar, I., Golinko, M., Rosenberg, H., Tomic-Canic, M., Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement, *Mol. Med.*, **13** (2007) 30-39.
- 2 . Schneider, L. A., Korber, A., Grabbe, S., Dissemond, J., Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?, *Arch. Dermatol. Res.*, **298** (2007) 413-420.
- 3 . Schreml, S., Meier, R. J., Wolfbeis, O. S., Landthaler, M., Szeimies, R. M., Babilas, P., 2D luminescence imaging of pH in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (2011) 24-32.
- 4 . McLister, A., Phair, J., Cundell, J., Davis, J., Electrochemical approaches to the development of smart bandages: a mini-review, *Electrochemistry Communications*, **40** (2014) 96-99.
- 5 . Enoch, S., Price, P., Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide wounds*, **1** (2004) 165-175.
- 6 . Matičić, D., Vnuk, D., *Veterinarska kirurgija i anesteziologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2010., str. 117.
- 7 . Spear, M., Acute or chronic? What's the difference?, *Plastic Surgical Nursing*, **33** (2013) 98-100.
- 8 . http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public_version/contents/chapters/chapter003/section003/blue/page001.html (pristup 01. 04. 2017.)
- 9 . Dargaville, T. R., Farrugia, B. L., Broadbent, J. A., Pace, S., Upton, Z., Voelcker, N. H., Sensors and imaging for wound healing: a review, *Biosens. Bioelectron.*, **41** (2013) 30-42.
- 10 . Harding, K., *Diagnostics and Wounds. A Consensus Document*, (2007).
- 11 . Healy, B., Freedman, A., ABC of wound healing: infections, *British Medical Journal* , **332** (2006) 838–841.
- 12 . Sharp, D., Gladstone, P., Smith, R. B., Forsythe, S., Davis, J., Approaching intelligent infection diagnostics: Carbon fibre sensor for electrochemical pyocyanin detection, *Bioelectrochemistry*, **77** (2010) 114–119.
- 13 . Sharp, D., Forsythe, S., Davis, J., Carbon fibre composites: integrated electrochemical sensors for wound management, *The Journal of Biochemistry*, **144** (2008) 87-93.
- 14 . Fernandez, M. L., Upton, Z., Edwards, H., Finlayson, K., Shooter, G. K., Elevated uric acid correlates with wound severity, *Int. Wound J.*, **9** (2012) 139–149.

-
- 15 . Yager, D. R., Chen, S. M., Ward, S. I., Olutoye, O. O., Diegelmann, R. F., Cohen, I. K., Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors, *Wound Repair Regen.*, **5** (1997) 23–32.
- 16 . Sarker, P., Shepherd, J., Swindells, K., Douglas, I., MacNeil, S., Swanson, L., Rimmer, S., Highly branched polymers with polymyxin end groups responsive to *Pseudomonas aeruginosa*, *Biomacromolecules* **12** (2011) 1–5.
- 17 . Shepherd, J., Douglas, I., Rimmer, S., Swanson, L., MacNeil, S., Development of three-dimensional tissue-engineered models of bacterial infected human skin wounds, *Tissue Eng. Part C Methods*, **15** (2009) 475-484.
- 18 . Allardyce, R. A., Langford, V. S., Hill, A. L., Murdoch, D. R., Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry, *Journal of Microbiological Methods*, **65** (2006) 361–365.
- 19 . Nakagami, G., Sanada, H., Iizaka, S., Kadono, T., Higashino, T., Koyanagi, H., Haga, N., Predicting delayed pressure ulcer healing using thermography: a prospective cohort study, *J. Wound Care*, **19** (2010) 465–472.
- 20 . Vasani, R. B., McInnes, S. J. P., Cole, M. A., Jani, A. M. M., Ellis, A. V., Voelcker, N. H., Stimulus-responsiveness and drug release from porous silicon films ATRP-grafted with poly (N-isopropylacrylamide), *Langmuir*, **27** (2011) 7843–7853.
- 21 . Queen, D., Gaylor, J. D. S., Evans, J. H., Courtney, J. M., Reid, W. H., The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressings, *Biomaterials*, **8** (1987) 367–371.
- 22 . Queen, D., Orsted, H., Sanada, H., Sussman, G., A dressing history, *Int. Wound J.*, **1** (2004) 59–77.
- 23 . McColl, D., Cartlidge, B., Connolly, P., Real-time monitoring of moisture levels in wound dressings in vitro: an experimental study, *International Journal of Surgery*, **5** (2007) 316–322.
- 24 . Hančević J, i sur., Dekubitus, etiologija, profilaksa i liječenje, *Medicinska naklada*, Zagreb, 2003, str. 24.
- 25 . Mehmood, N., Hariz, A., Fitridge, R., Voelcker, N. H., Applications of modern sensors and wireless technology in effective wound management, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **102** (2014) 885-895.
- 26 . Sridhar, V., Takahata, K., A Hydrogel-Based Passive Wireless Sensor Using a Flex-Circuit Inductive Transducer, *Sensors and Actuators A: Physical*, **155** (2009) 58-65.

-
- 27 . Phair, J., Newton, L., McCormac, C., Cardosi, M. F., Leslie, R., Davis, J., A disposable sensor for point of care wound pH monitoring, *Analyst*, **136** (2011) 4692–4695.
- 28 . Mohr, G. J., Muller, H., Bussemer, B., Stark, A., Carofiglio, T., Trupp, S., Heuermann, R., Henkel, T., Escudero, D., Gonzalez, L., Design of acidochromic dyes for facile preparation of pH sensor layers, *Anal. Bioanal. Chem.*, **392** (2008) 1411–1418.
- 29 . Trupp, S., Alberti, M., Carofiglio, T., Lubian, E., Lehmann, H., Heuermann, R., Yacoub-George, E., Bock, K., Mohr, G. J., Development of pH-sensitive indicator dyes for the preparation of micro-patterned optical sensor layers , *Sensors and Actuators B: Chemical*, **150** (2010) 206–210.
- 30 . Papazoglou, E. S., Zubkov, L., Mao, X., Neidrauer, M., Rannou, N., Weingarten, M. S., Image analysis of chronic wounds for determining the surface area, *Wound Repair Regen.*, **18** (2010) 349–358.
- 31 . Schreml, S., Meier, R. J., Wolfbeis, O. S., Landthaler, M., Szeimies, R. M., Babilas, P., 2D luminescence imaging of pH in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (2011) 2432–2437.
- 32 . Schreml, S., Meier, R. J., Wolfbeis, O. S., Maisch, T., Szeimies, R. M., Landthaler, M., Regensburger, J., Santarelli, F., Klimant, I., Babilas, P., 2D luminescence imaging of physiological wound oxygenation, *Exp. Dermatol.*, **20** (2011) 550–554.
- 33 . Meier, R. J., Schreml, S., Wang, X. D., Landthaler, M., Babilas, P., Wolfbeis, O. S., Simultaneous photographing of oxygen and pH in vivo using sensor films, *Angewandte Chemie-International Edition*, **50** (2011) 10893–10896.
- 34 . Pantelopoulos, A., Bourbakis, N. G., A Survey on Wearable Sensor-Based Systems for Health Monitoring and Prognosis, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics—Part C: Applications and Reviews*, **40** (2011) 171-193.
- 35 . Pesonen, N., Jaakkola, K., Lamy, J., Marjonen, J., Smart RFID Tags, u: Turcu, C., Development and Implementation of RFID Technology, ,I-Tech Education and Publishing, 1 (2009) 159-178.
- 36 . Strommer, E., Hillukkala, M., Ylisaukko-oja, A., Ultra-low Power Sensors with Near Field Communication for Mobile Applications, u: Orozco-Barbosa, L., Olivares, T., Casado, R., Bermudez, A., *Wireless Sensor and Actor Networks*, Albacete, Springer US, 248 (2007) 131-142.
- 37 . Zubak, M., Nosivi bežični optički kemijski senzori, Završni rad, FKIT, Sveučilište u Zagrebu (2015).

38 . Chen, L. F., Tsao, G. T., Physical characteristics of porous cellulose beads as supporting material for immobilized enzymes, *Biotechnology and Bioengineering*, **18** (1976) 1507-1516.

