ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ Σχολή Θετικών Επιστημών Τμήμα Χημείας



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Τμήματος Χημείας Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟΥ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΟΥ ΦΟΡΕΤΟΥ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΙΟΝΤΩΝ ΧΛΩΡΙΟΥ ΣΤΟΝ ΙΔΡΩΤΑ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ



Δήμητρα Μυλωνίδου

Χημικός

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

UNIVERSITY OF IOANNINA Faculty of Natural Sciences Department of Chemistry



Master program in Department of Chemistry Analytical Chemistry, Environmental and Food Chemistry and Technology

DEVELOPMENT OF A SCREEN-PRINTED FABRIC-BASED COLORIMETRIC MICROFLUIDIC WEARABLE SENSOR FOR THE DETERMINATION OF CHLORIDE IN SWEAT, A BIOMARKER FOR CYSTIC FIBROSIS



Dimitra Mylonidou

Chemist

Master Thesis submitted to the Department of Chemistry of the University of Ioannina

IOANNINA, GREECE 2023

Αφιερώνεται στην οικογένειά μου, Κυριάκο, Χρυσούλα, Ηλία

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική πειραματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος του τμήματος Χημείας κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2021-Οκτώβριος 2023.

Η εργασία αποτελείται από δύο μέρη, ένα θεωρητικό κι ένα πειραματικό μέρος. Στο θεωρητικό μέρος δίνεται το θεωρητικό υπόβαθρο για την κατανόηση του πειράματος, της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των αναλυτικών μετρήσεων (χρωματομετρία), της διαδικασίας εκτύπωσης του αισθητήρα σε υφασμάτινα υποστρώματα και της σπουδαιότητας των ιατροδιαγνωστικών συσκευών για αναλύσεις στο σημείο περίθαλψης (point-of-care) στη σύγχρονη Αναλυτική Χημεία.

Στο πειραματικό μέρος παρουσιάζεται η ανάπτυξη ενός νέου εκτυπωμένου σε ύφασμα μικρορευστονικού χρωματομετρικού φορετού αισθητήρα για τον προσδιορισμό ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα, που αποτελούν βιοδείκτη της κυστικής ίνωσης. Επίσης, παρατίθενται τα βήματα βελτιστοποίησης του αισθητήρα, η λειτουργία του αισθητήρα και η επικύρωση των αναλυτικών αποτελεσμάτων με μια μέθοδο αναφοράς.

Όλα τα παραπάνω δε θα ήταν εφικτά χωρίς την πολύτιμη βοήθεια κάποιων ανθρώπων που στάθηκαν αρωγοί σε αυτή την προσπάθειά μου τόσο σε γνωστικό επίπεδο όσο κα σε προσωπικό.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μάμαντο Προδρομίδη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τη συνεχή καθοδήγηση και την αμέριστη προσοχή του, ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία αυτή η εργασία. Έτσι, εγώ η ίδια νιώθω πιο πλούσια γνωστικά, αλλά και έτοιμη να βγω στην αγορά εργασίας καθώς έχω μάθει να λειτουργώ σωστά σε ένα εργαστήριο, να συνεργάζομαι με άλλους συναδέλφους και να είμαι αποδοτική. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δυο μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Βασίλειο Σακκά και τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημοσθένη Γκιώκα για το χρόνο που διέθεσαν και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάκτορα Ελένη Τζιάννη, για την άψογη συνεργασία μας και για τη πολύτιμη βοήθεια της. Για την υπομονή που έδειξε κατά τη διάρκεια εξοικείωσής μου με τον χώρο του εργαστηρίου, αλλά και για την διάθεσή της να μου μεταλαμπαδεύσει όλες τις γνώσεις της και την όρεξή της για δουλειά. Οι συμβουλές της ήταν ανεκτίμητες και θα ήταν μεγάλη μου χαρά να συνεργαστώ μελλοντικά μαζί της.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Άννα Χάλλα και τον κύριο Βασίλειο Χολέβα από την Παιδιατρική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την εξαιρετική συνεργασία μας κατά τις δοκιμασίες ιδρώτα, για τη λήψη πραγματικών δειγμάτων ιδρώτα μέσω ιοντοφόρησης, για τις σημαντικές πληροφορίες και γνώσεις που μοιράστηκαν μαζί μου και την καλή τους διάθεση.

Άλλο ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της καθημερινότητάς μου στο εργαστήριο, αλλά και της προσωπικής ζωή μου αυτά τα δύο χρόνια ήταν οι συνεργάτες μου, οι φίλοι μου, Σταμάτης, Μαρία, Καλλιρρόη, Ελευθερία και Ιωάννα, που έκαναν τις μέρες μου πιο διασκεδαστικές και ενδιαφέρουσες. Άνθρωποι που μπορεί να συναναστράφηκα μόνο για δύο χρόνια, αλλά έχουμε χτίσει γερά θεμέλια για μια δυνατή φιλία που θα κρατήσει στο πέρασμα των χρόνων. Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Σταμάτη Αργυρούδη, γιατί συνεργαστήκαμε εξαιρετικά για την λήψη πραγματικών δειγμάτων ιδρώτα είτε με ιοντοφόρηση είτε με φυσική άσκηση και που μοιράστηκε μαζί μου τις γνώσεις του σε πειραματικό επίπεδο. Πολύτιμη ήταν η παρουσία και των υπόλοιπων συναδέλφων στον εργαστηριακό χώρο, της Μαρίας και του Αλέξανδρου, καθώς και της εξαιρετικής κυρίας Φλώρου Αγγελικής που όποτε χρειάστηκα τη βοήθειά τους ήταν διαθέσιμοι και πρόθυμοι να μου τη δώσουν.

Τέλος, και κυριότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, Κυριάκο, Χρυσούλα, Ηλία, γιατί χάρη σε αυτούς βρίσκομαι στα Ιωάννινα τα τελευταία έξι χρόνια, που μέχρι τώρα έχουν αποδειχτεί τα καλύτερα και τα πιο εποικοδομητικά. Τους ευχαριστώ τόσο για την οικονομική, αλλά κυρίως για την ψυχολογική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια, την ηθική συμπαράσταση, τις συμβουλές τους και κυρίως, γιατί αποτελούν πρότυπο για μένα. Ήταν εκεί σε όλες τις χαρούμενες, αλλά και στενόχωρες στιγμές, στις διαφωνίες, στα κλάματα και στα γέλια. Ο παππούς μου, Δημήτρης, δε θα μπορούσε να λείπει από αυτό το κομμάτι, καθώς είναι ένας από τους πιο αγαπημένους μου ανθρώπους στον κόσμο και πάντα με χαμόγελο, αισιοδοξία και περηφάνεια συζητάει μαζί μου για το μέλλον και την πορεία μου. Το λιγότερο που μπορώ να κάνω είναι να αφιερώσω την παρούσα εργασία σε αυτούς που με υποστήριξαν από την αρχή μέχρι το τέλος με αγάπη και υπομονή.

> Δήμητρα Μυλωνίδου Ιωάννινα, 2023

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η ανάπτυξη ενός φορετού αισθητήρα για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα, τα οποία αποτελούν βιοδείκτη για την κυστική ίνωση. Ο αισθητήρας περιλαμβάνει ένα μικρορευστονικό κανάλι εκτυπωμένο σε ύφασμα χρησιμοποιώντας ένα καινοτόμο μελάνι κεριού συμβατό με την τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος και την ζώνη ανίχνευσης η οποία έχει τροποποιηθεί με χρωμικό άργυρο. Η αρχή λειτουργίας του αισθητήρα βασίζεται στη χρωματική αλλαγή της ζώνης ανίχνευσης από καστανέρυθρη σε κίτρινη λόγω της αντίδρασης των ιόντων χλωρίου με το χρωμικό άργυρο προς σχηματισμό λευκού χλωριούχου αργύρου και ελεύθερων χρωμικών ιόντων (κίτρινο χρώμα). Η βαθμονόμηση του αισθητήρα έγινε με τη λήψη φωτογραφιών με κινητό τηλέφωνο ή τη σάρωση της ζώνης ανίχνευσης και την ψηφιακή ανάλυση του χρώματος με κατάλληλο λογισμικό στους χρωματικούς χώρους RGB και L*a*b*. Οι πειραματικές μεταβλητές επιλέχθηκαν ώστε ο αισθητήρας να αποκρίνεται γραμμικά στην περιοχή συγκεντρώσεων 0-100 mM χλωριούχων ώστε να καλύπτει το διαγνωστικά χρήσιμο εύρος συγκεντρώσεων χλωριούχων χωρίς να απαιτείται αραίωση ή κάποια άλλη επεξεργασία του ιδρώτα. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε πραγματικά δείγματα ιδρώτα τα οποία συλλέχθηκαν από υγιείς εθελοντές είτε με ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης είτε με φυσική άσκηση. Τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία με εξαιρετική αυτά φασματοφωτομετρικής μεθόδου αναφοράς.

ABSTRACT

In this work, the development of a screen-printed, fabric-based colorimetric microfluidic wearable sensor for the determination of chloride in sweat, a biomarker for *cystic fibrosis*, is described. The sensor includes a screen-printed microfluidic channel and a detection zone modified with silver chromate. The operation of the sensor is based on the color change of the detection zone, from brown-red to yellow due the reaction of silver chromate with chloride ions and the production of white silver chloride and free chromates (yellow). The sensor was calibrated by either taken photos with a mobile phone or by scanning the sensor and the digital analysis of the color of the detection zone to RGB and L*a*b* color spaces with a software. Experimental variables were selected to ensure a linear response over the clinical important range from 0 to 100 mM chloride, directly to undiluted sweat. The sensor was successfully applied to real human sweat collected from healthy volunteers either with pilocarpine iontophoresis or after physical exercise. The results were in perfect agreement with those obtained by a reference spectrophotometric method.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣi		
ΠΕΡΙ/	\ HΨH iii	
ABSTRACTv		
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
1.	Συσκευές για αναλύσεις στο σημείο περίθαλψης (Point of Care-PoC)5	
2.	Τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος7	
3.	Χρωματομετρία ψηφιακής εικόνας8	
	3.1. RGB (Red, Green, Blue) 10	
	3.2. HSB (Hue, Saturation, Brightness)11	
	3.3. CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, Key= Black)	
	3.4. Lab (Lightness, a*, b*) 13	
4.	Επιλογή χρωματικού χώρου14	
5.	Χρήση κινητών τηλεφώνων στην χρωματομετρική ανάλυση	
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
1.	Σκοπός της εργασίας23	
2.	Περίληψη23	
3.	Εισαγωγή24	
4.	Πειραματική πορεία31	
	4.1. Υλικά και αντιδραστήρια31	
	4.2. Οργανολογία	
	4.3. Παρασκευή του μελανιού-κεριού εκτύπωσης32	
	4.4. Προκατεργασία του υφάσματος33	
	4.5. Εκτύπωση μικρορευστονικών καναλιών (microfluidics)34	
	4.6. Παρασκευή εναιωρήματος Αg₂CrO₄ σε Tween-80 35	
	4.7. Τροποποίηση υφασμάτων με το εναιώρημα Ag₂CrO₄ σε Tween 35	
	4.8. Παρασκευή διαλύματος τεχνητού ιδρώτα πρότυπων διαλυμάτων ιόντων χλωρίου	
	4.9. Βαθμονόμηση του αισθητήρα και ανάλυση ιδρώτα 36	
5.	Δειγματοληψία ιδρώτα	
6.	Μέθοδος αναφοράς38	
7.	Αποτελέσματα και Συζήτηση	
	7.1. Σχεδι ασμός και κατασκευή μικρορευστονικών καναλιών	
	7.2. Βελτιστοποίηση παραμέτρων44	

7.3. Καμπύλη αναφοράς	53
7 4.Προσδιορισμός χλωριούχων σε ανθρώπινο ιδρώτα και πιστοποίηση τη	ς μεθόδου 54
7.5.Κατασκευή αυτοκόλλητου επιθέματος που περιέχει τον υφασμάτινο	
μικρορευστονικό οπτικό αισθητήρα	56
8. Συμπεράσματα	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62
Παρουσίαση σε διεθνή συνέδρια	

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. Συσκευές για αναλύσεις στο σημείο περίθαλψης (Point of Care-PoC)

Οι αναλύσεις πεδίου κερδίζουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των αυξημένων απαιτήσεων για συνεχή ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο διαφόρων χημικών δεικτών σε διάφορους τομείς όπως, η υγεία, το περιβάλλον, τα τρόφιμα κ.λπ. Για την ικανοποίηση αυτών των απαιτήσεων, γίνεται ολοένα και πιο επιτακτική η ανάγκη νέων, γρήγορων, εύκολων στη χρήση και οικονομικών αναλυτικών μεθόδων που να επιτρέπουν τη διεξαγωγή των αναλύσεων στο χώρο συλλογής του δείγματος, ώστε να διευκολύνεται η συνεχής παρακολούθηση των αναλυτών σε πραγματικό χρόνο και να λαμβάνονται άμεσα οι απαραίτητες αποφάσεις. Ο όρος «αναλύσεις πεδίου» αναφέρεται στις τεχνικές που λαμβάνουν χώρα στο σημείο που βρίσκεται ο αναλύτης (Lopez-Avila and Hill, 1997). Τα βασικά χαρακτηριστικά των αναλύσεων πεδίου, που τους δίνουν το πλεονέκτημα έναντι των καθιερωμένων εργαστηριακών τεχνικών είναι η μείωση του χρόνου ανάλυσης, λόγω της εξάλειψης του σταδίου μεταφοράς του δείγματος, η χρήση χαμηλού κόστους φορητών συσκευών μικρών διαστάσεων, η ελαχιστοποίηση της ποσότητας των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση, η άμεση χρήση του δείγματος (ιδανικά χωρίς να προηγηθεί κάποια επεξεργασία) και η διεξαγωγή της ανάλυσης μέσω ενός εύκολου στη χρήση αναλυτικού πρωτοκόλλου ώστε, ιδανικά, η ανάλυση του δείγματος να μπορεί να διεξαχθεί από μη εξειδικευμένο προσωπικό (Eleni Tzianni, 2023; Gonzalo-Ruiz et al., 2009; Taghizadeh-Behbahani et al., 2019).

Τα κινητά τηλέφωνα προσομοιάζουν πλέον με μικρούς υπολογιστές και είναι εφοδιασμένα με λειτουργικά συστήματα, εσωτερική μνήμη, κυκλώματα ασύρματης μεταφοράς ψηφιακών δεδομένων και κάμερες υψηλής ανάλυσης. Ωστόσο, είναι δυνητικά πιο προσιτά και οικονομικά από τις εργαστηριακές φορητές συσκευές ανάλυσης και ως εκ τούτου τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί σημαντική έρευνα πάνω στην ανάπτυξη αναλυτικών συσκευών σε συνδυασμό με κινητά τηλέφωνα οι οποίες σταδιακά χρησιμοποιούνται για αναλύσεις, οι οποίες επί του παρόντος εκτελούνται από εκπαιδευμένο προσωπικό χρησιμοποιώντας εργαστηριακά όργανα, όπως μικροσκόπια και φασματοφωτόμετρα (Roda et al., 2016).

Αναμφίβολα όμως, ο σημαντικότερος τομέας ανάλυσης, ο οποίος έχει συγκεντρώσει και το μεγαλύτερο ερευνητικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον, αφορά στις αναλυτικές συσκευές και διατάξεις για κλινικές αναλύσεις, λόγω της σημαντικότητας που έχουν στην υγεία του ανθρώπου. Μερικά παραδείγματα ιατροδιαγνωστικών συσκευών που χρησιμοποιούνται καθημερινά είναι ο βιοαισθητήρας γλυκόζης, ο αισθητήρας μέτρησης της συγκέντρωσης του αλκοόλ στο αίμα και το τεστ εγκυμοσύνης. Για τις παραπάνω αναλύσεις έχουν κατασκευαστεί κατάλληλες ιατροδιαγνωστικές συσκευές οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκτός του εργαστηριακού χώρου και αξιοσημείωτα, σε πολλές περιπτώσεις, από τους ίδιους τους τελικούς χρήστες (Eleni Tzianni, 2023).

Ένας άλλος βιοδείκτης, ο οποίος αποτελεί και το αντικείμενο της παρούσας εργασίας, είναι τα ιόντα χλωρίου στον ιδρώτα. Η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου στο ιδρώτα αποτελεί βιοδείκτη για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης κι ως εκ τούτου τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια σημαντική ερευνητική δραστηριότητα για τη μετάβαση του προσδιορισμού τους από τις εργαστηριακές αναλύσεις στους χώρους των νοσοκομείων και των διαγνωστικών κέντρων με PoC συσκευές (Zhang et al., 2017). Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα κύρια χαρακτηριστικά και ταυτόχρονα πλεονεκτήματα αυτών των συσκευών είναι η εξοικονόμηση χρόνου και κόστους και η δυνατότητα χρήση τους από μη εξειδικευμένο προσωπικό ή ακόμα από τον ίδιο τον χρήστη (Taghizadeh-Behbahani et al., 2019).

Μια σημαντική παράμετρος στη λειτουργία αυτών των συσκευών είναι η απλοποίηση της αναλυτικής πορείας εργασίας και αυτό, σε ένα πολύ μεγάλο βαθμό, έχει επιτευχθεί με την ενσωμάτωση στις συσκευές PoC των μικροροιϊκών ή μικρορευστονικών διατάξεων (microfluidics). Η δυνατότητα των μικρορευστονικών καναλιών να χειρίζονται πολύ μικρούς όγκους (σε κλίμακα μικρολίτρων) αντιδραστηρίων και δειγμάτων, σε κανάλια διαστάσεων μικρομέτρου, προσφέρει χρήσιμες δυνατότητες όπως χαμηλό κόστος, υψηλή ευαισθησία και μικρούς χρόνους ανάλυσης (Whitesides, 2006).

Το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την κατασκευή μικρορευστονικών καναλιών σε χαρτί και ύφασμα έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών για την κατασκευή τους. Η εκτύπωση με κερί είναι η πιο δημοφιλής τεχνική για την ανάπτυξη μικρορευστονικών καναλιών με πολλά πλεονεκτήματα όπως η απλότητα,

η γρήγορη διαδικασία και η υψηλή απόδοση. Η εκτύπωση μέσω πλέγματος (σύμφωνα με ένα πιο εμπορικό όρο, μεταξοτυπία), που εφαρμόστηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής τόσο σε χαρτί όσο και σε ύφασμα χειροκίνητα και συγκεκριμένα με την τριβή ενός στερεού υδρόφοβου υλικού (κυρίως κεριού) ή ενός υγρού (με σχετικά μεγάλο ιξώδες) υδρόφοβου υλικού μέσω ενός πλέγματος-εκμαγείου (Eleni Tzianni, 2023; Noviana et al., 2021).

Διάφορες ΡοC συσκευές, η λειτουργία των οποίων βασίζεται σε μικρορευστονικά κανάλια, έχουν αναπτυχθεί με τις παραπάνω μεθόδους και έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό διαφόρων βιοδεικτών σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα, όπως και για τον προσδιορισμό ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα (Wang et al., 2023).

2. Τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος

Η τεχνική στην οποία στηρίχτηκε η κατασκευή του αισθητήρα στην παρούσα εργασία είναι η εκτύπωση μέσω πλέγματος και συγκεκριμένα η τεχνολογία παχιάς επίστρωσης, που χρησιμοποιείται ευρύτατα τόσο σε βιομηχανική κλίμακα όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο. Το μελάνι (ink) είναι ένα θιξοτροπικό υλικό, ένα υλικό δηλαδή το οποίο υπό πίεση γίνεται ρευστό και επανέρχεται στην αρχική του φυσική κατάσταση μετά την παύση της ασκούμενης πίεσης.

Το μέγεθος και το σχήμα της εκτύπωσης καθορίζεται από το πλέγμα και συγκεκριμένα από το mesh της γάζας που θα χρησιμοποιηθεί. Η περιοχή του πλέγματος που λειτουργεί ως εκμαγείο προκύπτει με μεθόδους λιθογραφίας και την έκθεση ενός φωτοευαίσθητου υλικού σε θάλαμο με UV ακτινοβολία. Το μελάνι, κινούμενο υπό πίεση με ένα ελαστικό σάρωθρο (squeegee) πάνω από το πλέγμαεκμαγείο (screen), εκτυπώνεται στο επιθυμητό υπόστρωμα (Προδρομίδης, 2013). **(Σχήμα 1)**.

Καθώς το σάρωθρο περνά επάνω από την επιφάνεια του πλέγματος, το πιέζει σταδιακά επάνω στο υπόστρωμα (το πλέγμα δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα), το μελάνι περνά μέσα από τις οπές του πλέγματος, αφήνοντας έτσι το επιθυμητό αποτύπωμα επάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος. Αμέσως μετά το πέρασμα του σαρώθρου το πλέγμα επανέρχεται σταδιακά στην αρχική του θέση αφήνοντας το αποτύπωμα του μελανιού άθικτο. Το υπόστρωμα συγκρατείται στην

επιφάνεια της κινητής βάσης του εκτυπωτή με τη βοήθεια μεταλλικών υποδοχέων αλλά κυρίως με το κενό, το οποίο δημιουργείται στο κέντρο της βάσης (Προδρομίδης, 2013).



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας εκτύπωσης (Προδρομίδης, 2013)

3. Χρωματομετρία ψηφιακής εικόνας

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται στην εξαγωγή χημικών πληροφοριών με βάση τη χρωματομετρία ψηφιακής εικόνας (Digital Image Colorimetry-DIC). Αυτές οι μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε διάφορους τομείς της χημικής ανάλυσης, όπως την κλινική χημεία, τη χημεία περιβάλλοντος, τη χημεία τροφίμων, τη δημόσια ασφάλεια κ.λπ. και παρέχουν γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα, με χαμηλό κόστος (Geng et al., 2023). Ως εκ τούτου, οι κάμερες των κινητών τηλεφώνων μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλέον ως φορητές συσκευές, με απλή λειτουργία για τους περισσότερους πολίτες, για τη λήψη ψηφιακών εικόνων της επιφάνειας ανίχνευσης μια αναλυτικής συσκευής PoC, για την ανάλυση των χρωματικών παραμέτρων (με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών) και τέλος, για την εξαγωγή, παρουσίαση και αποστολή του αναλυτικού αποτελέσματος. Προϋπόθεση για την παραπάνω χρήση των κινητών τηλεφώνων στην χημική ανάλυση αποτελεί φυσικά η ανάπτυξη, μεταβολή ή ο αποχρωματισμός της ζώνης ανίχνευσης με ένα τρόπο που συνδέεται με τη μεταβολή της συγκέντρωσης ή της απουσίας/παρουσίας ενός αναλύτη στο δείγμα (Carolina et al., 2022; Geng et al., 2023).

Η ανάλυση μιας ψηφιακής εικόνας στις χρωματικές παραμέτρους της δημιουργεί μήτρες που περιγράφουν την κατανομή διαφορετικών τόνων σε εικονοστοιχεία (pixels) που οριοθετούνται σε μια περιοχή ενδιαφέροντος (Region of Interest, ROI). Για παράδειγμα, η εικόνα αναλύεται σε κόκκινες, πράσινες και μπλε παραμέτρους στο σύστημα χρωμάτων RGB, ποσοτικοποιημένες από 0 έως 255. Οι παράμετροι RGB μπορούν επίσης να μετατραπούν, μέσω κατάλληλων λογισμικών (π.χ. Image J) και κατάλληλων εφαρμογών (π.χ. Color Grab, Touch Color, Color Pick, τα οποία είναι διαθέσιμα δωρεάν σε διάφορα ηλεκτρονικά καταστήματα για εφαρμογές Android ή IOS), σε άλλα χρωματικά μοντέλα, π.χ. HSB, CMYK, L*a*b *, τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια (Woolf et al., 2021; Ορφανάκος, 2004).

Τα RGB, HSB, CMYK και L*a*b *αποτελούν χρωματικά μοντέλα και όταν κάθε μία από τις χρωματικές παραμέτρους τους πάρει μια συγκεκριμένη τιμή μετατρέπονται σε χρωματικούς χώρους (Woolf et al., 2021). Το χρωματικό μοντέλο CMYK χρησιμοποιείται συχνά σε προϊόντα εκτύπωσης, το μοντέλο RGB στηρίζεται στην αρχή του εικονοστοιχείου, το χρωματικό μοντέλο HSB είναι αυτό που αντιλαμβάνεται καλύτερα η ανθρώπινη όραση, ενώ το μοντέλο L*a*b * μιμείται την ανθρώπινη αντίληψη των χρωμάτων μιας εικόνας και θεωρείται ότι υπερέχει ως προς την ομοιομορφία των χρωμάτων (Lyu, 2021) (Shamoi, 2022).

Οι διάφοροι χρωματικοί χώροι έχουν αναπτυχθεί για να γίνει δυνατή η περιγραφή των χρωμάτων με μαθηματική μορφή, κατάλληλη για την επεξεργασία τους από ψηφιακά μέσα. Έτσι όλα τα εικονοστοιχεία από τα οποία αποτελείται κάθε εικόνα, ακολουθούν ένα χρωματικό μοντέλο κάθε φορά, ώστε το αποτέλεσμα να είναι ομοιογενές. Ανάλογα με τη χρήση κάθε εικόνας υιοθετείται και το ανάλογο χρωματικό μοντέλο. Οι χρωματικοί χώροι μας βοηθούν να κατανοήσουμε τους τύπους χρωμάτων που μπορεί να παράγει μια συσκευή, καθώς σχετίζονται και με το εύρος των αντιληπτών χρωμάτων από την ανθρώπινη όραση ("HunterLab.com" 2023)

3.1. RGB (Red, Green, Blue)

Ο χρωματικός χώρος RGB αποτελεί την πρακτική εφαρμογή των προσθετικών χρωμάτων και αποτελείται από τα τρία βασικά (ή πρωτογενή ή κυρίαρχα) χρώματα: R=κόκκινο, G=πράσινο και B=μπλε, δηλαδή χρώματα που δεν μπορούν να παραχθούν με ανάμιξη δύο άλλων χρωμάτων σε οποιαδήποτε αναλογία. Όλα τα υπόλοιπα χρώματα προκύπτουν από το συνδυασμό αυτών (Ορφανάκος, 2004). Όπως φαίνεται και συνδυαστικά από τις εικόνες του κύβου RGB και του διαγράμματος RGB (Σχήμα 2) όταν το κόκκινο παραδείγματος χάρη συνδυαστεί με το πράσινο δίνει την ενδιάμεση ακμή του κύβου που είναι κίτρινο, αντίστοιχα το κόκκινο με το μπλε δίνει το ματζέντα και το πράσινο με το μπλε το κυανό. Πίσω από κάθε εικονοστοιχείο που βλέπουμε σε μία οθόνη υπάρχουν 3 υπο-εικονοστοιχεία, ένα κόκκινο, ένα πράσινο κι ένα μπλε.



Σχήμα 2: Αναπαράσταση RGB κύβου και πρωταρχικών χρωμάτων (Woolf et al., 2021)

Κάθε κανάλι του συγκεκριμένου χρωματικού χώρου περιγράφει την ένταση φωτεινότητας του δοθέντος χρώματος και παίρνει τιμές από 0 έως 255. Για να αποδοθεί κάθε χρώμα στην οθόνη αντιπροσωπεύεται από τρεις ακέραιους αριθμούς. Κάθε ένας αντιστοιχεί σε ένα από τα τρία βασικά χρώματα. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν 16.777.216 (256*256*256) RGB χρώματα. Το 0 αναφέρεται στην πλήρη απουσία φωτεινότητας του χρώματος, ενώ η τιμή 255 στη μέγιστη φωτεινότητα. Επομένως, καταλήγουμε στα εξής: η τιμή 0^R0^G0^B αναφέρεται στο μαύρο, η τιμή 255^R255^G255^B στο λευκό, ενώ όταν ισχύει R=G=B υπάρχει μια ενδιάμεση χρωματική κατάσταση, μια γκρι ζώνη. Καθένα από τα τρία βασικά χρώματα έχει τη μέγιστη τιμή για το ίδιο το χρώμα, αλλά την ελάχιστη για τα υπόλοιπα δύο (Ibraheem et al., 2012) ("RawPedia.com" 2023).

3.2. HSB (Hue, Saturation, Brightness)

Ο χρωματικός χώρος HSB αποτελείται από τις παραμέτρους Η=χροιά, S=κορεσμός ή χρωματική πυκνότητα και Β=λαμπρότητα (φωτεινότητα). Όσον αφορά τη χροιά ή αλλιώς ένταση της απόχρωσης του ουράνιου τόξου, παίρνει τιμές από 0 έως 360, όσες είναι και οι μοίρες ενός κύκλου, καθώς απεικονίζεται με αυτόν τον τρόπο (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Κύκλος χρωμάτων ή αλλιώς κύκλος αποχρώσεων (Lyu, 2021; Phuangsaijai et al., 2021; Shamoi, 2022)

Στη συγκεκριμένη παράμετρο δεν παίζει κάποιο ρόλο πόσο σκοτεινό ή φωτεινό είναι ένα χρώμα ούτε πόσο έντονο ή αχνό. Ο κορεσμός (S) παίρνει τιμές μεταξύ 0 και 100 και ανεξάρτητα της χροιάς (H), το 100% είναι η πιο έντονη δυνατή μορφή του συγκεκριμένου χρώματος, ενώ 0% η πιο αχνή, άτονη-γκρι μορφή του χρώματος. Η λαμπρότητα (B), η τρίτη χρωματική παράμετρος του συγκεκριμένου χρωματικού χώρου, παίρνει επίσης τιμές από 0 έως 100. Η τιμή 0% λαμπρότητα αναφέρεται στο μαύρο, αλλά η τιμή 100% αναφέρεται στο λευκό μόνο όταν ο κορεσμός είναι 0%, ενώ διαφορετικά αναφέρεται σε ένα πολύ φωτεινό χρώμα ("LearnUiDesignBlog.com" 2023).

Στον χρωματικό χώρο HSB το άσπρο και το μαύρο ορίζονται ως εξής:

- Μαύρο: η λαμπρότητα 0% και η χροιά και ο κορεσμός μπορεί να έχουν οποιαδήποτε τιμή.
- Λευκό: η λαμπρότητα 100% και ο κορεσμός 0%. Η χροιά μπορεί ακόμα να έχει οτιδήποτε.

Αυτό σημαίνει ότι στο σύστημα HSB το μαύρο δεν είναι το αντίθετο του λευκού.

3.3. CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, Key= Black)

Όσον αφορά το χρωματικό χώρο CMYK, αποτελεί την πρακτική εφαρμογή των τριών δευτερευόντων χρωμάτων του θαλασσί (Cyan), του ματζέντα (Magenta), του κίτρινου (Yellow) **(Σχήμα 4)**.



Σχήμα 4: Απεικόνιση του χρωματικού χώρου CMYK, ανάμιξη των βασικών του χρωμάτων και δημιουργία νέων χρωμάτων

Το μαύρο ή το κλειδί (key) περιλαμβάνεται για να βελτιώσει το εύρος πυκνότητας και να τονίσει τη διαθέσιμη χρωματική γκάμα του παραγόμενου χρώματος και προκύπτει από την ανάμειξη των τριών δευτερευόντων χρωμάτων. Είναι ένα μοντέλο αφαιρετικών χρωμάτων, καθώς το τελικό χρώμα προκύπτει όταν από μια λευκή επιφάνεια αφαιρούνται τα πρωτεύοντα χρώματα. Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στην εκτύπωση διάφορων υλικών (Ozturk et al., 2022; Phuangsaijai et al., 2021).

Κατά τη χρήση του χρωματικού μοντέλου CMYK, χρησιμοποιείται ένα λευκό φόντο-βάση κι εκεί προστίθεται το μελάνι εκτύπωσης. Το μελάνι απορροφά και εκπέμπει διαφορετικά μήκη κύματος (επίπεδα φωτός) δίνοντας διαφορετικές αποχρώσεις και τελικά το επιθυμητό χρώμα (Lyu, 2021). Ουσιαστικά, κάθε παράμετρος του συγκεκριμένου μοντέλου δείχνει το ποσοστό του μελανιού που βρίσκεται πάνω στο φόντο-βάση και παίρνει τιμές από 0 έως 100%. Η τιμή 0% αντιστοιχεί στην απουσία μελανιού, ενώ η τιμή 100% στο μέγιστο ποσοστό μελανιού που μπορεί να υπάρχει στο φόντο-βάση. Αντίστοιχα, η τιμή 0^c0^M0^Y0^K αποτελεί το λευκό, ενώ για το μαύρο, τα ποσοστά ποικίλουν ("GraficNotes.com" 2023).

3.4. Lab (Lightness, a*, b*)

Μία από τις επιλογές για τη μέτρηση του χρώματος είναι η χρήση χρωματικού μοντέλου L*a*b*, που καθορίζει το χρώμα ανάλογα με τη θέση του στον τρισδιάστατο χώρο, δηλαδή σε ένα τριαξονικό σύστημα γεωμετρικών συντεταγμένων (Ορφανάκος, 2004). Αυτός ο χώρος χωρίζεται στα εξής στοιχεία: λευκότητααπαλότητα χρώματος (L*), που υποδηλώνει πόσο άσπρο ή πόσο μαύρο είναι ένα χρώμα, και σε δύο χρωματικές παραμέτρους, το a* (chroma*) που υποδηλώνει πόσο κόκκινο ή πράσινο είναι ένα χρώμα και το b*, που υποδηλώνει πόσο μπλε ή κίτρινο είναι ένα χρώμα **(Σχήμα 5)**. Η παράμετρος L* είναι αντίθετη των παραμέτρων C, M, Y, K του αντίστοιχου χρωματικού χώρου (Ibraheem et al., 2012).

Εάν χρησιμοποιείται ο χρωματικός χώρος L*a*b* και γίνεται προσαρμογή της λευκότητας, το αποτέλεσμα θα φαίνεται πιο «οικείο» στο ανθρώπινο μάτι, γι' αυτό και η χρωματική παράμετρος της λευκότητας διατηρείται σε ξεχωριστό άξονα από τις άλλες δύο χρωματικές παραμέτρους. Παρ' όλα αυτά ο χρωματικός χώρος L*a*b*

περιέχει και χρώματα που δε μπορεί να δει το ανθρώπινο μάτι, δηλαδή κάποια πολύ φωτεινά και κάποια πολύ κορεσμένα ("HunterLab.com," 2023).

Η λευκότητα (L*) κυμαίνεται από 0 έως 100 στο σύστημα L*a*b*, με το 0 να αντιστοιχεί στο απόλυτο μαύρο και το 100 στο απόλυτο λευκό. Η παράμετρος a* ποικίλλει από αρνητικές (πράσινες) τιμές έως θετικές (κόκκινες) τιμές, ενώ η παράμετρος b* ποικίλλει από αρνητικές (μπλε) τιμές έως θετικές (κίτρινες) τιμές. Το πράσινο με το κόκκινο και το μπλε με το κίτρινο είναι αντίθετα χρώματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα παρακάτω (Carolina et al., 2022; Shamoi, 2022). Αυτό το χρωματικό διάγραμμα παίρνει τη μορφή κύκλου, στο κέντρο του οποίου οι τιμές μηδενίζονται κι επομένως έχουμε απουσία χρώματος (αχρωματικό σημείο), ενώ στην περιφέρειά του οι αποχρώσεις έχουν τη μέγιστη πυκνότητά τους (Ορφανάκος, 2004). Η χρήση του χρωματικού χώρου L*a*b* ενδείκνυται για μεγάλες χρωματικές αλλαγές καθώς αποτελείται από τεράστια γκάμα αποχρώσεων. Από την άλλη, αυτή η τεράστια γκάμα χρωμάτων, δημιουργεί προβλήματα κατά την εκτύπωση και γενικότερα ως χρωματικός χώρος είναι αρκετά δυσνόητος στην αρχή.



Σχήμα 5: L*a*b* χρωματικό μοντέλο (Phuangsaijai et al., 2021)

4. Επιλογή χρωματικού χώρου

Για την επιλογή των πληροφοριών χρώματος και των χρωματικών χώρων που θα μελετηθούν, χρησιμοποιούνται κυρίως τυχαίες μέθοδοι και μέθοδοι σύγκρισης. Για πειραματικά δεδομένα με σχετικά μεγάλη χρωματική αντίθεση, τα τυχαία επιλεγμένα κανάλια μπορούν να λάβουν ακριβή αποτελέσματα, τα οποία δεν απαιτούν χρόνο και κόστος και είναι πολύ αποτελεσματικά. Για πειράματα με χαμηλή διάκριση χρώματος, είναι σημαντικό να συγκρίνουμε την επίδραση της επιλογής καναλιού στην ευαισθησία, καταλήγοντας στα πιο γραμμικά αποτελέσματα. Εκτός από την επιλογή των τιμών ενός μεμονωμένου καναλιού για τη σύγκρισης της επίδρασης, η αναλογία μεταξύ των καναλιών χρησιμοποιείται επίσης συχνά για τη βαθμονόμηση δεδομένων (Geng et al., 2023).

Επιπλέον, ο μετασχηματισμός ενός χρωματικού χώρου σε άλλον έχει αποδειχθεί ότι είναι μια πολύ αποτελεσματική και απλή μέθοδος ποσοτικής χρωματομετρικής ανάλυσης. Αυτό πραγματοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία με το λογισμικό ImageJ, μετατρέποντας το χρωματικό χώρο RGB σε L*a*b*.

5. Χρήση κινητών τηλεφώνων στην χρωματομετρική ανάλυση

Η ποιότητα της εικόνας σχετίζεται με διάφορους παράγοντες, όπως το μοντέλο του κινητού τηλεφώνου, η απόσταση και η γωνία λήψης, η τοποθεσία, ο φωτισμός, καθώς και από παράγοντες που πολλές φορές διαφέρουν από χρήστη σε χρήστη. Στόχος γενικά αποτελεί η βελτιστοποίηση των πηγών φωτός, των αλγορίθμων ή η χρήση σημάτων φόντου για τη διόρθωση των χρωματικών πληροφοριών που λαμβάνουμε (Geng et al., 2023). Για όλους τους παραπάνω λόγους, σε πολλές εργασίες, η λήψη των φωτογραφιών γίνεται με σαρωτές (scanners), καθώς με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζονται οι ομοιόμορφες συνθήκες που απαιτούνται για επαναλήψιμα αποτελέσματα, κάτι που χωρίς ειδικό κώδικα δεν είναι εφικτό όταν η λήψη των φωτογραφιών γίνεται με κινητά τηλέφωνα (Phuangsaijai et al., 2021; Woolf et al., 2021).

Στη βιβλιογραφία πολλές ερευνητικές ομάδες, για να αποφύγουν τη χρήση σαρωτή και να αυξήσουν έτσι τη «φορητότητα» της μεθόδου, έχουν αναπτύξει ειδικούς κώδικες σε διάφορες γλώσσες προγραμματισμού, ώστε να πραγματοποιείται αυτόματη κανονικοποίηση (διόρθωση) των αποτελεσμάτων ανάλογα με το φυσικό φωτισμό και τις συνθήκες (απόσταση, γωνία) λήψης της φωτογραφίας. Έτσι, η βαθμονόμηση των χρωμάτων γίνεται ως προς ιδανικά λευκές ή μαύρες επιφάνειες αναφοράς, ενώ σταθερά σημάδια πάνω στο αισθητήρα

βοηθούν στη λήψη φωτογραφιών με τον ίδιο τρόπο κάθε φορά. Με αυτόν τον τρόπο, η μετατροπή της χρωματικής πληροφορίας σε αναλυτικό σήμα είναι πιο αξιόπιστη (Koh et al., 2016; Lopez-Ruiz et al., 2014; Park et al., 2022).



Σχήμα 6: Εικόνες του επιδερμικού μικρορευστονικού αισθητήρα (αριστερά) πριν και (δεξιά) μετά την έγχυση τεχνητού ιδρώτα και απεικόνιση των σημαδιών αναφοράς για τη χρωματική βαθμονόμηση (Koh et al., 2016).



Σχήμα 7: Επεξεργασία εικόνας για βαθμονόμηση θέσης. (Α) Αρχική εικόνα και μεγεθυμένες εικόνες (Β) πριν και (C) μετά τη βαθμονόμηση θέσης με τη βοήθεια των τεσσάρων μαύρων σταυρών (Koh et al., 2016)

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στον επιδερμικό αισθητήρα που απεικονίζεται στο (Σχήμα 6), ως σημεία αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις μαύροι σταυροί και μία

λευκή κουκκίδα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του χρώματος και κατ' επέκταση τη σωστή επεξεργασία των εικόνων (Koh et al.). Αυτά τα σημάδια αναφοράς [πραγματικά λευκό (κουκκίδα) και πραγματικά μαύρο (σταυροί)], χρησιμοποιούνται για την εξισορρόπηση του λευκού ανεξάρτητα από τις συνθήκες φωτισμού (φως ημέρας, σκιά και διάφορες πηγές φωτός) κατά τη λήψη της φωτογραφίας. Οι σταυροί έχουν διττό ρόλο, αφού χρησιμοποιούνται και για την ευθυγράμμιση του κινητού τηλεφώνου με την επιφάνεια του επιδερμικού αισθητήρα και ως ιδανικά μαύρες επιφάνειες αναφοράς για τον καθορισμό των χρωματικών παραμέτρων %RGB (Σχήμα 7).

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που σχετίζονται με τη χρήση κινητού τηλεφώνου στη λήψη φωτογραφιών, μια ερευνητική ομάδα (Park et al., 2022) ανέπτυξε μια εφαρμογή με ειδικό κώδικα, σε γλώσσα προγραμματισμού Kotlin, σε συνδυασμό με μία κάρτα αναφοράς, πάνω στη συσκευή **(Σχήμα 8)**. Αυτή αποτελείται από ένα κωδικό QR και τρία πλαίσια τοποθετημένα στις τρεις από τις τέσσερις γωνίες του κωδικού QR, με την οποία επιτυγχάνονταν βαθμονόμηση σε πραγματικό χρόνο. Μετά τη λήψη φωτογραφίας της κάρτας αναφοράς, η εφαρμογή με τη βοήθεια του QR κωδικού ορίζει τις συντεταγμένες της ζώνης ανίχνευσης της εικόνας. Τα τρία πλαίσια αναγνωρίζονται από το κινητό και οι θέσεις τους χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της γωνίας φωτογράφησης και τη διόρθωση της λοξότητας της εικόνας (Park et al., 2022).



Σχήμα 8: Απεικόνιση της κάρτας αναφοράς για τη προσαρμογή των χρωματικών παραμέτρων ανάλογα με τις συνθήκες κατά τη λήψη της φωτογραφίας. (i) QR code και τρία γωνιακά πλαίσια για διόρθωση των τιμών σε σχέση με την απόσταση και τη γωνία λήψης, (ii) λευκό και μαύρο πλαίσιο για διόρθωση των τιμών σε σχέση με το φωτισμό, (iii) κόκκινο, πράσινο, μπλε πλαίσιο (προσαρμογή χρωμάτων), (iv) δοκιμαστική ταινία, η οποία σαρώνεται κατά μήκος της για το τελικό σήμα (Park et al., 2022)

Η επίδραση του φωτισμού στην ανάλυση των χρωμάτων διορθώνεται σε σχέση με το λευκό και μαύρο χρώμα που υπάρχει στα δύο αντίστοιχα πλαίσια. Η διαφορά χρώματος προσαρμόστηκε βαθμονομώντας τις τιμές του κόκκινου, του πράσινου και του μπλε, καθεμία από ένα από τα τρία επιθέματα αναφοράς, όπως φαίνεται και παρακάτω. Τέλος, η εφαρμογή σάρωσε κατά μήκος της δοκιμαστικής ταινίας LFA, το πρωτογενές οπτικό σήμα στα κόκκινα, πράσινα και μπλε κανάλια και αφού έγινε η κανονικοποίηση τους το μετέτρεψε σε αναλυτικό σήμα (Park et al., 2022).

Η λειτουργικότητα της συγκεκριμένης εφαρμογής φαίνεται στο **(Σχήμα 9)** στην ανάλυση των χρωματικών παραμέτρων της δοκιμαστικής ταινίας κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτισμού (φυσικό ηλιακό φως, χωρίς φως, φως φθορισμού και συνθήκες κίτρινου φωτός). Παρόλες τις διαφορετικές συνθήκες φωτισμού, οι τιμές έντασης που υπολογίστηκαν με τον προτεινόμενο αλγόριθμο σε κάθε περίπτωση ήταν παρόμοιες **(Σχήμα 9)** (Park et al., 2022).



Σχήμα 9: Φωτογραφίες των δοκιμαστικών ταινιών κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτισμού (φυσικό φως, χωρίς φως, φως φθορισμού και κίτρινο φως) σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναλύτη και σύγκριση των υπολογιζόμενων τιμών έντασης μετά τη διόρθωσή τους με τον αλγόριθμο της εφαρμογής qLINE (Park et al., 2022).

Τέλος, η αποτελεσματικότητα του αλγόριθμου στην ευθυγράμμιση της κάμερας (γωνία και απόσταση λήψης της φωτογραφίας) φαίνεται στο **(Σχήμα 10).** Οι δοκιμαστικές ταινίες τοποθετήθηκαν στην κάρτα αναφοράς και έγινε λήψη φωτογραφιών σε διαφορετικές γωνίες της κάμερας καθώς και σε διάφορες αποστάσεις. Για μια δεδομένη συγκέντρωση αναλύτη ο αλγόριθμος παρήγαγε τιμές έντασης που ήταν στατιστικά ίδιες ανεξάρτητα από τη θέση της κάμερας (Park et al., 2022).



Σχήμα 10: Διόρθωση των τιμών έντασης από φωτογραφίες των δοκιμαστικών ταινιών σε διαφορετικές γωνίες και αποστάσεις. Για μια δεδομένη συγκέντρωση αναλύτη, η διορθωμένη ένταση ήταν στατιστικά ίδια, ανεξάρτητα από τη θέση της κάμερας (Park et al., 2022).

Μία άλλη ερευνητική ομάδα (Lopez-Ruiz et al., 2014) ανέπτυξε μια διαφορετική εφαρμογή για τη λήψη φωτογραφιών με κινητό τηλέφωνο. Συγκεκριμένα, η θέση της κάμερας ελέγχεται με τη βοήθεια ενός τριγώνου κι ενός τετραγώνου τα οποία έχουν εκτυπωθεί στις δύο άκρες της περιοχής ανίχνευσης του αισθητήρα χάρτου (Whatman chromatographic paper) με ανεξίτηλο μελάνι.

Κατά τη λήψη μιας νέας φωτογραφίας, η εφαρμογή διατηρεί σταθερές τις παραμέτρους της κάμερας. Στη συνέχεια, εμφανίζονται δύο κόκκινα σημάδια πάνω από την προβολή της κάμερας προκειμένου να ευθυγραμμιστούν τα δύο αντίστοιχα σημάδια (τρίγωνο και τετράγωνο) της μικρορευστονικής συσκευής με αυτά **(Σχήμα 11)**. Αυτό το βήμα επιτρέπει τη λήψη φωτογραφιών πάντα με τον ίδιο προσανατολισμό και την ίδια απόσταση μεταξύ της κάμερας και του αισθητήρα (Lopez-Ruiz et al., 2014).



Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας της εφαρμογής και των εντοπισμό των (κόκκινων) σημαδιών για τον έλεγχο της θέσης της κάμερας και των περιοχών ανίχνευσης (Lopez-Ruiz et al., 2014)

Στην παρούσα εργασία, η ανάλυση των χρωματικών παραμέτρων έγινε, αρχικά, με επιτραπέζιο σαρωτή όπου επιτυγχάνονται απόλυτα επαναλήψιμες συνθήκες φωτισμού, απόστασης, γωνίας και ανάλυσης, κάτι που όπως αναφέρεται παραπάνω, χωρίς την ύπαρξη κάποιου ειδικού λογισμικού, δεν είναι εφικτό με το κινητό τηλέφωνο. Στην συνέχεια, προκειμένου να αυξήσουμε τη «φορητότητα» της μεθόδου, η λήψη των φωτογραφιών έγινε με κινητό τηλέφωνο σε ειδικό φωτιζόμενο κλειστό θάλαμο, που προσαρμόζεται το (συγκεκριμένο) κινητό τηλέφωνο, εξασφαλίζοντας έτσι σταθερές συνθήκες λήψης όσον αφορά το φωτισμό, την απόσταση και τη γωνία λήψης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν:

- Η κατασκευή ενός χαμηλού κόστους φορετού, μικρορευστονικού αισθητήρα σε ύφασμα, απλής λειτουργίας και χρήσης για τον προσδιορισμό χλωριούχων στον ιδρώτα, η λειτουργία του οποίου θα στηρίζεται στη χρωματική ανάλυση της περιοχής ανίχνευσης λόγω της αντίδρασης των χλωριούχων με τη στιβάδα χρωμικού αργύρου (αντίδραση Mohr), η οποία παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.
- Η αντικατάσταση του τοξικού υδραργύρου που χρησιμοποιείται ευρύτατα σε παρόμοιες εφαρμογές [Hg(TPTZ)+Fe(II)]με τον βιοσυμβατό άργυρο.
- Η άμεση εφαρμογή του αισθητήρα σε πραγματικά δείγματα ιδρώτα, που λαμβάνονται μετά από φυσική άσκηση ή από ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης για τον προσδιορισμό των ιόντων χλωρίου που αποτελούν βιοδείκτη της κυστικής ίνωσης.

2. Περίληψη

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η ανάπτυξη ενός φορετού αισθητήρα για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα, τα οποία αποτελούν βιοδείκτη για την κυστική ίνωση. Ο αισθητήρας περιλαμβάνει ένα μικρορευστονικό κανάλι εκτυπωμένο σε ύφασμα χρησιμοποιώντας ένα καινοτόμο μελάνι κεριού συμβατό με την τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος και την ζώνη ανίχνευσης η οποία έχει τροποποιηθεί με χρωμικό άργυρο. Η αρχή λειτουργίας του αισθητήρα βασίζεται στη χρωματική αλλαγή της ζώνης ανίχνευσης από καστανέρυθρη σε κίτρινη λόγω της αντίδρασης των ιόντων χλωρίου με το χρωμικό άργυρο προς σχηματισμό λευκού χλωριούχου αργύρου και ελεύθερων χρωμικών ιόντων (κίτρινο χρώμα). Η βαθμονόμηση του αισθητήρα έγινε με τη λήψη φωτογραφιών με κινητό τηλέφωνο ή τη σάρωση της ζώνης ανίχνευσης και την ψηφιακή ανάλυση του χρώματος με κατάλληλο λογισμικό στους χρωματικούς χώρους RGB και L*a*b*. Οι πειραματικές μεταβλητές επιλέχθηκαν ώστε ο αισθητήρας να αποκρίνεται γραμμικά στην περιοχή συγκεντρώσεων 0-100 mM χλωριούχων ώστε να καλύπτει το διαγνωστικά χρήσιμο εύρος συγκεντρώσεων χλωριούχων χωρίς να απαιτείται αραίωση ή κάποια άλλη επεξεργασία του ιδρώτα. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε πραγματικά δείγματα ιδρώτα τα οποία συλλέχθηκαν από υγιείς εθελοντές είτε με ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης είτε με φυσική άσκηση. Τα αποτελέσματα ήταν σε εξαιρετική συμφωνία με αυτά φασματοφωτομετρικής μεθόδου αναφοράς.

3. Εισαγωγή

Το χλώριο είναι ένας σημαντικός ηλεκτρολύτης, η συγκέντρωση του οποίου σε διάφορα βιολογικά υγρά μπορεί να αποτελέσει ένδειξη διαφόρων ασθενειών και δυσλειτουργιών (Zhang et al., 2017). Η κυστική ίνωση (Cystic Fibrosis, CF) αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα και είναι η πιο συχνή κληρονομική ασθένεια μεταξύ των Καυκάσιων λαών, δηλαδή της Ευρώπης, της Νότιας Αμερικής και της Αυστραλίας και περιορίζει δραστικά το προσδόκιμο ζωής των ασθενών (Bugli et al., 2022; Ecftn and Ecfs, 2004). Υπολογίζεται ότι 1 στα 2.500 νεογνά γεννιούνται με τη νόσο αυτή (Calvopina et al., 2022; Raina et al., 2016). Μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και προκύπτει από μεταλλάξεις στο γονίδιο του ρυθμιστή αγωγιμότητας που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 (Blanchard and Waters, 2019; Harvey et al., 2022). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη ρυθμιστή αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (CFTR), που ελέγχει την έκκριση ιόντων χλωρίου (Cl⁻) και όξινων ανθρακικών (HCO₃⁻) ιόντων κατά μήκος των επιθηλιακών φραγμών, ρυθμίζοντας έτσι τη σύνθεση του βλεννογόνου υγρού (Harvey et al., 2022).

Δεδομένου ότι στους ασθενείς με κυστική ίνωση η περιεκτικότητά ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα είναι υψηλή, η συγκέντρωση αυτών στον ιδρώτα χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης της λειτουργίας CFTR *in vivo* και της διάγνωσης της νόσου της κυστικής ίνωσης (Collie et al., 2014). Υψηλότερα επίπεδα CI⁻ από 60 mmol/L στον ιδρώτα είναι ενδεικτικά της ασθένειας, ενώ συγκεντρώσεις μικρότερες από 30 mmol/L θεωρούνται φυσιολογικές (Collie et al., 2014). Συγκεντρώσεις μεταξύ 30 και 59 mmol/L χαρακτηρίζονται ως ενδιάμεσες (οριακές) και συνιστούν επαναλαμβανόμενα test ιδρώτα ή πρόσθετες διαγνωστικές εξετάσεις (Collie et al., 2014). Μετά από ένα θετικό αποτέλεσμα στο test ιδρώτα διεξάγεται γενετικός έλεγχος (test DNA) για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση της κυστικής ίνωσης (Gokdemir and Karadag, 2021).
Σε πολλές χώρες, η διάγνωση της κυστικής ίνωσης πραγματοποιείται στην αρχή της ζωής με τον καθολικό προσυμπτωματικό έλεγχο νεογνών (Newborn screening, NBS). Τα πρώτα προγράμματα NBS για την κυστική ίνωση διερευνήθηκαν σχεδόν πριν από 50 χρόνια. Έκτοτε, ο προσυμπτωματικός έλεγχος για την κυστική ίνωση εφαρμόστηκε σταδιακά σε όλη τη Βόρεια Αμερική, την Ωκεανία και το μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης (Castellani and Massie, 2010). Το 2010, πάνω από τα μισά (58%) των ατόμων με κυστική ίνωση στις Η.Π.Α διαγνώστηκαν με τον προσυμπτωματικό έλεγχο νεογνών σε σύγκριση με μόνο το 8% αυτών που διαγνώστηκαν το 2000 (Ratjen et al., 2020). Αν και δεν υπάρχει ένα καθολικό πρωτόκολλο προσυμπτωματικού ελέγχου νεογνών με κυστική ίνωση που να ταιριάζει στις ετερογενείς ανάγκες διαφορετικών περιοχών, υπάρχουν πλέον πολλές επιλογές για την προσαρμογή των αλγορίθμων στις τοπικές συνθήκες (Castellani and Massie, 2010; Wagener et al., 2012). Οι ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες (Castellani et al., 2009, 2008) επισημαίνουν ότι ο προληπτικός έλεγχος θα πρέπει να καλύπτει το 75%-85% των μεταλλάξεων του πληθυσμού (Smyth et al., 2014).

Τα πιο συχνά εμφανιζόμενα συμπτώματα είναι τα αναπνευστικά και οι λοιμώξεις, που αυξάνονται με την ηλικία, γι' αυτό οι δύο ειδικότητες ιατρών που ασχολούνται με την κυστική ίνωση είναι οι παιδίατροι και οι πνευμονολόγοι.

Η πρότυπη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη διέγερση έκκρισης και τη συλλογή ιδρώτα από το 1959 είναι η μέθοδος ιοντοφόρησης πιλοκαρπίνης των Gibson και Cooke (Gibson and Cooke, 1959). Αν και χρησιμοποιείται ευρέως, όχι μόνο για τον έλεγχο της κυστικής ίνωσης αλλά για οποιαδήποτε εξέταση στον ιδρώτα, η μέθοδος παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, καθώς είναι χρονοβόρος και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει έντονο ερεθισμό (Collie et al., 2014; Gokdemir and Karadag, 2021; Gonzalo-Ruiz et al., 2009; Raina et al., 2016).

Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός χλωριούχων στο ιδρώτα πραγματοποιείται είτε εργαστηριακά με τιτλοδότηση με νιτρικό υδράργυρο Hg(NO₃)₂ (Keith and Turcios, 1994; Schales and Schales, 1941), είτε με εμπορικά διαθέσιμους αναλυτές, από τους οποίους οι πιο διαδεδομένοι είναι αυτοί της εταιρείας Macroduct[®] (ELITechGroup Ink. USA) ("ELITechGroup.com," 2023), οι οποίοι φαίνονται στο **Σχήμα 12**. Το μοντέλο Sweat-Chek[™] Analyzer χρησιμοποιείται για την ανάλυση του ιδρώτα με αγωγιμομετρίας και απαιτεί ελάχιστο όγκο δείγματος 6-10 μL. Το μοντέλο Nanoduct[®]

Neonatal Sweat Analysis, ενδείκνυται για τον προσδιορισμό χλωριούχων στον ιδρώτα κυρίως νεογνών και απαιτεί τουλάχιστον 3 μL ιδρώτα ενώ το μοντέλο ChloroChek[®] Chloridometer[®], χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χλωριούχων στον ιδρώτα με κουλομετρική τιτλοδότηση και απαιτεί ελάχιστο όγκο δείγματος 10 μL (Rueegg et al., 2019).



Σχήμα 12: A: Macroduct Advanced[®] Sweat Collection System (ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης), Β: Συλλογή του ιδρώτα στο σπειροειδές τριχοειδές, C: Sweat-Chek[™] Analyzer (μεταφορά του δείγματος από το τριχοειδές στην συσκευή), D: Chlorochek[®], E: Nanoduct[®] Neonatal Sweat Analysis System. ("ELITech Group.com," 2023)

Η κουλομετρία είναι από τις πιο βασικές τεχνικές που αναφέρονται στο *Clinical* and Laboratory Standards Institute (CLSI, USA) (Collie et al., 2014; Rock et al., 2014) για τον προσδιορισμό των ελεύθερων ιόντων χλωρίου. Οι κουλομετρικές μέθοδοι [κουλομετρική ογκομέτρηση σταθερού ρεύματος (i)] βασίζονται σε μια άνοδο αργύρου και την ποσοτική αντίδραση των ηλεκτροχημικά παραγόμενων ιόντων αργύρου με τα χλωριούχα στο δείγμα. Το τελικό σημείο αυτής της τιτλοδότησης

καθίζησης [χρόνος (t) που διαβιβάζεται το ρεύμα έντασης (i)] προσδιορίζεται ηλεκτροχημικά (γαλβανοστατικά) με ένα δίδυμο ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου από την απότομη πτώση της τάσης μεταξύ των δίδυμων ηλεκτροδίων λόγω της πτώσης της ηλεκτρικής αντίστασης που παρατηρείται μεταξύ των δίδυμων ηλεκτροδίων με την εμφάνιση ελεύθερων ιόντων αργύρου στο διάλυμα μέτρησης. Η συγκέντρωση των χλωριούχων υπολογίζεται από την εξίσωση των ηλεκτροχημικών ισοδυνάμων (Q/F=it/F, όπου F η σταθερά Faraday) με τα χημικά ισοδύναμα του αναλύτη (moL χλωριούχων) (Collie et al., 2014; Dubot et al., 2019; Gokdemir and Karadag, 2021; Rueegg et al., 2019) χωρίς να απαιτείται καμπύλη αναφοράς. Η λειτουργία άλλων αναλυτών βασίζεται σε μετρήσεις αγωγιμότητας καθώς η αναλογία Cl⁻/Na⁺ είναι αυξημένη σε ασθενείς με κυστική ίνωση σε σύγκριση με υγιείς ανθρώπους. Αν και οι μετρήσεις αγωγιμότητας δεν είναι εκλεκτικές ως προς τη συγκέντρωση των χλωριούχων, η μέτρηση της αγωγιμότητας του ιδρώτα μπορεί να διακρίνει μεταξύ ατόμων με κυστική ίνωση και μη ασθενών (διαγνωστική ακρίβεια) ενώ τα αποτελέσματα συσχετίζονται πολύ καλά με αυτά της κουλομετρικής μεθόδου (Barben, 2005; Gregu^{*} et al., 2014; Keith and Turcios, 1994; Mal et al., 2021; Mastella et al., 2000; Mattar et al., 2014; Rueegg et al., 2019; Webster and Quirante, 2000).

Μια έρευνα που υλοποιήθηκε σε περίπου 400 κλινικά εργαστήρια έδειξε πως ο προσδιορισμός των ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης πραγματοποιείται, σε ποσοστό 70%, ογκομετρικά (κλασική τιτλοδότηση με προχοϊδα, χειροκίνητα), ενώ οι αυτόματοι αναλυτές χρησιμοποιούνται σε ποσοστό <7% (Zhang et al., 2017).

Η δειγματοληψία ιδρώτα με τη συσκευή Macroduct (ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης) είναι σχετικά χρονοβόρος (ανάλογα με την ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα ιδρώτα διαρκεί περίπου 15-30 λεπτά), εν μέρει επεμβατική και σχετικά δαπανηρή (τα αναλώσιμα περίπου ανά δειγματοληψία κοστίζουν περίπου 50-60 ευρώ). Επιπλέον, η μέθοδος δειγματοληψίας μερικές φορές δεν παράγει την επαρκή ποσότητα ιδρώτα που απαιτείται για περαιτέρω ανάλυση, ειδικά στα βρέφη, καθώς τα ποσοστά ιδρώτα τους είναι χαμηλά (Mal et al., 2021).

Λόγω της υψηλής διαγνωστικής σημασίας του προσδιορισμού των χλωριούχων στον ιδρώτα, στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολλές μέθοδοι οι οποίες στηρίζονται κυρίως σε ηλεκτροχημικές (Choi et al., 2018; Emaminejad et al., 2017;

Gonzalo-Ruiz et al., 2009; Li et al., 2017), φασματοσκοπικές (Hernando et al., 2018; Matteis et al., 2016; Sekine et al., 2018; Zhang et al., 2017) και χρωματομετρικές (Bandodkar et al., 2019; Choi et al., 2021; He et al., 2019; Kim et al., 2019; Koh et al., 2016; Kwon et al., 2021; Loken and Lamb, 2014; Matteis et al., 2016; Sekine et al., 2018; Soft et al., 2018; Taghizadeh-Behbahani et al., 2019; Zhao et al., 2021) μετρήσεις.

Η συνεχής προσπάθεια για μείωση του κόστους της οργανολογίας που χρησιμοποιείται σε ιατροδιαγνωστικές συσκευές, η ευρεία χρήση των κινητών τηλεφώνων και η εξοικείωση των ανθρώπων με την τεχνολογία αυτή έχουν δώσει στις οπτικές μεθόδους ένα σημαντικό προβάδισμα σε σχέση με τις ηλεκτροχημικές (Zhang et al., 2017).

Για το χρωματομετρικό προσδιορισμό των ιόντων χλωρίου έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες αντιδράσεις, οι οποίες βασίζονται σε τοξικά ιόντα υδραργύρου. Παρόλο την υψηλή τοξικότητα του υδραργύρου και την απαγόρευση του σε πολλές χώρες (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2020), οι μέθοδοι αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί και για την ανάπτυξη φορετών αναλυτικών συσκευών που έρχονται σε επαφή με το δέρμα, που θα αναφερθούν παρακάτω.

Η αντίδραση των Hg(SCN)₂ με τα ιόντα Cl⁻, παρουσία ιόντων τρισθενούς σιδήρου, και το σχηματισμό αιματέρυθρου χρώματος, σύμφωνα με τις παρακάτω χημικές εξισώσεις (Hamilton, 1965; Iwasaki Iwaji, 1952; Sanik, 1957; Zall et al., 1956)

 $Hg(SCN)_2 + 2CI^- \rightarrow HgCI_2 + 2SCN^-$

SCN⁻ + Fe³⁺ → Fe(SCN)²⁺ (αιματέρυθρο)

χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη φορετών αναλυτικών συσκευών για τον προσδιορισμό των χλωριούχων στον ιδρώτα (He et al., 2019; Merchant, 2009).

Μία άλλη αντίδραση που συνοδεύεται από χρωματική αλλαγή και έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό χλωριούχων σε σύγχρονες μελέτες ανάπτυξης φορετών αναλυτικών συσκευών αφορά την αντίδραση τους με χλωρανιλικό άργυρο (AgC₆Cl₂O₄), καθώς προκύπτει κοκκινωπό μωβ χρώμα από το ανιόν του χλωρανιλικού οξέος που απελευθερώνεται σύμφωνα με την παρακάτω χημική εξίσωση (Bandodkar et al., 2019; Choi et al., 2021; Kim et al., 2019; Kwon et al., 2021).

AgC₆Cl₂O₄ + Cl⁻ + H⁺ \rightarrow AgCl + HC₆Cl₂O₄⁻ (κοκκινωπό μωβ χρώμα)

Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες (Bandodkar et al., 2019; Choi et al., 2021; Kim et al., 2019; Kwon et al., 2021) ο σχηματισμός λευκού, κολλοειδούς AgCl παρεμποδίζει τον χρωματομετρικό προσδιορισμό των χλωριούχων και ως τούτου η ζώνη ανίχνευσης τροποποιείται επιπλέον με το πολυμερές πολυ-υδροξυαιθυλομεθακρυλικό (pHEMA) για την προσρόφηση του AgCl.

Η παραπάνω αντίδραση αφορά προσαρμογή της μεθόδου που αρχικά είχε αναπτυχθεί για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό χλωριούχων σύμφωνα με την χημική εξίσωση (Bertolacini, 1958; J. E Barney and Bertolacini, 1957):

 $HgC_6Cl_2O_4 + 2Cl^- + H^+ \rightarrow HgCl_2 + HC_6Cl_2O_4^-$

όπου αντί αργύρου χρησιμοποιούνταν υδράργυρος προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία λευκού κολλοειδούς παραπροϊόντος AgCl που παρεμπόδιζε τις μετρήσεις απορρόφησης.

Επίσης έχει μελετηθεί η αντίδραση ιόντων χλωρίου με το σύμπλοκο υδραργύρου 2,4,6-(2-πυριδυλ)-1,3,5-τριαζίνη (TPTZ) παρουσία ιόντων δισθενούς σιδήρου (E.P. Diamadis, C.E. Eftsathiou, 1982.; Feldkamp et al., 1974; Holder, 1982; Stephens, 1983). Σύμφωνα με την παρακάτω χημική εξίσωση

Hg[TPTZ]₂ + Fe²⁺ +2 Cl⁻ → HgCl₂ + Fe[TPTZ]₂ (μπλε χρώμα) παρουσία ιόντων χλωρίου σχηματίζεται δυσδιάλυτος χλωριούχος υδράργυρος (HgCl₂) και το TPTZ που απελευθερώνεται συνδυάζεται με το δισθενή σίδηρο προς σχηματισμό μπλε συμπλόκου Fe[TPTZ]₂ (Koh et al., 2016; Loken and Lamb, 2014; Soft et al., 2018; Zhao et al., 2021).

Άλλη μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό χλωριούχων ιόντων στον ιδρώτα στηρίζεται στην αντίδραση μεταξύ του χρωμικού υδραργύρου των χλωριούχων ιόντων και του διφαινυλοκαρβαζιδίου σε όξινο περιβάλλον σύμφωνα με τις παρακάτω χημικές εξισώσεις ("Mechanism of the Reaction between Dichromate and Diphenylcarbazide," 1952; Op et al., 1957; Pflaum et al., 1954)

 $Hg_2CrO_4 + 2Cl^- \rightarrow Hg_2Cl_2 + CrO_4^{2-}$

 $2 CrO_4^{2^-} + 2 H^+ \rightarrow Cr_2O_7^{2^-} + H_2O$ $Cr_2O_7^{2^-} + s-\delta\iota\phi \alpha\iotaνυλοκαρβαζίδιο$ ^{Οξινες συνθήκες} κοκκινο-μωβ χρώμα

Σε αυτή την αντίδραση στηρίχτηκε μια ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου του Ιράν (Taghizadeh-Behbahani et al., 2019), αλλά αντικατέστησε τον υδράργυρο με άργυρο χρησιμοποιώντας όμως μια πολύπλοκη και χρονοβόρο διαδικασία

τροποποίησης του υποστρώματος χάρτου που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εφαρμογή.

Παρ' όλο που οι παραπάνω μέθοδοι αποτελούν τη βάση για την ανάπτυξη χρωματικών αισθητήρων για τον προσδιορισμό χλωριούχων στο ιδρώτα, παρουσιάζουν κάποια σημαντικά μειονεκτήματα. Σε περισσότερες μεθόδους χρησιμοποιείται τοξικός υδράργυρος, η χρήση του οποίου σε φορετό βιοαισθητήρα είναι επικίνδυνη, ερεθιστική και κατ' επέκταση απαγορευτική. Όσον αφορά τον χλωρανιλικό άργυρο δεν είναι εμπορικά διαθέσιμος ενώ στις εργασίες που αναφέρεται συστήνεται και η χρήση του σχετικά ακριβού πολυμερούς pHEMA (για την προσρόφηση του κολλοειδούς AgCl) (Bandodkar et al., 2019; Choi et al., 2021; Kim et al., 2019; Kwon et al., 2021). Τέλος, σε μια εργασία που προτείνεται η αντικατάσταση του τοξικού Hg₂CrO₄ με Ag₂CrO₄, η τροποποίηση των υποστρωμάτων χάρτου είναι πολύπλοκη και χρονοβόρος αφού περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια αντιδράσεων, εκπλύσεων και θέρμανσης (Taghizadeh-Behbahani et al., 2019).

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η ανάπτυξη ενός χαμηλού κόστους, εύκολου στη χρήση αυτοκόλλητου φορετού χρωματομετρικού αισθητήρα, απουσία τοξικού υδραργύρου, για την ανίχνευση των ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα για την έγκαιρη διάγνωση της κυστικής ίνωσης. Η προτεινόμενη μέθοδος χρησιμοποιεί άλατα αργύρου, αντί τοξικών αλάτων υδραργύρου, και στηρίζεται στην αντίδραση χλωριούχων ιόντων με στερεό (καστανέρυθρο) χρωμικό άργυρο και στην απελευθέρωση κίτρινων χρωμικών ιόντων σύμφωνα με την παρακάτω χημική εξίσωση (μέθοδος Mohr):

Ag₂CrO₄(s) (καστανέρυθρο) + 2 Cl⁻ \rightarrow 2 AgCl + CrO₄²⁻(κίτρινο)

Επιπλέον, χρησιμοποιείται ένα βιοσυμβατό, χαμηλού κόστους, υδατοδιαλυτό μέσο διασποράς, το Tween-80, το οποίο μπορεί να έρθει άφοβα σε επαφή με το δέρμα και αποτελεί εξαιρετικό μέσο διασποράς του Ag₂CrO₄. Η τροποποίηση των υφασμάτων είναι μια εύκολη διαδικασία, ενός σταδίου, και η μεταβολή του χρώματος είναι ορατή, καθώς δεν παρατηρήθηκε κάποια παρεμπόδιση από τον λευκό κολλοειδή AgCl που σχηματίζεται ως παραπροϊόν της αντίδρασης, κάτι που αποτέλεσε μεγάλο πρόβλημα σε άλλες μεθόδους και συσκευές, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Η κατασκευή του μικρορευστονικού καναλιού του αισθητήρα έγινε με εκτύπωση μέσω πλέγματος χρησιμοποιώντας ένα καινοτόμο μελάνι κεριού που αναπτύχθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο μας και επιτρέπει την εκτύπωση μεγάλου αριθμού αισθητήρων σε μικρό χρόνο και με σχεδόν μηδενικό κόστος (Eleni Tzianni, 2023). Η βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών έγινε με πρότυπα διαλύματα χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα, η λήψη των εικόνων με σάρωση των αισθητήρων με επιτραπέζιο σαρωτή και η ψηφιακή ανάλυση των φωτογραφιών με το λογισμικό ImageJ. Η αναλυτική χρησιμότητα του μικρορευστονικού καναλιού για τον προσδιορισμό των χλωριούχων στον ιδρώτα εξετάστηκε σε 14 υγιείς εθελοντές, οι οποίοι ενημερώθηκαν και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους. Τα αποτελέσματα του αισθητήρα συγκρίθηκαν με αυτά πρότυπης φασματοφωτομετρικής μεθόδου. Όπως πιστοποιείται από τα διαγράμματα διασποράς και Bland&Altman, η συμφωνία των δύο μεθόδων ήταν εξαιρετική.

Στη συνέχεια, ολοκληρώθηκε η κατασκευή του αυτοκόλλητου φορετού αισθητήρα ο οποίος τοποθετήθηκε στον πήχη κάθε εθελοντή μετά από φυσική άσκηση ή ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης και την εφίδρωσή τους. Μετά την πλήρωση της ζώνης ανίχνευσης με ιδρώτα, ο αισθητήρας αποκολλήθηκε και μετά από 5 λεπτά έγινε λήψη φωτογραφίας με κινητό τηλέφωνο σε φορητό σκοτεινό θάλαμο. Η επεξεργασία της ψηφιακής εικόνας έγινε με το λογισμικό ImageJ.

4. Πειραματική πορεία

4.1. Υλικά και αντιδραστήρια

Για την παρασκευή του μελανιού εκτύπωσης χρησιμοποιήθηκαν 100% καθαρό κερί μέλισσας, μαύρο χρώμα κεριού (Bekro No. 01-232 και Bekro No. 01-508) από την εταιρεία Wax Hellas S.A. (Αθήνα, Ελλάδα), 2-οξεικός βουτοξυαιθυλεστέρας (BEA), αιθυλική κυτταρίνη (EC), τερπινεόλη (μίγμα ισομερών, άνυδρη), τεξανόλη (μονοϊσοβουτυρική 2,2,4-τριμεθυλ-1,3-πεντανοδιόλη, μείγμα ισομερών, 99%) που ήταν προϊόντα της Merck. Για την παρασκευή του εναιωρήματος Ag₂CrO₄ σε Tween-80 χρησιμοποιήθηκαν χρωμικός άργυρος (Ag₂CrO₄) και Sorbital T80 PH (Tween-80) της εταιρείας Merck. Για την παρασκευή τεχνητού ιδρώτα και του πρότυπου

διαλύματος 2 M NaCl χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια νιτρικό νάτριο (NaNO₃), νιτρικό κάλιο (KNO₃), θειϊκό αμμώνιο ((NH₄)₂SO₄), επταένυδρο θειικό μαγνήσιο MgSO₄·7H₂O, όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃), διένυδρο διβασικό φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄·2H₂O), χλωριούχο νάτριο (NaCl) της εταιρείας Merck. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ύφασμα 95/5 βαμβάκι/ελαστάνη (253±13 μm πάχος) το οποίο προμηθευτήκαμε από τοπικό κατάστημα υφασμάτων. Για την κατασκευή του αυτοκόλλητου αισθητήρα χρησιμοποιήθηκαν αθλητική επιδεσμική ταινία και διαφανής κολλητική ταινία (Crystal 3M Schotch[®]). Όλα τα αντιδραστήρια ήταν υψηλής καθαρότητας και η παρασκευή των διαλυμάτων έγινε με δισαπεσταγμένο νερό (DDW).

4.2. Οργανολογία

Για την εκτύπωση των υφασμάτων με την τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος χρησιμοποιήθηκε ο ημιαυτόματος εκτυπωτής Screen and Stencil Printer E2 (EKRA) και το πλέγμα παρασκευάστηκε εντός του εργαστηρίου, αφού εκτέθηκε σε φωτοτράπεζα UV COMBINETUVE ETABLI 608/1,TIFLEX. Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με το κινητό τηλέφωνο Xiaomi Redmi 4A με κάμερα 13 Mpixel εντός φορητού φωτιζόμενου κλειστού θαλάμου που κατασκευάστηκε και μας παραχωρήθηκε από τον καθηγητή Jan Hrbac (Masaryk University, Brno). Η ψηφιακή ανάλυση των εικόνων και η μετατροπή των παραμέτρων R,G,B σε L*,a*,b* πραγματοποιήθηκε με το δωρεάν λογισμικό ImageJ (National Institutes of Health, US). Οι μετρήσεις απορρόφησης για την ανάλυση των δειγμάτων με την μέθοδο αναφοράς έγιναν με το φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1800 και το λογισμικό UV Solutions 1.2.

4.3. Παρασκευή του μελανιού-κεριού εκτύπωσης

Αρχικά παρασκευάστηκε μια πάστα κεριού 50% w/v με διαλυτοποίηση 10 g καθαρού κεριού σε 20 mL BEA στους 97°C (ελαιόλουτρο). Το υγρό κερί αφέθηκε υπό συνεχή ανάδευση να κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι τη στερεοποίησή του. Αυτή η πορεία επαναλήφθηκε δύο φορές υπό τις ίδιες συνθήκες. Το διάλυμα 8% w/v αιθυλικής κυτταρίνης παρασκευάστηκε προσθέτοντας, σε μικρές ποσότητες, 4 g EC σε 50 mL BEA. Ακολούθησε προσθήκη 0,04 g χρώματος κεριού

μαύρο Bekro No. 01-232 και έντονη ανάδευση όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Για την παρασκευή του μελανιού εκτύπωσης, στην πάστα κεριού/BEA προστέθηκαν προοδευτικά 20 g του διαλύματος EC/BEA (8% w/v) υπό συνεχή ανάδευση με υάλινη ράβδο μέχρι το μελάνι να αποκτήσει τις επιθυμητές ρεολογικές ιδιότητες (Σχήμα 13). Πριν από την εκτύπωση, ακολούθησε ένα επιπλέον βήμα ομογενοποίησης και απομάκρυνσης φυσαλίδων στις 500 rpm για 1 λεπτό σε πλανητική φυγόκεντρο (Uni-Cyclone). Το μελάνι κεριού αποθηκεύτηκε σε σφραγισμένα φιαλίδια στους 20°C.





4.4. Προκατεργασία του υφάσματος

Το ύφασμα (2 m × 1 m) κόπηκε σε μικρότερα κομμάτια 11 cm × 11 cm. Πριν την εκτύπωση των μικρορευστονικών καναλιών, το ύφασμα παρέμεινε σε βραστό νερό βρύσης για 10 λεπτά για να αφαιρεθούν τυχόν ακαθαρσίες και πρόσθετες ρητίνες που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή του και ξεπλύθηκε με άφθονο νερό βρύσης. Στη συνέχεια, το ύφασμα ξεπλύθηκε με δισαπεσταγμένο νερό και αφέθηκε να στεγνώσει όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τη χρήση του, σιδερώθηκε για να λειανθούν οι ζάρες-πτυχώσεις στην επιφάνεια του και οι ίνες που προεξείχαν αφαιρέθηκαν με ψαλίδι.

4.5. Εκτύπωση μικρορευστονικών καναλιών (microfluidics)

Τα επιθυμητά μικρορευστονικά κανάλια σχεδιάστηκαν στο CorelDRAW X8 και τυπώθηκαν σε διαφάνεια εικονοθεσίας η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάσκα για το φωτοευαίσθητο υλικό. Για τη δημιουργία των πλεγμάτων εκτύπωσης χρησιμοποιήθηκε γάζα μεταξοτυπίας από πολυεστέρα με 305 οπές ανά ίντσα και 34 μm διάμετρο ίνας (305/34, SEFAR[®] PET 1500) και μεταλλικά πλαίσια. Για την κατασκευή του πλέγματος εκτύπωσης, η τανυσμένη γάζα (25-28 N/m) καλύφθηκε με το φωτοευαίσθητο υλικό (Polycol S, KIWO) και στις δύο πλευρές (3-1 wet-on-wet) και αφέθηκε να στεγνώσει για 3 ώρες στους 40 °C.



Σχήμα 14: Πλέγμα εκτύπωσης με τα κατάλληλα μικρορευστονικά κανάλια

Στη συνέχεια, η πλευρά εκτύπωσης καλύφθηκε με τη μάσκα και το πλέγμα τοποθετήθηκε, υπό κενό, σε φωτοτράπεζα UV ακτινοβολίας (COMBINETUVE ETABLI 608/1, TIFLEX) για 700 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε η μάσκα και το πλέγμα πλύθηκε με ροή νερού υψηλής πίεσης μέχρι να απομακρυνθεί το μη φωτοπολυμερισμένο τμήμα του φωτοευαίσθητου υλικού. Η τελική μορφή του πλέγματος που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτύπωση φαίνεται στο **Σχήμα 14**. Το μελάνι με βάση το κερί εκτυπώθηκε στο ύφασμα (11 cm × 11 cm) με σάρωθρο πολυουρεθάνης 75 dm και ήταν έτοιμο για χρήση μετά από 24 ώρες, χωρίς καμία περαιτέρω θερμική επεξεργασία. Το κερί έτσι σχηματίζει υδρόφοβα φράγματα που ορίζουν την υδρόφιλη περιοχή του αισθητήρα.

4.6. Παρασκευή εναιωρήματος Ag_2CrO_4 σε Tween-80

Το βέλτιστο μέσο διασποράς και η βέλτιστη περιεκτικότητα του αντίστοιχου εναιωρήματος για την επίστρωση του υλικού ανίχνευσης ήταν 18 mg/mL Ag₂CrO₄ σε 1 mL Tween-80. Το Tween-80 είναι ένα ιδιαίτερα ιξώδες υγρό και γι' αυτό η παραλαβή του έγινε με ζύγιση (p=1,06 g/mL). Το μείγμα παρακαταθήκης παρασκευάστηκε με ζύγιση 72 mg Ag₂CrO₄ και 4,24 g Tween-80 σε σκουρόχρωμο πωματισμένο φιαλίδιο με ελαστικό καπάκι. Ακολούθησε μαγνητική ανάδευση για περίπου 10-15 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων (Sonicator Emmi-D30, EMAG Technologies) για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία, τυπικά <40-45 °C. Το εναιώρημα παρακαταθήκης Ag₂CrO₄ φυλάσσονταν σε δροσερό και σκιερό μέρος για περίπου 3-4 εβδομάδες.

4.7. Τροποποίηση υφασμάτων με το εναιώρημα Ag_2CrO_4 σε Tween

Κατά τη διάρκεια τροποποίησης των υφασμάτων το εναιώρημα Ag₂CrO₄ αναδευόταν σε υδατόλουτρο στους 40-45 °C προκειμένου να αποκτήσει την επιθυμητή ομοιογένεια και ρευστότητα. Η τροποποίηση των περιοχών ανίχνευσης έγινε με την επίσταξη 5 μL εναιωρήματος το οποίο αφέθηκε να στεγνώσει για περίπου 24 ώρες μέσα σε πλαστικό σακουλάκι zip, ώστε να μην έρχεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα και σε σκοτεινό μέρος, λόγω της ευαισθησίας του αργύρου. Υπό αυτές τις συνθήκες τα τροποποιημένα υφάσματα μπορούν να αποθηκευτούν για τουλάχιστον 6 μήνες.

4.8. Παρασκευή διαλύματος τεχνητού ιδρώτα πρότυπων διαλυμάτων ιόντων χλωρίου

Το διάλυμα τεχνητού ιδρώτα παρασκευάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που δίνεται σε προηγούμενη εργασία (Parrilla et al., 2019) αντικαθιστώντας οποιοδήποτε άλας χλωρίου με το αντίστοιχο άλας νιτρικών ή θειικών ιόντων. Συγκεκριμένα, το διάλυμα τεχνητού ιδρώτα που παρασκευάστηκε είχε την εξής σύσταση: 50 mM NaNO₃, 6 mM KNO₃, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 0,08 mM MgSO₄·7H₂O, 2,6 mM NaHCO₃ και 0,04 mM Na₂HPO₄·2H₂O. Το διάλυμα παρακαταθήκης του τεχνητού ιδρώτα αποθηκεύτηκε στο ψυγείο για περίπου τρεις εβδομάδες. Το pH του τεχνητού ιδρώτα

Χρησιμοποιώντας το παραπάνω διάλυμα και κατάλληλες ποσότητες διαλύματος 2 Μ NaCl παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα ιόντων χλωρίου συγκέντρωσης 10, 20, 40, 60, 80, 100 mM Cl⁻.

4.9. Βαθμονόμηση του αισθητήρα και ανάλυση ιδρώτα

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και τον προσδιορισμό των ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα, προστέθηκε όγκος 3 μL πρότυπων διαλυμάτων συγκεντρώσεων 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 mM Cl⁻ ή 3 μL ιδρώτα στις τροποποιημένες με Ag₂CrO₄ ζώνες ανίχνευσης. Μετά από 5 λεπτά, πραγματοποιήθηκε σάρωση του υφάσματος με σαρωτή (Hewlett Packard Deskjet 1050 all-in-one) με ανάλυση 600 dpi και αποθήκευση της ψηφιακής εικόνας με μορφή TIFF ή εναλλακτικά, το ύφασμα τοποθετήθηκε στο φορητό φωτιζόμενο κλειστό θάλαμο και η λήψη της ψηφιακής φωτογραφίας έγινε με το κινητό τηλέφωνο υπό απόλυτα επαναλήψιμες συνθήκες φωτισμού και λήψης.

Η χρωματομετρική ανάλυση των ζωνών ανίχνευσης, ο προσδιορισμός των χρωματικών παραμέτρων RGB (Κόκκινο, Πράσινο, Μπλε) και η μετατροπή τους στις παραμέτρους L*a*b* έγινε το λογισμικό ImageJ. Η περιοχή ενδιαφέροντος (ROI, Region of Interest) επιλέχθηκε να καλύψει ολόκληρη τη ζώνη ανίχνευσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που περιγράφονται παρακάτω, η βέλτιστη γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των χλωριούχων και των τιμών των διάφορων χρωματικών παραμέτρων παρατηρήθηκε με την παράμετρο b*, οι τιμές της οποίας

χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και την ανάλυση των πραγματικών δειγμάτων ιδρώτα.

5. Δειγματοληψία ιδρώτα

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η λήψη ιδρώτα από 14 υγιείς εθελοντές. Εννιά από αυτά τα δείγματα ιδρώτα λήφθηκαν με ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης (Schales and Schales, 1941), σε συνεργασία με το τμήμα κυστικής ίνωσης του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΓΠΝΙ), ενώ τα υπόλοιπα πέντε δείγματα λήφθηκαν μετά από 30 λεπτά ήπιας σωματικής άσκησης (jogging). Η ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης έγινε με την διαβίβαση σταθερού ρεύματος έντασης 4 mA μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Το ένα ηλεκτρόδιο [κόκκινο (+), κάθοδος] καλύπτεται με γάζα εμποτισμένη σε διάλυμα 0,64% w/v πιλοκαρπίνης σε απεσταγμένο νερό και στηρίζεται στον πήχη του χεριού και το άλλο ηλεκτρόδιο [μαύρο (-), άνοδος] καλύπτεται με γάζα εμποτισμένη σε διάλυμα 0,02 N H₂SO₄ και στηρίζεται πάνω από τον αγκώνα, όπως φαίνεται στο (Σχήμα 15). Η χρήση της γάζας και η διαβροχή της με τα διαλύματα είναι απαραίτητη για να μην έρθουν τα ηλεκτρόδια σε άμεση επαφή με το δέρμα και προκληθεί κάποιο κάψιμο. Μετά από 10 λεπτά ιοντοφόρησης, τα ηλεκτρόδια απομακρύνθηκαν, η περιοχή κάτω από το κόκκινο ηλεκτρόδιο καθαρίστηκε με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκε στεγνή γάζα η οποία συγκρατήθηκε με επίδεσμο. Στη συνέχεια, οι εθελοντές περπάτησαν για περίπου 30-45 λεπτά και η ποσότητα ιδρώτα που συγκρατήθηκε στη γάζα συλλέχθηκε τοποθετώντας της σε σύριγγα και πιέζοντας την με το έμβολο. Τα δείγματα ιδρώτα όγκου 300-700 μL αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια eppendorf, σφραγίστηκαν με parafilm για να αποφευχθεί η εξάτμισή τους και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο για περίπου 2 εβδομάδες. Παρόμοια συλλέχτηκε και ο ιδρώτας στους εθελοντές μετά τη σωματική άσκηση.



Σχήμα 15: Απεικόνιση της διαδικασίας λήψης δείγματος ιδρώτα με ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης, όπως περιγράφεται στο κείμενο.

6. Μέθοδος αναφοράς

Η μέθοδος αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στην αντίδραση Hg(SCN)₂ με ιόντα Cl⁻, στην απελευθέρωση ιόντων SCN⁻ και την αντίδραση τους με ιόντα τρισθενούς σιδήρου προς σχηματισμό αιματέρυθρου συμπλόκου Fe(SCN)²⁺, η απορρόφηση του οποίου μετρήθηκε στα 460 nm (Iwasaki Iwaji, 1952; Sanik, 1957; Zall et al., 1956). Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και την ανάλυση των δειγμάτων παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα 3 mM NaCl, κορεσμένο διάλυμα 0,3 g Hg(SCN)₂ σε 100 mL αιθανόλη και διάλυμα 15,1 g Fe(NO₃)₃·9H₂O σε μείγμα 47 mL πυκνού υπερχλωρικού οξέος (HClO₄) και 53 mL H₂O. Η απορρόφησή των πρότυπων και των αγνώστων διαλυμάτων (όγκου 5 mL) μετρήθηκε στα 460 nm, 20 λεπτά μετά την ανάμειξη των επιμέρους αντιδραστηρίων, σύμφωνα με τα δεδομένα που φαίνονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Σύσταση προτύπων και άγνωστων	[,] διαλυμάτων για	ι τον φασματοφω	τομετρικό
προσδιορισμό χλωριούχων σε ιδρώτα.			

Διάλυμα	Λευκό	Π1	П2	П3	П4	П5	Δείγμα
3 mM NaCl (μL)	0	20	40	100	200	300	100*
Hg(SCN)₂ (μL)	400	400	400	400	400	400	400
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O (μL)	400	400	400	400	400	400	400
H ₂ O (μL)	4200	4180	4160	4100	4000	3900	4100
[CI⁻] µM	0	12	24	60	120	180	$C_{\delta} = C_x \times 500$

* 1:10 του δείγματος

7. Αποτελέσματα και Συζήτηση

7.1. Σχεδιασμός και κατασκευή μικρορευστονικών καναλιών

Η κατασκευή του προτεινόμενου μικρορευστονικού αισθητήρα για τον προσδιορισμό των ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα στηρίζεται στην ύπαρξη μιας υδρόφιλης και μια υδρόφοβης περιοχής (περιοχή εκτυπωμένη με κερί) πάνω στο ύφασμα. Έτσι δημιουργείται η ζώνη ανίχνευσης όπου πραγματοποιείται η αντίδραση του χρωμικού αργύρου με τα ιόντα χλωρίου και η παρατηρούμενη χρωματική αλλαγή, αλλά και τα κανάλια υπερχείλισης για τον έλεγχο του όγκου του πραγματικού δείγματος που απορροφάται στη ζώνη ανίχνευσης **(Σχήμα 16)**. Σημειώνεται ότι μικρορευστονικά κανάλια θα μπορούσαν να εκτυπωθούν κατευθείαν στο σχήμα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εφαρμογή, χρησιμοποιήσαμε όμως τα μικρορευστονικά κανάλια που υπήρχαν στο εργαστήριο από άλλη εφαρμογή.



Σχήμα 16: (Αριστερά) κομμάτι υφάσματος (11 cm × 11 cm) με 12 εκτυπωμένα μικρορευστονικά κανάλια και (δεξιά) κοπή ενός μικρορευστονικού καναλιού όπου φαίνονται η ζώνη ανίχνευσης με τα κανάλια υπερχείλισης

Για τη βελτιστοποίηση της σύστασης του μελανιού κεριού παρασκευάστηκαν μείγματα 50% w/v καθαρού κεριού σε BEA (ενεργό υλικό) και διάφορα διαλύματα EC. Το κερί μέλισσας σε BEA παρασκευάστηκε όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό τμήμα και σε ολόκληρο το μείγμα, προστέθηκαν διάφορες ποσότητες πολυμερικών διαλυμάτων EC σε διάφορους διαλύτες και συγκεντρώσεις. Μελάνια με βάση το κερί παρασκευάστηκαν προσθέτοντας 18, 20 ή 22 g 8% w/v EC σε BEA, 8 g 4% w/v EC σε τεξανόλη ή 6 ή 8 g 2% w/v EC σε τερπινεόλη. Τα μελάνια που προέκυψαν συνοψίζονται στον Πίνακα 2. Η επιλογή των συγκεκριμένων μειγμάτων έγινε λαμβάνοντας υπόψη τη διαλυτότητα και το ιξώδες των διαλυμάτων EC στους συγκεκριμένους διαλύτες, τις ρεολογικές ιδιότητες των αντίστοιχων μειγμάτων με το ενεργό υλικό και τη συνεκτικότητα του ενεργού υλικού με τα αντίστοιχα διαλύματα EC.

Μελάνι	Ενεργό υλικό	Διάλυμα ΕϹ	Ποσότητα διαλύματος ΕC στο μελάνι (g)
Ink _{18/BEA}	50% w/v wax in BEA	8% EC in BEA	18
Ink _{20/BEA}	50% w/v wax in BEA	8% EC in BEA	20
Ink _{22/BEA}	50% w/v wax in BEA	8% EC in BEA	22
Ink _{6/Terpineol}	50% w/v wax in BEA	2% EC in Terpineol	6
Ink _{8/Terpineol}	50% w/v wax in BEA	2% EC in Terpineol	8
Ink _{8/Texanol}	50% w/v wax in BEA	4% EC in Texanol	8

	2. Sugaran	Sugar day w	unal an una'nu	waara''
πινακας.	Ζ: 200ια0η	οιαφορων	μελανιων	κεριου

Για την εκτίμηση του μικρότερου πλάτους καναλιού που επιτρέπει τη ροή του υγρού (ανάλυση εκτύπωσης καναλιού), τυπώθηκαν παράλληλα κανάλια με διαφορετικά πλάτη. Αντίστοιχα, για τον υπολογισμό του μικρότερου πλάτους φράγματος που εμποδίζει τη ροή του υγρού, τυπώθηκαν κανάλια με φράγματα διαφορετικού πλάτους. Η διαδικασία εκτύπωσης πραγματοποιήθηκε σε ένα μόνο βήμα για κάθε μελάνι κεριού σε δύο διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων, χαρτί και ύφασμα, χρησιμοποιώντας πλέγμα με mesh 305/34. Η ανάλυση εκτύπωσης σε όλα τα υφάσματα ήταν καλύτερη από το χαρτί για όλα τα μελάνια. Οι εκτυπώσεις έγιναν με 1 ή 2 στρώσεις και τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία

περιβάλλοντος για 24 ώρες πριν από τη χρήση, χωρίς κάποια άλλη κατεργασία (θερμική ή έκθεση σε IR ακτινοβολία).

Η ποιότητα κατασκευής των μικρορευστονικών καναλιών και η ανάλυση εκτύπωσης εξετάστηκαν σε βαθμονομημένα σχέδια πλάτους 300-2000 μm (Σχήμα 17Α). Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη διαλύματος χρωστικής στα υδρόφιλα κανάλια και στα υδρόφοβα φράγματα (Σχήμα 17Β).



Σχήμα 17: Έλεγχος ποιότητας εκτυπωμένων μικρορευστονικών καναλιών συγκεκριμένων διαστάσεων (σύμφωνα με το σχέδιο που απεικονίζεται στο πάνω μέρος του σχήματος,) σε χαρτί (MN 261, Macherey-Nagel, πάχους 0,18 mm) με διάφορα μελάνια.

Στην περίπτωση των υποστρωμάτων χάρτου, μία εκτύπωση ήταν επαρκής, ενώ δύο εκτυπώσεις είχαν ως αποτέλεσμα την εκτύπωση περίσσειας μελάνης η οποία, λόγω πλευρικής ροής, διείσδυσε στην υδρόφιλη ζώνη. Είναι προφανές ότι στην περίπτωση του μελανιού σε τερπινεόλη, το διάλυμα της χρωστικής διαπέρασε την υδρόφοβη περιοχή χωρίς να γεμίσει τα κανάλια. Στην περίπτωση του μελανιού σε τεξανόλη, το διάλυμα της χρωστικής διαπέρασε το υδρόφοβο φράγμα σε μικρότερο βαθμό, όμοια όμως δεν μπόρεσε να κινηθεί στο υδρόφιλο κανάλι. Σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρήθηκε διαχωρισμός του διαλύτη (τεξανόλη) από τη μάζα του μελανιού γύρω από την περιοχή εκτύπωσης λίγα λεπτά μετά την εκτύπωση. Αντίθετα, τα μικρορευστονικά κανάλια που εκτυπώθηκαν με τα μελάνια κεριού σε διαλύτη BEA έδειξαν πολύ καλή συμπεριφορά. Το διάλυμα της χρωστικής ρέει ικανοποιητικά στα περισσότερα υδρόφιλα κανάλια και τα περισσότερα υδρόφοβα φράγματα περιορίζουν το διάλυμα εντός του καναλιού. Σύμφωνα με τις αντίστοιχες φωτογραφίες **(Σχήμα 17B)**, η καλύτερη ποιότητα εκτύπωσης παρατηρήθηκε με το μελάνι Ink₂₀/BEA. Η ανάλυση εκτύπωσης του υδρόφιλου καναλιού και του υδρόφοβου φράγματος ήταν >750 μm.

Τα ίδια πειράματα πραγματοποιήθηκαν με όλα τα μελάνια κεριού σε υπόστρωμα υφάσματος με σύσταση βαμβάκι/ελαστάνη 95/5, χρησιμοποιώντας πλέγματα με mesh 305/34 ή 230/40. Στην περίπτωση των υφασμάτινων υποστρωμάτων απαιτήθηκαν δύο εκτυπώσεις προκειμένου το μελάνι να διαπεράσει όλο το πάχος του υποστρώματος. Ο έλεγχος ποιότητας των εκτυπωμένων μικρορευστονικών καναλιών και η ανάλυση εκτύπωσης εξετάστηκε όπως περιγράφεται παραπάνω.

Όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση των υποστρωμάτων χάρτου, οι εκτυπώσεις με τα μελάνια κεριού σε τερπινεόλη και τεξανόλη ήταν μικρότερης ανάλυσης σε σχέση με τα μελάνια κεριού σε BEA (Σχήμα 18). Μεταξύ αυτών το μελάνι Ink₂₀/BEA είχε την καλύτερη ανάλυση εκτύπωσης. Όπως φαίνεται στο (Σχήμα 18), η ανάλυση εκτύπωσης του υδρόφιλου καναλιού ήταν 400 μm και του υδρόφοβου φράγματος >750 μm. Ως εκ τούτου, τόσο σε χάρτινα όσο και σε υφασμάτινα υποστρώματα, το Ink₂₀/BEA κρίθηκε πιο κατάλληλο για το σχηματισμό υδρόφιλων καναλιών και υδρόφοβων φραγμάτων.

Το μελάνι Ink₂₀/BEA δοκιμάστηκε επίσης σε διαφορετικούς τύπους υφάσματος και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πάχος του υφάσματος και ενδεχόμενα άλλες ιδιότητες που απορρέουν από τη σύσταση και την πλέξη κάθε υφάσματος δρουν καθοριστικά στην ποιότητα και την ανάλυσης της εκτύπωσης. Το 100% βαμβακερό ύφασμα με πάχος 169±5 μm και το ύφασμα βαμβάκι/πολυεστέρα 35/65 με πάχος 136±6 μm ήταν πολύ λεπτά και το μελάνι απλώθηκε πολύ γρήγορα σε ολόκληρο το ύφασμα χωρίς να σχηματίσει υδρόφιλα κανάλια. Αντίθετα, το ύφασμα 50/50

βαμβάκι/πολυεστέρα με πάχος 286±10 μm και το ύφασμα βαμβάκι/πολυεστέρα 35/65 με πάχος 317±13 μm ήταν πολύ παχιά και το μελάνι δεν μπορούσε να διαπεράσει ολόκληρο το πάχος της μάζας. Οι εκτυπώσεις σε αυτά τα υποστρώματα δεν παρουσιάζονται. Το μελάνι κεριού (Ink₂₀/BEA) που επιλέχθηκε εκτυπώθηκε επίσης σε υποστρώματα υφάσματος χρησιμοποιώντας πλέγμα με mesh 230/40 χωρίς να βελτιώσει την ανάλυση εκτύπωσης **(Σχήμα 18)**.



Σχήμα 18: Έλεγχος ποιότητας εκτυπωμένων μικρορευστονικών καναλιών συγκεκριμένων διαστάσεων σε ύφασμα βαμβάκι/ελαστάνη 95/5 με διάφορα μελάνια.



Σχήμα 19: Έλεγχος ποιότητας εκτυπωμένων μικρορευστονικών καναλιών συγκεκριμένων διαστάσεων σε ύφασμα βαμβάκι/ελαστάνη 95/5 με το μελάνι Ink₂₀/BEA.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, η κατασκευή μικρορευστονικών καναλιών πραγματοποιήθηκε με το μελάνι κεριού που αποτελείται από το μείγμα του ενεργού υλικού (10 g καθαρού κεριού σε 20 mL BEA) με 20 g 8% w/v EC σε BEA (Ink₂₀/BEA) , χρησιμοποιώντας πλέγμα με mesh 305/34, δύο εκτυπώσεις σε ύφασμα βαμβάκι/ελαστάνη 95/5 **(Σχήμα 19)**. Το κόστος του μελανιού (ποσότητα 50 g) και της καθεμίας μικρορευστονικής συσκευής, συμπεριλαμβανομένου του κόστους του υφάσματος υπολογίστηκε βάση των λιανικών τιμών πώλησης των υλικών περίπου 2.25 και 0,004 € (**Πίνακας 3**).

Υλικό	Λιανική	Ποσότητα (~51 g)	Κόστος
	τιμή		(€)
κερί	13€/Kg	10 g	0.13
EC	266 €/500 g	1.58 g	0.84
BEA	32.40 €/L	39.6 g (~41 mL)	1.33
χρώμα	60 €/250 g	40 mg	0.01
		Κόστος ανά 50 g μελανιού	2.25
Ύφασμα	3 €/m²	~ 83 κομμάτια 11 cm × 11 cm με 12 μικρορευστονικά κανάλια	0.036
		Κόστος ανά μικρορευστονικό κανάλι (χωρίς ύφασμα; με 50 g μελάνι εκτυπώνονται 50 κομμάτια=600 κανάλια)	0.0038
		Κόστος ανά μικρορευστονικό αισθητήρα (0.036/12) + 0.0038	0.0068

Πίνακας 3. Υπολογισμός του κόστους του μελανιού κεριού (Ink_{20/BEA}) και των μικρορευστονικών συσκευών με βάσει τις τιμές λιανικής.

7.2. Βελτιστοποίηση παραμέτρων

7.2.1. Επιλογή της βέλτιστης χρωματικής παραμέτρου

Αρχικά μελετήθηκε η μεταβολή των τιμών των χρωματικών παραμέτρων R, G, B, L*, a*, b* συναρτήσει της συγκέντρωσης των πρότυπων διαλυμάτων χλωριούχων 0, 20, 40, 60, 80, 100 mM. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα του **Σχήματος 20**, σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός αυτές που αφορούν στις παραμέτρους a* και b*, η απόκριση των αισθητήρων δεν είναι γραμμική με τη συγκέντρωση των χλωριούχων και ως εκ τούτου απορρίφθηκαν. Λαμβάνοντας υπόψη τη γραμμικότητα των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς και τη τυπική απόκλιση των μετρήσεων, για την ποσοτικοποίηση των χρωματικών αλλαγών συναρτήσει της συγκέντρωσης χλωριούχων, επιλέχθηκε η παράμετρος b*.



Σχήμα 20: Μεταβολή της τιμής διαφόρων χρωματικών παραμέτρων (R, G, B, L*, a*, b*) συναρτήσει της συγκέντρωσης χλωριούχων. Η σάρωση των αισθητήρων, τροποποιημένων με 5 μL 18 mg/mL Ag₂CrO₄ σε Tween-80, έγινε 5 λεπτά μετά την προσθήκη 3 μL πρότυπου διαλύματος χλωριούχων. Οι τιμές έχουν διορθωθεί ως προς την τιμή b* του λευκού δείγματος. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων από 3 διαφορετικούς αισθητήρες.

7.2.2. Επιλογή του μέσου διασποράς Ag₂CrO₄

Για την επιλογή του μέσου διασποράς του χρωμικού αργύρου δοκιμάστηκαν διάφοροι διαλύτες και μείγματα διαλυτών με διαλύματα πολυμερών έχοντας ως κριτήρια την ομοιόμορφη διασπορά του στερεού (σε όλες τις δοκιμές η περιεκτικότητα του εναιωρήματος ήταν 1 mg/mL), τη σταθερότητα του γαλακτώματος με το χρόνο, την ευκολία επίσταξης του στο ύφασμα και τη χρωματική αλλαγή μετά τη προσθήκη διαλύματος χλωριούχων συγκέντρωσης 40 mM.

Σε αιθανόλη, BEA και σε μείγμα 50/50 v/v αιθανόλης/Tween-80, η διασπορά του Ag₂CrO₄ και η σταθερότητα του εναιωρήματος ήταν περιορισμένη. Σε ακετόνη η διασπορά του Ag₂CrO₄ ήταν μηδενική. Σε 1% και 5% w/v Nafion σε νερό, η διασπορά του Ag₂CrO₄ και η σταθερότητα του εναιωρήματος ήταν πολύ καλή, παρόλο αυτά τα συγκεκριμένα μέσα διασποράς απορρίφθηκαν γιατί δεν ήταν δυνατή η απορρόφηση των αντίστοιχων εναιωρημάτων στο ύφασμα. Σε 0.5% w/v Nafion σε νερό η διασπορά του Ag₂CrO₄ και η σταθερότητα του εναιωρήματος ήταν πολύ καλή, παρατηρήθηκε όμως αλλαγή του χρώματος από καστανέρυθρο σε κίτρινο, απουσία ιόντων χλωρίου. Σε μείγμα 10/1 v/v 0.5% w/v Nafion σε νερό/Tween-80 η διασπορά του Ag₂CrO₄ και η σταθερότητα του εναιωρήματος ήταν πολύ καλή και το χρώμα του εναιωρήματος σταθερό. Σε μείγματα 10/1 v/v 0.5% w/v Nafion σε νερό με Aliquot-336 ή 2νιτροφαινυλ-οκτυλ-αιθέρας (Ο-NPOE), η διασπορά του Ag₂CrO₄ ήταν μηδενική.

Σε 4% και 8% w/v EC σε BEA, η διασπορά του Ag₂CrO₄ και η σταθερότητα του εναιωρήματος ήταν πολύ καλή. Η απορρόφηση του εναιωρήματος στο ύφασμα ήταν επίσης ικανοποιητική, παρόλο αυτά απορρίφθηκε γιατί μετά την προσθήκη διαλύματος 40 μΜ χλωριούχων δεν παρατηρήθηκε καμία χρωματική αλλαγή. Τέλος, σε Tween-80 το εναιώρημα του Ag₂CrO₄ παρουσίασε συνολικά την καλύτερη συμπεριφορά και έτσι επιλέχθηκε για τις περαιτέρω μελέτες. Συγκεντρωτικά, η συμπεριφορά των εξεταζόμενων μέσων διασποράς φαίνεται στον **Πίνακα 4**.

Μέσο διασποράς	Διασπορά εναιωρήματος	Σταθερότητα εναιωρήματος	Χρωματική αλλαγή κατά την αποθήκευση	Επικάλυψη της ζώνης ανίχνευσης	Χρωματική αλλαγή μετά την προσθήκη χλωριούχων
EtOH	*	*	-	*	**
BEA	*	*	-	-	-
50/50 EtOH/Tween-80	*	*	**	-	-
Ακετόνη	-	-	-	-	-
0,5% Nafion	* * *	*	* * *	-	-
1% Nafion	* * *	* * *	-	*	-
5% Nafion	* * *	* * *	-	*	-
10/1 0,5% Nafion/ Tween-80	***	***	-	-	-
10/1 0,5% Nafion/ Aliquot-336	-	-	-	-	-
10/1 0,5% Nafion/ O- NPOE	-	-	-	-	-
4% EC/BEA	***	**	**	*	-
8% EC/BEA	*	*	*	-	-
Tween-80	***	***	-	***	***

Πίνακας 4: Βασικές ιδιότητες διαφόρων μέσων διασποράς στερεού Ag₂CrO₄

- μηδενική, * μη ικανοποιητική, ** μέτρια, *** ικανοποιητική

7.2.3. Επιλογή βέλτιστης περιεκτικότητας εναιωρήματος Ag₂CrO₄ σε Tween-80

Για την επιλογή της βέλτιστης περιεκτικότητας του εναιωρήματος Ag₂CrO₄ σε Tween-80 δοκιμάστηκαν διάφορα εναιωρήματα με περιεκτικότητα 6, 10, 15 και 18 mg Ag₂CrO₄ σε 1 mL Tween-80. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 21**, όσο αυξάνεται η ποσότητα Ag₂CrO₄, αν και παρατηρείται μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου, οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς είναι πιο γραμμικές στο εύρος συγκέντρωσης χλωριούχων στον ιδρώτα (ως προς τον παράγοντα b* που όπως περιγράφεται παρακάτω επιλέχθηκε μεταξύ των άλλων χρωματικών παραμέτρων ως η βέλτιστη χρωματική παράμετρος για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων) επιτρέποντας έτσι την άμεση εφαρμογή του αισθητήρα χωρίς να απαιτείται αραίωση του δείγματος. Η συμπεριφορά της μεθόδου για περιεκτικότητες 15 και 18 mg/mL είναι παρόμοιες και η περιεκτικότητα 18 mg/mL Tween-80 επιλέχθηκε για τις επόμενες μελέτες.



Σχήμα 21: Επίδραση της περιεκτικότητας του εναιωρήματος Ag₂CrO₄ σε Tween-80 στην αναλυτική συμπεριφορά των αισθητήρων. Όγκος εναιωρήματος στο ύφασμα, 5 μL, όγκος πρότυπου διαλύματος χλωριούχων, 2 μL. Η χρωματική ανάλυση της ζώνης ανίχνευσης έγινε 5 λεπτά μετά την προσθήκη του αναλύτη.

7.2.4. Επιλογή βέλτιστου όγκου εναιωρήματος Ag₂CrO₄/Tween-80 στο ύφασμα

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές επιστάζοντας στο ύφασμα 3, 4, 5 και 6 μ εναιωρήματος Ag₂CrO₄ σε Tween-80. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 22**, τα 5 μ εναιωρήματος καλύπτουν όλη την επιφάνεια της ζώνης ανίχνευσης, χωρίς να παρατηρείται υπερχείλιση. Αντίθετα, όγκοι μικρότεροι των 5 μL δεν καλύπτουν επαρκώς τη ζώνη ανίχνευσης ενώ όγκοι μεγαλύτεροι των 5 μL την υπερχειλίζουν.



Σχήμα 22: Απεικόνιση αισθητήρων τροποποιημένων με (a) 3, (b) 4, (c) 5, και (d) 6 μL εναιωρήματος 18 mg/mL Ag₂CrO₄ σεTween-80. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με USB Digital Microscope και το λογισμικό Plugable Digital Viewer.

7.2.5. Επιλογή βέλτιστου όγκου δείγματος

Για την επιλογή του βέλτιστου όγκου δείγματος πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διάφορους όγκους από 1 έως 5 μL πρότυπων διαλυμάτων τεχνητού ιδρώτα που περιείχαν χλωριούχα στο εύρος συγκεντρώσεων από 0 έως 100 mM, λαμβάνοντας ως κριτήρια τον ελάχιστο όγκο δείγματος που μπορεί να αποχρωματίσει ολόκληρη την επιφάνεια της ζώνης ανίχνευσης και το μέγιστο όγκο που μπορεί να συγκρατήσει το μικρορευστονικό κανάλι, εντός στη ζώνη ανίχνευσης, ώστε το δείγμα να μην κινείται στο, μη τροποποιημένο με Ag₂CrO₄, κανάλι υπερχείλισης. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 23**, τα 3 μL δείγματος καλύπτουν ακριβώς την τροποποιημένη ζώνη ανίχνευσης, χωρίς να υπάρχει διαρροή στα κανάλια υπερχείλισης. Μικρότεροι όγκοι (1, 2 μL) δεν καλύπτουν επαρκώς τη ζώνη ανίχνευσης ενώ μεγαλύτεροι όγκοι (4, 5 μL) διαρρέουν στο κανάλι υπερχείλισης. Οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς φαίνονται στο **Σχήμα 24**.



Σχήμα 23: Φωτογραφίες αισθητήρων τροποποιημένων με 5 μL εναιωρήματος 18 mg/mL Ag₂CrO₄ σεTween-80, μετά την προσθήκη (α) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 3, (e) 4, και (f) 5 μL πρότυπου διαλύματος τεχνητού ιδρώτα συγκέντρωσης 100 mM Cl⁻. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με USB Digital Microscope και το λογισμικό Plugable Digital Viewer.



Σχήμα 24: Επίδραση του όγκου δείγματος στην αναλυτική συμπεριφορά αισθητήρων τροποποιημένων με 5 μL 18 mg/mL Ag₂CrO₄ σε Tween-80. Η χρωματική ανάλυση της ζώνης ανίχνευσης έγινε 5 λεπτά μετά την προσθήκη του αναλύτη. Οι τιμές έχουν διορθωθεί ως προς την τιμή b* του λευκού δείγματος. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων από 3 διαφορετικούς αισθητήρες.

7.2.6. Επιλογή κατάλληλου χρόνου σάρωσης του υφάσματος

Για την επιλογή του βέλτιστου χρόνου καταγραφής των τιμών των χρωματικών παραμέτρων στην ROI της ζώνης ανίχνευσης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με σάρωση του υφάσματος 5, 10 και 30 λεπτά μετά την προσθήκη των πρότυπων διαλυμάτων χλωριούχων. Η μελέτη αυτή αποσκοπεί στην εύρεση του βέλτιστου χρόνου που απαιτείται για να στεγνώσει το διάλυμα και ο αποχρωματισμός του Ag₂CrO₄, να είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση των χλωριούχων στο επιθυμητό εύρος συγκεντρώσεων. Σύμφωνα με τις πειραματικές παρατηρήσεις, ο ελάχιστος χρόνος για να στεγνώσει το δείγμα είναι 2-3 λεπτά ενώ σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο (Σχήμα 25), η χρωματική αλλαγή μεταξύ των 5 και 10 λεπτών είναι σταθερή. Ενώ, με το πέρας του χρόνου (30 λεπτά), σε συγκέντρωση 60 mM Cl[−] η μέτρηση πιάνει πλατώ. Ως εκ τούτου, ως βέλτιστος χρόνος καταγραφής των τιμών των χρωματικών παραμέτρων επιλέχθηκαν τα 5 λεπτά.



Σχήμα 25: Απόκριση των αισθητήρων τροποποιημένων με 5 μL 10 mg/mL Ag₂CrO₄ σε Tween-80 με καταγραφή των χρωματικών παραμέτρων 5, 10 και 30 λεπτά μετά την προσθήκη 2 μL πρότυπων διαλυμάτων χλωριούχων. Οι τιμές έχουν διορθωθεί ως προς την τιμή b* του λευκού δείγματος.



Σχήμα 26: Απόκριση των αισθητήρων σε πρότυπα διαλύματα τεχνητού ιδρώτα, pH 4-8 συγκέντρωσης 40 mM χλωριούχων. Οι τιμές έχουν διορθωθεί ως προς την τιμή του b* λευκού δείγματος στην αντίστοιχη τιμή pH. Οι πειραματικές συνθήκες είναι όμοιες με αυτές που περιγράφονται στο Σχήμα 20. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων από 6 διαφορετικούς αισθητήρες.

7.2.1. Επίδραση του pH

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η διερεύνηση για τον αν οι διαφορετικές τιμές pH που μπορεί να έχουν τα πραγματικά δείγματα ιδρώτα (pH=4-8) (Dang et al., 2018; Legner et al., 2019; Yin et al., 2023) επηρεάζουν την τιμή της χρωματικής παραμέτρου b*. Σύμφωνα με τις τιμές που φαίνονται στο **Σχήμα 26** για την ενδιάμεση συγκέντρωση χλωριούχων στον ιδρώτα (40 mM) σε τιμές pH 4-8 και τη τυπική απόκλιση (SD) των μετρήσεων ως προς τον αριθμητικό μέσο όρο (\vec{x}) του σήματος, η % σχετική τυπική απόκλιση των μετρήσεων υπολογίστηκε, %*RSD* = 3,87% και κρίνεται ικανοποιητική.



Σχήμα 27: Καμπύλη αναφοράς και φωτογραφίες των ζωνών ανίχνευσης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Οι τιμές έχουν διορθωθεί ως προς την τιμή b* του λευκού δείγματος. Οι πειραματικές συνθήκες είναι όμοιες με αυτές που περιγράφονται στο Σχήμα 20. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων από 3 διαφορετικούς αισθητήρες.

7.3. Καμπύλη αναφοράς

Υπό τις επιλεγείσες πειραματικές συνθήκες, όπως αναφέρονται στις προηγούμενες παραγράφους, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς του αισθητήρα. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 27**, η μεταβολή της τιμής της χρωματικής παραμέτρου b*, διορθωμένη ως προς την τιμή του λευκού δείγματος (διάλυμα τεχνητού ιδρώτα που δεν περιέχει χλωριούχα), συσχετίζεται γραμμικά (R² = 0.9995) με τη συγκέντρωση χλωριούχων για τιμές από 10 έως 100 mM.

Στο **Σχήμα 28** φαίνεται η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς με μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 2 μηνών σε 6 διαφορετικές μέρες ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία.



Σχήμα 28: Καμπύλη αναφοράς. Οι πειραματικές συνθήκες είναι όμοιες με αυτές που περιγράφονται στο Σχήμα 20. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση των μέσων από μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 2 μηνών σε 6 διαφορετικές μέρες.

Σύμφωνα με τις πειραματικές τιμές που παρουσιάζονται στα **Σχήματα 27** και **28**, υπολογίστηκε η επαναληψιμότητα της μεθόδου σε δυο συγκεντρώσεις χλωριούχων, 20 mM (φυσιολογική τιμή) και 60 mM (ενδεικτική της ασθένειας), με μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν εντός της ημέρας (within a day) και μεταξύ διαφορετικών ημερών (between days) σε διάστημα 2 μηνών. Σύμφωνα με τις τιμές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5, η μέθοδος παρέχει αξιόπιστες μετρήσεις με υψηλή επαναληψιμότητα.

Πίνακα 5. Επαναληψιμότητα της μεθόδου με μετρήσεις εντός της ημέρας (within a day) και μεταξύ διαφορετικών ημερών (between days)

Συγκέντρωση χλωριούχων	RSD%, within a day, n=3	RSD%, between days, n=6
20 mM	1,5%	10,1%
60 mM	4,8%	6,3%

7.4. Προσδιορισμός χλωριούχων σε ανθρώπινο ιδρώτα και πιστοποίηση της μεθόδου

Ο υφασμάτινος αισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χλωριούχων στον ιδρώτα σε 14 υγιείς εθελοντές μετά την εφίδρωση τους με σωματική άσκηση (jogging) και με ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης. Η τιμή της συγκέντρωσης των χλωριούχων υπολογίστηκε από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που κατασκευάζονταν την ίδια μέρα με επίσταξη 3 μL πρότυπων διαλυμάτων χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα στη ζώνη ανίχνευσης, και σάρωση των μικρορευστονικών καναλιών (περιοχή ROI στη ζώνη ανίχνευσης) με επιτραπέζιο σαρωτή με ανάλυση 1200 dpi, 5 λεπτά με την προσθήκη του ιδρώτα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα για τον προσδιορισμό χλωριούχων σε ανθρώπινο ιδρώτα με τον προτεινόμενο αυτοκόλλητο αισθητήρα και τη μέθοδο αναφοράς. RSD, σχετική τυπική απόκλιση. RE, σχετικό σφάλμα.

Δείγμα	Μέθοδος δειγματοληψίας	Αυτοκόλλητος αισθητήρας (mM) mean ± SD (n=3)	RSD%	Μέθοδος αναφοράς (mM)	RE%
S1	Ιοντοφόρηση	13,91 ± 1,36	9,78	13,32	-4,43
S2	Ιοντοφόρηση	14,27 ± 1,83	12,82	13,18	-8,27
S3	Ιοντοφόρηση	14,78 ± 0,97	6,56	15,08	1,99
S4	Ιοντοφόρηση	15,31 ± 1,18	7,71	18,18	15,79
S5	Ιοντοφόρηση	19,59 ± 0,92	4,70	19,42	-0,87
S6	Ιοντοφόρηση	13,87 ± 1,90	13,70	12,68	-9,38
S7	Ιοντοφόρηση	15,64 ± 1,32	8,44	16,42	4,75
S8	Φυσική άσκηση	17,43 ± 1,86	10,67	17,29	-0,81
S9	Φυσική άσκηση	66,48 ± 1,76	2,65	59,91	-10,97

S10	Φυσική άσκηση	46,22 ± 0,99	2,14	46,81	1,26
S11	Φυσική άσκηση	44,16 ± 2,64	5,98	43,48	-1,56
S12	Φυσική άσκηση	47,90 ± 2,04	4,26	50,55	5,24
S13	Ιοντοφόρηση	8,95 ± 0,22	2,46	8,25	-8,48
S14	Ιοντοφόρηση	22,12 ± 1,05	4,75	22,50	1,69

Όλα τα πραγματικά δείγματα αναλύθηκαν με τον προτεινόμενο αισθητήρα και με μια φασματοφωτομετρική μέθοδο αναφοράς. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**, οι τιμές των συγκεντρώσεων χλωριούχων που βρέθηκαν με τον προτεινόμενο αισθητήρα είναι σε πολύ καλή συμφωνία με αυτά που λήφθηκαν με τη μέθοδο αναφοράς. Σημειώνεται ότι στα τέσσερα από τα πέντε δείγματα που προέκυψαν από την εφίδρωση με σωματική άσκηση οι τιμές της συγκέντρωσης χλωριούχων ήταν υψηλές, παρόλο που αφορούν υγιείς εθελοντές, υποδεικνύοντας έτσι τη εξάρτηση της σύστασης του ιδρώτα ανάλογα με τον τρόπο εφίδρωσης (Legner et al., 2019).



Σχήμα 29: Διάγραμμα διασποράς για τις τιμές της συγκέντρωσης χλωριούχων με τον αυτοκόλλητο αισθητήρα και τη μέθοδο αναφοράς.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα διασποράς **(Σχήμα 29)**, υπάρχει ισχυρή θετική γραμμική συσχέτιση των τιμών, μικρή διασπορά των τιμών από την ευθεία ταυτότητας (ή ισότητας) και ο συντελεστής συσχέτισης Pearson υπολογίστηκε r =

0,9929. Παράλληλα, από το διάγραμμα Bland-Altman **(Σχήμα 30)** παρατηρείται ότι ο μέσος όρος διαφορών (mean difference, md) των δύο μεθόδων είναι πολύ μικρός (md=0,26), ενώ εντός του διαστήματος εμπιστοσύνης με πιθανότητα 95% για το μέσο όρο των διαφορών, md±1,96SD, όπου SD η τυπική απόκλιση στον υπολογισμό του μέσου όρου των διαφορών είναι [-4,05, 4,56], βρίσκονται όλες οι τιμές εκτός της τιμής του δείγματος (S9) που μπορεί να οφείλεται σε συμπύκνωση του δείγματος κατά τη διάρκεια αποθήκευσής του. (Dubot et al., 2019; Yalamati et al., 2015; Zhang et al., 2017).



Σχήμα 30: Διάγραμμα Bland & Altman για τις τιμές της συγκέντρωσης χλωριούχων με τον αυτοκόλλητο αισθητήρα και τη μέθοδο αναφοράς. Πορτοκαλί γραμμή, μέσος όρος διαφοράς μέσων τιμών, μαύρες γραμμές, διαφορά μέσων τιμών ± 1,96 SD.

7.5. Κατασκευή αυτοκόλλητου επιθέματος που περιέχει τον υφασμάτινο μικρορευστονικό οπτικό αισθητήρα.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές προσομοίωσης της χρήσης του αισθητήρα ως φορετού και συγκεκριμένα, ως αυτοκόλλητου επιθέματος στην επιδερμίδα. Ως εκ τούτου, το δείγμα προστέθηκε από την πίσω πλευρά του αισθητήρα και μετρήθηκε η τιμή της παραμέτρου b* εντός της ζώνης ανίχνευσης στην μπροστινή πλευρά του αισθητήρα σύμφωνα με τα παραπάνω. Σύμφωνα με τις τιμές που φαίνονται στο **Σχήμα 31**, τα αποτελέσματα είναι ίδια ανεξάρτητα της πλευράς που έγινε η προσθήκη του δείγματος υποδεικνύοντας ότι ο προτεινόμενος υφασμάτινος αισθητήρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορετός αισθητήρας στον οποίο από τη μία πλευρά (πίσω πλευρά) θα εισέρχεται το δείγμα και από την άλλη (μπροστινή πλευρά) θα λαμβάνεται η φωτογραφία για ανάλυση και τον προσδιορισμό των χλωριούχων για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης.



Σχήμα 31. Απόκριση των αισθητήρων σε πρότυπα διαλύματα τεχνητού ιδρώτα τα οποία προστέθηκαν στην πίσω ή την μπροστινή πλευρά των αισθητήρων και η λήψη των φωτογραφιών της ζώνης ανίχνευσης έγινε από την μπροστινή πλευρά και στις δυο περιπτώσεις. Οι πειραματικές συνθήκες είναι όμοιες με αυτές που περιγράφονται στο Σχήμα 20.

Η κατασκευή του αυτοκόλλητου επιθέματος για τον προσδιορισμό των χλωριούχων απευθείας στον ανθρώπινο ιδρώτα φαίνεται στο **Σχήμα 32**. Αποτελείται από τρία κομμάτια (**Σχήμα 32-a,b,c)**: (i) έναν ελαστικό αυτοκόλλητο επίδεσμο μορφοποιημένο εσωτερικά στις διαστάσεις της ζώνης ανίχνευσης και των καναλιών υπερχείλισης με κοπή λέιζερ, (ii) τον υφασμάτινο μικρορευστονικό οπτικό αισθητήρα με την τροποποιημένη με Ag₂CrO₄ σε Tween-80 ζώνη ανίχνευσης και τα κανάλια υπερχείλισης εκατέρωθεν και (iii) μια κολλητική ταινία (Scotch 3M) μορφοποιημένη με διακορευτή διαμέτρου 6 mm, η αυτοκόλλητη πλευρά της οποίας καλύπτεται με ένα επανακολλούμενο κομμάτι λαδόκολλας για καλύτερο χειρισμό κατά τη διακόρευση και το χειρισμό της. Η αυτοκόλλητη πλευρά του επιδέσμου τοποθετείται στην μπροστινή πλευρά του αισθητήρα και η αυτοκόλλητη πλευρά του αυτοκόλλητικής ταινίας στην πίσω πλευρά του αισθητήρα. Η τελική κατασκευή του αυτοκόλλητου επιθέματος φαίνεται στα **Σχήματα 32-d** (μπροστινή όψη) και **32-e** (πίσω όψη).



Σχήμα 32: Επιμέρους τμήματα του αισθητήρα αυτοκόλλητου επιθέματος. Λεπτομέρειες δίνονται στο κείμενο.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 24**, οι καμπύλες αναφοράς των 4 και 5 μL, όταν δηλαδή το δείγμα δεν έχει «τρέξει» στα κανάλια υπερχείλισης, δε διαφέρουν ιδιαίτερα. Αντίθετα, σύμφωνα με τις εικόνες στο **Σχήμα 23**, όταν ο όγκος του δείγματος είναι μεγαλύτερος από 3 μL, η ροή του δείγματος στα κανάλια υπερχείλισης είναι ορατή. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η εμφάνιση του ιδρώτα στα κανάλια υπερχείλισης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη για τον υπολογισμό του όγκου του ιδρώτα στον αισθητήρα ώστε να αποκολληθεί και η ανάλυση της εικόνας, μετά από 5 λεπτά, να γίνει με την καμπύλη αναφοράς των 4 ή 5 mL. Η εφαρμογή του αισθητήρα αυτοκόλλητου επιθέματος στον πήχη ενός ανθρώπου και η ροή του ιδρώτα στα κανάλια υπερχείλισης φαίνεται στο **Σχήμα 33**.



Σχήμα 33: Απεικόνιση φορετού αισθητήρα στον πήχη ανθρώπου (α) κατά την επικόλλησή του, τα βελάκια υποδεικνύουν τα άδεια κανάλια υπερχείλισης και (β) μετά την επικόλληση του (πριν την αποκόλληση), τα βελάκια υποδεικνύουν την υπερχείλιση του δείγματος.

Τέλος, προκειμένου να αυξήσουμε τη «φορητότητα» του αισθητήρα αυτοκόλλητου επιθέματος, η λήψη των φωτογραφιών της ζώνης ανίχνευσης μπορεί να γίνει, αντί του επιτραπέζιου σαρωτή, με ένα κινητό τηλέφωνο στο φωτιζόμενο κλειστό θάλαμο που φαίνεται στο **Σχήμα 34**, όπου οι συνθήκες λήψης των φωτογραφιών (φωτισμός, απόσταση και γωνία λήψης) είναι απόλυτα επαναλήψιμες.



Σχήμα 34: Φορητός φωτιζόμενος κλειστός σκοτεινός θάλαμος για τη λήψη φωτογραφιών της ζώνης ανίχνευσης με (το συγκεκριμένο) κινητό τηλέφωνο υπό απόλυτα επαναλήψιμες συνθήκες φωτισμού, απόστασης και γωνίας λήψης.

8. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μια απλή, γρήγορη, οικονομική και μη επεμβατική χρωματομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό των ιόντων χλωρίου σε πραγματικά δείγματα ιδρώτα για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης, η οποία βασίζεται σε ένα μικρορευστονικό κανάλι εκτυπωμένο σε ύφασμα και τη χρωματική αλλαγή της ζώνης ανίχνευσης.

Η χρήση της αντίδρασης Mohr Ag₂CrO₄ (s) (καστανέρυθρο) + 2 Cl⁻ → 2 AgCl + CrO₄²⁻ (κίτρινο), και η επικάλυψη της ζώνης ανίχνευσης με Tween-80 παρουσιάζεται για πρώτη φορά και αποτελεί μια εξαιρετική εναλλακτική προσέγγιση για την αντικατάσταση του τοξικού υδραργύρου ή του υψηλού κόστους συστήματος χλωρανιλικού αργύρου- pHEMA, για τον προσδιορισμό των χλωριούχων στον ιδρώτα.

Σύμφωνα με τις μελέτες επικύρωσης της μεθόδου, τα αναλυτικά αποτελέσματα είναι αξιόπιστα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης.

Η εξαιρετικά υδρόφιλη στιβάδα του Tween-80 επιτρέπει τη λήψη ιδρώτα και από την πίσω πλευρά της μικρορευστονικής διάταξης και σε συνδυασμό με την κατασκευή που παρουσιάστηκε αναλυτικά στο κείμενο είναι εφικτή η κατασκευή
ενός αισθητήρα με τη μορφή αυτοκόλλητου επιθέματος, του οποίου η εφαρμογή και χρήση σε πραγματικές συνθήκες, στο σημείο περίθαλψης, είναι εφικτή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bandodkar, A.J., Gutruf, P., Choi, J., Lee, K., Sekine, Y., Reeder, J.T., Jeang, W.J., Aranyosi, A.J., Lee, S.P., Model, J.B., Ghaffari, R., Su, C., Leshock, J.P., Ray, T., Verrillo, A., Thomas, K., Krishnamurthi, V., Han, S., Kim, J., 2019. systems for simultaneous electrochemical, colorimetric, and volumetric analysis of sweat 1–16.
- Barben, J., 2005. Conductivity Determined By a New Sweat Analyzer Compared 183– 188.
- Bertolacini, R.J., 1958. Ultraviolet Spectrophotometric Determination of Sulfate , Chloride , and Fluoride with Chloranilic Acid 202–205.
- Blanchard, A.C., Waters, V.J., 2019. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease.
- Bugli, F., Martini, C., Di Vito, M., Cacaci, M., Catalucci, D., Gori, A., Iafisco, M., Sanguinetti, M., Vitali, A., 2022. Antimicrobial peptides for tackling cystic fibrosis related bacterial infections: A review. Microbiol. Res. 263, 127152. https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127152
- Calvopina, D.A., Lewindon, P.J., Ramm, L.E., Noble, C., Hartel, G.F., Leung, D.H., Ramm, G.A., 2022. Gamma-glutamyl transpeptidase-to-platelet ratio as a biomarker of liver disease and hepatic fibrosis severity in paediatric Cystic Fibrosis. J. Cyst. Fibros. 21, 236–242. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2021.10.014
- Carolina, A., Andrada, S., Brito, S., 2022. Journal of Food Composition and Analysis Determination of peroxide value in edible oils based on Digital Image Colorimetry 113. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104724
- Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M., Cassiman, J.J., Kerem, E., Durie, P., Tullis, E., Assael, B.M., Bombieri, C., Brown, A., Casals, T., Claustres, M., Cutting, G.R., Dequeker, E., Dodge, J., Doull, I., Farrell, P., Ferec, C., Girodon, E., Johannesson, M., Kerem, B., Knowles, M., Munck, A., Pignatti, P.F., Radojkovic, D., Rizzotti, P., Schwarz, M., Stuhrmann, M., Tzetis, M., Zielenski, J., Elborn, J.S., 2008.
 Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J. Cyst. Fibros. 7, 179–196. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.03.009
- Castellani, C., Massie, J., 2010. Emerging issues in cystic fibrosis newborn screening. Curr. Opin. Pulm. Med. 16, 584–590. https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32833e9e27
- Castellani, C., Southern, K.W., Brownlee, K., Dankert Roelse, J., Duff, A., Farrell, M., Mehta, A., Munck, A., Pollitt, R., Sermet-Gaudelus, I., Wilcken, B., Ballmann, M., Corbetta, C., de Monestrol, I., Farrell, P., Feilcke, M., Férec, C., Gartner, S., Gaskin, K., Hammermann, J., Kashirskaya, N., Loeber, G., Macek, M., Mehta, G., Reiman, A., Rizzotti, P., Sammon, A., Sands, D., Smyth, A., Sommerburg, O., Torresani, T., Travert, G., Vernooij, A., Elborn, S., 2009. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. J. Cyst. Fibros. 8, 153–173.

https://doi.org/10.1016/j.jcf.2009.01.004

- Choi, D.H., Thaxton, A., Jeong, I. cheol, Kim, K., Sosnay, P.R., Cutting, G.R., Searson, P.C., 2018. Sweat test for cystic fibrosis: Wearable sweat sensor vs. standard laboratory test. J. Cyst. Fibros. 17, e35–e38. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.03.005
- Choi, J., Chen, S., Deng, Y., Xue, Y., Reeder, J.T., Franklin, D., Oh, Y.S., Model, J.B., Aranyosi, A.J., Lee, S.P., Ghaffari, R., Huang, Y., Rogers, J.A., 2021. Skin-Interfaced Microfluidic Systems that Combine Hard and Soft Materials for Demanding Applications in Sweat Capture and Analysis 2000722, 1–9. https://doi.org/10.1002/adhm.202000722
- Collie, J.T.B., Massie, R.J., Jones, O.A.H., Cchem, M., Legrys, V.A., Ascp, M.T., Greaves, R.F., Rcpa, F., 2014. State of the Art Sixty-Five Years Since the New York Heat Wave : Advances in Sweat Testing for Cystic Fibrosis College of American Pathologists 117, 106–117. https://doi.org/10.1002/ppul.22945
- Dang, W., Manjakkal, L., Navaraj, W.T., Lorenzelli, L., Vinciguerra, V., Dahiya, R., 2018. Stretchable wireless system for sweat pH monitoring. Biosens.
 Bioelectron. 107, 192–202. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.025
- Dubot, P., Liang, J., Dubs, J., Missiak, Y., Sarazin, C., Couderc, F., Caussé, E., 2019.
 Sweat chloride quantification using capillary electrophoresis. Pract. Lab. Med.
 13, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.plabm.2018.e00114
- Ecftn, W.H.O., Ecfs, I.C.F.M.A., 2004. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis Report of a joint meeting of.
- Eleni Tzianni, 2023. Ελένη Τζιάννη.
- ELITechGroup.com [WWW Document], 2023.
- Emaminejad, S., Gao, W., Wu, E., Davies, Z.A., Yin, H., Nyein, Y., Challa, S., 2017. Autonomous sweat extraction and analysis applied to cystic fibrosis and glucose monitoring using a fully integrated wearable platform 1–6. https://doi.org/10.1073/pnas.1701740114
- Geng, Z., Miao, Y., Zhang, G., Liang, X., 2023. Colorimetric biosensor based on smartphone: State-of-art. Sensors Actuators A Phys. 349, 114056. https://doi.org/10.1016/j.sna.2022.114056
- Gibson, R., Cooke, L., 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis 1–4.
- Gokdemir, Y., Karadag, B.T., 2021. Sweat Testing and Recent Advances. Front. Pediatr. 9, 1–8. https://doi.org/10.3389/fped.2021.649904
- Gonzalo-Ruiz, J., Mas, R., de Haro, C., Cabruja, E., Camero, R., Alonso-Lomillo, M.A., Muñoz, F.J., 2009. Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat. Biosens. Bioelectron. 24, 1788–1791. https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.051

GraficNotes.com [WWW Document], 2023.

Gregu^{*}, M., Kubá, P., Pokojová, E., Sk^{*}, J., 2014. Double opposite end injection capillary electrophoresis with contactless conductometric detection for simultaneous determination of chloride, sodium and potassium in cystic fibrosis diagnosis 1358, 293–298. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.091

Hamilton, H., 1965. Houston Hamilton.

- Harvey, C., Weldon, S., Elborn, S., Downey, D.G., Taggart, C., 2022. The Effect of CFTR Modulators on Airway Infection in Cystic Fibrosis. Int. J. Mol. Sci. 23. https://doi.org/10.3390/ijms23073513
- He, X., Xu, T., Gu, Z., Gao, W., Xu, L., Pan, T., Zhang, X., 2019. Flexible and Superwettable Bands as a Platform toward Sweat Sampling and Sensing 8–12. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05875
- Hernando, E., Trigo, M., Iturbe, D., Quesada, R., Garcı, M., 2018. quantification of chloride in human sweat . 3735–3741. https://doi.org/10.1039/c8tb00682b
- HunterLab.com [WWW Document], 2023.
- Ibraheem, N. a, Hasan, M.M., Khan, R.Z., Mishra, P.K., 2012. Understanding Color Models : A Review. ARPN J. Sci. Technol. 2, 265–275.
- Iwasaki Iwaji, S.U. and T.O., 1952. New Colorimetric Determination of Chloride using Mercuric Thio- cyanate and Ferric Ion (1) By IWaji IWASAKI, Satori UTSUMI and Takejiro OZAWA 2261.
- J. E Barney, Bertolacini, R.J., 1957. Colorimetric Determination of Chloride with Mercuric Chloranilate 29, 0–1.
- Keith, B.H., Turcios, N.L., 1994. Clinical evaluation of the macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis.
- Kim, S.B., Nyberg, N., Hourlier-fargette, A., Model, B., 2019. Soft, Skin-Integrated Multifunctional Micro fl uidic Systems for Accurate Colorimetric Analysis of Sweat Biomarkers and Temperature. https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01218
- Koh, A., Kang, D., Xue, Y., Lee, S., Pielak, R.M., Kim, J., Hwang, T., Min, S., Banks, A., Bastien, P., Manco, M.C., Wang, L., Ammann, K.R., Jang, K., Won, P., Han, S., Ghaffari, R., Paik, U., Slepian, M.J., Balooch, G., Huang, Y., Rogers, J.A., 2016. A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and colorimetric sensing of sweat 165, 1–14.
- Kwon, K., Kim, J.U., Deng, Y., Krishnan, S.R., Choi, J., Jang, H., Lee, K., Su, C., Yoo, I.,
 Wu, Y., Lipschultz, L., Kim, J., Chung, T.S., Wu, D., Park, Y., Kim, T., 2021. sweat
 in real time. Nat. Electron. 4. https://doi.org/10.1038/s41928-021-00556-2

LearnUiDesignBlog.com [WWW Document], 2023.

Legner, C., Kalwa, U., Patel, V., Chesmore, A., Pandey, S., 2019. Sweat sensing in the

smart wearables era: Towards integrative, multifunctional and body-compliant perspiration analysis. Sensors Actuators, A Phys. 296, 200–221. https://doi.org/10.1016/j.sna.2019.07.020

- Li, Y., Cutting, G.R., Peter, C., Li, Y., Cutting, G.R., Searson, P.C., 2017. A wearable potentiometric sensor with integrated salt bridge for sweat chloride measurement. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.129
- Loken, H.F., Lamb, J.D., 2014. An improved automated method for serum chloride 1– 3. https://doi.org/10.1093/clinchem/26.8.1233
- Lopez-Avila, V., Hill, H.H., 1997. Field Analytical Chemistry. Anal. Chem. 69, 289–306. https://doi.org/10.1021/a19700121
- Lopez-Ruiz, N., Curto, V.F., Erenas, M.M., Benito-Lopez, F., Diamond, D., Palma, A.J., Capitan-Vallvey, L.F., 2014. Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices. Anal. Chem. 86, 9554–9562. https://doi.org/10.1021/ac5019205
- Lyu, F., 2021. Color design in application interfaces for children 507–517. https://doi.org/10.1002/col.22726
- Mal, M., Itterheimov, P., Vinohradsk, J., 2021. 3D Printed Skin-Wash Sampler for Sweat Sampling in Cystic Fibrosis Diagnosis Using Capillary Electrophoretic Ion Ratio Analysis.
- Mastella, G., Cesare, G. Di, Borruso, A., Menin, L., Zanolla, L., 2000. Reliability of sweat-testing by the Macroduct 1 collection method combined with conductivity analysis in comparison with the classic Gibson and Cooke technique 933–937.
- Mattar, A.C.V., Leone, C., Rodrigues, J.C., Adde, F.V., 2014. Sweat conductivity: An accurate diagnostic test for cystic fibrosis? J. Cyst. Fibros. 13, 528–533. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.01.002
- Matteis, V. De, Cannavale, A., Blasi, L., Quarta, A., Gigli, G., 2016. Sensors and Actuators B : Chemical Chromogenic device for cystic fibrosis precocious diagnosis : A " point of care " tool for sweat test 225, 474–480.
- Mechanism of the Reaction between Dichromate and Diphenylcarbazide, 1952. 347, 1952.
- Merchant, M., 2009. Miniaturization of a chloride ion assay for use in a microtiter format. Microchem. J. 92, 80–82. https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.01.002
- Noviana, E., Ozer, T., Carrell, C.S., Link, J.S., McMahon, C., Jang, I., Henry, C.S., 2021. Microfluidic Paper-Based Analytical Devices: From Design to Applications. Chem. Rev. 121, 11835–11885. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01335
- Op, C.D., Allen, R., Science, O.F., 1957. Colorimetric determination of chloride.
- Ozturk, M., Baran, M., Latifoğlu, F., 2022. Beyond the colors: enhanced deep learning on invasive ductal carcinoma. Neural Comput. Appl. 34, 18953–18973.

https://doi.org/10.1007/s00521-022-07478-w

- Park, J.H., Park, E.K., Cho, Y.K., Shin, I.S., Lee, H., 2022. Normalizing the Optical Signal Enables Robust Assays with Lateral Flow Biosensors. ACS Omega 7, 17723– 17731. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00793
- Parrilla, M., Ortiz-Gómez, I., Cánovas, R., Salinas-Castillo, A., Cuartero, M., Crespo, G.A., 2019. Wearable Potentiometric Ion Patch for On-Body Electrolyte Monitoring in Sweat: Toward a Validation Strategy to Ensure Physiological Relevance. Anal. Chem. 91, 8644–8651. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02126
- Pflaum, R.T., Howick, L.C., Howick, L.C., 1954. The Chromium-Diphenylcarbazide Reaction1 78, 4862–4866.
- Phuangsaijai, N., Jakmunee, J., Kittiwachana, S., 2021. Investigation into the predictive performance of colorimetric sensor strips using RGB, CMYK, HSV, and CIELAB coupled with various data preprocessing methods : a case study on an analysis of water quality parameters 9.
- Raina, M.A., Khan, M.S., Malik, S.A., Raina, A.H., Makhdoomi, M.J., Bhat, J.I., Mudassar, S., 2016. Assessment of correlation between sweat chloride levels and clinical features of cystic fibrosis patients. J. Clin. Diagnostic Res. 10, BC01– BC06. https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/21526.8951
- Ratjen, F., Bell, S.C., Rowe, S.M., Goss, C.H., Alexandra, L., 2020. Cystic fibrosis 1–44. https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.10.Cystic
- RawPedia.com [WWW Document], 2023.
- Rock, M.J., Makholm, L., Eickhoff, J., 2014. A new method of sweat testing: The CF Quantum[®]sweat test. J. Cyst. Fibros. 13, 520–527. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.05.001
- Roda, A., Michelini, E., Zangheri, M., Di, M., Calabria, D., Simoni, P., 2016. Trends in Analytical Chemistry Smartphone-based biosensors : A critical review and perspectives. Trends Anal. Chem. 79, 317–325. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.019
- Rueegg, C.S., Kuehni, C.E., Gallati, S., Jung, A., Casaulta, C., 2019. Comparison of two sweat test systems for the diagnosis of cystic fibrosis in newborns 264–272. https://doi.org/10.1002/ppul.24227
- Sanik, J.G.B.J., 1957. Determination of Trace Amounts of Chlorine in Naphtha 29, 241–243.
- Schales, O., Schales, S.S., 1941. Determination of Chloride. J. Biol. Chem. 140, 879– 884. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)72872-X
- Sekine, S.Y., Rogers, J.A., Sugita, T., Wu, Y., Lee, Kunhyuck, Lee, Kyu-tae, 2018. As featured in : Lab on a Chip and smartphone imaging module for in situ. https://doi.org/10.1039/c8lc00530c

- Shamoi, P., 2022. Comparative Overview of Color Models for Content-Based Image Retrieval.
- Smyth, A.R., Bell, S.C., Bojcin, S., Bryon, M., Duff, A., Flume, P., Kashirskaya, N., Munck, A., Ratjen, F., Schwarzenberg, S.J., Sermet-Gaudelus, I., Southern, K.W., Taccetti, G., Ullrich, G., Wolfe, S., 2014. European cystic fibrosis society standards of care: Best practice guidelines. J. Cyst. Fibros. 13, S23–S42. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.03.010
- Soft, S., Kim, S.B., Zhang, Y., Won, S.M., Bandodkar, A.J., Sekine, Y., Xue, Y., Koo, J., Harshman, S.W., Martin, J.A., Park, J.M., Ray, T.R., Crawford, K.E., Lee, K., Choi, J., Pitsch, R.L., Grigsby, C.C., Strang, A.J., Chen, Y., Xu, S., Kim, J., Koh, A., Ha, J.S., Huang, Y., Kim, S.W., Rogers, J.A., 2018. Super-Absorbent Polymer Valves and Colorimetric Chemistries 1703334, 1–11. https://doi.org/10.1002/smll.201703334
- Taghizadeh-Behbahani, M., Hemmateenejad, B., Shamsipur, M., Tavassoli, A., 2019. A paper-based length of stain analytical device for naked eye (readout-free) detection of cystic fibrosis. Anal. Chim. Acta 1080, 138–145. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.050
- Wagener, J.S., Zemanick, E.T., Sontag, M.K., 2012. Newborn screening for cystic fibrosis. Curr. Opin. Pediatr. 24, 329–335. https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328353489a
- Wang, B., Li, Y., Zhou, M., Han, Y., Zhang, M., Gao, Z., Liu, Z., Chen, P., Du, W., Zhang, X., Feng, X., Liu, B., 2023. Smartphone-based platforms implementing micro fl uidic detection with image-based arti fi cial intelligence. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36017-x
- Webster, H.L., Quirante, C.G., 2000. Micro-flowcell conductometric sweat analysis for cystic fibrosis diagnosis. Ann. Clin. Biochem. 37, 399–407. https://doi.org/10.1258/0004563001899348
- Whitesides, G.M., 2006. The origins and the future of microfluidics. Nature 442, 368– 73. https://doi.org/10.1038/nature05058
- Woolf, M.S., Dignan, L.M., Scott, A.T., Landers, J.P., 2021. Digital postprocessing and image segmentation for objective analysis of colorimetric reactions. Nat. Protoc. 16, 218–238. https://doi.org/10.1038/s41596-020-00413-0
- Yalamati, P., Bhongir, A.V., Karra, M., Beedu, S.R., 2015. Comparative Analysis of Urinary Total Proteins by Bicinchoninic Acid and Pyrogallol Red Molybdate Methods 23215, 1–4. https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13543.6313
- Yin, J., Li, J., Reddy, V.S., Ji, D., Ramakrishna, S., Xu, L., 2023. Flexible Textile-Based Sweat Sensors for Wearable Applications. Biosensors 13, 1–26. https://doi.org/10.3390/bios13010127
- Zall, D.M., Fisher, D., Garner, M.Q., 1956. Photometric Determination of Chlorides in Water. Anal. Chem. 28, 1665–1668. https://doi.org/10.1021/ac60119a009

Zhang, C., Kim, J.P., Creer, M., Yang, J., Liu, Z., 2017. A smartphone-based

chloridometer for point-of-care diagnostics of cystic fibrosis. Biosens. Bioelectron. 97, 164–168. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.048

- Zhao, Z., Li, Q., Chen, L., Zhao, Y., Gong, J., 2021. Lab on a Chip and monitoring ⁺. Lab Chip 21, 916–932. https://doi.org/10.1039/D0LC01075H
- Ευρωπαϊκό, Κοινοβούλιο, 2020. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2017/852 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟ για τον υδράργυρο και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1102/2008 [WWW Document].

Ορφανάκος, Β., 2004. ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ, Βασικές Αρχές.

Προδρομίδης, Μ., 2013. Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες και Βιοαισθητήρες.

Παρουσίαση σε διεθνή συνέδρια

Eleni I. Tzianni, Dimitra K. Mylonidou, Mamas I. Prodromidis, *Wax Screen-Printed Fabric-based Colorimetric Microfluidic Wearable (Bio)sensors for the Determination of Biomarkers in Sweat*, 18th ESEAC, 5-8 Ιουνίου 2022, Βίλνιους, Λιθουανία, Προφορική Ανακοίνωση.