



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας Ι: Χημικών Επιστημών
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

Ανάπτυξη νέων υλικών ως υποστρώματων για την
ανίχνευση μορίων με τη μέθοδο επιφανειακής
ενίσχυσης της σκέδασης Raman [Surface Enhanced
Raman Spectroscopy (SERS)]

Διπλωματική Εργασία
Κουσούλη Έλλη Μαρίνα

Επιβλέπουσα: Αναστασία Δέτση
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Οκτώβριος 2021

Ευχαριστίες

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αναστασία Δέτση, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτού του θέματος και για την καθοδήγησή της καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του Ε.Μ.Π, Δημήτρη Κουκουζέλη για την στήριξή του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, τη λήψη και αποτίμηση των φασμάτων Raman και την συνολική συμβολή στον σχεδιασμό και την οργάνωση της διπλωματικής εργασίας.

Επιπροσθέτως οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την πολύτιμη βοήθειά τους και την αρμονική συνεργασία που υπήρχε στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κα. Ζαμπία Κατσανεβάκη ΕΕΔΙΠ (ΙΙ) του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του Ε.Μ.Π, για την βοήθεια και την υποστήριξή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για την στήριξη και την υπομονή της, όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Go raibh míle maith agaibh.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια η επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS), μια μη καταστρεπτική και ευαίσθητη αναλυτική τεχνική, χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση χημικών ουσιών μέσω ηλεκτρομαγνητικών και χημικών φαινομένων. Η εύρεση κατάλληλων υποστρωμάτων με ευκολία χρήσης και επαναληψιμότητα είναι επίπονη διαδικασία. Τα νανοσωματίδια αργύρου χρησιμοποιούνται εκτενώς ως υπόστρωμα SERS καθώς εμφανίζουν φαινόμενο συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance absorption, SPR), το οποίο θεωρείται πως ενισχύει την ένταση του σήματος Raman, παρασκευάζονται με απλές διαδικασίες και έχουν σημαντική κολλοειδή σταθερότητα.

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη και η βελτιστοποίηση της σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου από ιοντικό υγρό για την χρήση τους ως υπόστρωμα SERS στην ανίχνευση της δισφαινόλης Α. Η δισφαινόλη Α (Bisphenol A, BPA) είναι οργανική ένωση που χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία των πλαστικών και εντοπίζεται σε πλαστικά ποτήρια, ως εσωτερική επίστρωση σε σωλήνες νερού και σε μεταλλικά σκευάσματα τροφίμων. Συνδέεται με επικίνδυνες επιπτώσεις στην υγεία όπως δυσλειτουργία της αναπαραγωγής, αποβολές και καρκίνο του μαστού. Λόγω της ικανότητάς της να διεισδύει από τα τοιχώματα του προϊόντος στο τρόφιμο είναι σημαντική η εύρεση μεθόδων ελέγχου των επιπέδων BPA σε προϊόντα κατανάλωσης.

Εφαρμόστηκε πράσινη μεθοδολογία για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων, μέσω της αναγωγής του νιτρικού αργύρου με τη χρήση ιοντικού υγρού ως αναγωγικός και προστατευτικός παράγοντας και της χιτοζάνης, η οποία είχε σταθεροποιητικό ρόλο και πιθανόν προέτρεπε την ανομοιομορφη ανάπτυξη των νανοσωματιδίων.

Αρχικά μελετήθηκαν δύο είδη ιοντικών υγρών για την παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου, το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (**IY1**) και το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (**IY2**). Τα παραγόμενα νανοσωματίδια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν το σήμα Raman της δισφαινόλης Α. Τα νανοσωματίδια που παράχθηκαν από το **IY1** δεν ήταν αποτελεσματικό υπόστρωμα SERS, ενώ τα νανοσωματίδια από το **IY2** συνέβαλλαν στην ανίχνευση υψηλής συγκέντρωσης της ουσίας.

Επομένως επιλέχθηκε η βελτιστοποίηση των νανοσωματιδίων παρασκευασμένα από το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (**IY2**) για την ανίχνευση χαμηλότερων συγκεντρώσεων δισφαινόλης Α. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός τύπου Box-Behnken ο οποίος υπέδειξε την πραγματοποίηση 14 πειραμάτων

για τη μελέτη της επίδρασης τριών ανεξάρτητων μεταβλητών στο μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων, καθώς και την ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση της δισφαινόλης A που μπορεί να ανιχνευτεί με αυτά τα νανοσωματίδια. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές ήταν η ποσότητα του διαλύματος του μεταλλικού άλατος (AgNO_3), του ιοντικού υγρού (ασκορβικό 2- υδροξυαιθυλαμμώνιο) και η περιεκτικότητα σε χιτοζάνη (%w/v).

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προέκυψαν μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν την εξάρτηση των αποκρίσεων από τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Μέσω της φασματοσκοπίας Raman μελετήθηκαν τα παραγόμενα νανοσωματίδια αργύρου ως υποστρώμα SERS.

Τελικά, η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση δισφαινόλης A ήταν 0.09 mM (20 $\mu\text{g/ml}$), σε διάλυμα αιθανόλης, με τη χρήση των νανοσωματιδίων των πειραμάτων 2 και 9. Τα νανοσωματίδια του πειράματος 2 είχαν μέγεθος 107.3 ± 2.1 nm, δείκτη PDI 0.232 ± 0.02 και ζ-δυναμικό $+18.3 \pm 1.0$ mV, ενώ του πειράματος 9 είχαν μέγεθος 135.3 ± 4.6 nm, δείκτη PDI 0.284 ± 0.021 και ζ-δυναμικό $+21.6 \pm 0.3$ mV.

Λέξεις-Κλειδιά: Νανοσωματίδια αργύρου, Δισφαινόλη A, Ιοντικό Υγρό, Επιφανειακή Ενίσχυση Σκέδασης Raman, Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken

Abstract

In recent years, Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), a non-destructive and sensitive analytical technique, has been widely used to detect and identify chemical compounds through electromagnetic and chemical phenomena. Finding suitable substrates with ease of use and repeatability can be a laborious process. Silver nanoparticles are widely used as SERS substrate as they can exhibit Surface Plasmon Resonance absorption (SPR), which is considered to amplify the Raman signal intensity, and are prepared by simple procedures with significant colloidal stability.

The object of the present study was the synthesis and optimization of silver nanoparticles from ionic liquid for their use as SERS substrate in the detection of bisphenol A. Bisphenol A (BisphenolA, BPA) is an organic compound widely used in the plastics industry as packaging, as an inner coating on water pipes and metal food packaging. It is associated with dangerous health effects such as reproductive dysfunction, miscarriage, and breast cancer. Due to its ability to diffuse from the packaging into the food, it's consequential to find methods to detect BPA levels in consumer products.

A green methodology was applied for the synthesis of nanoparticles through the reduction of silver nitrate using ionic liquid as a reducing and protective agent and chitosan, which had a stabilizing role and possibly stimulated the uneven growth of nanoparticles.

Two types of ionic liquids were initially studied for the preparation of silver nanoparticles, 2-hydroxyethylammonium citrate (IL1) and 2-hydroxyethylammonium ascorbate (IL2). The nanoparticles produced were tested for their ability to amplify the Raman signal of bisphenol A. The nanoparticles produced by IL1 were not an effective SERS substrate, while the nanoparticles from IL2 contributed to the detection of high concentrations of the substance.

Therefore, the nanoparticles produced from 2-hydroxyethyl ammonium ascorbate (IL2) were chosen to be optimized for the detection of lower concentrations of bisphenol A. For this purpose, the experimental design used was type Box-Behnken, which recommended a total of 14 experiments to be conducted to study the effect of three independent variables on the size, polydispersity index, and ζ -potential of nanoparticles, as well as the minimum possible concentration of bisphenol A which can be detected with these nanoparticles. The independent variables of the design were the amount of silver nitrate solution (AgNO_3), ionic liquid solution (2-hydroxyethylammonium ascorbate) and the chitosan content (% w/v).

Mathematical models were applied to describe the dependence of the responses on the independent variables. The generated silver nanoparticles were used as SERS substrate for Raman spectroscopy.

Finally, the minimum detectable concentration of bisphenol A was 0.09 mM (20 μ g/ml), in ethanol solution, using the nanoparticles of experiments 2 and 9. The nanoparticles of experiment 2 had a size of 107.3 ± 2.1 nm, PDI index 0.232 ± 0.02 and ζ -potential $+18.3 \pm 1.0$ mV, while those of experiment 9 had a size of 135.3 ± 4.6 nm, PDI index 0.284 ± 0.021 and ζ -potential $+21.6 \pm 0.3$ mV.

Key-words: Silver nanoparticles, Bisphenol A, Ionic Liquid, Surface-Enhanced Raman Scattering, Box-Behnken design

Περιεχόμενα

	Σελ.
Ευχαριστίες	i
Περίληψη	ii
Abstract	iv
Κατάλογος Σχημάτων	x
Κατάλογος Πινάκων	xiii
1 Εισαγωγή	1
1.1 Νανοτεχνολογία	1
1.1.1 Μεταλλικά νανοσωματίδια - Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων	1
1.1.2 Νανοσωματίδια αργύρου	1
1.1.3 Μέθοδοι παρασκευής	2
1.2 Ιοντικά Υγρά	3
1.2.1 Πρωτικά Ιοντικά Υγρά	4
1.2.2 Ιοντικά Υγρά Ειδικής Αποστολής	5
1.2.3 Παρασκευή νανοσωματιδίων απο Ιοντικά Υγρά	5
1.3 Χιτοζάνη	6
1.4 Φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση	8
1.4.1 Φασματοσκοπία Raman	8
1.4.1.1 Οργανολογία	9
1.4.1.2 Εφαρμογές	11
1.4.2 Φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση (SERS)	11

1.4.2.1	Επίδραση μεγέθους των νανοσωματιδίων στο σήμα του SERS	13
1.4.2.2	Επίδραση σχήματος των νανοσωματιδίων στο σήμα του SERS	14
1.5	Δισφαινόλη Α (Bisphenol A, BPA)	15
2	Μέθοδοι ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων αργύρου	18
2.1	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	18
2.1.1	Μέγεθος Νανοσωματιδίων	18
2.1.2	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	19
2.1.3	ζ-δυναμικό	19
2.2	Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)	20
2.2.1	Νανοσωματίδια αργύρου και UV-Vis	21
3	Πειραματικός Σχεδιασμός	23
4	Υλικά και Μέθοδοι	25
4.1	Σκοπός	25
4.2	Υλικά	25
4.3	Όργανα και συσκευές	26
4.4	Μέθοδοι	27
4.4.1	Παρασκευή Ιοντικών Υγρών, (IY)	27
4.4.1.1	Κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (IY1)	27
4.4.1.2	Ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (IY2)	28
4.4.2	Παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου	29
4.4.2.1	Παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου από κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (IY1)	30
4.4.3	Πειραματικός Σχεδιασμός - Βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής νανοσωματιδίων αργύρου	31
4.4.4	Χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων	32
4.4.4.1	Χαρακτηρισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού	32

4.4.4.2	Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)	33
4.4.4.3	Φασματοσκοπία Raman	33
5	Αποτελέσματα-Συζήτηση αποτελεσμάτων	34
5.1	Νανοσωματίδια αργύρου από ΓΥ κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο	34
5.1.1	Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	34
5.1.2	Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman	36
5.2	Νανοσωματίδια αργύρου από ΓΥ ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο	36
5.2.1	Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman	36
5.3	Πειραματικός σχεδιασμός - Experimental Design	38
5.3.1	Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	38
5.3.2	Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)	40
5.3.3	Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων αργύρου	42
5.3.3.1	Μοντέλο πρόβλεψης μεγέθους (size) νανοσωματιδίων αργύρου	42
5.3.3.2	Μοντέλο πρόβλεψης δείκτη πολυδιασποράς (PDI) νανοσωματιδίων αργύρου	46
5.3.3.3	Μοντέλο πρόβλεψης ζ-δυναμικού (Zeta) νανοσωματιδίων αργύρου	49
5.3.4	Ανίχνευση Δισφαινόλης Α μέσω φασματοσκοπίας Raman με τη χρήση νανοσωματιδίων αργύρου ως υπόστρωμα SERS	50
5.3.5	Μοντέλο πρόβλεψης ανίχνευσης ελάχιστης συγκέντρωσης δισφαινόλης Α με τη χρήση νανοσωματιδίων αργύρου ως υπόστρωμα SERS (Raman thresh)	55
6	Συμπεράσματα	59
	Βιβλιογραφία	65

Κατάλογος Σχημάτων

1.1	Σχηματική απεικόνιση σχηματισμού AgNPs μέσω μεθόδου "bottom up"	2
1.2	Οι αρχές της σύνθεσης των AgNPs	3
1.3	Συνήθη κατιόντα και ανιόντα στα ιοντικά υγρά	4
1.4	Απεικόνιση ομάδων ιόντων ιοντικού υγρού που σχηματίζουν προστατευτική διπλοστιβάδα γύρω από ένα θετικά φορτισμένο νανοσωματίδιο	6
1.5	Δομή της χιτοζάνης	7
1.6	Εικόνες SEM (Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης) νανοσωματιδίων αργύρου με μορφολογία λουλουδιού (mesoflowers)	7
1.7	Εικόνες SEM νανοσωματιδίων αργύρου για σταθερή ποσότητα AgNO ₃ (60 μL, 1.0 M) και διαφορετικές συγκεντρώσεις χιτοζάνης	8
1.8	Φαινόμενα ελαστικής (Rayleigh) και ανελαστικής σκέδασης (Raman)	9
1.9	Φαινόμενα σκέδασης Raman: Stokes και anti-Stokes	9
1.10	Διάγραμμα φασματόμετρου Raman	10
1.11	Εύρος μεγέθους των AgNPs που παράγονται σε θερμοκρασία δωματίου από διαφορετικές πηγές	14
1.12	Δομή της δισφαινόλης A	16
1.13	Αντίδραση σχηματισμού BPA	16
2.1	Μέθοδος υπολογισμού ζ-δυναμικού. Διακρίνονται στην εικόνα η εσωτερική και εξωτερική στιβάδα, καθώς και η στιβάδα ολίσθησης	19
2.2	Φασματόμετρα UV-Vis απλής και διπλής δέσμης	21
3.1	Σχηματική αναπαράσταση πειραμάτων Box Behnken για 3 μεταβλητές σχεδιασμού	24
4.1	Αντίδραση παρασκευής ΙΥ από ασκορβικό οξύ και αιθανολαμίνη Koukouzelis et al., 2020.	27
4.2	Εξάτμιση του ΙΥ1 στον περιστροφικό εξατμιστήρα.	28
4.3	Το ΙΥ1 στην αντλία κενού.	28
4.4	Ιοντικό υγρό 1 (ΙΥ1).	28
4.5	Τελική μορφή ΙΥ1.	28
4.6	Εξάτμιση του ΙΥ2 στον περιστροφικό εξατμιστήρα.	29
4.7	Το Ιοντικό υγρό 2 στην αντλία κενού.	29
4.8	Διαδικασία σύνθεσης AgNPs στον απαγωγό.	29
4.9	Κολλοειδές διάλυμα AgNPs.	29
5.1	Ανάλυση ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων αργύρου από το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (ΙΥ1).	35
5.2	Φάσμα Raman της ροδαμίνης B συγκέντρωσης 10 ⁻⁸ M με τα νανοσωματίδια παρασκευασμένα από ΙΥ κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο.	36

5.3	Φάσμα Raman της δισφαινόλης A συγκέντρωσης 50 mg/ml με χρήση των νανοσωματιδίων από ΓΥ ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο.	37
5.4	Ανάλυση ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων αργύρου που παρασκευάστηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 2).	38
5.5	Ανάλυση μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 2).	38
5.6	Φάσμα UV-Vis νανοσωματιδίων αργύρου που παρασκευάστηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 2).	40
5.7	Φάσμα UV-Vis νανοσωματιδίων αργύρου που παρασκευάστηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 9).	40
5.8	Φάσμα UV-Vis νανοσωματιδίων αργύρου που παρασκευάστηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 2) από 200 έως 500 nm.	41
5.9	Φάσμα UV-Vis ιοντικού υγρού ΓΥ1 (ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο).	41
5.10	Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 1η απόκριση (μέγεθος νανοσωματιδίων αργύρου).	42
5.11	Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 1η απόκριση (μέγεθος νανοσωματιδίων αργύρου).	43
5.12	Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 1ης απόκρισης (μέγεθος νανοσωματιδίων αργύρου).	43
5.13	3D επιφάνεια του μεγέθους των νανοσωματιδίων συναρτήσει των μεταβλητών A (ποσότητα του νιτρικού αργύρου) και C (περιεκτικότητα χιτοζάνης (% w/v CS)), για ελάχιστη ποσότητα ΓΥ, B=150 μl).	44
5.14	3D επιφάνεια του μεγέθους των νανοσωματιδίων συναρτήσει των μεταβλητών A (ποσότητα του νιτρικού αργύρου) και B (ποσότητα ΓΥ) για μέγιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης (% w/v CS).	45
5.15	Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 2η απόκριση (δείκτης πολυδιασποράς PDI νανοσωματιδίων αργύρου).	46
5.16	Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 2η απόκριση (δείκτης πολυδιασποράς PDI νανοσωματιδίων αργύρου).	46
5.17	Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 2ης απόκρισης (δείκτης πολυδιασποράς PDI νανοσωματιδίων αργύρου).	47
5.18	3D επιφάνεια του δείκτη πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων συναρτήσει των μεταβλητών A (ποσότητα του νιτρικού αργύρου) και C (περιεκτικότητα χιτοζάνης) για μέγιστη ποσότητα ΓΥ (250 μl).	48
5.19	Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 3η απόκριση (ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων αργύρου).	49
5.20	Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 3η απόκριση (δείκτης πολυδιασποράς νανοσωματιδίων αργύρου).	49
5.21	Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 3ης απόκρισης (ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων αργύρου).	50
5.22	Εικόνα απο το μικροσκόπιο Raman του κolloειδούς συστήματος νανοσωματιδίων αργύρου με την δισφαινόλη A.	51
5.23	Φάσματα Raman της δισφαινόλης A συγκέντρωσης 200 mg/ml με υπόστρωμα τα νανοσωματίδια των πειραμάτων 2 και 9.	52
5.24	Φάσματα Raman της δισφαινόλης A συγκέντρωσης 50 mg/ml με υπόστρωμα τα νανοσωματίδια των πειραμάτων 2 και 9.	52

5.25	Φάσματα Raman της δισφαινόλης A συγκέντρωσης 20 mg/ml με υπόστρωμα τα νανοσωματίδια των πειραμάτων 2 και 9.	52
5.26	Σύγκριση των φασμάτων Raman νανοσωματιδίων πειραμάτων 2, 9 και 10 για συγκέντρωση BPA 200 μg/ml.	53
5.27	Σύγκριση των φασμάτων Raman νανοσωματιδίων με διαφορετικό μέγεθος (9, 14 και 11) για συγκέντρωση BPA 50 μg/ml.	53
5.28	Σύγκριση των φασμάτων Raman νανοσωματιδίων με διαφορετικό δείκτη πολυδιασποράς (1, 2 και 11) για συγκέντρωση BPA 200 μg/ml.	54
5.29	Σύγκριση των φασμάτων Raman νανοσωματιδίων με διαφορετικό ζ-δυναμικό (2, 3 και 4) για συγκέντρωση BPA 200 μg/ml.	54
5.30	Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 4η απόκριση (συγκέντρωση ανίχνευσης BPA).	55
5.31	Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 4η απόκριση (συγκέντρωση ανίχνευσης BPA).	55
5.32	Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 4η απόκριση (συγκέντρωση ανίχνευσης BPA).	56
5.33	3D επιφάνεια της ελάχιστης συγκέντρωσης BPA που ανιχνεύεται, με υπόστρωμα SERS τα νανοσωματίδια αργύρου, συναρτήσει των μεταβλητών A (ποσότητα του νιτρικού αργύρου) και C (περιεκτικότητα χιτοζάνης) για μέγιστη ποσότητα ΙΥ (250 μl).	57

Κατάλογος Πινάκων

4.1	Παραγόμενα νανοσωματίδια αργύρου από Υ1 με 0.1%w/v χιτοζάνης (CS) σε 2% ασκορβικό οξύ.	31
4.2	Αντιστοίχιση των μεταβλητών στο πρόγραμμα Design Expert.	31
4.3	Τα 14 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό για την παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου.	32
5.1	Αποτελέσματα δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) για τα νανοσωματίδια αργύρου που παρασκευάστηκαν από το κίτρινο 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (Υ1).	34
5.2	Αποτελέσματα δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) για τα νανοσωματίδια των 14 πειραμάτων που παρασκευάστηκαν από το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο.	39
5.3	Αποτελέσματα ανίχνευσης BPA με τη χρήση νανοσωματιδίων αργύρου ως υπόστρωμα SERS.	51

1. Εισαγωγή

1.1 Νανοτεχνολογία

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας είναι ραγδαία και έχει εφαρμογές σε πολλούς κλάδους. Η μεγάλη ανάπτυξή της οφείλεται στο γεγονός ότι οι ιδιότητες πολλών συμβατικών υλικών αλλάζουν όταν σχηματίζονται από νανοσωματίδια. Εξαιτίας του μεγέθους τους (της τάξης του 10^{-9}) έχουν μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια και μεγαλύτερο λόγο επιφάνειας/όγκο. Με τα χαρακτηριστικά αυτά εμφανίζουν ενδιαφέρουσες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες οι οποίες τα κάνουν ελκυστικά για χρήση σε ποικίλους τομείς Silva et al., 2016.

1.1.1 Μεταλλικά νανοσωματίδια - Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων

Τα νανοσωματίδια που προσελκύουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι τα μεταλλικά. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια εμφανίζουν βελτιωμένες οπτικές ιδιότητες εξαιτίας του ηλεκτρομαγνητικού φαινομένου που δημιουργείται κατά την αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με το φως, το οποίο ονομάζεται τοπικός συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) Rucha et al., 2012; Ammari et al., 2016.

Τα ηλεκτρόνια των μεταλλικών νανοσωματιδίων υπόκεινται σε συντονισμό και γι'αυτό λέγονται επίσης επιφανειακά πλασμόνια. Η διέγερση των επιφανειακών πλασμονίων ενισχύει την απορρόφηση και τη σκέδαση της ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα τα μεταλλικά νανοσωματίδια να εμφανίζουν οπτικές ιδιότητες που τα καθιστούν χρήσιμα σε μεγάλο εύρος εφαρμογών Rucha et al., 2012; Ammari et al., 2016.

1.1.2 Νανοσωματίδια αργύρου

Από τα μεταλλικά νανοσωματίδια, αυτά που έχουν ευρέως εφαρμογή και έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών είναι τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs). Τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν λάβει ιδιαίτερη προσοχή λόγω των ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν εφαρμόσιμα σε πολλούς τομείς. Χρησιμοποιούνται στην βιοϊατρική, την βιομηχανία τροφίμων, την γεωργία και σε περιβαλλοντικές εφαρμογές Silva et al., 2016; Pryshchepa et al., 2020. Εμφανίζουν σημαντικές οπτικές ιδιότητες, υψηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα και χαμηλό σημείο τήξης και βρασμού, ενώ έχουν επίσης

αντιμικροβιακή δράση Pryshchepa et al., 2020; Srikar et al., 2016.

Λόγω των ισχυρών ταλαντώσεων συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance Oscillations) δίνεται η δυνατότητα χρήσης τους σε προχωρημένες αναλυτικές τεχνικές όπως στην φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση (Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS). Έχουν ευρεία εφαρμογή στην ιατρική ως μέσα ανίχνευσης βιολογικών μορίων, στην διάγνωση καρκινικών κυττάρων και ως νανο-μεταφορείς φαρμάκων. Ταυτόχρονα χρησιμοποιούνται στην βιολογία ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, σε περιβαλλοντικές εφαρμογές όπως στην επεξεργασία νερού και σε ηλεκτρονικές συσκευές Rucha et al., 2012; Ammari et al., 2016; Pryshchepa et al., 2020; Srikar et al., 2016.

1.1.3 Μέθοδοι παρασκευής

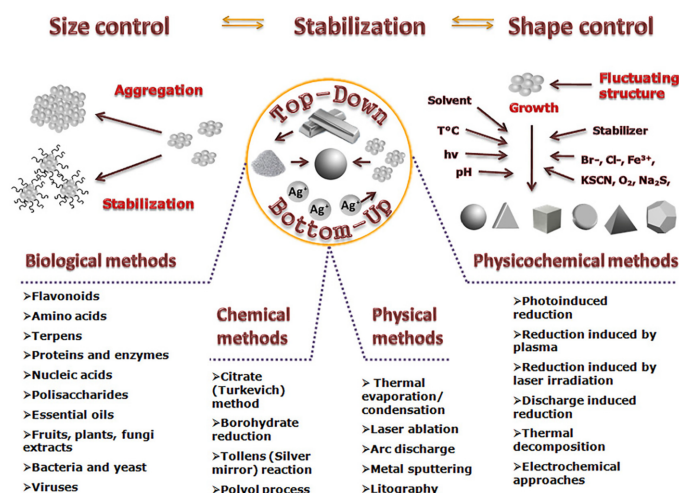
Στην νανοτεχνολογία είναι σημαντική η ακριβής γνώση της επιρροής που έχει ο τρόπος σύνθεσης των νανοσωματιδίων στο τελικό προϊόν, δηλαδή στο σχήμα το μέγεθος και σε ορισμένες ιδιότητες των νανοσωματιδίων. Ανάλογα με την προσέγγιση, η μέθοδος σύνθεσης μπορεί να χαρακτηριστεί ως "top-down" κατά την οποία ένα υλικό μειώνεται σε μέγεθος έως την νανοκλίμακα και "bottom-up" κατά την οποία χρησιμοποιούνται συνθετικές τεχνικές για την δημιουργία AgNPs Pryshchepa et al., 2020; Kaabipour and Hemmati, 2021. Η "bottom-up" μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση αναγωγικών παραγόντων για την αναγωγή κατιόντων αργύρου σε ουδέτερα άτομα, που στη συνέχεια συσσωρεύονται σε ομάδες ατόμων και μορίων και σχηματίζουν σταθερά νανοσωματίδια (Σχήμα 1.1) Srikar et al., 2016; Kaabipour and Hemmati, 2021.



Σχήμα 1.1: Σχηματική απεικόνιση σχηματισμού AgNPs μέσω μεθόδου "bottom up" Srikar et al., 2016.

Η νανοςύνθεση μπορεί να χαρακτηριστεί επίσης ανάλογα με την μέθοδο που ακολουθήθηκε ως φυσική, χημική ή βιολογική. Ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων AgNPs, επιλέγεται και ο αντίστοιχος τρόπος παρασκευής τους (Σχήμα 1.2). Οι φυσικές και οι χημικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως επειδή εμφανίζουν υψηλές αποδόσεις. Έχουν όμως υψηλό κόστος, υψηλή ενεργειακή απαίτηση και πολλά απόβλητα, ορισμένα από τα οποία είναι πιθανώς τοξικά Srikar et al., 2016.

Τα χαρακτηριστικά αυτά, καθιστούν τις μεθόδους αυτές βλαβερές για το περιβάλλον και πλέον επιζητάτε από την επιστημονική κοινότητα η χρήση «πράσινων μεθόδων». «Πράσινη σύνθεση νανοσωματιδίων» χαρακτηρίζεται η ασφαλής μέθοδος παραγωγής τους, με το μικρότερο αντίκτυπο στο περιβάλλον. Τον σκοπό αυτό ζητά να εκπληρώσει η πράσινη νανοτεχνολογία η οποία προσφέρει ασφαλέστερες διεργασίες σύνθεσης νανοσωματιδίων με εναλλακτικές πρώτες ύλες, μειωμένα απόβλητα και λιγότερους



Σχήμα 1.2: Οι αρχές της σύνθεσης των AgNPs Pryshchepa et al., 2020.

κινδύνους για την υγεία Kaabirour and Hemmati, 2021. Στην κατηγορία της πράσινης σύνθεσης των AgNPs εμπίπτουν οι βιολογικές μέθοδοι οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση μικροοργανισμών, φυτών και των παραγώγων τους για την αναγωγή των ιόντων αργύρου Srikar et al., 2016; Kaabirour and Hemmati, 2021.

1.2 Ιοντικά Υγρά

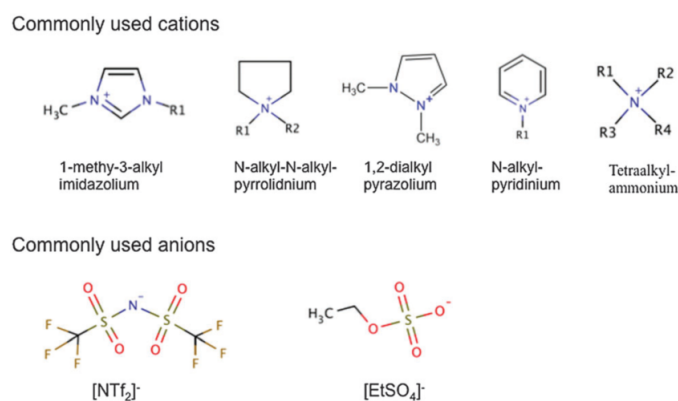
Η παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου με φυσικές και χημικές μεθόδους εμφανίζει μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος, την επικινδυνότητα και τον μεγάλο απαιτούμενο χρόνο παραγωγής. Περιλαμβάνει συνήθως την αναγωγή ενός άλατος αργύρου, κάτω από ακραίες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, με τη χρήση τοξικών ουσιών που απαιτούν ειδικό χειρισμό και προσθήκη σταθεροποιητικών παραγόντων Srikar et al., 2016; Tzani et al., 2017. Σκοπός της πράσινης σύνθεσης είναι η μείωση των απαιτούμενων βημάτων μέσω της χρήσης ενός φιλικού προς το περιβάλλον παράγοντα που ταυτόχρονα θα ανάγει και θα σταθεροποιεί τα νανοσωματίδια. Για την μετάβαση σε πράσινες συνθήκες στην διπλωματική αυτή χρησιμοποιείται ιοντικό υγρό ως αναγωγικός και σταθεροποιητικός παράγοντας.

Τα ιοντικά υγρά, ΙΥ (Ionic Liquids, ILs) έχουν πολλούς ορισμούς που είναι αποδεκτοί, αλλά έχουν στοιχεία που περιορίζουν την χρήση της ονομασίας. Τέτοια στοιχεία είναι ότι είναι υγρά σε θερμοκρασίες κάτω των 100°C, το οποίο αποκλείει τα ΙΥ που είναι υγρά σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, ή ότι έχουν σημείο τήξης κάτω των 100°C όπου δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός του σημείου τήξης. Έτσι λοιπόν ο ιδανικός ορισμός που καλύπτει όλες τις περιπτώσεις των ΙΥ είναι ο ακόλουθος «ιοντικό υγρό είναι οποιοδήποτε υγρό που αποτελείται αποκλειστικά από ιόντα» Macfarlane et al., 2017.

Τα ιοντικά υγρά έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των χαρακτηριστικών τους που τα καθιστούν κατάλληλα προς χρήση σε πλήθος εφαρμογών. Λόγω της χημικής τους δομής, η παρουσία κατιόντος και ανιόντος αποσταθεροποιεί την στερεή κρυσταλλική τους δομή, με

αποτέλεσμα να βρίσκονται σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος Tzani et al., 2019; Hayes et al., 2015; Tzani et al., 2016. Έχουν χαμηλή τάση ατμών και έτσι χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα των πτητικών οργανικών ενώσεων (Volatile Organic Compounds, VOCs). Εμφανίζουν θερμική και χημική σταθερότητα, υψηλή ιοντική αγωγιμότητα, χαμηλή ευφλεκτότητα και υψηλή διαλυτική ικανότητα Macfarlane et al., 2017; Tzani et al., 2019. Ταυτόχρονα προσφέρουν τη δυνατότητα σχεδιασμού τους ανάλογα με την επιθυμητή εφαρμογή, μέσω της επιλογής κατάλληλου ανιόντος και κατιόντος Macfarlane et al., 2017; Manoj Kumar et al., 2016. Είναι επίσης κατάλληλα για την παρασκευή νανοσωματιδίων, καθώς η ιοντική τους φύση συμβάλλει στην σταθεροποίηση της διασποράς τους Macfarlane et al., 2017.

Λόγω των ιδιοτήτων τους, τα ιοντικά υγρά βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στον τομέα της χημείας, στην οργανική σύνθεση και στην κατάλυση Manoj Kumar et al., 2016. Χρησιμοποιούνται ως ηλεκτρολύτες σε μπαταρίες λιθίου, σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές λόγω της δυνατότητάς τους να διαλύουν και να σταθεροποιούν μόρια όπως πρωτεΐνες, στην φαρμακευτική ως διαλύτες για την μεταφορά φαρμάκων και σε ηλεκτροχημικές συσκευές Macfarlane et al., 2017; Z. He and Alexandridis, 2015. Τα πιο συνηθισμένα κατιόντα και ανιόντα που χρησιμοποιούνται στα ιοντικά υγρά διακρίνονται στην παρακάτω εικόνα (Σχήμα 1.3) Z. He and Alexandridis, 2015.



Σχήμα 1.3: Συνήθη κατιόντα και ανιόντα στα ιοντικά υγρά Z. He and Alexandridis, 2015.

1.2.1 Πρωτικά Ιοντικά Υγρά

Τα πρωτικά ιοντικά υγρά (Protic Ionic Liquid, PIL) σχηματίζονται με την μεταφορά ενός πρωτονίου από μια βάση σε ένα οξύ κατά Bronsted. Επειδή ο τρόπος παρασκευής τους είναι απλός και εύκολος, χωρίς παραπροϊόντα, τα πρωτικά ιοντικά υγρά είναι και οικονομικότερα Tzani et al., 2019; Hayes et al., 2015; Tzani et al., 2016. Επιπλέον εμφανίζουν υψηλή αγωγιμότητα, χαμηλά σημεία τήξης, έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιηθούν ως καταλύτες και επιπλέον να διαλύουν ενώσεις που είναι αδιάλυτες σε οργανικούς διαλύτες Macfarlane et al., 2017; Tzani et al., 2019; Tzani et al., 2016. Οι ιδιότητες αυτές σχετίζονται με την ικανότητά τους να σχηματίζουν και δεσμούς υδρογόνου πέρα από τους ιοντικούς Hayes et al., 2015.

1.2.2 Ιοντικά Υγρά Ειδικής Αποστολής

Τα ιοντικά υγρά ειδικής αποστολής (Task specific Ionic Liquids) ή πολυλειτουργικά (Multifunctional) είναι τα ιοντικά υγρά στα οποία έχει γίνει προσαρμογή ειδικών λειτουργικών ομάδων στο κατιόν ή στο ανιόν τους, οι οποίες προσδίδουν επιπλέον ιδιότητες Macfarlane et al., 2017. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να συμπεριφέρονται ως μέσα αντίδρασης, αντιδραστήρια ή καταλύτες σε κάποια αντίδραση. Δρουν επίσης ως διαλύτες για την αντίδραση κατάλυσης μετάλλων μετάπτωσης, ενώ έχουν και τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες προστασίας για τη σταθεροποίηση μεταλλικών νανοσωματιδίων Bartsch, 2003.

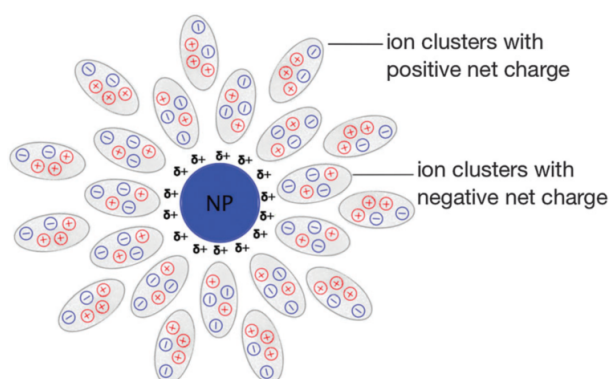
1.2.3 Παρασκευή νανοσωματιδίων από Ιοντικά Υγρά

Η ανάγκη για την πράσινη σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων, σύμφωνα με τις «12 Αρχές της Πράσινης Χημείας» Anastas et al., 2013 οδήγησε στην χρήση των ΙΥ, λόγω σημαντικών ιδιοτήτων τους. Τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα των ΙΥ στην παραγωγή μεταλλικών νανοσωματιδίων έχουν ως εξής: Tzani et al., 2017; Macfarlane et al., 2017; Manoj Kumar et al., 2016; Z. He and Alexandridis, 2015; Mudring et al., 2009

- ▶ Μέσω της επιλογής των ιόντων του ΙΥ υπάρχει η δυνατότητα σύνθεσης των νανοσωματιδίων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.
- ▶ Έχουν την δυνατότητα σχεδιασμού ώστε να διαλύουν ικανοποιητικά ανόργανα άλατα που χρησιμοποιούνται συνήθως ως υλικά εκκίνησης για τη σύνθεση νανοσωματιδίων.
- ▶ Ακολουθώντας την ίδια λογική, μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να αποτελούν το αναγωγικό και σταθεροποιητικό μέσο για τα νανοσωματίδια αλλά και να δρουν ως διαλύτης.
- ▶ Ταυτόχρονα μπορούν να συντεθούν ώστε να έχουν φιλικό προς το περιβάλλον χαρακτήρα.
- ▶ Τα ΙΥ, καθώς αποτελούνται από ανιόντα και κατιόντα, μπορούν να σχηματίσουν ένα προστατευτικό ηλεκτροστατικό κέλυφος γύρω από τα νανοσωματίδια συμβάλλοντας έτσι στην προστασία τους από συσσωμάτωση. Τα ιόντα των ΙΥ μπορούν να έλκονται από ένα αντίθετα φορτισμένο νανοσωματίδιο και να δημιουργούν ένα φορτισμένο στρώμα στην επιφάνειά του, το οποίο στη συνέχεια ενισχύεται με την έλξη των αντίθετα φορτισμένων ιόντων του ιοντικού υγρού που δημιουργούν ένα δεύτερο στρώμα πάνω στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου (Σχήμα 1.4). Ταυτόχρονα μπορούν να τα σταθεροποιούν μέσω συντονισμού των ιόντων τους. Τα νανοσωματίδια σε ένα διάλυμα μπορούν να σταθεροποιηθούν από ιόντα του ΙΥ με μεγάλες αλκαλικές αλυσίδες.

- Παρότι είναι πολικά, υπάρχει δυνατότητα σχηματισμού πολύ μικρών νανοσωματιδίων (υψηλό ρυθμό πυρήνωσης) λόγω της χαμηλής διεπιφανειακής τάσης που ενδεχομένως έχουν.

Με τον τρόπο αυτό οι παραπάνω ιδιότητες καθιστούν τα ιοντικά υγρά ως πράσινη εναλλακτική λύση για την παρασκευή νανοσωματιδίων σύμφωνα με τις «12 Αρχές της Πράσινης Χημείας» Anastas et al., 2013.



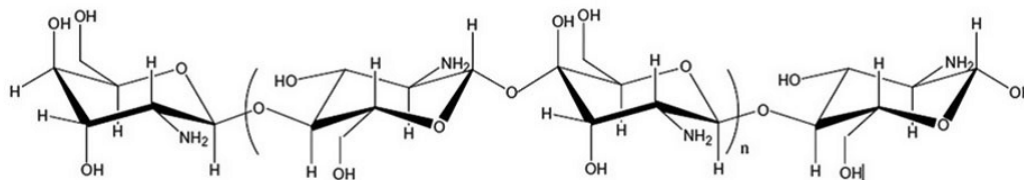
Σχήμα 1.4: Απεικόνιση ομάδων ιόντων ιοντικού υγρού που σχηματίζουν προστατευτική διπλοστιβάδα γύρω από ένα θετικά φορτισμένο νανοσωματίδιο Z. He and Alexandridis, 2015.

1.3 Χιτοζάνη

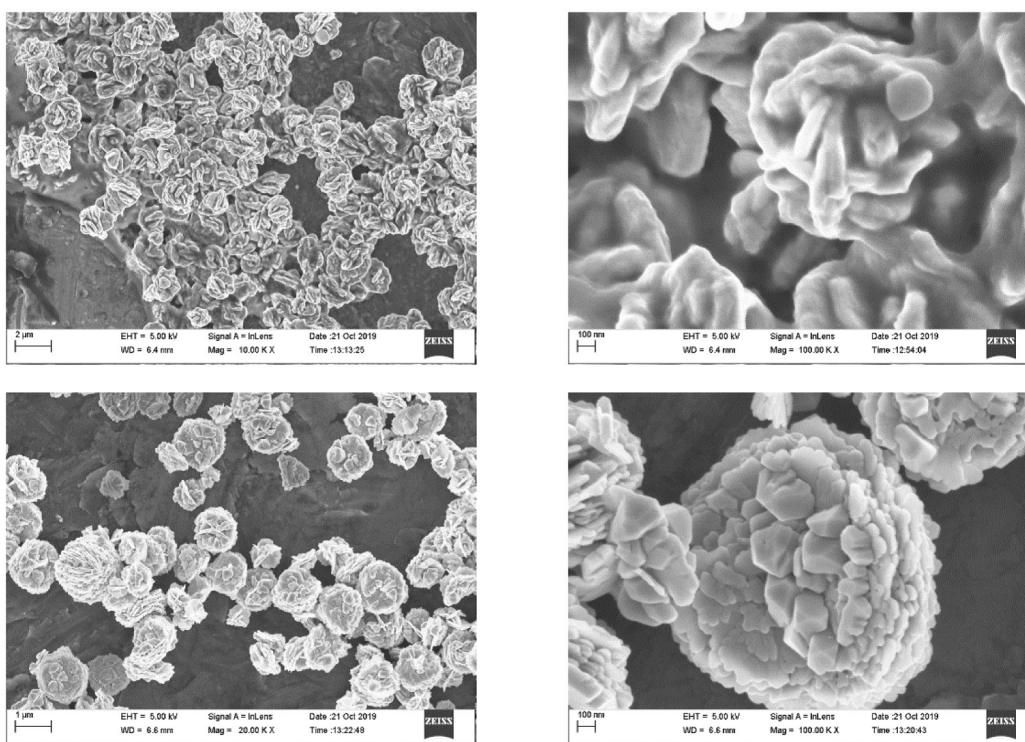
Η χιτοζάνη είναι κατιονικός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από την από την αποακετυλίωση της χιτίνης, η οποία εντοπίζεται στο κέλυφος καρκινοειδών dos Santos Lima et al., 2017; Detsi et al., 2020. Χρησιμοποιείται ευρέως στις τεχνολογικές εφαρμογές λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων της όπως η χαμηλή τοξικότητα, βιοδιαθεσιμότητα, βιοαποικοδομησιμότητα, βιοσυμβατότητα καθώς και η αντιμικροβιακή της δράση dos Santos Lima et al., 2017; Detsi et al., 2020; Nate et al., 2018; Restrepo and Villa, 2021. Έχει ευρεία εφαρμογή ως σταθεροποιητικός παράγοντας στην παραγωγή μεταλλικών νανοσωματιδίων, στον τομέα της βιοϊατρικής ως πολυμερική μήτρα για τους φορείς φαρμάκων (drug delivery) ακόμα και στην γεωργία όπου νανοσωματίδια χιτοζάνης είχαν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ζωικών και φυτικών οργανισμών dos Santos Lima et al., 2017; Detsi et al., 2020.

Γενικά, στην παραγωγή μεταλλικών νανοσωματιδίων οι σταθεροποιητικοί παράγοντες μπορεί να είναι οργανικοί, ανόργανοι ή σύνθετα συστήματα που εντοπίζονται στη φύση Nate et al., 2018. Έχουν σημαντικό ρόλο στην αποφυγή της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων στο κολλοειδές σύστημα. Συνήθως η σύνθεση των AgNPs μέσω της μεθόδου «bottom-up» περιλαμβάνει τη χρήση σταθεροποιητικών παραγόντων για τον έλεγχο του μεγέθους, της μορφολογίας και της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων Restrepo and Villa, 2021.

Η χιτοζάνη είναι κατάλληλος σταθεροποιητικός παράγοντας για τη σύνθεση AgNPs λόγω της παρουσίας δύο ενεργών ομάδων στο μόριό της, της υδροξυλομάδας και της αμινομάδας (Σχήμα 1.5) Nate et al., 2018. Με τη συμβολή των ομάδων αυτών η χιτοζάνη συνδέεται στην επιφάνεια των παραγόμενων AgNPs και αποτρέπει την συσσωμάτωση τους Nate et al., 2018; Restrepo and Villa, 2021. Ταυτόχρονα προτρέπει την ανομοιόμορφη ανάπτυξη των νανοσωματιδίων (Σχήμα 1.6) Nhung and Lee, 2014; Koukouzelis et al., 2020.



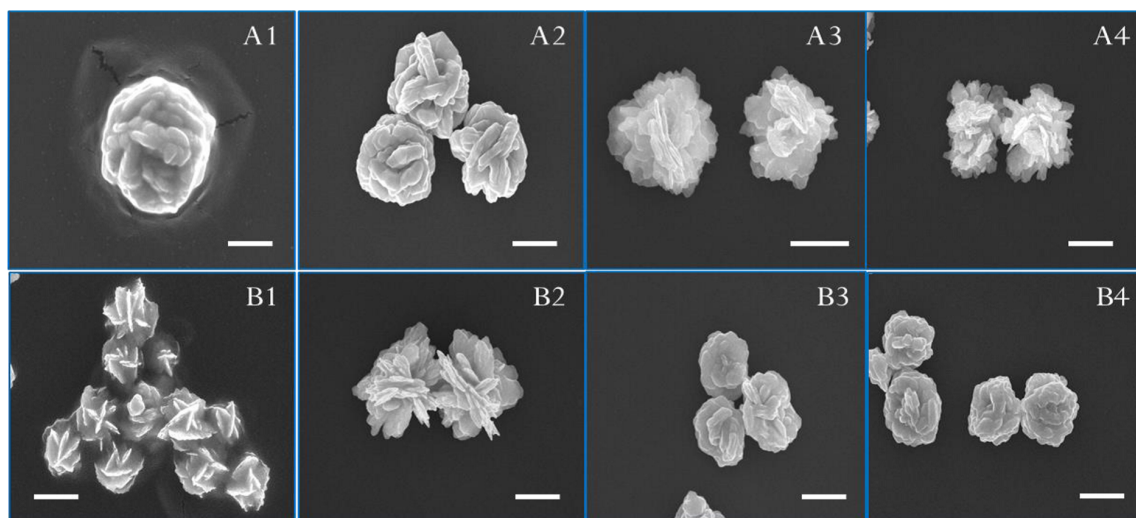
Σχήμα 1.5: Δομή της χιτοζάνης dos Santos Lima et al., 2017.



Σχήμα 1.6: Εικόνες SEM (Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης) νανοσωματιδίων αργύρου με μορφολογία λουλουδιού (mesoflowers) Koukouzelis et al., 2020.

Σύμφωνα με μελέτες η παραγωγή AgNPs μέσω αναγωγής και με σταθεροποιητικό παράγοντα την χιτοζάνη, έδωσε υποσχόμενα αποτέλεσμα. Δίνεται δυνατότητα πράσινης σύνθεσης νανοσωματιδίων με one-pot αντίδραση σε θερμοκρασία δωματίου, δηλαδή αντίδραση που γίνεται σε ένα σκεύος με τα ελάχιστα βήματα Nhung and Lee, 2014; Koukouzelis et al., 2020. Ρυθμίζεται το μέγεθος και το σχήμα των AgNPs μέσω της αλλαγής των συγκεντρώσεων της χιτοζάνης και του μεταλλικού άλατος. Με την αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους των AgNPs και ανισοτροπική ανάπτυξη (Σχήμα 1.7) Nhung and Lee, 2014. Επιπλέον μελετήθηκε η

επίδραση της χιτοζάνης στο μέγεθος των AgNPs μέσω χρήσης μικροκυμάτων και βρέθηκε ότι το μέσο μέγεθος μειώθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα, όταν αυτή κυμαινόταν μεταξύ 1.2 και 3% (w/v) Nate et al., 2018.



Σχήμα 1.7: Εικόνες SEM νανοσωματιδίων αργύρου για σταθερή ποσότητα AgNO_3 (60 μL , 1.0 M) και διαφορετικές συγκεντρώσεις χιτοζάνης: A1 0.05 κ.β %, A2 0.1 κ.β %, A3 0.3 κ.β %, A4 0.4 κ.β %, και για σταθερή συγκέντρωση χιτοζάνης 0.1 κ.β. % και διαφορετικές ποσότητες AgNO_3 , 1.0 M: B1 10 l, B2 30 μl , B3 60 μl , B4 90 μl Nhung and Lee, 2014.

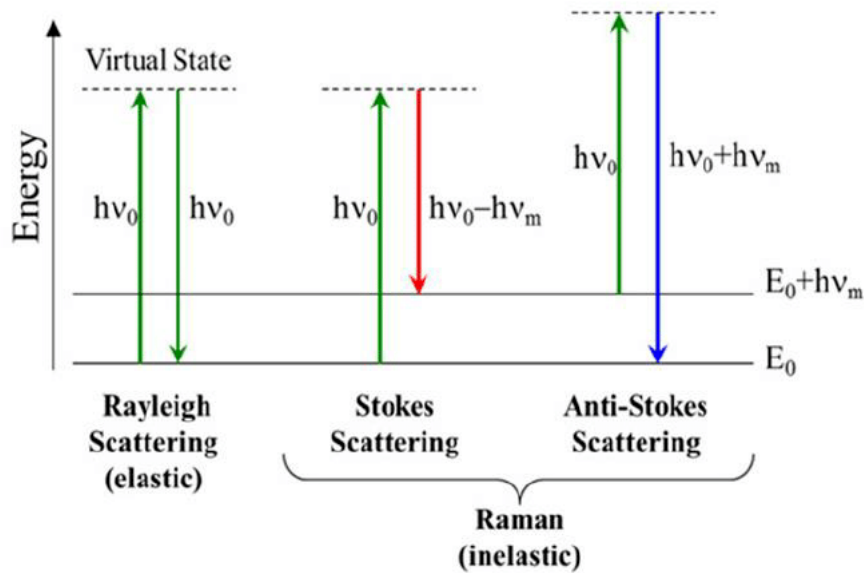
1.4 Φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση

1.4.1 Φασματοσκοπία Raman

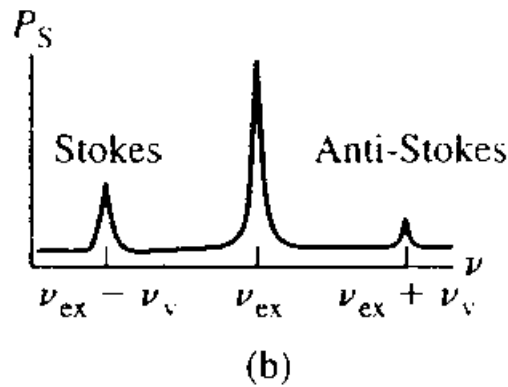
Το φαινόμενο Raman είναι η ανελαστική σκέδαση της ακτινοβολίας καθώς διέρχεται από ένα υλικό. Συγκεκριμένα κατά το φαινόμενο αυτό όταν ένα υλικό ακτινοβολείται με μια ισχυρή πηγή λέιζερ ορατής ή εγγύς υπερύθρου μονοχρωματικής ακτινοβολίας, τότε η ακτινοβολία που σκεδάζεται έχει διαφορετική συχνότητα από αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Αυτό οφείλεται στο ότι ορισμένα από τα μόρια του υλικού απορροφούν φωτόνια συγκεκριμένης ενέργειας και επανεκπέμπουν φωτόνια διαφορετικής ενέργειας. Η διαφορά αυτή είναι ένδειξη της μεταβολής της δονητικής κατάστασης του μορίου Skoog et al., 2007.

Γενικότερα, υπάρχουν δύο είδη σκεδάσεων, σκέδαση Rayleigh και Raman. Στην περίπτωση της ελαστικής σκέδασης (ή σκέδαση Rayleigh) το εκπεμπόμενο φωτόνιο έχει την ίδια ενέργεια με το προσπίπτον φωτόνιο (φωτόνιο διέγερσης). Αντιθέτως, στην σκέδαση Raman η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου που θα απορροφήσει ένα μόριο στην θεμελιώδη κατάσταση διαφέρει από αυτή του εκπεμπόμενου φωτονίου (Σχήμα 1.8). Όταν η σκεδαζόμενη ακτινοβολία έχει μικρότερη συχνότητα από την προσπίπτουσα ακτινοβολία λέιζερ τότε ονομάζεται σκέδαση Stokes, ενώ στην περίπτωση που έχει

μεγαλύτερη συχνότητα τότε ονομάζεται σκέδαση anti-Stokes (Σχήμα 1.8 και 1.9). Η τελευταία οφείλεται στη σύγκρουση φωτονίων με μόρια που βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση και τα οποία καταλήγουν στην θεμελιώδη κατάσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η περισσευούμενη ενέργεια να μεταβιβάζεται στα φωτόνια Skoog et al., 2007; Larkin, 2011a, 2011b.



Σχήμα 1.8: Φαινόμενα ελαστικής (Rayleigh) και ανελαστικής σκέδασης (Raman) Ismail, 2015.



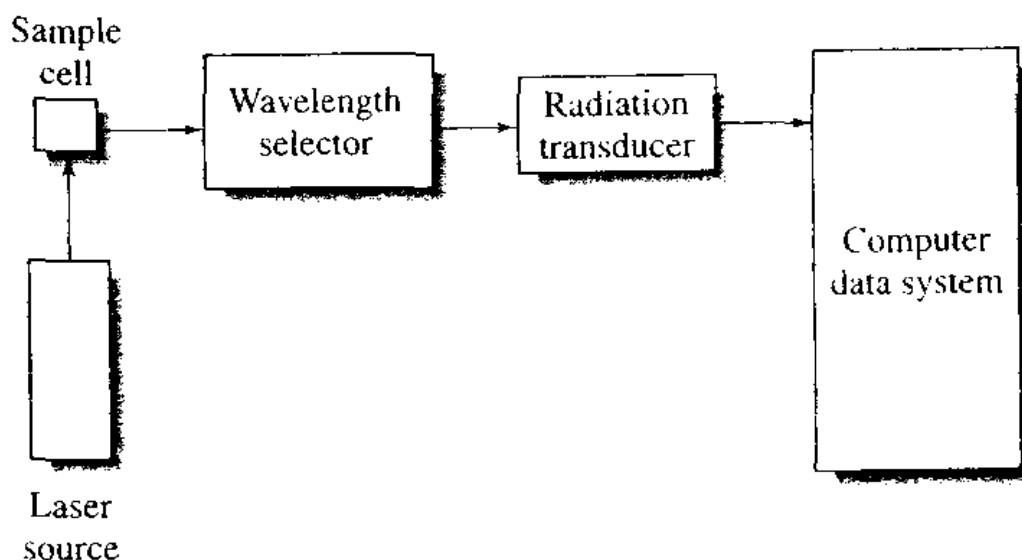
Σχήμα 1.9: Φαινόμενα σκέδασης Raman: Stokes και anti-Stokes Skoog et al., 2007.

1.4.1.1 Οργανολογία

Τα φασματόμετρα Raman περιέχουν μία πηγή λέιζερ, σύστημα ακτινοβολίας του δείγματος και φασματόμετρο. Ο τύπος της πηγής λέιζερ που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ιόντων αργού ή κρυπτού, τα οποία εκπέμπουν ακτινοβολία μεγάλης έντασης. Αυτό

είναι σημαντικό για να είναι εφικτή η ανίχνευση της σκέδασης Raman. Ένα συνηθισμένο πρόβλημα που εμφανίζεται όταν χρησιμοποιούνται οι πηγές αυτές (μικρού μήκους κύματος) είναι η παραγωγή φθορισμού και η πιθανή φωτοδιάσπαση του δείγματος. Για την αποφυγή αυτών των κινδύνων προτιμώνται πηγές που εκπέμπουν στην περιοχή εγγύς υπεριώθρου, που δεν προκαλούν φωτοδιάσπαση ούτε παράγουν φθορισμό. Πέρα από τον φθορισμό και τη φωτοδιάσπαση, ανάλογα με το δείγμα υπάρχει περίπτωση ορισμένα στοιχεία του, όπως το χρώμα ή ο διαλύτης, να απορροφούν μέρος της προσπίπτουσας ή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman. Έτσι απαιτείται επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος διέγερσης Skoog et al., 2007.

Η αρχή λειτουργίας ενός φασματόμετρου Raman διακρίνεται στην παρακάτω εικόνα (Σχήμα 1.10). Η πηγή εκπέμπει ακτινοβολία λέιζερ που προσπίπτει στο δείγμα και σκεδάζεται υπό γωνία 90° , για να μην μετρηθεί η ακτινοβολία της πηγής. Στη συνέχεια απομονώνεται το επιθυμητό φασματικό εύρος μέσω ενός επιλογέα μήκους κύματος και με τη χρήση ενός φασματοφωτόμετρου μετατρέπεται το σήμα σε ηλεκτρικό. Έπειτα γίνεται επεξεργασία των δεδομένων με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή Skoog et al., 2007.



Σχήμα 1.10: Διάγραμμα φασματόμετρου Raman Skoog et al., 2007.

1.4.1.2 Εφαρμογές

Με την φασματοσκοπία Raman γίνεται ανάλυση δειγμάτων που βρίσκονται σε στερεή, υγρή ή αέρια φάση. Είναι ταχύτατη τεχνική, που δεν καταστρέφει το δείγμα και δεν απαιτεί προεπεξεργασία. Ταυτόχρονα απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος και μπορούν να χρησιμοποιηθούν υδατικά διαλύματα των δειγμάτων καθώς το νερό δεν προκαλεί παρεμπόδιση Skoog et al., 2007.

Χρησιμοποιείται για τη μελέτη της δομής διαφόρων υλικών και σε συνδυασμό με την υπέρυθη φασματοσκοπία χρησιμοποιείται στη χημεία για την αναγνώριση μορίων και για τη μελέτη των χημικών και διαμοριακών δεσμών. Καθώς οι μετατοπίσεις στο μήκος κύματος της ακτινοβολίας εξαρτώνται από το είδος του μορίου και τη χημική του δομή, οι συχνότητες δόνησης είναι χαρακτηριστικές για κάθε μόριο (ανάλογα με τους χημικούς δεσμούς και τη συμμετρία). Έτσι εφαρμόζεται ευρέως για τον προσδιορισμό των δραστικών ομάδων των οργανικών ενώσεων οι οποίες θα έχουν συγκεκριμένο “δακτυλικό αποτύπωμα” Skoog et al., 2007; Larkin, 2011a, 2011b.

Αποτελεί χρήσιμη τεχνική για τη μελέτη ανόργανων ενώσεων, καθώς προσφέρει πληροφορίες για τη σύσταση, τη δομή και τη σταθερότητα των ενώσεων. Για το σκοπό αυτό είναι αποτελεσματικότερη σε σύγκριση με την φασματοσκοπία υπέρυθρου, με την οποία δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν μετρήσεις σε υδατικά διαλύματα Skoog et al., 2007.

Επιπλέον καθιστά εφικτή τις ποσοτικές μετρήσεις ουσιών σε μικρά δείγματα, καθώς οι κορυφές των φασμάτων σπανίως αλληλεπικαλύπτονται και η εστίαση του λέιζερ μπορεί να γίνει με μεγάλη ακρίβεια. Με τη χρήση μικροσκοπίας Raman (micro-Raman) προσδιορίζονται αναλυτές και μελετάται η ύπαρξη δεσμών ή δραστικών ομάδων σε επιφάνειες. Δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης μικροσκοπικών δειγμάτων ή περιοχών μεγαλύτερων δειγμάτων Skoog et al., 2007.

1.4.2 Φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση (SERS)

Κύριο μειονέκτημα της τεχνικής είναι οι χαμηλές αναλογίες σήματος προς θόρυβο επειδή μόνο ένα στα 10^8 φωτόνια υφίσταται σκέδαση Raman Stampelcoskie et al., 2011. Έτσι δεν ανιχνεύονται ουσίες που βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (ασθενέστερο σήμα από τη σκέδαση Rayleigh). Επομένως για την αύξηση του εύρους ανίχνευσης γίνεται χρήση υλικών, όπως μέταλλα και νανοσωματίδια μετάλλων, ως υποστρώματα που θα ενισχύσουν το σήμα των ουσιών που απορροφώνται στην επιφάνειά τους. Η τεχνική αυτή ονομάζεται φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) και έχει μεγάλο εύρος εφαρμογών στην βιοτεχνολογία, την ασφάλεια τροφίμων και την ιατρική Skoog et al., 2007; Stampelcoskie et al., 2011; Cheng et al., 2014a. Με τη μέθοδο αυτή, τα δείγματα είναι προσροφημένα στην επιφάνεια μετάλλων ή κolloειδών σωματιδίων τους και η ένταση των γραμμών Raman αυξάνεται κατά 10^3 ως 10^6 . Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύονται ουσίες σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις Skoog et al., 2007.

Το φαινόμενο SERS συμβαίνει όταν το μόριο που αναλύεται έρχεται πολύ κοντά ή

προσροφάται σε μία μεταλλική επιφάνεια. Προκαλείται από αλληλεπίδραση με επιφανειακά πλασμόνια¹ τα οποία βρίσκονται σε μέταλλα, επομένως επιλέγονται συνήθως επιφάνειες Ag ή Au Leopold et al., 2018. Η ενίσχυση του σήματος αποδίδεται σε δύο μηχανισμούς, την ηλεκτρομαγνητική ενίσχυση (Electromagnetic enhancement, EM) και την χημική ενίσχυση (Chemical enhancement, CHEM). Η ηλεκτρομαγνητική ενίσχυση οφείλεται στα επιφανειακά πλασμόνια στην επιφάνεια του μετάλλου που βρίσκονται πιο κοντά στο μόριο και δημιουργούν τοπικά οπτικά πεδία (local optical fields). Η εισερχόμενη ακτινοβολία (laser) ακτινοβολεί την επιφάνεια και διεγείρει επιφανειακά πλασμόνια. Αν η συχνότητα του laser βρίσκεται σε συντονισμό με τα πλασμόνια τότε η ενίσχυση γίνεται μέγιστη (συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων, Surface Plasmon Resonance, SPR). Κατά τον τρόπο αυτό ενισχύεται η ένταση των γραμμών Raman Skoog et al., 2007; Stamplescokie et al., 2011; Leopold et al., 2018. Δεν απαιτείται χημική επαφή μεταξύ του μορίου και της επιφάνειας, όμως το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μειώνεται κατά την απομάκρυνση από την μεταλλική επιφάνεια, με αποτέλεσμα να μειώνεται και η ενίσχυση του πεδίου της σκέδασης Raman όσο μεγαλώνει η απόσταση από το μέταλλο Leopold et al., 2018.

Η χημική ενίσχυση οφείλεται στην μεταφορά φορτίου μεταξύ του μορίου και της μεταλλικής επιφάνειας. Το μόριο προσροφάται στην μεταλλική επιφάνεια με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενεργός διατομή σκέδασης Raman. Εξαρτάται από το μόριο που αναλύεται και από τη θέση δέσμησης του μορίου στην μεταλλική επιφάνεια. Σε αντίθεση με την ηλεκτρομαγνητική ενίσχυση, για την χημική ενίσχυση απαιτείται απευθείας προσρόφηση στην μεταλλική επιφάνεια. Ο μηχανισμός CHEM προσφέρει παράγοντα ενίσχυσης 10-100, ενώ ο παράγοντας ενίσχυσης του μηχανισμού EM είναι μεγαλύτερος, 10⁶-10⁷ Koukouzelis et al., 2020; Leopold et al., 2018.

Αποτελεί μη καταστρεπτική και ευαίσθητη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση χημικών ουσιών. Η ιδιότητα αυτή καθιστά δυνατή την χρήση της σε πολλαπλά πεδία όπως στην επιστήμη των πολυμερών, τη βιοχημεία, την ηλεκτροχημεία και κατάλυση Sharma et al., 2012. Η υψηλή της ευαισθησία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην ανίχνευση μορίων ενδιαφέροντος σε βιολογικά δείγματα που μπορεί να σχετίζονται με τον καρκίνο Choi et al., 2020; Grubisha et al., 2003, με ασθένειες όπως Parkinson Shi et al., 2008 και Alzheimer Benford et al., 2008. Βρίσκει εφαρμογή στον έλεγχο της ποιότητας τροφίμων και της καθαρότητας φαρμάκων Koukouzelis et al., 2020; Cheng et al., 2014b. Η ικανότητα να ανιχνεύει χημικές ουσίες, χαμηλής συγκέντρωσης, σε υλικά μικρής ποσότητας έδωσε την ώθηση να χρησιμοποιηθεί η τεχνική SERS στην διατήρηση έργων τέχνης, όπου τα δείγματα έχουν το ελάχιστο μέγεθος που επιτρέπεται Sharma et al., 2012. Με την κατασκευή φορητών φασματομέτρων Raman δόθηκε η δυνατότητα άμεσης ανίχνευσης χημικών ουσιών στο εξωτερικό περιβάλλον μέσω SERS, όπως περιβαλλοντικούς ρύπους Álvarez-Puebla and Liz-Marzán, 2010 και χημικών όπλων, με σημαντική επιρροή στην εγκληματολογική έρευνα Sharma et al., 2012.

Η αποτελεσματικότητα και η ευαισθησία της φασματοσκοπίας SERS εξαρτάται από την μορφολογία και το μέγεθος του υποστρώματος. Στην περίπτωση ομογενών πλασμονικών νανοδομών η μεγαλύτερη ενίσχυση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου εντοπίζεται στις έντονες προεξοχές και κορυφές νανοσωματιδίων, ενώ στην περίπτωση συσσωματωμένων

¹Πλασμόνιο είναι το κβάντο της διαταραχής της πυκνότητας των ηλεκτρονίων όταν διαπερνούν αγωγία μέσα όπως μέταλλα. Τα επιφανειακά πλασμόνια δημιουργούνται όταν ο αγωγός έρθει σε επαφή με διηλεκτρικό μέσο.

νανοδομών το αυξημένο πεδίο εμφανίζεται στα κενά μεταξύ γειτονικών νανοσωματιδίων, στα λεγόμενα 'hot spots' Koukouzelis et al., 2020; Leopold et al., 2018. Τα νανοσωματίδια αργύρου χρησιμοποιούνται εκτενώς καθώς εμφανίζουν φαινόμενο συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance absorption, SPR) το οποίο θεωρείται πως ενισχύει την ένταση των γραμμών Raman, παρασκευάζονται με απλές διαδικασίες και έχουν σημαντική κolloειδή σταθερότητα Koukouzelis et al., 2020; Skoog et al., 2007; Stampleskoskie et al., 2011.

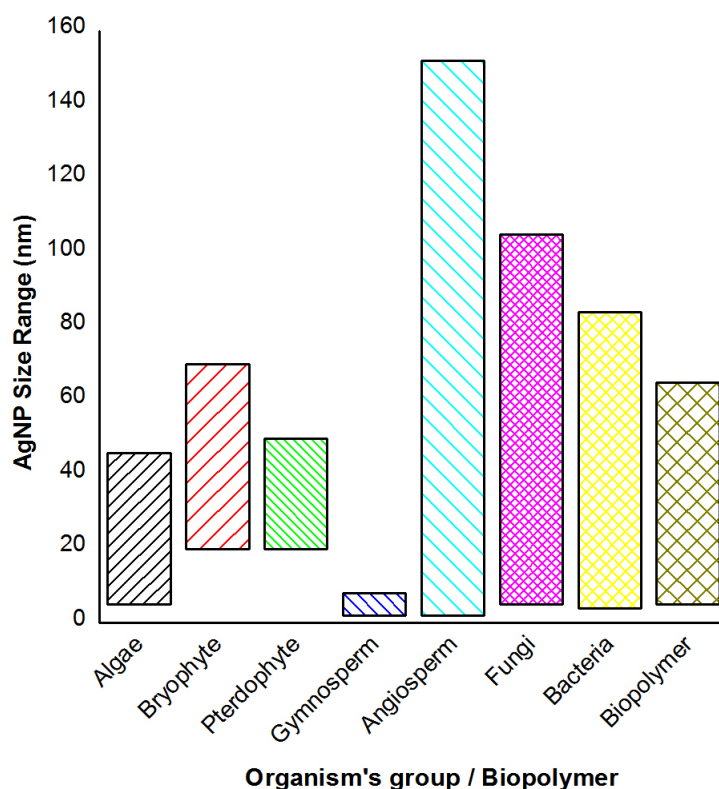
1.4.2.1 Επίδραση μεγέθους των νανοσωματιδίων στο σήμα του SERS

Σύμφωνα με μελέτες, με την αύξηση του μεγέθους των μεταλλικών νανοσωματιδίων αυξάνεται η ηλεκτρομαγνητική ενίσχυση (Electromagnetic enhancement, EM) και άρα το σήμα SERS Stampleskoskie et al., 2011; R. X. He et al., 2017. Με την αύξηση του μεγέθους παράγεται ισχυρότερος τοπικός συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR), ενισχύοντας τελικά το σήμα SERS R. X. He et al., 2017. Ωστόσο, μεγάλα νανοσωματίδια απορροφούν λιγότερο φως καθώς ενισχύεται η ανελαστική σκέδαση, πράγμα που μειώνει την ένταση του Raman. Ταυτόχρονα, καθώς αυξάνεται το μέγεθος για μια δεδομένη μάζα μετάλλου η ολική επιφάνεια προσρόφησης μειώνεται, με αποτέλεσμα να προσροφάται μικρότερη ποσότητα ουσίας στην επιφάνεια μεγάλων νανοσωματιδίων Stampleskoskie et al., 2011. Έτσι λοιπόν, πρέπει να βρεθεί η κατάλληλη ισορροπία μεταξύ του μεγέθους των νανοσωματιδίων που ενισχύει το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και άρα το σήμα Raman, και του μεγέθους που συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη σκέδαση της ακτινοβολίας, οδηγώντας σε χαμηλότερα σήματα Raman. Βρέθηκε ότι το επιθυμητό μέγεθος για τα AgNPs για την μέγιστη ένταση SERS της προσροφημένης ροδαμίνης 6G (R6G) είναι 50-60 nm Stampleskoskie et al., 2011; R. X. He et al., 2017.

Το μέγεθος των AgNPs ποικίλει ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής και την εφαρμογή τους. Στην πράσινη μέθοδο παραγωγής των AgNPs μέσω αναγωγής, το μέγεθος εξαρτάται από τις συνθήκες παρασκευής όπως το ρυθμό ανάδευσης, το χρόνο αντίδρασης και τη θερμοκρασία, το pH και τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων Srikar et al., 2016.

Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αυξημένο ρυθμό σύνθεσης AgNPs με μικρότερο μέγεθος Srikar et al., 2016. Εντούτοις, χρησιμοποιείται συνήθως η θερμοκρασία δωματίου για τη σύνθεσή τους και ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής, είτε από μικροοργανισμούς, είτε από βιο-πολυμερούς εμφανίζεται η παρακάτω διακύμανση μεγεθών (Σχήμα 1.11):

Η παραγωγή AgNPs μέσω αναγωγής με ασκορβικό οξύ και με σταθεροποιητή το κιτρικό οξύ, δίνει τη δυνατότητα ρύθμισης του μεγέθους με αλλαγή του pH Qin et al., 2010 (είτε με προσθήκη διαλύματος κιτρικού οξέος, είτε διαλύματος καυστικού νατρίου). Για μεγαλύτερες τιμές του pH παράγονται νανοσωματίδια με μικρότερο μέγεθος, το οποίο οφείλεται στην δραστηριότητα του ασκορβικού οξέος σε αυξημένες τιμές pH, παράγοντας μεγαλύτερο αριθμό πυρήνων Qin et al., 2010. Όμως, σε πολύ υψηλές τιμές pH (>11) παρατηρείται αποσταθεροποίηση και συσσωμάτωση των AgNPs Srikar et al., 2016. Αξίζει να αναφερθεί ότι για τον περιορισμό της συσσωμάτωσης, το διάλυμα της αντίδρασης αναδεύεται συνεχώς Srikar et al., 2016.



Σχήμα 1.11: Εύρος μεγέθους των AgNPs που παράγονται σε θερμοκρασία δωματίου από διαφορετικές πηγές Srikar et al., 2016.

Επιπλέον μπορούν να παραχθούν διαφορετικά μεγέθη AgNPs μεταβάλλοντας τις συγκεντρώσεις του βιοπολυμερούς και του μεταλλικού άλατος Leung et al., 2010, όπως στη σύνθεση AgNPs μέσω αναγωγής με ασκορβικό οξύ όπου για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χιτοζάνης, δηλαδή του βιοπολυμερούς, το μέγεθος των νανοσωματιδίων μειώνεται, όπως διακρίνεται στο παραπάνω σχήμα 1.7 Nhung and Lee, 2014; Zain et al., 2014. Αυτό συμβαίνει καθώς η χιτοζάνη έχει σταθεροποιητικό ρόλο και απορροφάται στην επιφάνεια των σωματιδίων, αποτρέποντας τη συσσωμάτωσή τους. Ταυτόχρονα, για σταθερή συγκέντρωση χιτοζάνης, παρατηρήθηκε ότι αυξάνοντας τη συγκέντρωση του AgNO_3 αυξήθηκε το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν αρκετά πρωτονιωμένα μόρια χιτοζάνης ώστε να απορροφηθούν στην επιφάνεια των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων, με αποτέλεσμα να αυξηθεί το μέγεθός τους Zain et al., 2014.

1.4.2.2 Επίδραση σχήματος των νανοσωματιδίων στο σήμα του SERS

Πέρα από το μέγεθος, το σχήμα των νανοσωματιδίων επηρεάζει σημαντικά το σήμα του SERS. Τα ασύμμετρα νανοσωματίδια με προεξοχές αυξάνουν το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και προσφέρουν περισσότερα ενισχυμένα σημεία στην επιφάνειά τους που βελτιώνουν το φάσμα Raman Cheng et al., 2014b. Η παραγωγή AgNPs με διαφορετική μορφολογία, όπως σφαιρικό ή σχήμα λουλουδιού, γίνεται με τη ρύθμιση των πειραματικών παραμέτρων

όπως τις συγκεντρώσεις του μεταλλικού άλατος και του αναγωγικού παράγοντα, το χρόνο αντίδρασης, την ταχύτητα περιστροφής και το pH Cheng et al., 2014b; Khodashenas and Ghorbani, 2019.

Την πιο σημαντική επιρροή έχουν οι συγκεντρώσεις του μεταλλικού άλατος και του αναγωγικού παράγοντα. Στην παρασκευή AgNPs μέσω αναγωγής, η μείωση της συγκέντρωσης του AgNO₃ και η αύξηση του ασκορβικού οξέος οδήγησε σε ανάπτυξη AgNPs με ανισοτροπική γεωμετρία και σε μορφολογία με έντονα άκρα. Αντιθέτως, με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος και διατηρώντας τις υπόλοιπες παραμέτρους σταθερές, τα νανοσωματίδια τείνουν σε σφαιρικό σχήμα Cheng et al., 2014b. Αυτό αποδεικνύεται και απο τους Nhung et al. Nhung and Lee, 2014 οι οποίοι αναφέρουν ότι με την αύξηση της ποσότητας του AgNO₃ τα νανοσωματίδια αποκτούν σφαιρικό σχήμα (Σχήμα 1.7). Ταυτόχρονα δείχνουν ότι σημαντικό ρόλο έχει και ο σταθεροποιητικός παράγοντας καθώς με την αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης για σταθερή ποσότητα άλατος, τα νανοσωματίδια εμφανίζουν ανισοτροπική ανάπτυξη (Σχήμα 1.7) Nhung and Lee, 2014.

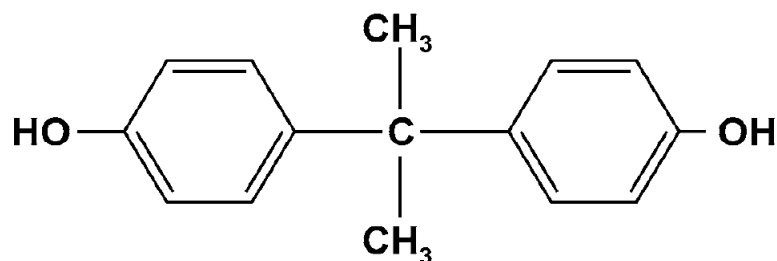
Όσον αφορά το χρόνο αντίδρασης, τα νανοσωματίδια απομακρύνονται από το σφαιρικό σχήμα και αποκτούν σχήμα λουλουδιού, κοραλιού κ.λπ. όσο αυξάνεται ο χρόνος αντίδρασης. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μεταλλικού άλατος, είναι μεγαλύτερος και ο ρυθμός της αντίδρασης (μικρή διάρκεια). Αντιθέτως για χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μεταλλικού ιόντος (μικρότερος ρυθμός) η μορφολογία μεταβάλλεται από σφαιρικό σχήμα σε σχήμα αχινιού Cheng et al., 2014b.

Η επίδραση του pH μελετήθηκε μέσα από τη σύνθεση AgNPs μέσω αναγωγής με κιτρικό οξύ Khodashenas and Ghorbani, 2019. Βρέθηκε ότι για υψηλές τιμές pH ευνοήθηκαν σφαιρικά σχήματα και σχήματα ράβδου λόγω του υψηλού ρυθμού αναγωγής του μεταλλικού άλατος. Αντίστοιχα, σε χαμηλές τιμές pH λόγω του χαμηλού ρυθμού αναγωγής, τα νανοσωματίδια απέκτησαν τριγωνικό ή πολύγωνο σχήμα Khodashenas and Ghorbani, 2019.

1.5 Δισφαινόλη A (Bisphenol A, BPA)

Η δισφαινόλη A (Bisphenol A, BPA) αποτελεί οργανική ένωση που χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία των πλαστικών. Η δομή της διακρίνεται στην παρακάτω εικόνα (Σχήμα 1.12) και χρησιμοποιείται σε πολλά προϊόντα καθημερινής χρήσης όπως σε πλαστικά ποτήρια, ηλεκτρονικούς υπολογιστές και εξοπλισμό αυτοκινήτων Schug and Birnbaum, 2014; Ullah and Zheng, 2015.

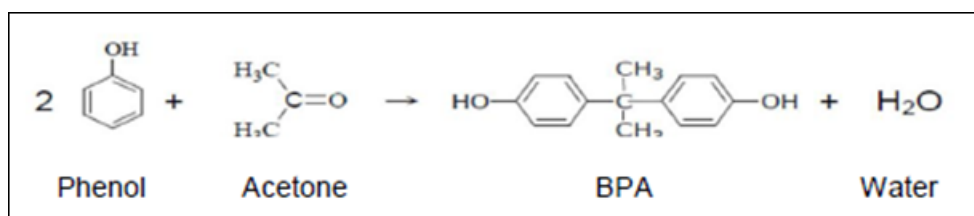
Βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην παραγωγή πολυανθρακικών ρητινών (polycarbonate, PC), εποξικών ρητινών και ως πρόσθετη ουσία σε πλήθος εφαρμογών όπως σε υγρά φρένων. Τα πολυανθρακικά πλαστικά χρησιμοποιούνται σε προϊόντα ασφαλείας όπως στο τζάμι κρανών, σε αλεξίσφαιρο γυαλί, σε οικιακές και ηλεκτρικές συσκευές Schug and Birnbaum, 2014; Ullah and Zheng, 2015. Βρίσκουν χρήση σε συνήθη καταναλωτικά προϊόντα όπως σε επαναχρησιμοποιημένα πλαστικά μπουκάλια, σε συσκευασίες τροφίμων και ποτών, σε αθλητικό εξοπλισμό. Οι εποξικές ρητίνες που περιέχουν BPA χρησιμοποιούνται ως



Σχήμα 1.12: Δομή της δισφαινόλης A Schug and Birnbaum, 2014.

εσωτερική επίστρωση σε σωλήνες νερού και σε μεταλλικά σκευάσματα τροφίμων ώστε να έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και να μειώνεται η μεταλλική γεύση που αφήνεται στα τρόφιμα. Επίσης έχουν εφαρμογή στην κατασκευή βιομηχανικών δαπέδων, ως βερνίκια στην βιομηχανία αυτοκινήτων και σε κονσέρβες τροφίμων και ποτών. Η BPA χρησιμοποιείται ακόμα και για την παραγωγή οδοντιατρικών σκευασμάτων όπως οδοντικών ρητινών (σφραγίσματα) και ως μέσο εμφάνισης χρωστικής ουσίας σε θερμικό χαρτί το οποίο χρησιμοποιείται σε ταμειακές αποδείξεις καταστημάτων και σε εισιτήρια μέσω μεταφοράς Schug and Birnbaum, 2014; Ullah and Zheng, 2015; Yang et al., 2017.

Σε εμπορικό επίπεδο η BPA παράγεται από την χημική αντίδραση δυο μορίων φαινόλης και ενός μορίου ακετόνης με την συμβολή του υδροχλωρίου ως καταλύτη, ο οποίος διαβιβάζεται με την μορφή φουσαλίδων (Σχήμα 1.13). Σε βιομηχανικό επίπεδο παράγεται με την εισαγωγή των αντιδρώντων σε αντιδραστήρα στους 75 °C. Στη συνέχεια απομακρύνεται το νερό και η ακετόνη μέσω συμπίεσης, κρυσταλλώνεται και τελικά, ύστερα από έκπλυση με φαινόλη, οδηγείται σε απόσταξη υπό κενό Altuwair, 2018.



Σχήμα 1.13: Αντίδραση σχηματισμού BPA Altuwair, 2018.

Έρευνες έχουν δείξει ότι η BPA συνδέεται με επικίνδυνες επιπτώσεις στην υγεία, με πιθανή γενετοξική και καρκινική δράση. Υποστηρίζεται ότι η δισφαινόλη Α αποτελεί ενδοκρινικό διαταράκτη που μπορεί να προκαλέσει ορμονική διαταραχή με άμεση συνέπεια στην ανάπτυξη και εξέλιξη του οργανισμού καθώς και της αναπαραγωγής. Μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία της αναπαραγωγής, σε αποβολές, γενετικές ανωμαλίες στα παιδιά και καρκίνο του μαστού. Σύμφωνα με μελέτες, η BPA όταν χρησιμοποιείται ως επίστρωση στο εσωτερικό δοχείων που περιέχουν προϊόντα, έχει την ικανότητα να διεισδύει από τα τοιχώματα στο προϊόν με αποτέλεσμα να υπάρχει πιθανότητα κατανάλωσης Ullah and Zheng, 2015; Yang et al., 2017; Pei Ying et al., 2017. Για το λόγο αυτό σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία “Κανονισμός (ΕΕ) 2018/213”, 2018 έχει απαγορευτεί η χρήση της BPA σε πλαστικά μπουκάλια διατροφής βρεφών, συσκευασίες δημητριακών και γαλακτοκομικών προϊόντων που προορίζονται για παιδιά και βρέφη καθώς και πλαστικά παιχνίδια. Ταυτόχρονα έχει περιοριστεί το όριο ειδικής

μετανάστευσης στα τρόφιμα (Specific Migration Limit, SML²) στην τιμή 0.05 mg BPA/ kg τροφίμου (mg/kg), ώστε να ληφθεί υπόψη η νέα ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (ΑΗΠ) που είναι ίση με 4 µg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα “Κανονισμός (ΕΕ) 2018/213”, 2018.

Οι δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία που σχετίζονται με την δράση της δισφαινόλης Α έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση νέων τεχνικών ανίχνευσης της ουσίας σε οικιακά προϊόντα και σε τρόφιμα. Έχουν αναπτυχθεί ήδη ποικίλες μέθοδοι ανίχνευσης της BPA στα προϊόντα ενδιαφέροντος όπως μέσω της υγρής χρωματογραφίας, αέρια χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας και ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) η οποία αποτελεί βιοχημική μέθοδος που ανιχνεύει την ύπαρξη ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Οι παραπάνω μέθοδοι, παρόλο που είναι ακριβής και έχουν χαμηλό όριο ανίχνευσης, είναι χρονοβόρες, ακριβές και απαιτούν εξειδικευμένο εργαστηριακό προσωπικό Yang et al., 2017; Pei Ying et al., 2017.

Υποσχόμενη τεχνική αποτελεί η φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση (SERS). Αποτελεί διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μορίων που έχουν προσροφηθεί στην επιφάνεια υποστρωμάτων που συμβάλλουν στην ενίσχυση του σήματος της σκέδασης Raman. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως ευγενή μέταλλα ή μεταλλικά νανοσωματίδια. Το πρόβλημα που εμφανίζεται είναι η αδύναμη συγγένεια της BPA με τα μεταλλικά υποστρώματα με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται ανίχνευσής της με την παραδοσιακή μέθοδο του SERS Yang et al., 2017. Επιχειρούνται διαρκώς νέοι μέθοδοι για την επιτυχής ανίχνευση BPA μέσω SERS που περιλαμβάνουν από τη χρήση linkers μέχρι Roschi et al., 2021 και χρήση φύλλων γραφενίου Pei Ying et al., 2017.

²«Όριο ειδικής μετανάστευσης» (SML): η μέγιστη επιτρεπόμενη ποσότητα δεδομένης ουσίας που ελευθερώνεται από ένα υλικό ή αντικείμενο στα τρόφιμα ή στους προσομοιωτές τροφίμων “Κανονισμός (ΕΕ) 2018/213”, 2018.

2. Μέθοδοι ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων αργύρου

2.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Η μέθοδος Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές τεχνικές χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων και η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην κίνηση Brown Δεμέτζος, 2014. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό σωματιδιακών μεγεθών και κατανομών μεγεθών. Βασίζεται στον υπολογισμό του συντελεστή διάχυσης των σωματιδιακών δομών μέσω της φωτοβόλησης του δείγματος με μονοχρωματική ακτινοβολία και της καταγραφής των διακυμάνσεων της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός Δεμέτζος, 2014; Bhattacharjee, 2016.

Κίνηση Brown είναι η τυχαία κίνηση σωματιδίων σε ένα μέσο διασποράς. Είναι το αποτέλεσμα της θερμικής ενέργειας που δέχονται τα σωματίδια του δείγματος από την σύγκρουσή τους με τα μόρια του διαλύτη. Η διακύμανση της έντασης πραγματοποιείται εξαιτίας των τυχαίων κινήσεων Brown των σωματιδίων Δεμέτζος, 2014; Bhattacharjee, 2016.

2.1.1 Μέγεθος Νανοσωματιδίων

Ως μέγεθος εκφράζεται η υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων η οποία συσχετίζεται με τον συντελεστή διάχυσης μέσω της εξίσωσης Stokes-Einstein Δεμέτζος, 2014; Bhattacharjee, 2016:

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Όπου D_h είναι η υδροδυναμική διάμετρος, k_B η σταθερά Boltzman, T η απόλυτη θερμοκρασία, η το ιξώδες του μέσου διασποράς και D_t ο συντελεστής διάχυσης.

Η μέθοδος περιλαμβάνει μονοχρωματική ακτινοβολία που προσπίπτει στο δείγμα το οποίο βρίσκεται υπό μορφή διασποράς μέσα στην κυψελίδα. Τα σωματίδια σκεδάζουν μέρος της ακτινοβολίας και λόγω της κίνησης Brown μεταβάλλεται η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το χρόνο. Η διάμετρος των σωματιδίων συνδέεται με την ταχύτητα κίνησής τους, συγκεκριμένα όσο μικρότερα είναι τόσο πιο γρήγορα κινούνται. Δεν πληροφορεί τον χρήστη για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων και τα θεωρεί όλα σφαιρικά. Έτσι η υδροδυναμική διάμετρος είναι η διάμετρος μιας νοητής σφαίρας που έχει τον ίδιο συντελεστή διάχυσης με το σωματίδιο Δεμέτζος, 2014; Bhattacharjee, 2016

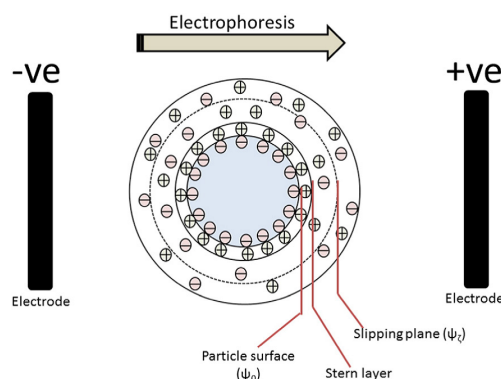
2.1.2 Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)

Αποτελεί μέτρο της ετερογένειας ενός δείγματος ως προς το μέγεθος των νανοσωματιδίων και μπορεί να λάβει τιμές από 0 έως 1. Νανοσωματίδια με τιμή PDI κοντά στο 0 εμφανίζουν ομοιομορφία μεγέθους (μονοδιασπορά), ενώ κατά την απομάκρυνση από την τιμή 0 έχουν ευρεία κατανομή μεγέθους και επομένως πολυδιασπορά Bhattacherjee, 2016.

2.1.3 ζ-δυναμικό

Το μέτρο του ζ-δυναμικού αποτελεί ένδειξη της σταθερότητας του κολλοειδούς συστήματος σωματιδίων-υγρού μέσου διασποράς. Η λειτουργία της μεθόδου για τον υπολογισμό του ζ-δυναμικού βασίζεται στην αρχή σκέδασης του φωτός. Το δείγμα τοποθετείται σε έναν θάλαμο που περιέχει δυο ηλεκτρόδια και μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου τα φορτισμένα σωματίδια αναγκάζονται να μεταναστεύουν προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο Δεμέτζος, 2014; Bhattacherjee, 2016

Τα στερεά σωματίδια σε ένα υγρό μέσο διασποράς είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ανάλογα με το φορτίο των ομάδων που αποτελούν το σωματίδιο και των προσροφημένων ιόντων από το μέσο διασποράς. Αντίθετα φορτισμένα ιόντα του μέσου διασποράς συγκεντρώνονται στην επιφάνεια των σωματιδίων. Έτσι δημιουργούνται δύο υγρές στιβάδες που περιβάλλουν το σωματίδιο, η στιβάδα Stern (εσωτερική) και η στιβάδα διάχυσης (εξωτερική) και αποτελούν την ηλεκτρική διπλοστιβάδα (Electric Double Layer, EDL). Η στιβάδα Stern περιέχει αντίθετα φορτισμένα από το σωματίδιο ιόντα, ενώ η εξωτερική φέρει θετικά ή αρνητικά ιόντα που δέχονται ελκτικές ή απωστικές δυνάμεις από το επιφανειακό φορτίο του σωματιδίου. Μέσα σε αυτή υπάρχει ένα υποθετικό επίπεδο που ονομάζεται επίπεδο ολίσθησης (Slipping plane) και αποτελεί διεπιφάνεια μεταξύ των κινούμενων σωματιδίων και του στρώματος διασποράς το οποίο έχει ηλεκτροφορηθεί. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται μία ηλεκτρική διπλοστιβάδα γύρω από κάθε σωματίδιο (Σχήμα 2.1). Έτσι λοιπόν το ζ-δυναμικό ορίζεται ως η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται στο επίπεδο ολίσθησης Bhattacherjee, 2016.



Σχήμα 2.1: Μέθοδος υπολογισμού ζ-δυναμικού. Διακρίνονται στην εικόνα η εσωτερική και εξωτερική στιβάδα, καθώς και η στιβάδα ολίσθησης Bhattacherjee, 2016.

Η τιμή του ζ-δυναμικού αποτελεί ένδειξη της σταθερότητας των νανοσωματιδίων. Όσο

αυξάνεται το ζ-δυναμικό κατά απόλυτη τιμή, τόσο περισσότερο απωθούνται τα σωματίδια μεταξύ τους και ελαττώνονται οι συσσωματώσεις. Τέτοιες τιμές είναι συνήθως μεγαλύτερες από ± 30 mV Δεμέτζος, 2014. Όμως για χαμηλό κατά απόλυτη τιμή ζ-δυναμικό, οι έλξεις μεταξύ των σωματιδίων είναι μεγαλύτερες από τις απώσεις και έτσι έχουν την τάση να συσσωματώνονται Δεμέτζος, 2014; Bhattacharjee, 2016.

2.2 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Η φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού φωτός (UV-Vis) είναι αναλυτική τεχνική με την οποία ταυτοποιείται και υπολογίζεται η συγκέντρωση ουσίας σε ένα υγρό διάλυμα. Στηρίζεται στις ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις των μορίων της ουσίας που απορροφάει ακτινοβολία στην ορατή (750-380 nm) και υπεριώδη περιοχή (400-100 nm). Με τον τρόπο αυτό τα είδη των σωματιδίων συσχετίζονται με τα μήκη κύματος των απορροφήσεων και είναι εφικτός ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών ομάδων μιας ένωσης (ποιοτική ανάλυση). Ταυτόχρονα με τη χρήση του νόμου Lambert-Beer υπολογίζεται η συγκέντρωση της ένωσης (ποσοτική ανάλυση), καθώς η απορρόφηση της ακτινοβολίας εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας που απορροφά την ακτινοβολία Skoog et al., 2007; Shard et al., 2020.

Μετράται η απορρόφηση ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος και μετατρέπεται σε μονάδες συγκέντρωσης σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times c \times l$$

Όπου η απορρόφηση, I_0 η ακτινοβολία αρχικής έντασης με την οποία εισέρχεται στην κυψελίδα, I ακτινοβολία έντασης με την οποία εξέρχεται, ϵ ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, c η συγκέντρωση του διαλύματος, l η διαδρομή που κάνει η ακτινοβολία μέσα στο διάλυμα Skoog et al., 2007; Shard et al., 2020.

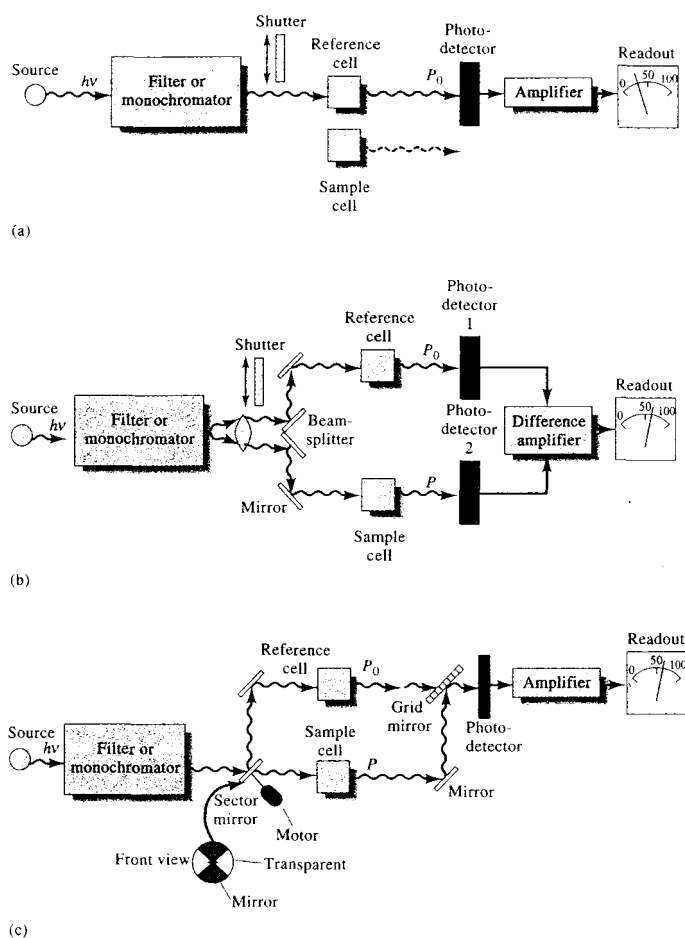
Η φασματοσκοπία UV-Vis χρησιμοποιείται ευρέως καθώς αποτελεί απλή, σύντομη μέθοδο, με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία και είναι μη καταστρεπτική για το δείγμα από το οποίο απαιτείται μικρή ποσότητα. Επίσης είναι χρήσιμη τεχνική για την παρακολούθηση αντιδράσεων όταν η απορρόφηση των αντιδρώντων διαφέρει από αυτή των προϊόντων Shard et al., 2020.

Το φάσμα απορρόφησης της διαλυμένης ουσίας αποτελεί γραφική απεικόνιση της απορρόφησης ενός διαλύματος συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και δίνει ωφέλιμες πληροφορίες για τη δομή της ουσίας που απορροφά. Τα χαρακτηριστικά απορρόφησης των ουσιών και τελικά τα φάσματα απορρόφησης μεταβάλλονται ανάλογα με τις συνθήκες του διαλύματος όπως θερμοκρασία και pH και την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων με τον διαλύτη όπως δεσμούς υδρογόνου Shard et al., 2020.

Πειραματικά οι μετρήσεις γίνονται στην περιοχή του ορατού και εγγύς υπεριώδους (400-190 nm), καθώς στην περιοχή άπω υπεριώδους (190-100 nm) η ακτινοβολία απορροφάται από

τον ατμοσφαιρικό αέρα και από το υλικό των κυψελίδων Skoog et al., 2007.

Η οργανολογία της φασματοσκοπίας υπεριώδους - ορατού φωτός (UV-Vis) περιλαμβάνει πηγή με συνεχές φάσμα εκπομπής το οποίο παράγεται συνήθως με λυχνίες δευτερίου ή υδρογόνου για την υπεριώδη περιοχή και βολφραμίου για την ορατή. Τα δείγματα τοποθετούνται σε κυψελίδες κατασκευασμένες από υλικό, συνήθως χαλαζία, μέσα από το οποίο μπορεί να διέλθει η ακτινοβολία. Χρησιμοποιείται μονοχρωμάτορας για την επιλογή μήκους κύματος της ακτινοβολίας και στο τέλος κάθε διαδρομής υπάρχει οπτικός ανιχνευτής που μετατρέπει την ενέργεια της ακτινοβολίας σε ηλεκτρικό σήμα Skoog et al., 2007. Τα φασματόμετρα μπορεί να είναι απλής ή διπλής δέσμης όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 2.2.



Σχήμα 2.2: Φασματόμετρα UV-Vis απλής (a) και διπλής δέσμης (b, c) Skoog et al., 2007.

2.2.1 Νανοσωματίδια αργύρου και UV-Vis

Η επιβεβαίωση της ύπαρξης νανοσωματιδίων γίνεται πολύ συχνά με την φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους UV-Vis. Πιο συγκεκριμένα επιτυγχάνεται με τον έλεγχο της απορρόφησης στην περιοχή 400-430 nm, η οποία είναι ενδεικτική του σχηματισμού νανοσωματιδίων αργύρου (φαινόμενο συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων, Surface

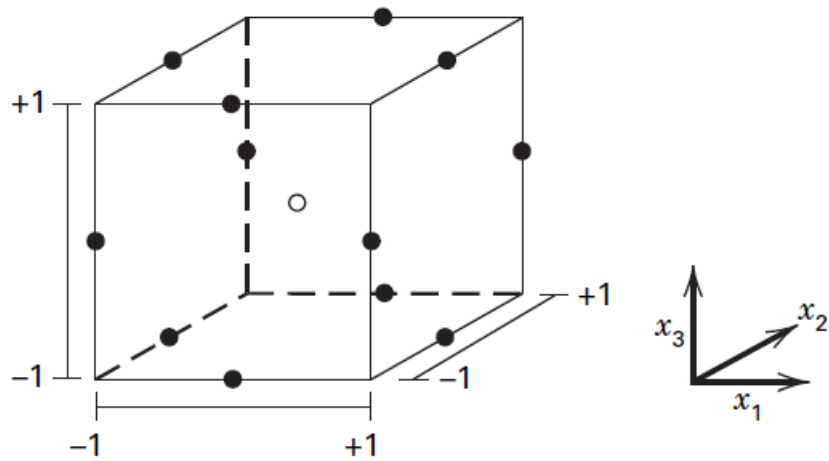
Plasmon Resonance SPR). Η αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με την υπεριώδη και ορατή ακτινοβολία οφείλεται στο φαινόμενο συντονισμού SPR και εξαρτάται από ορισμένα χαρακτηριστικά τους όπως το σχήμα και το μέγεθος. Με τον τρόπο αυτό είναι πιθανός ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών τους μέσα από την μελέτη του φάσματος UV-Vis Rucha et al., 2012.

3. Πειραματικός Σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη της αλληλεπίδρασης ορισμένων παραγόντων του πειράματος και την επίτευξη του βέλτιστου αποτελέσματος με τον ελάχιστο αριθμό πειραμάτων και κόστος. Οι G. Box και K. B. Wilson προτείνανε ένα σύνολο στατιστικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τη μοντελοποίηση και την πρόβλεψη της απόκρισης ενός εξεταζόμενου μεγέθους, στην οποία επιδρούν μια σειρά από ανεξάρτητες μεταβλητές εισόδου, με στόχο τη βελτιστοποίησή της Montgomery, 2017.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και την εύρεση της βέλτιστης γεωμετρίας είναι η Μεθοδολογία Επιφανειών Απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM). Μέσω της RSM μελετάται η σχέση ανάμεσα στις συνθήκες του πειράματος (μεταβλητές) και των αποτελεσμάτων του και κατασκευάζονται γραφήματα που αναπαριστούν αυτή τη σχέση. Μάλιστα τα τρισδιάστατα μοντέλα προβάλλουν τη σχέση ανάμεσα σε μια απόκριση (αποτέλεσμα) και δυο ανεξάρτητων μεταβλητών, με σταθερές τις υπόλοιπες μεταβλητές Montgomery, 2017; Viswanath et al., 2016. Η RSM έχει χρησιμοποιηθεί για την εύρεση των εξισώσεων συσχέτισης μεταξύ των ποσοτήτων των αντιδρώντων στην παραγωγή νανοσωματιδίων αργύρου και του μεγέθους και ζ-δυναμικού των σωματιδίων Koukouzelis et al., 2020, μέχρι και για την βελτιστοποίηση της παραγωγής ενζύμων από βακτήρια όπως *Aspergillus niger* Viswanath et al., 2016.

Ο σχεδιασμός Box–Behnken (BBD) αποτελεί ερευνητική μέθοδο που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον σχεδιασμό πειραμάτων και τη μετέπειτα ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων. Είναι κατάλληλο να δώσει μοντέλο πρόβλεψης για πειράματα πολλαπλών παραγόντων. Βασίζεται στον καθορισμό τριών επιπέδων σχεδίασης για κάθε παράγοντα χαμηλό, μεσαίο και υψηλό και με τη χρήση ενός κύβου (Σχήμα 3.1) αναπαριστώνται τα σημεία, τα οποία είναι τοποθετημένα εσωτερικά στις ακμές ενός κύβου, με ένα κεντρικό σημείο που επαναλαμβάνεται. Δεν υπάρχουν σημεία στις κορυφές του κύβου το οποίο είναι χρήσιμο όταν είναι επιθυμητή η αποφυγή μελέτης ακραίων τιμών μιας μεταβλητής που έχει περιορισμούς Montgomery, 2017.



Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση πειραμάτων Box Behnken για 3 μεταβλητές σχεδιασμού Montgomery, 2017.

4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παραγωγή καινοτόμου υλικού κατάλληλο να λειτουργήσει ως υπόστρωμα SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)) για την ανίχνευση της δισφαινόλης A. Για αυτό το σκοπό ακολουθήθηκαν τα εξής:

- ▶ Σύνθεση δυο ειδών νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) με χρήση δυο ιοντικών υγρών «ειδικής αποστολής» των οποίων τα συστατικά επιλέχθηκαν να έχουν αναγωγικό, σταθεροποιητικό και προστατευτικό χαρακτήρα.
- ▶ Μελέτη των παραγόμενων νανοσωματιδίων αργύρου απο τα δύο ιοντικά υγρά ως προς την ικανότητά τους να λειτουργήσουν ως υπόστρωμα SERS για την ανίχνευση της δισφαινόλης A.
- ▶ Επιλογή κατάλληλου υλικού για την ανίχνευση της δισφαινόλης A με φασματοσκοπία Raman.
- ▶ Βελτιστοποίηση και εύρεση των σημαντικών πειραματικών παραμέτρων της διεργασίας, μέσω πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken με απόκριση το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων και την χαμηλότερη συγκέντρωση ανίχνευσης BPA με φασματοσκοπία Raman.

4.2 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του ιοντικού υγρού και των νανοσωματιδίων είναι τα ακόλουθα:

- ▶ Αιθανολαμίνη, 61.084 g/mol
- ▶ Ασκορβικό οξύ, 176.13 g/mol
- ▶ Κιτρικό οξύ (άνυδρο), 192.124 g/mol
- ▶ Μεθανόλη
- ▶ Χιτοζάνη, 5-20 mPa*s, 0.5% σε 0.5% οξικό οξύ στους 20°C

- ▶ Νιτρικός άργυρος, 169.87 g/mol
- ▶ Υπερκάθαρο νερό
- ▶ Δισφαινόλη Α (Bisphenol A, BPA), 228.29 g/mol
- ▶ Αιθανόλη
- ▶ Διάλυμα Piranha (Θειικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου σε αναλογία 3:1)

4.3 Όργανα και συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και την αξιολόγηση των ιοντικών υγρών και των νανοσωματιδίων είναι τα εξής:

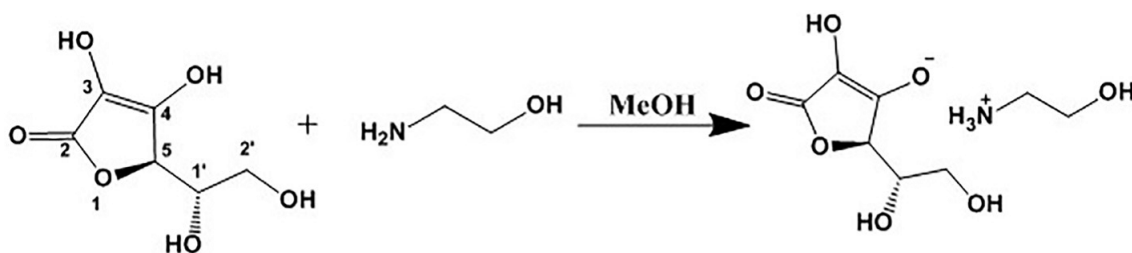
- ▶ Αναλυτικός ζυγός, Kern ADJ
- ▶ Αναδευτήρας Vortex, ZX4, Velp
- ▶ Λουτρό υπερήχων, Wisd
- ▶ Φυγόκεντρος
- ▶ Περιστροφικός εξατμιστήρας, Buchi
- ▶ Αντλία κενού
- ▶ Συσκευή DLS, Malvern Zetasizer Nano ZS
- ▶ Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, διπλής δέσμης, JASCO V-770
- ▶ Φασματοφωτόμετρο Raman, RENISHAW inVia Raman Microscope

Σημείωση: Όλα τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρισμένα με διάλυμα piranha.

4.4 Μέθοδοι

4.4.1 Παρασκευή Ιοντικών Υγρών, (IY)

Η μέθοδος σύνθεσης των ιοντικών υγρών περιλαμβάνει αντίδραση εξουδετέρωσης (Σχήμα 4.1), σύμφωνα με τη μελέτη Koukouzelis et al., 2020. Γίνεται προσθήκη του οξέος στην αιθανολαμίνη, υπό συνεχή ανάδευση. Η διαλυτοποίηση του στερεού οξέος γίνεται αρχικά σε ποσότητα μεθανόλης, πριν την προσθήκη στην σφαιρική φιάλη που περιέχει την αμίνη.



Σχήμα 4.1: Αντίδραση παρασκευής IY από ασκορβικό οξύ και αιθανολαμίνη Koukouzelis et al., 2020.

Αρχικά, ζυγίζεται ισομοριακή ποσότητα στερεού οξέος και αιθανολαμίνης. Το οξύ διαλυτοποιείται σε ποσότητα μεθανόλης (5-8 ml). Έπειτα το διάλυμα του οξέος προστίθεται με τη βοήθεια πιπέτας (100-1000 μ l) στη σφαιρική φιάλη που περιέχει την ποσότητα αιθανολαμίνης και τυλίγεται με αλουμινόχαρτο (για την προστασία του ασκορβικού οξέος από φωτοχημική οξείδωση). Είναι αναγκαία η συνεχής ανάδευση με την προσθήκη μαγνήτη και τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα στα 400 rpm. Το αντιδρών σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης η σφαιρική φιάλη υπόκειται σε περιστροφική εξάτμιση υπό κενό για την απομάκρυνση του διαλύτη σε θερμοκρασία 40°C και για 20 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετείται σε αντλία κενού για περαιτέρω απομάκρυνση ιχνών μεθανόλης ή τυχόν υγρασίας που έχει προσχωρήσει στο τελικό προϊόν, για μία ώρα.

4.4.1.1 Κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (IY1)

Για την παρασκευή του IY1 χρησιμοποιήθηκαν ισομοριακές ποσότητες αιθανολαμίνης και κιτρικού οξέος. Ζυγίστηκαν 676.6 mg άνυδρου κιτρικού οξέος και 214.1 mg αιθανολαμίνης. Ακολουθήθηκε ο τρόπος παρασκευής σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο. Κατά την εξάτμιση το IY από άχρωμο έγινε κίτρινο υγρό με μεγαλύτερο ιξώδες (Σχήμα 4.2) και κατά την ξήρανση στην αντλία κενού (χωρίς θέρμανση) απέκτησε έντονο κίτρινο χρώμα και με υψηλό ιξώδες (Σχήμα 4.3).

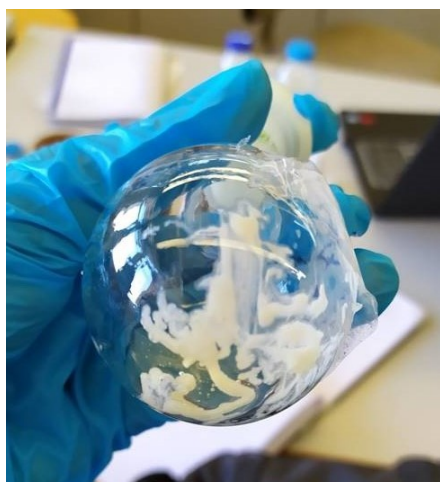
Μετά το πέρας της ξήρανσης παρατηρήθηκε η εμφάνιση λευκών κηλίδων στο κίτρινο υγρό, το οποίο στη συνέχεια λόγω ανάδευσης μετατράπηκε σε λευκό στερεό (Σχήμα 4.4 και 4.5).



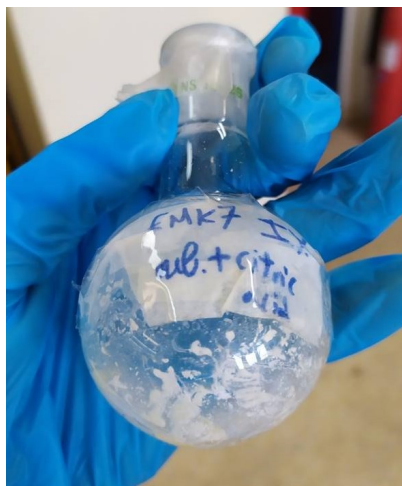
Σχήμα 4.2: Εξάτμιση του ΙΥ1 στον περιστροφικό εξατμιστήρα.



Σχήμα 4.3: Το ΙΥ1 στην αντλία κενού.



Σχήμα 4.4: Ιοντικό υγρό 1 (ΙΥ1).



Σχήμα 4.5: Τελική μορφή ΙΥ1.

4.4.1.2 Ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (ΙΥ2)

Με το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο παρασκευάστηκαν τα νανοσωματίδια αργύρου στο κομμάτι του πειραματικού σχεδιασμού που ακολουθείται στο κεφάλαιο 4.4.3, σύμφωνα με τη δημοσίευση Koukouzelis et al., 2020. Για την παρασκευή του ΙΥ2 χρησιμοποιήθηκαν ισομοριακές ποσότητες αιθανολαμίνης και ασκορβικού οξέος (3.28 mmol). Πιο συγκεκριμένα 200 mg αιθανολαμίνης και 579.9 mg ασκορβικού οξέος. Ακολουθήθηκε ο τρόπος παρασκευής σύμφωνα με τα παραπάνω. Το προκύπτον ΙΥ έχει υψηλό ιξώδες και κόκκινο/πορτοκαλί χρώμα όπως διακρίνεται στην παρακάτω εικόνα (Σχήμα 4.7).



Σχήμα 4.6: Εξάτμιση του ΙΥ2 στον περιστροφικό εξατμιστήρα.



Σχήμα 4.7: Το Ιοντικό υγρό 2 στην αντλία κενού.

4.4.2 Παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου

Η παρασκευή των νανοσωματιδίων αργύρου περιλαμβάνει την διαλυτοποίηση της χιτοζάνης σε διάλυμα οξέος και την δημιουργία διαλυμάτων νιτρικού αργύρου και ιοντικού υγρού συγκέντρωσης 1 M. Μετά την πλήρη διάλυση της χιτοζάνης, μεταφέρονται 15 ml του διαλύματος σε σφαιρική φιάλη η οποία τυλίγεται με αλουμινόχαρτο σε απαγωγό χωρίς φως, καθώς ο άργυρος είναι φωτοευαίσθητος (Σχήμα 4.8), κλείνεται με πώμα και τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα για ανάδευση στα 600 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου. Ποσότητα του διαλύματος νιτρικού αργύρου προστίθεται στην σφαιρική και αναδεύεται για 5 min. Ύστερα προστίθεται ποσότητα του διαλύματος ΙΥ και αναδεύεται για 10 min. Ο σχηματισμός των AgNPs διακρίνεται άμεσα με την αλλαγή του χρώματος από άχρωμο σε σκούρο γκρι, όπου το αφήνουμε σε ανάδευση για 15 λεπτά (Σχήμα 4.9).



Σχήμα 4.8: Διαδικασία σύνθεσης AgNPs στον απαγωγό.



Σχήμα 4.9: Κολλοειδές διάλυμα AgNPs.

Ο καθαρισμός των νανοσωματιδίων περιλαμβάνει τέσσερις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Μετά από κάθε φυγοκέντρωση απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό και επαναδιαλύονται τα νανοσωματίδια σε υπερκάθαρο νερό ή διάλυμα οξέος, με χρήση υπερήχων και Vortex. Τελικά γίνεται επαναιώριση των νανοσωματιδίων σε μικρή ποσότητα υπερκάθολου νερού και αποθηκεύονται σε σκουρόχρωμα φιαλίδια στο ψυγείο (4 °C) με άζωτο.

4.4.2.1 Παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου από κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (IY1)

Τα νανοσωματίδια αυτά παρασκευάστηκαν από την αναγωγή του νιτρικού άλατος με το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (IY1). Το διάλυμα χιτοζάνης που παρασκευάζεται έχει περιεκτικότητα 0.1% w/v χιτοζάνη (CS) σε 2% v/v ασκορβικό οξύ. Παρασκευάζονται 90 ml διαλύματος χιτοζάνης σε κωνική φιάλη και τοποθετείται σε αναδευτήρα με μαγνήτη και αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση της χιτοζάνης. Κατασκευάζονται τα διαλύματα AgNO₃ (1 M) και IY1 (1 M) με επιθυμητό τελικό όγκο τα 1200 ml, καθώς θα παρασκευαστούν πέντε είδη AgNPs, διαφορετικών ποσοτήτων νιτρικού και ιοντικού υγρού. Σε erpendorf των 1.5 ml ζυγίζονται 286.2 mg IY1 και προστίθενται 1207.3 ml υπερκάθαρο νερό. Αναδεύεται με τη χρήση vortex για την πλήρη διάλυση του ιοντικού υγρού. Έπειτα ζυγίζεται ποσότητα νιτρικού αργύρου ίση με 212.7 mg απευθείας σε erpendorf και διαλυτοποιείται σε 1251.9 ml υπερκάθαρο νερό με τη χρήση Vortex.

Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml μεταφέρονται 15 ml διαλύματος χιτοζάνης (0.1% w/v σε 2% v/v ασκορβικό οξύ) και τίθεται σε ανάδευση στα 600 rpm. Καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και κλείνεται με πώμα. Η αντίδραση γίνεται σε σκοτεινό απαγωγό και ξεκινάει με την προσθήκη 180 ml διαλύματος IY1 (1 M) και ανάδευση για 5 min. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 180 ml διαλύματος AgNO₃ (1 M) και ακολουθεί ανάδευση για 10 min. Παρατηρήθηκε σχηματισμός AgNPs με την αλλαγή χρώματος του διαλύματος σε σκούρο γκρι.

Έστερα γίνονται τέσσερις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, όπου μετά από κάθε φυγοκέντρωση απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό και επαναδιαλύονται τα νανοσωματίδια σε υπερκάθαρο νερό ή διάλυμα ασκορβικού οξέος, με χρήση υπερήχων και Vortex. Τελικά γίνεται επαναιώριση των νανοσωματιδίων σε μικρή ποσότητα υπερκάθολου νερού και αποθηκεύονται σε σκουρόχρωμα φιαλίδια στο ψυγείο (4 °C) με άζωτο.

Παρασκευάζονται με την ίδια μεθοδολογία νανοσωματίδια με διάφορες αναλογίες ποσοτήτων διαλυμάτων AgNO₃ και IY1, οι οποίες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Παραγόμενα νανοσωματίδια αργύρου από **IY1** με 0.1%w/v χιτοζάνης (CS) σε 2% ασκορβικό οξύ.

AgNPs	AgNO ₃ (μl)	IY (μl)
1	180	180
2	240	180
3	180	240
4	240	240
5	210	210

4.4.3 Πειραματικός Σχεδιασμός - Βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής νανοσωματιδίων αργύρου

Χρησιμοποιείται πειραματικός σχεδιασμός τύπου Box-Behnken μέσω της εφαρμογής Design Expert για την παραγωγή των κατάλληλων νανοσωματιδίων και γίνονται δυο επαναλήψεις του κεντρικού σημείου (0 0 0) για την εκτίμηση του γνήσιου σφάλματος. Επιλέγεται το ιοντικό υγρό ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (**IY2**). Αυτό το ιοντικό υγρό είχε χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες για την παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου, τα οποία λειτούργησαν ως αποτελεσματικό υπόστρωμα SERS για την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων ροδαμίνης B Koukouzelis et al., 2020.

Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό πρέπει να πραγματοποιηθούν 14 πειράματα. Τα νανοσωματίδια παρασκευάστηκαν από την αναγωγή του νιτρικού άλατος με το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (**IY2**), σύμφωνα με το κεφάλαιο 4.4.2. Οι μεταβαλλόμενοι παράγοντες των πειραμάτων είναι οι ποσότητες των διαλυμάτων του άλατος AgNO₃ και του **IY2** συγκέντρωσης 1 M και η %w/v περιεκτικότητα του διαλύματος χιτοζάνης σε 2% διάλυμα κιτρικού οξέος. Οι τιμές των μεταβλητών συμβολίζονται με -1, 0 και 1 και αντιστοιχούν στις ποσότητες στον πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Αντιστοίχιση των μεταβλητών στο πρόγραμμα Design Expert.

Παράγοντες	-1	0	1
AgNO ₃ (μl)	150	200	250
IY (μl)	150	200	250
% w/v Χιτοζάνη	0.1	0.25	0.4

Οι 14 συνδυασμοί διακρίνονται στον παρακάτω πίνακα 4.3. Οι αποκρίσεις που εξετάζονται σε κάθε πείραμα περιλαμβάνουν το μέγεθος των νανοσωματιδίων, τον δείκτη

πολυδιασποράς, το ζ-δυναμικό την χαμηλότερη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση BPA μέσω της επιφανειακής ενίσχυσης της σκέδασης Raman.

Πίνακας 4.3: Τα 14 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό για την παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου.

AgNPs	AgNO ₃ (μl)	ΙΥ (μl)	% w/v Χιτοζάνης
1	0	1	1
2	0	0	0
3	0	0	0
4	1	-1	0
5	0	1	-1
6	-1	0	1
7	-1	0	-1
8	-1	1	0
9	1	0	-1
10	1	0	1
11	-1	-1	0
12	1	1	0
13	0	-1	-1
14	0	-1	1

4.4.4 Χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων

4.4.4.1 Χαρακτηρισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων έγινε με τη μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός μέσω της χρήσης του οργάνου Zetasizer Nano ZS. Πριν την εισαγωγή του δείγματος στο όργανο πραγματοποιείται η απαραίτητη αραίωση και στη συνέχεια ανάδευση σε αναδευτήρα Vortex για να επιτευχθεί καλύτερη διασπορά του δείγματος. Με την χρήση σύριγγας μεταφέρεται ποσότητα του δείγματος στην κυψελίδα τύπου U (DTS1070) μέχρι την πλήρης διαβροχή των ηλεκτροδίων και εξασφαλίζεται ότι δεν δημιουργήθηκαν φυσαλίδες. Έπειτα κλείνονται οι εισοδοί της με πώματα και τοποθετείται στο όργανο. Με την επιλογή του κατάλληλου SOP, λαμβάνονται οι μετρήσεις μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού. Για κάθε μέγεθος λαμβάνονται τρεις μετρήσεις με σκοπό την επίτευξη επαναληψιμότητας και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους.

4.4.4.2 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων επιβεβαιώθηκε μέσω του φάσματος απορρόφησης Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis). Για την διενέργεια της UV-Vis ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή διπλής δέσμης JASCO V-770. Λαμβάνονται 20 μl από το δείγμα των νανοσωματιδίων αργύρου και αραιώνονται με 3 ml υπερκάθαρου νερού στην κυψελίδα. Τα δείγματα τοποθετούνται στην συσκευή μετά την εξισορρόπηση και μηδενισμό του ανιχνευτή με υπερκάθαρο νερό. Το εύρος απορρόφησης είναι για όλα τα δείγματα 300-500 nm.

4.4.4.3 Φασματοσκοπία Raman

Η ικανότητα των νανοσωματιδίων αργύρου να προκαλέσουν το φαινόμενο SERS μελετήθηκε με τη χρήση συσκευής micro-Raman (Renishaw In-via Raman Spectrometer) και με ακτινοβολία λέιζερ μήκους κύματος 532 nm. Χρησιμοποιήθηκε φακός μεγέθυνσης x50, ο χρόνος κάθε μέτρησης ήταν 30 s, με 3 accumulations (αριθμός επαναλήψεων της σάρωσης). Τα παραγόμενα νανοσωματίδια προετοιμάστηκαν σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία.

Σε Eppendorf των 1.5 ml μεταφέρονται με χρήση πιπέτας 15 μl AgNPs και 15 μl διαλύματος ιωδιούχου καλίου (KI) 10^{-3} M και αναδεύονται με την πιπέτα. Έπειτα προστίθενται 30 μl διαλύματος δισφαινόλης A συγκεκριμένης συγκέντρωσης και τέλος 10 μl υδατικού διαλύματος θεικού ψευδαργύρου 10^{-2} M. Το διάλυμα αναδεύεται με την πιπέτα, λαμβάνονται 2-3 μl και τοποθετείται μια σταγόνα σε αντικειμενοφόρο πλάκα καθαρισμένη με διάλυμα πιράνχας. Αφήνεται να στεγνώσει το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλα τα είδη νανοσωματιδίων που παράχθηκαν.

Ταυτόχρονα σύμφωνα με μελέτες τα αλογονίδια συμβάλλουν στον καθαρισμό της επιφάνειας των νανοσωματιδίων από ακαθαρσίες, με αποτέλεσμα να μην εμποδίζεται η προσρόφηση της ουσίας στην επιφάνειά τους. Αναφέρεται ότι η μεγαλύτερη βελτιστοποίηση του SERS έγινε με συγκέντρωση αλογονιδίου 10^{-3} mol/L Yang et al., 2017.

Παράλληλα η προσθήκη του θεικού ψευδαργύρου αποσκοπεί στην ενίσχυση του SERS των νανοσωματιδίων. Έχει βρεθεί ότι τα κατιόντα των θεικών συμβάλλουν στην συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων μέσω της ηλεκτροστατικής έλξης ανάμεσα στα τροποποιημένα με αλογονίδια νανοσωματίδια και τα θεικά ιόντα. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται περισσότερα 'hot spots' που ευθύνονται για τη βελτιστοποίηση του σήματος. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η συγκέντρωση των θεικών και βρέθηκε ότι το βέλτιστο αποτέλεσμα δίνουν τα νανοσωματίδια τροποποιημένα με θεικό ψευδάργυρο συγκέντρωσης 10^{-2} mol/L Yang et al., 2017.

5. Αποτελέσματα-Συζήτηση αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιούνται τεχνικές ενόργανης ανάλυσης για τον χαρακτηρισμό και την εκτίμηση των νανοσωματιδίων αργύρου. Σκοπός είναι η σύγκριση των νανοσωματιδίων ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην ανίχνευση διαφαινόλης Α μέσω της φασματοσκοπίας Raman. Επιλέγεται το κατάλληλο ιοντικό υγρό για την παρασκευή των βέλτιστων νανοσωματιδίων που θα ενισχύσουν το σήμα Raman και μετέπειτα γίνεται η βελτιστοποίησή τους σύμφωνα με την εκάστοτε επιλογή.

5.1 Νανοσωματίδια αργύρου από ΙΥ κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο

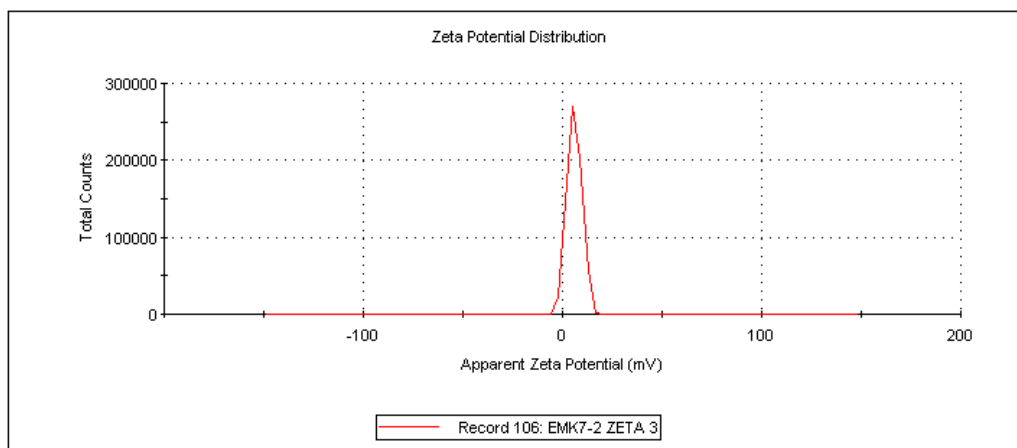
5.1.1 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Η Δυναμική Σκέδαση Φωτός χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν από το ιοντικό υγρό κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (ΙΥ1). Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά ορισμένα διαγράμματα με τις τιμές ζ-δυναμικού, μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς PDI των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν από το ιοντικό υγρό κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (ΙΥ1). Στον πίνακα 5.1 δίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για όλα τα νανοσωματίδια.

Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) για τα νανοσωματίδια αργύρου που παρασκευάστηκαν από το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (ΙΥ1).

AgNPs	ζ-δυναμικό (mV)	SD (mV)	Μέγεθος (d.nm)	SD (d.nm)	PDI	SD
2	+8.3	3.1	684.4	61.2	0.564	0.109
3	+3.9	1.7	376.0	32.5	0.615	0.165
4	+9.5	2.2	601.3	68.7	0.495	0.076
5	+5.4	4.5	92.0	-	0.515	-

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 6.05	Peak 1: 6.05	100.0	3.55
Zeta Deviation (mV): 3.55	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0190	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			



Σχήμα 5.1: Ανάλυση ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων αργύρου από το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (ΙΥ1).

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι τα νανοσωματίδια αργύρου που έχουν συντεθεί από το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (ΙΥ1) εμφανίζουν χαμηλές τιμές ζ-δυναμικού, μεγάλο μέγεθος και υψηλές τιμές δείκτη πολυδιασποράς PDI.

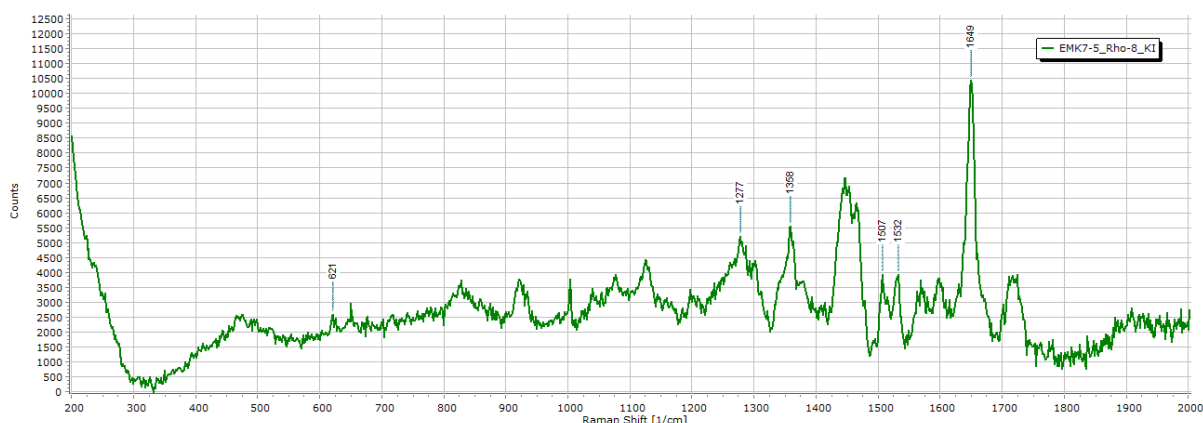
Συγκεκριμένα τα νανοσωματίδια έχουν τιμές ζ-δυναμικού από $+3.9 \pm 1.7$ mV έως $+9.5 \pm 2.2$ mV, κατά απόλυτη τιμή. Ως γνωστών είναι επιθυμητή η υψηλή κατά απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού, το οποίο είναι ένδειξη της σταθερότητας του κolloειδούς συστήματος νανοσωματιδίων Δεμέτζος, 2014; Bhattacharjee, 2016. Επομένως πιθανότατα η κolloειδούς διασπορά των νανοσωματιδίων δεν είναι σταθερή και εμφανίζουν τάση συσσωμάτωσης.

Τα νανοσωματίδια που παράχθηκαν από το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση μεγέθους. Έχουν μέγεθος από 92.0 έως 684.4 ± 61.2 nm, ενώ ο δείκτης πολυδιασποράς κυμαίνεται από 0.495 ± 0.076 και 0.615 ± 0.165 . Είναι γνωστό ότι επιθυμητή τιμή του δείκτη για τα νανοσωματίδια είναι κοντά στο 0 (μικρότερη από 0.3) καθώς τότε υπάρχει ομοιομορφία μεγέθους Bhattacharjee, 2016. Όλα τα νανοσωματίδια που παράχθηκαν με το ΙΥ1 εμφανίζουν υψηλές τιμές του δείκτη.

5.1.2 Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman

Μέσω της φασματοσκοπίας Raman, τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν από το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (IY1), δεν αποτέλεσαν κατάλληλο υπόστρωμα SERS για την ανίχνευση της διαφαινόλης Α σε διάλυμα αιθανόλης.

Επιχειρήθηκε η ανίχνευση της ροδαμίνης Β σε υδατικό διάλυμα με τη χρήση των νανοσωματιδίων από το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο. Η ροδαμίνη Β είναι συνηθισμένη χρωστική που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο φαινομένων SERS. Τελικά λήφθηκε αποδεκτό φάσμα με συγκέντρωση ροδαμίνης 10^{-8} M, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.2.



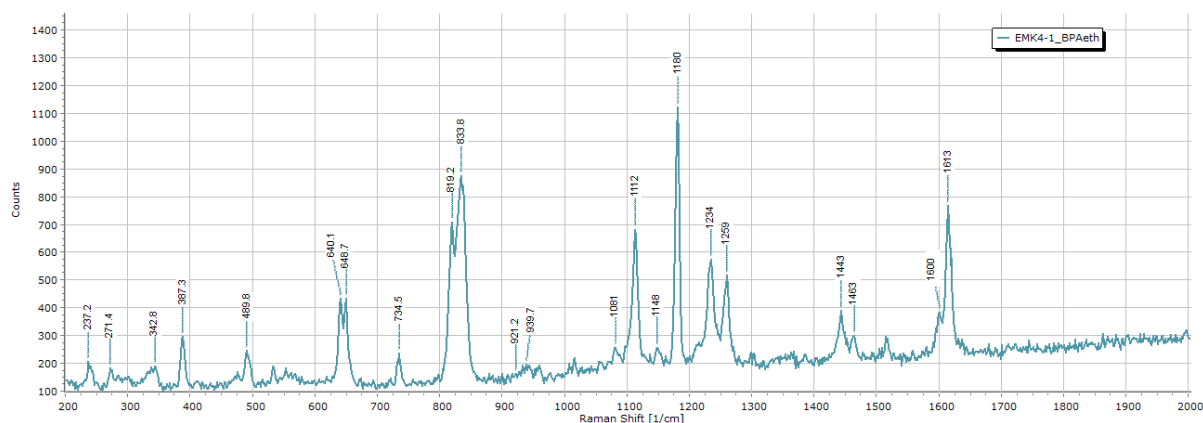
Σχήμα 5.2: Φάσμα Raman της ροδαμίνης Β συγκέντρωσης 10^{-8} M με τα νανοσωματίδια παρασκευασμένα από IY κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο.

Στο παραπάνω φάσμα διακρίνονται οι κορυφές της ροδαμίνης Β. Η κορυφή στα 621 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις κάμψης αρωματικού δακτυλίου. Το σήμα στα 1277 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση κάμψης ομάδας C-H δακτυλίου, ενώ τα 1358 cm^{-1} και 1507 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις τάσης δεσμού C-C. Τέλος, η απορρόφηση στα 1649 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις τάσης C-C Sun et al., 2015.

5.2 Νανοσωματίδια αργύρου από IY ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο

5.2.1 Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman

Ύστερα από παρασκευή των νανοσωματιδίων από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (IY2), σύμφωνα με τη μέθοδο που εξηγείται στην πειραματική διαδικασία, εξετάστηκε η ικανότητά τους ως υπόστρωμα SERS για την ανίχνευση της διαφαινόλης Α. Τα νανοσωματίδια αυτά έχουν προοπτική αφού λήφθηκε ικανοποιητικό φάσμα Raman της BPA (Σχήμα 5.3) συγκέντρωσης 50 mg/ml σε διάλυμα αιθανόλης (0.219 M).



Σχήμα 5.3: Φάσμα Raman της δισφαινόλης Α συγκέντρωσης 50 mg/ml με χρήση των νανοσωματιδίων από ΙΥ ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο.

Από το παραπάνω γράφημα διακρίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της BPA. Τα σήματα στα 342.8 και 489.8 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις κάμψης της ομάδας C-O και στις εντός επιπέδου δονήσεις κάμψης του σκελετού C-C-C αντίστοιχα. Η απορρόφηση στο 640.1 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση κάμψης εντός επιπέδου των δακτυλίων, ενώ η κορυφή στο 648.1 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης της ομάδας C-C. Η κορυφή στο 734.5 cm^{-1} οφείλεται στην συστρεφόμενη δόνηση κάμψης στους δυο δακτυλίους και εν μέρη στην εκτός επιπέδου κάμψη των ομάδων C-O και C-C. Τα σήματα 819.2 και 833.8 cm^{-1} αποδίδονται στην εκτός επιπέδου κάμψη του C-H, τα 921.2 και 939.7 cm^{-1} οφείλονται στην δόνηση τάσης του C-C και τα 1081 και 1112 cm^{-1} είναι λόγω της εκτός επιπέδου κάμψης των ατόμων H δεσμευμένα σε άτομα άνθρακα (παλλόμενη δόνηση). Η κορυφή 1180 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης της ομάδας C-C. Η απορρόφηση στο 1234 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση τάσης του C-O και η απορρόφηση στο 1259 cm^{-1} στην δόνηση τάσης του C-C στους δακτυλίους. Τέλος, οι κορυφές στα 1443 και 1463 cm^{-1} αποδίδονται στην παλλόμενη δόνηση 3 ατόμων H ενωμένα σε ένα άτομο C και οι κορυφές 1600 και 1613 cm^{-1} στην δόνηση τάσης της ομάδας C-C στους δακτυλίους Ullah and Zheng, 2015; Yang et al., 2017.

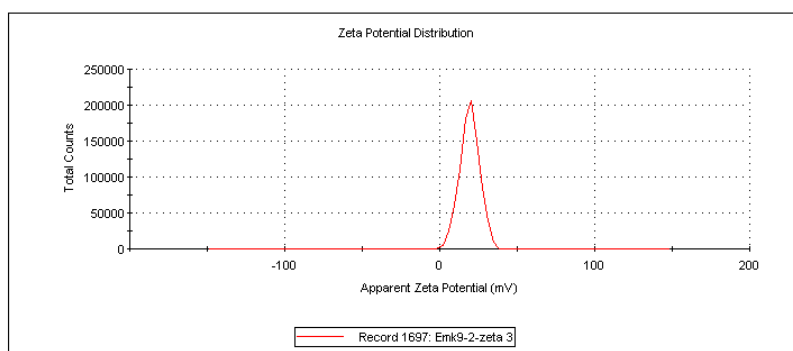
5.3 Πειραματικός σχεδιασμός - Experimental Design

5.3.1 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν από το ιοντικό υγρό ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (IY2) χρησιμοποιήθηκε η Δυναμική Σκέδαση Φωτός. Παρακάτω δίνονται ενδεικτικά ορισμένα διαγράμματα με τις τιμές ζ-δυναμικού, μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς PDI των νανοσωματιδίων που παρήχθησαν από το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (Σχήμα 5.4 και 5.5). Στον πίνακα 5.2 δίνονται τα αποτελέσματα των μερήσεων για όλα τα νανοσωματίδια.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 19.2	Peak 1: 19.2	100.0	6.38
Zeta Deviation (mV): 6.38	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0224	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

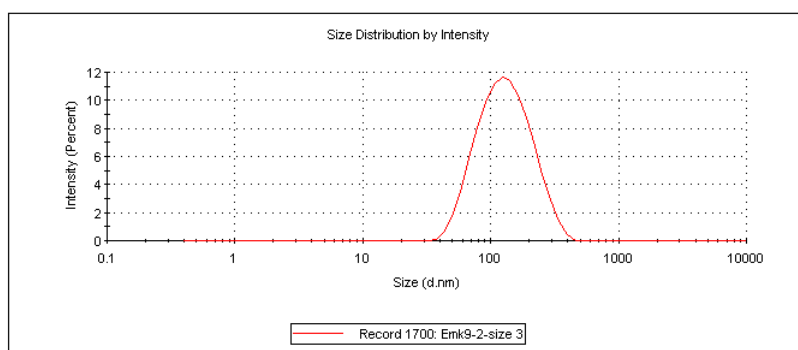
Result quality : **Good**



Σχήμα 5.4: Ανάλυση ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων αργύρου που παρασκευάστηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 2).

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 107.8	Peak 1: 141.2	100.0	66.71
Pdi: 0.216	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.812	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : **Good**



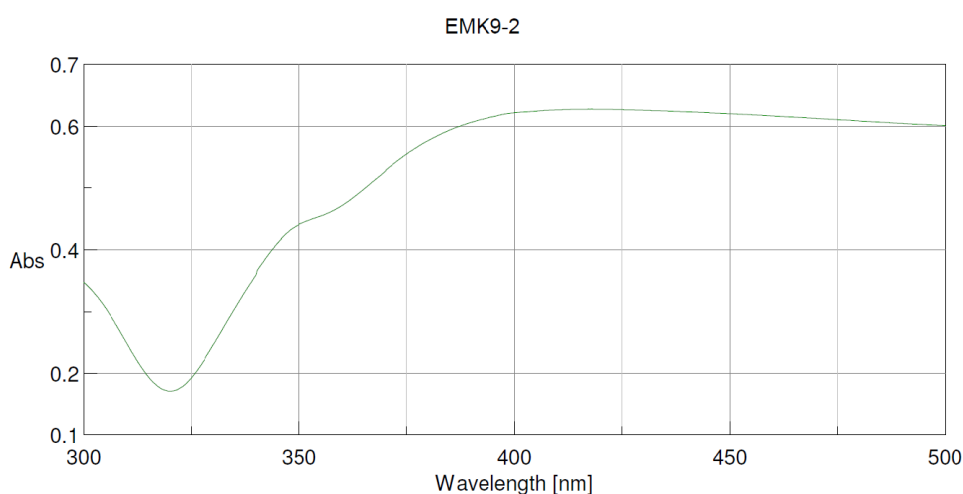
Σχήμα 5.5: Ανάλυση μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 2).

Πίνακας 5.2: Αποτελέσματα δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) για τα νανοσωματίδια των 14 πειραμάτων που παρασκευάστηκαν από το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο.

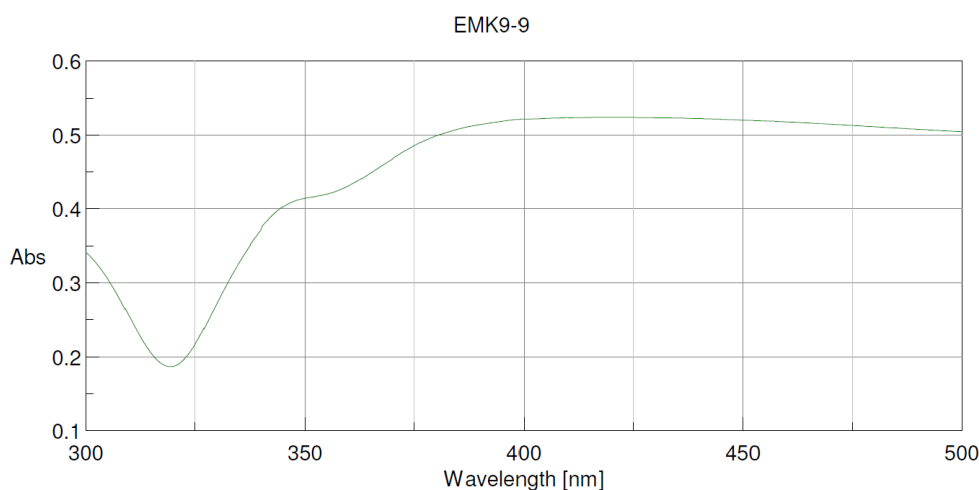
AgNPs	ζ-δυναμικό (mV)	SD (mV)	Μέγεθος (d.nm)	SD (d.nm)	PDI	SD
1	+22.6	0.3	143.4	4.1	0.343	0.011
2	+18.3	1.0	107.3	2.1	0.232	0.02
3	+21.8	1.3	107.5	2.2	0.242	0.006
4	+25.6	0.7	131.0	1.5	0.248	0.013
5	+20.7	0.8	138.3	9.3	0.315	0.018
6	+19.0	0.8	108.6	4.0	0.336	0.052
7	+24.3	1.1	139.7	10.5	0.298	0.053
8	+26.7	0.2	106.3	0.6	0.216	0.003
9	+21.6	0.3	135.3	4.6	0.284	0.021
10	+18.2	0.6	130.8	1.3	0.476	0.05
11	+23.3	0.7	84.8	1.6	0.291	0.004
12	+23.9	0.8	104.0	2.4	0.344	0.038
13	+22.5	0.6	133.2	5.0	0.259	0.01
14	+22.9	1.3	109.3	5.3	0.301	0.022

5.3.2 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Τα νανοσωματίδια αργύρου που παρασκευάστηκαν από το ιοντικό υγρό ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο εμφανίζουν παρόμοια φάσματα UV-Vis με ισχυρή απορρόφηση στην περιοχή 380-500 nm. Αυτό αποτελεί χαρακτηριστική ζώνη συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων των νανοσωματιδίων αργύρου, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξή τους. Διακρίνονται παρακάτω τα φάσματα UV-Vis των νανοσωματιδίων που παράχθηκαν από τα πειράματα 2 και 9 (πίνακας 4.3). Είχαν το πιο ακριβές σήμα στην ανίχνευση της BPA στην φασματοσκοπία Raman.



Σχήμα 5.6: Φάσμα UV-Vis νανοσωματιδίων αργύρου που παρασκευάστηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 2).

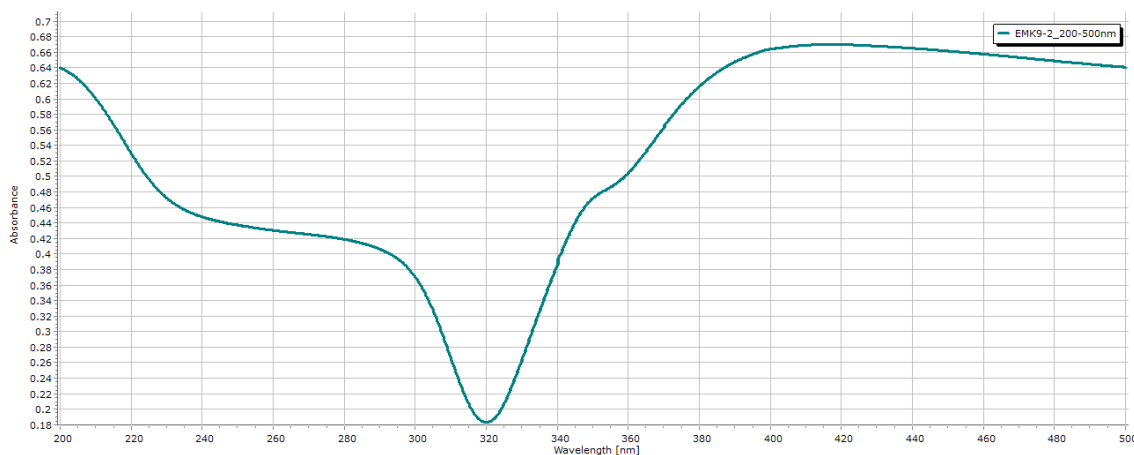


Σχήμα 5.7: Φάσμα UV-Vis νανοσωματιδίων αργύρου που παρασκευάστηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 9).

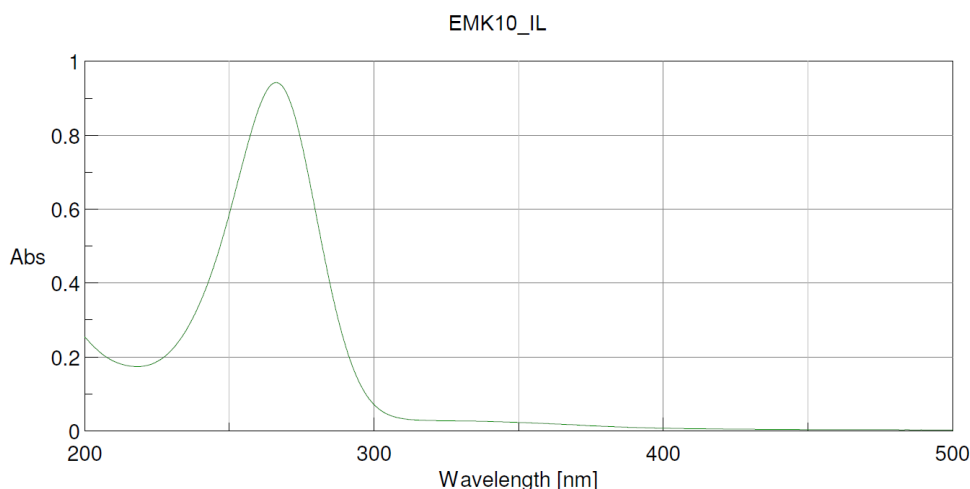
Όπως φαίνεται στα παραπάνω φάσματα, διακρίνεται ευρεία απορρόφηση στο διάστημα 380-500 nm. Αυτό ίσως οφείλεται στο σχήμα τους το οποίο σύμφωνα με μελέτες όταν

εμφανίζει αιχμές και απέχει από τη σφαιρική μορφή, ενισχύεται το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο σε μεγάλη περιοχή και η ζώνη συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων μεγαλώνει Nhung and Lee, 2014; Koukouzelis et al., 2020. Αντιθέτως στην περίπτωση των σφαιρικών κolloειδών νανοσωματιδίων αργύρου, δίνουν μία κορυφή SPR (Surface Plasmon Resonance) σε εύρος 410-440 nm Nhung and Lee, 2014.

Σημαντική πληροφορία που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι στο φάσμα των παραπάνω νανοσωματιδίων αργύρου (σχήμα 5.7) στο εύρος 200-500 nm εμφανίζεται άνοδος της καμπύλης η οποία μπορεί να οφείλεται στην χαρακτηριστική κορυφή του ιοντικού υγρού (Σχήμα 5.9). Η σημασία στην παρατήρηση αυτή αποδίδεται στο γεγονός ότι αυτό αποτελεί απόδειξη ότι πιθανότατα το ιοντικό υγρό παραμένει στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων και δεν απομακρύνεται κατά την διαδικασία έκπλυσης των νανοσωματιδίων με υπερκάθαρο νερό ή με διάλυμα κιτρικού οξέος, κατά τη διάρκεια των φυγοκεντρίσεων Tzani et al., 2017. Έτσι λοιπόν υποδεικνύεται ο προστατευτικός και σταθεροποιητικός ρόλος του ιοντικού υγρού ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο για τα νανοσωματίδια αργύρου.



Σχήμα 5.8: Φάσμα UV-Vis νανοσωματιδίων αργύρου που παρασκευάσθηκαν από ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο (πείραμα 2) από 200 έως 500 nm.



Σχήμα 5.9: Φάσμα UV-Vis ιοντικού υγρού **IL1** (ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο).

5.3.3 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων αργύρου

Για τη μελέτη των αποκρίσεων, επιλέχθηκε το μοντέλο της μορφής quadratic model (απλοποιημένο τετραγωνικό). Η αρχική μορφή της εξίσωσης περιέχει τους όρους A, B, C, AB, BC, AC, A², B² και C², όπου με A, B, C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές. Με A συμβολίζεται η ποσότητα σε μl του AgNO₃ (συγκέντρωσης 1 M), με B η ποσότητα σε μl του IY (συγκέντρωσης 1 M) και C η %w/v περιεκτικότητα χιτοζάνης σε διάλυμα κιτρικού οξέος 2% w/v. Από την παραπάνω μορφή αφαιρούνται σταδιακά οι όροι που έχουν υψηλές τιμές p-value (>0.05) καθώς δεν είναι στατιστικά σημαντικοί (not significant) και μπορεί να επηρεάζουν αρνητικά την προσρμογή του μοντέλου.

5.3.3.1 Μοντέλο πρόβλεψης μεγέθους (size) νανοσωματιδίων αργύρου

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το μέγεθος των νανοσωματιδίων, όταν από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι A² και B² και προστεθεί οι όροι AC² και BC². Πριν την προσθήκη των όρων αυτών, το τετραγωνικό μοντέλο είχε οδηγήσει σε μη σημαντικούς όρους, με p-value μοντέλου ίσο με 0.0791 (μεγαλύτερη από 0.05). Από τον παρακάτω πίνακα (Σχήμα 5.10) οι 7 από τις 9 μεταβλητές είναι σημαντικές (p-value μοντέλου=0.0016<0.05). Η F-value του μοντέλου είναι 37.83 και δηλώνει ότι είναι σημαντικό σε σχέση με το θόρυβο, ενώ υπάρχει 0.16% πιθανότητα η υψηλή τιμή F-value να είναι αποτέλεσμα του θορύβου. Η F-value του Lack-of-fit του μοντέλου μαρτυρά ότι αυτό είναι σημαντικό μπροστά στο γνήσιο σφάλμα και υπάρχει 2.59% πιθανότητα η F-value να έχει αυτήν την τιμή λόγω του θορύβου.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	4115.68	9	457.30	37.83	0.0016	significant
A-AgNO3 1M	482.68	1	482.68	39.93	0.0032	
B-IL 1M	7.45	1	7.45	0.6166	0.4762	
C-Chitosan conc	369.92	1	369.92	30.60	0.0052	
AB	589.03	1	589.03	48.73	0.0022	
AC	176.89	1	176.89	14.63	0.0187	
BC	210.25	1	210.25	17.39	0.0140	
C ²	1816.08	1	1816.08	150.25	0.0003	
AC ²	85.41	1	85.41	7.07	0.0565	
BC ²	249.31	1	249.31	20.63	0.0105	
Residual	48.35	4	12.09			
Lack of Fit	48.33	3	16.11	805.49	0.0259	significant
Pure Error	0.0200	1	0.0200			
Cor Total	4164.03	13				

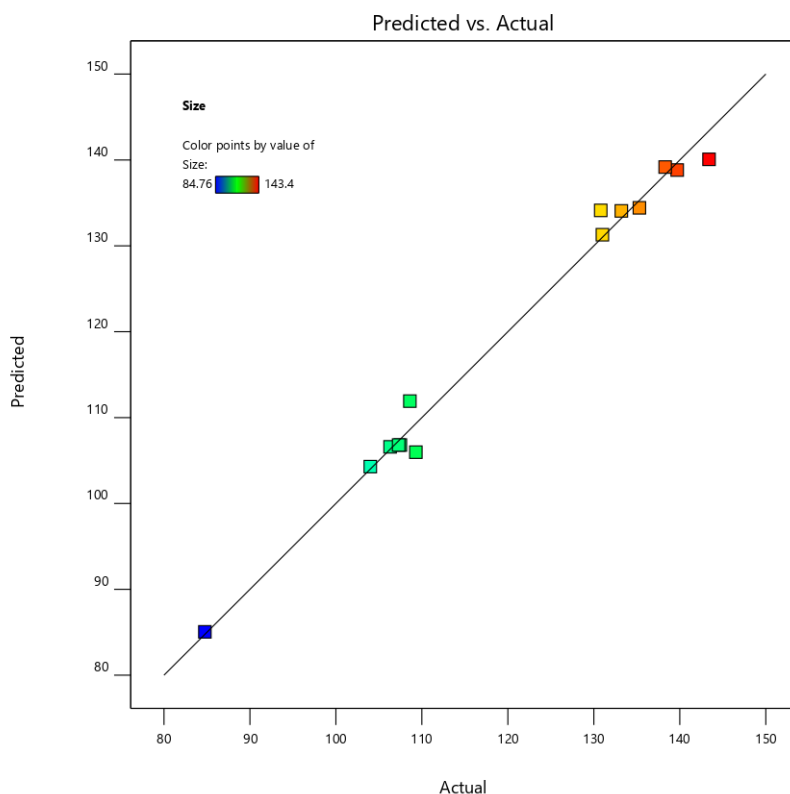
Σχήμα 5.10: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 1η απόκριση (μέγεθος νανοσωματιδίων αργύρου).

Σύμφωνα με τον επόμενο πίνακα (Σχήμα 5.11), η τιμή «Predicted R²» συγκλίνει στην τιμή του «Adjusted R²» (η διαφορά είναι μικρότερη από 0.2), πράγμα που υποδεικνύει ότι τα πειραματικά αποτελέσματα ταυτίζονται ικανοποιητικά με την προσέγγιση. Η τιμή «Adequate Precision» που σχετίζεται με το λόγο του σήματος προς το θόρυβο είναι ικανοποιητική καθώς είναι μεγαλύτερη από 4.

Std. Dev.	3.48	R²	0.9884
Mean	119.96	Adjusted R²	0.9623
C.V. %	2.90	Predicted R²	0.8060
		Adeq Precision	18.7249

Σχήμα 5.11: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 1η απόκριση (μέγεθος νανοσωματιδίων αργύρου).

Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 5.12), απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πειραματικές που ελήφθησαν.

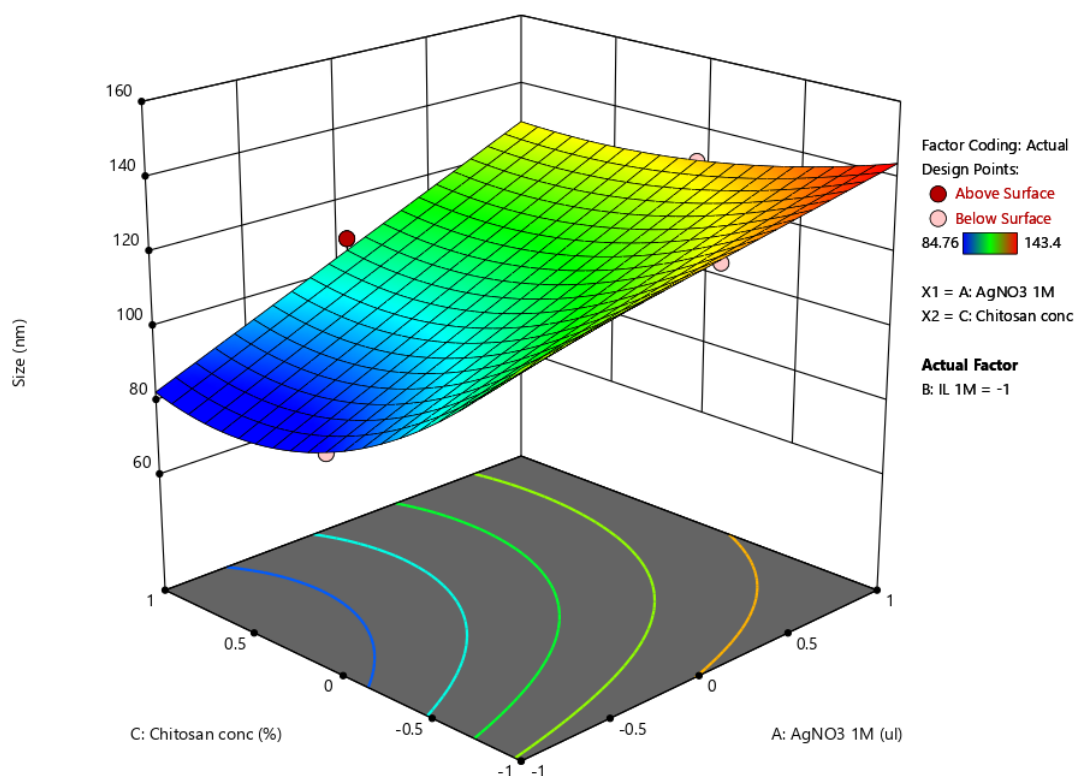


Σχήμα 5.12: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 1ης απόκρισης (μέγεθος νανοσωματιδίων αργύρου).

Συμπερασματικά, η εξίσωση που περιγράφει την πρώτη απόκριση είναι η εξής (με τη χρήση των συμβόλων A, B, C):

$$Size = 106.81 + 10.98A - 1.37B - 6.80C - 12.13AB + 6.65AC + 7.25BC + 23.01C^2 - 6.53AC^2 + 11.17BC^2$$

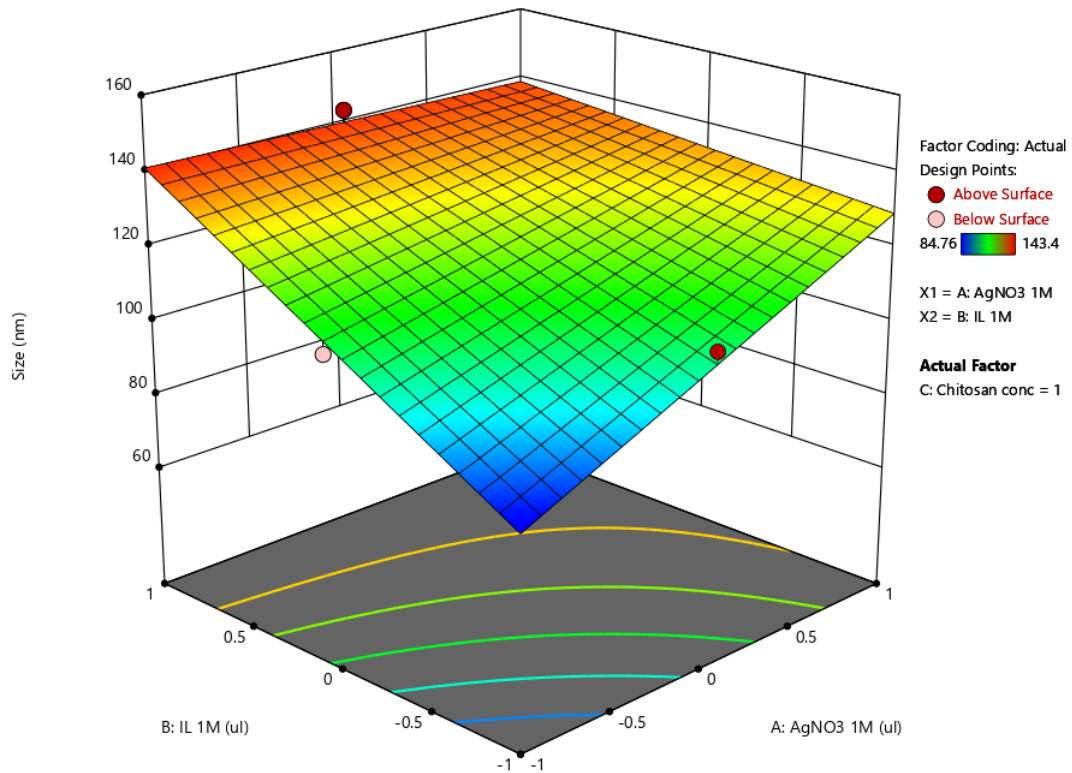
Τα τρισδιάστατα γραφήματα που απεικονίζουν το μέγεθος των νανοσωματιδίων συναρτήσει δυο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών διακρίνονται παρακάτω.



Σχήμα 5.13: 3D επιφάνεια του μεγέθους των νανοσωματιδίων συναρτήσει των μεταβλητών A (ποσότητα του νιτρικού αργύρου) και C (περιεκτικότητα χιτοζάνης (% w/v CS)), για ελάχιστη ποσότητα ΙΥ, B=150 μl).

Για σταθερή ποσότητα ΙΥ (B) στην ελάχιστη τιμή 150 μl, απεικονίζεται η επιφάνεια του μεγέθους συναρτήσει της περιεκτικότητας της χιτοζάνης (% w/v CS) και της ποσότητας του νιτρικού αργύρου (μl) (Σχήμα 5.13). Παρατηρείται ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων μειώνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε χιτοζάνη (C) και με μείωση της ποσότητας του AgNO₃ (A), εντός των ορίων (0.1-0.4% w/v CS και 150-250 μl AgNO₃). Αυτό ίσως συμβαίνει καθώς η χιτοζάνη έχει σταθεροποιητικό ρόλο και απορροφάται στην επιφάνεια των σωματιδίων, αποτρέποντας τη συσσωμάτωσή τους Nhung and Lee, 2014; Zain et al., 2014.

Ομοίως έχουμε παρόμοιο συμπέρασμα από το 3D γράφημα της επιφάνειας του μεγέθους των νανοσωματιδίων συναρτήσει της ποσότητας AgNO₃ (A) και της ποσότητας ΙΥ (B), με σταθερή την %w/v περιεκτικότητα χιτοζάνης (CS) (Σχήμα 5.14). Παρατηρείται ότι για μέγιστη συγκέντρωση χιτοζάνης το μέγεθος ελαχιστοποιείται στις μικρότερες ποσότητες ΙΥ και AgNO₃, δηλαδή 150 μl. Με την αύξηση όμως της ποσότητας του AgNO₃ και για χαμηλές ποσότητες ΙΥ, το μέγεθος των νανοσωματιδίων μεγαλώνει. Αυτό ίσως οφείλεται στην μειωμένη ποσότητα ΙΥ το οποίο πιθανόν σχηματίζει ένα προστατευτικό ηλεκτροστατικό κέλυφος γύρω από τα νανοσωματίδια συμβάλλοντας έτσι στην προστασία τους από συσσωμάτωση και στον σχηματισμό νανοσωματιδίων μικρότερου μεγέθους Tzani et al., 2017; Mudring et al., 2009.



Σχήμα 5.14: 3D επιφάνεια του μεγέθους των νανοσωματιδίων συναρτήσει των μεταβλητών A (ποσότητα του νιτρικού αργύρου) και B (ποσότητα ΙΥ) για μέγιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης (% w/v CS).

5.3.3.2 Μοντέλο πρόβλεψης δείκτη πολυδιασποράς (PDI) νανοσωματιδίων αργύρου

Στον παρακάτω πίνακα (Σχήμα 5.15) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA για τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των νανοσωματιδίων. Χρησιμοποιήθηκε όταν από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι BC, B² και έχει προστεθεί ο όρος A²C. Το αρχικό p-value του μοντέλου είναι 0.0582 (>0.05), ενώ μετά την μεταβολή των όρων είναι 0.0007 (significant). Φαίνεται ότι οι 7 από τους 8 όρους είναι σημαντικοί και η F-value του μοντέλου είναι 31.76, το οποίο δηλώνει ότι δεν είναι σημαντικό σε σχέση με το θόρυβο, ενώ υπάρχει 0.07% πιθανότητα η υψηλή τιμή F-value να είναι αποτέλεσμα του θορύβου. Η F-value του Lack-of-fit του μοντέλου ισούται με 5.16 και δείχνει ότι αυτό είναι ασήμαντο μπροστά στο γνήσιο σφάλμα και υπάρχει 31.76% πιθανότητα η F-value να έχει αυτήν την τιμή λόγω του θορύβου.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0.0550	8	0.0069	31.76	0.0007	significant
A-AgNO3 1M	0.0056	1	0.0056	25.73	0.0039	
B-IL 1M	0.0018	1	0.0018	8.18	0.0354	
C-Chitosan conc	0.0012	1	0.0012	5.66	0.0632	
AB	0.0073	1	0.0073	33.80	0.0021	
AC	0.0059	1	0.0059	27.41	0.0034	
A ²	0.0057	1	0.0057	26.54	0.0036	
C ²	0.0169	1	0.0169	78.23	0.0003	
A ² C	0.0032	1	0.0032	14.79	0.0120	
Residual	0.0011	5	0.0002			
Lack of Fit	0.0010	4	0.0003	5.16	0.3176	not significant
Pure Error	0.0000	1	0.0000			
Cor Total	0.0560	13				

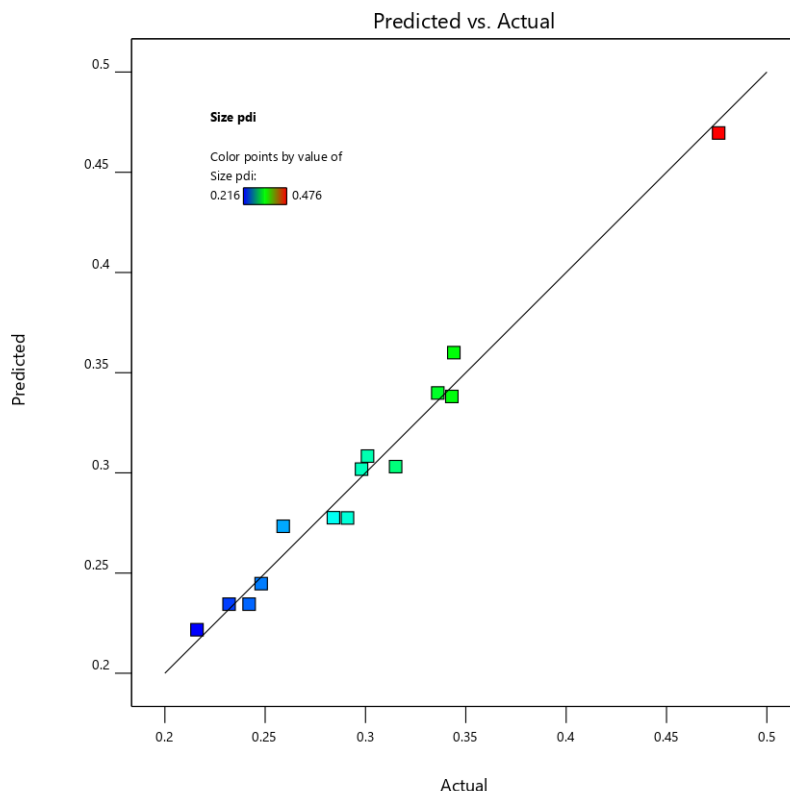
Σχήμα 5.15: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 2η απόκριση (δείκτης πολυδιασποράς PDI νανοσωματιδίων αργύρου).

Σύμφωνα με τον επόμενο πίνακα (Σχήμα 5.16), η τιμή «Predicted R²» συγκλίνει στην τιμή του «Adjusted R²», πράγμα που υποδεικνύει ότι τα πειραματικά αποτελέσματα ταυτίζονται ικανοποιητικά με την προσέγγιση. Η τιμή «Adequate Precision» που είναι ικανοποιητική καθώς είναι μεγαλύτερη από 4.

Std. Dev.	0.0147	R²	0.9807
Mean	0.2989	Adjusted R²	0.9498
C.V. %	4.92	Predicted R²	0.7952
		Adeq Precision	21.0207

Σχήμα 5.16: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 2η απόκριση (δείκτης πολυδιασποράς PDI νανοσωματιδίων αργύρου).

Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 5.17), απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών που προβλέπονται από το μοντέλο με τις πειραματικές.



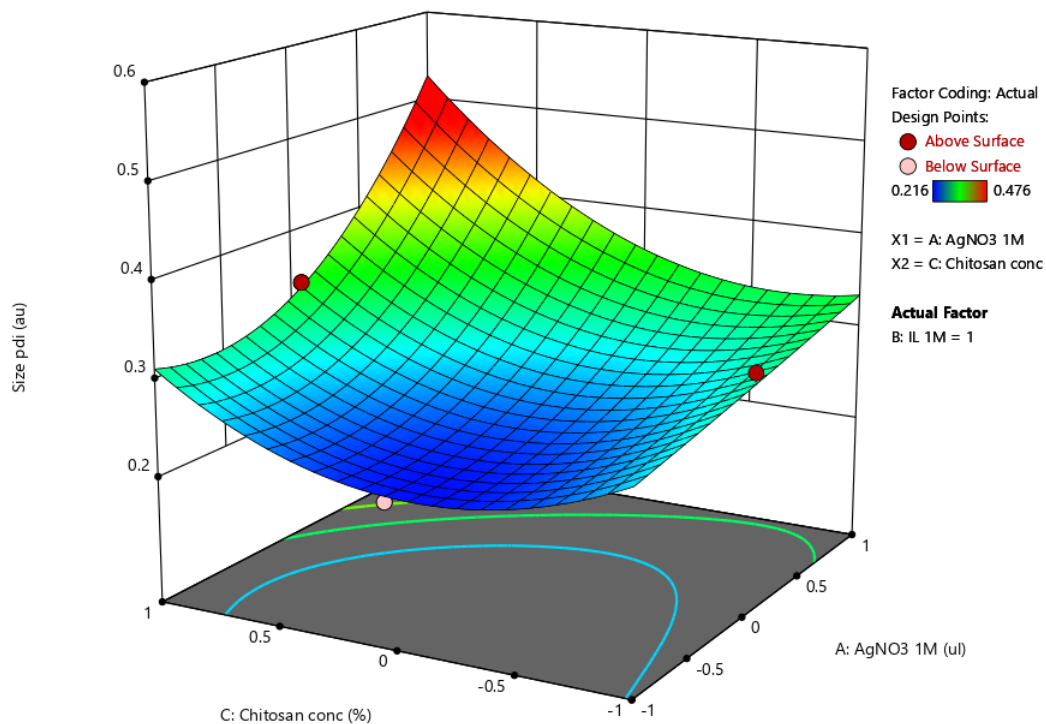
Σχήμα 5.17: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 2ης απόκρισης (δείκτης πολυδιασποράς PDI νανοσωματιδίων αργύρου).

Συμπερασματικά, η εξίσωση που περιγράφει την εξάρτηση του δείκτη πολυδιασποράς από τις ανεξάρτητες μεταβλητές είναι η ακόλουθη:

$$PDI = 0.2345 + 0.0264A + 0.0149B + 0.0175C + 0.0428AB + 0.0385AC + 0.0415A^2 + 0.0712C^2 + 0.0400A^2C$$

Το τρισδιάστατο γράφημα που απεικονίζει τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των νανοσωματιδίων συναρτήσει δυο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών δίνεται παρακάτω (Σχήμα 5.18).

Από το γράφημα συμπεραίνεται ότι για την μέγιστη ποσότητα ΙΥ (250 μl), ο δείκτης πολυδιασποράς μειώνεται με την μείωση της ποσότητας του νιτρικού αργύρου και με τιμή περιεκτικότητας της χιτοζάνης 0.25% w/v. Η ελάχιστη τιμή του δείκτη PDI είναι και η επιθυμητή στην παρασκευή κολλοειδούς διασποράς νανοσωματιδίων ώστε να υπάρχει ομοιομορφία μεγέθους Bhattacherjee, 2016.



Σχήμα 5.18: 3D επιφάνεια του δείκτη πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων συναρτήσει των μεταβλητών A (ποσότητα του νιτρικού αργύρου) και C (περιεκτικότητα χιτοζάνης) για μέγιστη ποσότητα ΙΥ (250 μl).

5.3.3.3 Μοντέλο πρόβλεψης ζ-δυναμικού (Zeta) νανοσωματιδίων αργύρου

Στον παρακάτω πίνακα (Σχήμα 5.19) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA για ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων, όταν από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι A, B, C, AC, BC και C² και έχει προστεθεί ο όρος A²C. Πριν την προσθήκη των όρων αυτών, το τετραγωνικό μοντέλο είχε οδηγήσει σε μη σημαντικούς όρους, με p-value μοντέλου ίσο με 0.4926 (μεγαλύτερη από 0.05). Από τον παρακάτω πίνακα οι 3 από τις 4 μεταβλητές είναι σημαντικές (p-value μοντέλου=0.0032<0.05). Η F-value του μοντέλου είναι 9.04 και δηλώνει ότι δεν είναι σημαντικό σε σχέση με το θόρυβο, ενώ υπάρχει 0.32% πιθανότητα η υψηλή τιμή F-value να είναι αποτέλεσμα του θορύβου. Η F-value του Lack-of-fit του μοντέλου ισούται με 0.22 και δείχνει ότι αυτό είναι ασήμαντο μπροστά στο γνήσιο σφάλμα και υπάρχει 93.36% πιθανότητα η F-value του να έχει αυτήν την τιμή λόγω του θορύβου.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	68.27	4	17.07	9.04	0.0032	significant
AB	6.50	1	6.50	3.45	0.0964	
A ²	12.16	1	12.16	6.44	0.0318	
B ²	36.52	1	36.52	19.35	0.0017	
A ² C	18.92	1	18.92	10.03	0.0114	
Residual	16.98	9	1.89			
Lack of Fit	10.86	8	1.36	0.2216	0.9336	not significant
Pure Error	6.13	1	6.13			
Cor Total	85.25	13				

Σχήμα 5.19: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 3η απόκριση (ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων αργύρου).

Στον επόμενο πίνακα (Σχήμα 5.20), η τιμή «Predicted R²» φαίνεται να συγκλίνει στην τιμή του «Adjusted R²» (η διαφορά είναι μικρότερη από 0.2), πράγμα που υποδεικνύει ότι τα πειραματικά αποτελέσματα ταυτίζονται ικανοποιητικά με την προσέγγιση. Η τιμή «Adequate Precision» είναι ικανοποιητική καθώς είναι μεγαλύτερη από 4.

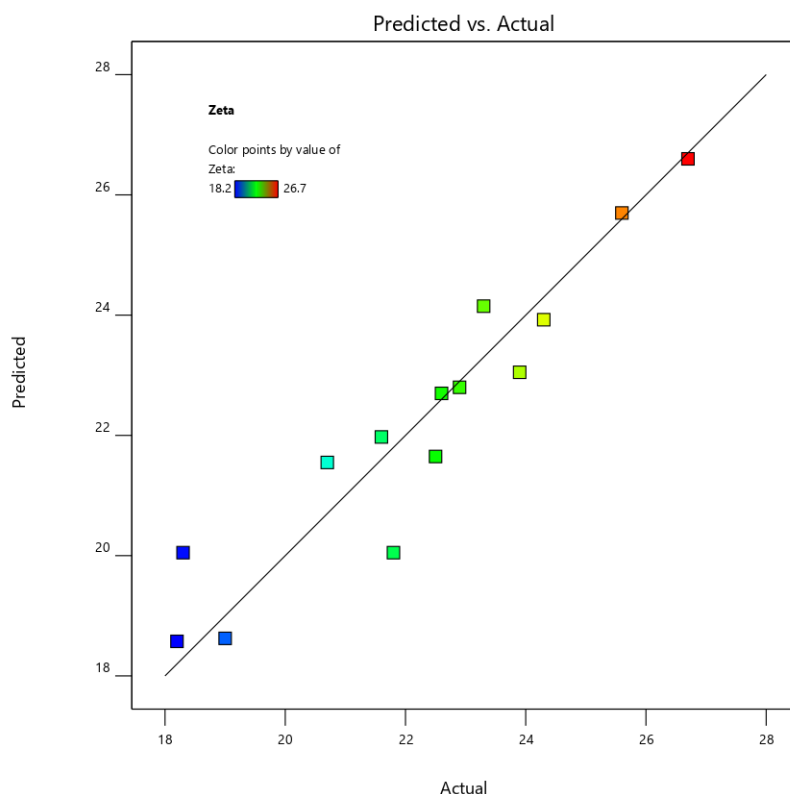
Std. Dev.	1.37	R²	0.8008
Mean	22.24	Adjusted R²	0.7123
C.V. %	6.18	Predicted R²	0.5247
		Adeq Precision	8.2345

Σχήμα 5.20: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 3η απόκριση (δείκτης πολυδιασποράς νανοσωματιδίων αργύρου).

Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 5.21), απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών που προβλέπονται από το μοντέλο με τις πειραματικές.

Το μαθηματικό μοντέλο που προέκυψε και περιγράφει την εξάρτηση του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων από την ποσότητα του AgNO₃, του IY και την περιεκτικότητα της χιτοζάνης, έχει ως εξής:

$$Zeta = 19.26 - 1.27AB + 1.91A^2 + 3.31B^2 - 2.18A^2C$$



Σχήμα 5.21: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 3ης απόκρισης (ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων αργύρου).

Στο παραπάνω μοντέλο, παρατηρείται ότι υπάρχουν μόνο συνδυασμοί των ανεξάρτητων μεταβλητών A, B και C, αφού κατά την εύρεση των σημαντικών μεταβλητών, έπρεπε να αφαιρεθούν. Αυτό υποδεικνύει την πολυπλοκότητα του ζ-δυναμικού, το οποίο ίσως εξαρτάται περισσότερο από τους συνδυασμούς των παραγόντων και επομένως δεν εκφράζεται σωστά η εξάρτησή του από την ποσότητα του AgNO₃, του ΓΥ και την περιεκτικότητα της χιτοζάνης.

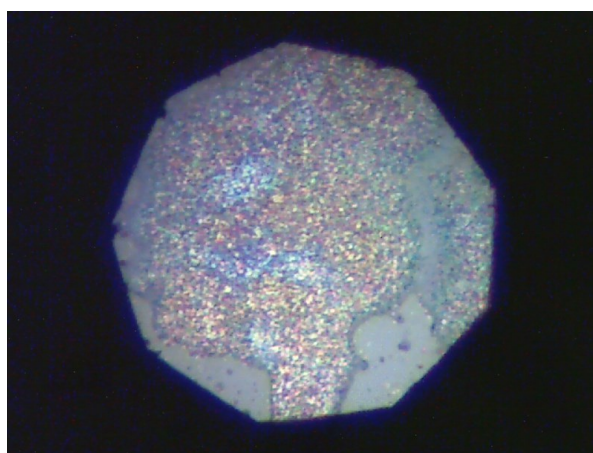
5.3.4 Ανίχνευση Δισφαινόλης A μέσω φασματοσκοπίας Raman με τη χρήση νανοσωματιδίων αργύρου ως υπόστρωμα SERS

Τα φάσματα Raman των νανοσωματιδίων αργύρου που παρασκευάστηκαν από το ιοντικό υγρό ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο ελήφθησαν χρησιμοποιώντας πηγή ακτινοβολίας μήκους κύματος 532 nm. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φασμάτων ήταν το Spectragryph. Εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να λειτουργήσουν ως υπόστρωμα SERS για την ανίχνευση της δισφαινόλης A (BPA). Επιχειρήθηκε η ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων BPA σε διάλυμα αιθανόλης, με τη χαμηλότερη συγκέντρωση τα 20 µg/ml ή 0.0876 mM. Διακρίνονται στον παρακάτω πίνακα 5.3 τα αποτελέσματα ανίχνευσης της δισφαινόλης A με τα νανοσωματίδια των πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού.

Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα ανίχνευσης BPA με τη χρήση νανοσωματιδίων αργύρου ως υπόστρωμα SERS.

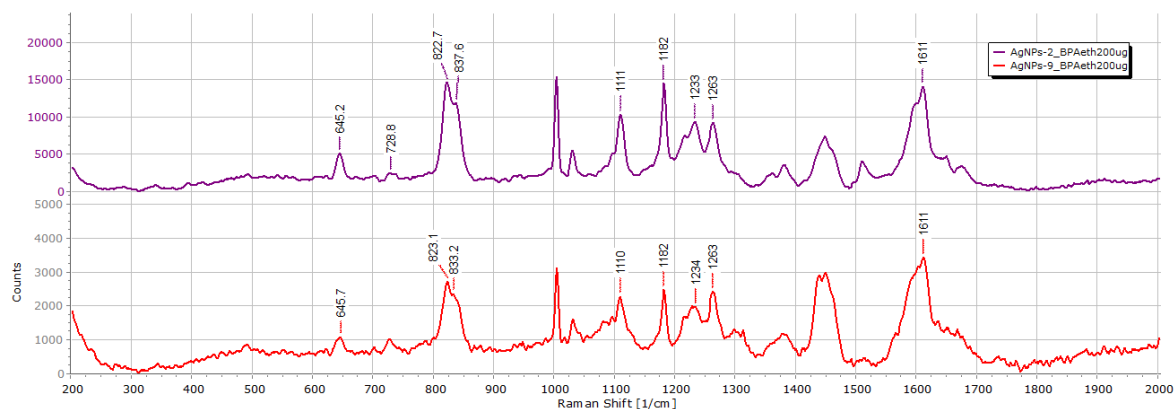
AgNPs	Συγκέντρωση BPA		
	200 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$
1	✓	✓	✗
2	✓	✓	✓
3	✓	✓	✗
4	✓	✗	✗
5	✓	✗	✗
6	✓	✓	✗
7	✓	✓	✗
8	✓	✓	✗
9	✓	✓	✓
10	✓	✗	✗
11	✓	✓	✗
12	✓	✗	✗
13	✓	✗	✗
14	✓	✓	✗

Τα βέλτιστα φάσματα Raman της BPA ελήφθησαν με τη χρήση των νανοσωματιδίων των πειραμάτων 2 και 9. Στην παρακάτω εικόνα διακρίνονται τα νανοσωματίδια με την ουσία BPA, όπως φαίνονται από το μικροσκόπιο της συσκευής Raman (Σχήμα 5.22).

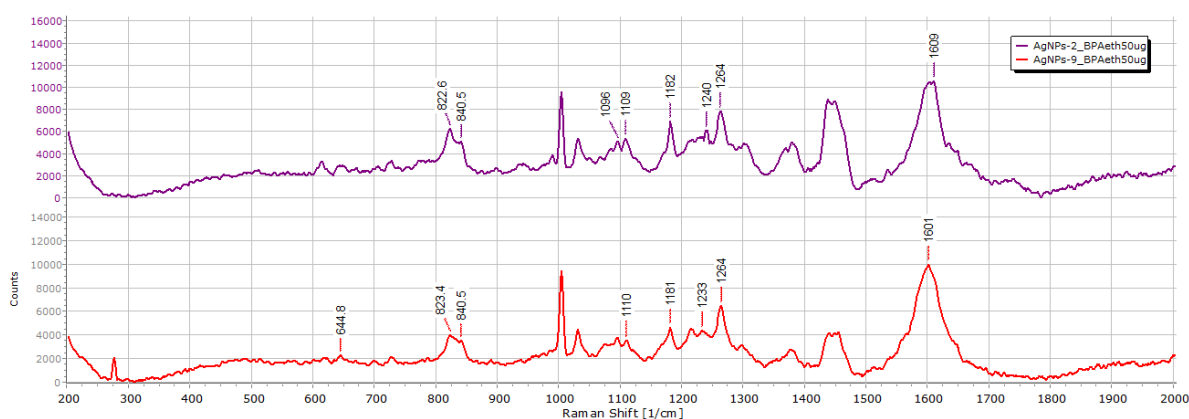


Σχήμα 5.22: Εικόνα από το μικροσκόπιο Raman του κολλοειδούς συστήματος νανοσωματιδίων αργύρου με την διαφαινόλη Α.

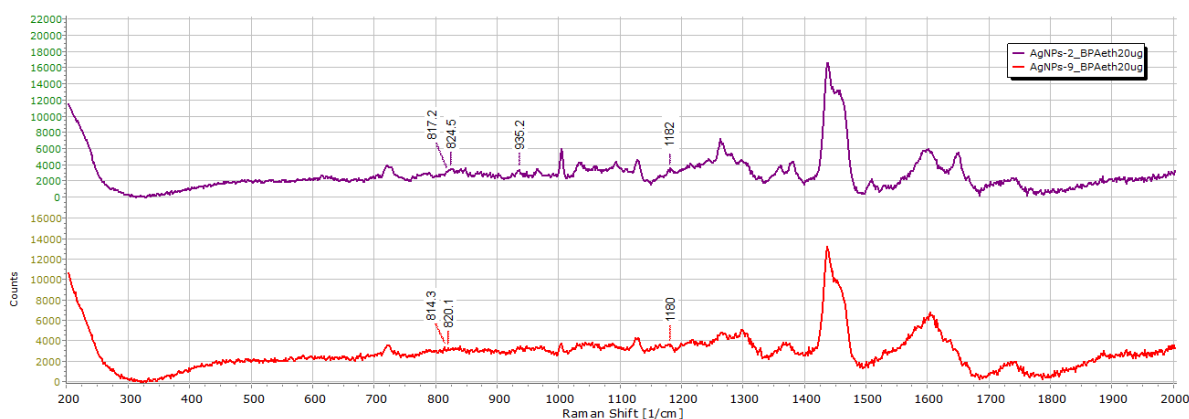
Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται ξεκάθαρα οι χαρακτηριστικές κορυφές της BPA που αναφέρθηκαν παραπάνω, για συγκεντρώσεις 200 $\mu\text{g/ml}$ (0.876 mM), 50 $\mu\text{g/ml}$ (0.219 mM) και 20 $\mu\text{g/ml}$ (0.0876 mM) και με χρήση των νανοσωματιδίων των πειραμάτων 2 και 9 ως υπόστρωμα SERS (Σχήμα 5.23, 5.24, 5.25).



Σχήμα 5.23: Φάσματα Raman της διαφαινόλης A συγκέντρωσης 200 mg/ml με υπόστρωμα τα νανοσωματίδια των πειραμάτων 2 και 9.



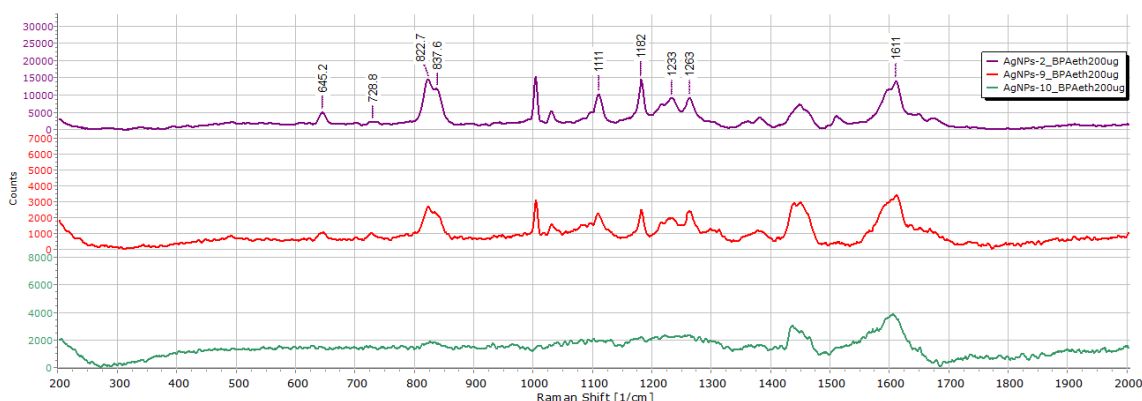
Σχήμα 5.24: Φάσματα Raman της διαφαινόλης A συγκέντρωσης 50 mg/ml με υπόστρωμα τα νανοσωματίδια των πειραμάτων 2 και 9.



Σχήμα 5.25: Φάσματα Raman της διαφαινόλης A συγκέντρωσης 20 mg/ml με υπόστρωμα τα νανοσωματίδια των πειραμάτων 2 και 9.

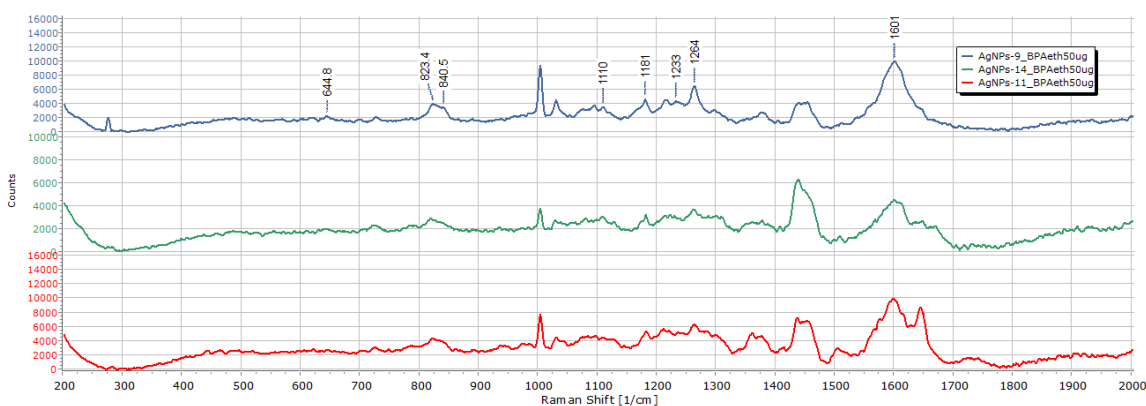
Στο παρακάτω φάσμα (Σχήμα 5.26) συγκρίνονται τα νανοσωματίδια των πειραμάτων 2 και 9, τα οποία ενίσχυσαν πιο αποτελεσματικά το σήμα της διαφαινόλης A συγκέντρωσης 200 μg/ml, με τα νανοσωματίδια του πειράματος 10 που είχαν το χειρότερο σήμα. Τα νανοσωματίδια του πειράματος 2 είχαν μέγεθος 107.3 ± 2.1 nm, δείκτη PDI 0.232 ± 0.02 και ζ-δυναμικό 18.3 ± 1 mV, κατά απόλυτη τιμή. Τα νανοσωματίδια του πειράματος 9

είχαν μέγεθος 135.3 ± 4.6 nm, δείκτη PDI 0.284 ± 0.021 και ζ-δυναμικό 21.6 ± 0.3 mV, κατά απόλυτη τιμή. Ενώ τα νανοσωματίδια του πειράματος 10 είχαν μέγεθος 130.8 ± 1.3 nm, δείκτη PDI 0.476 ± 0.05 και ζ-δυναμικό 18.2 ± 0.6 mV, κατά απόλυτη τιμή.



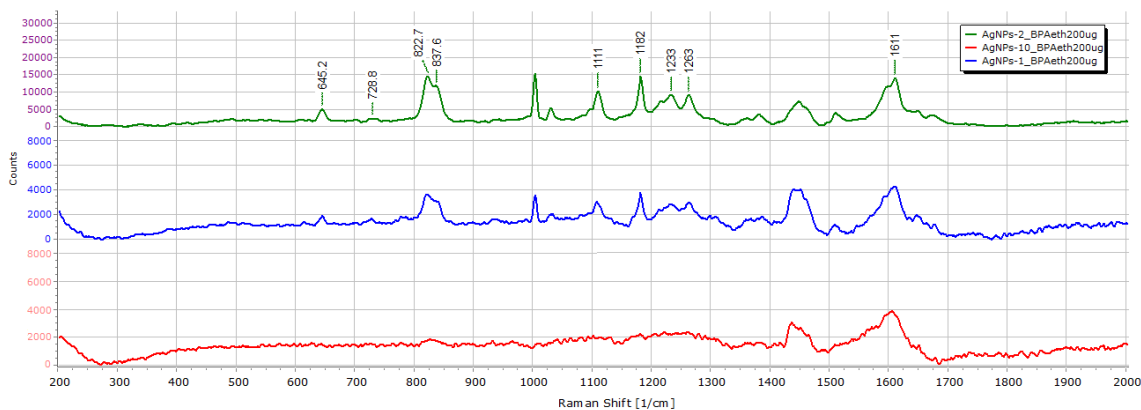
Σχήμα 5.26: Σύγκριση των φασμάτων Raman νανοσωματιδίων πειραμάτων 2, 9 και 10 για συγκέντρωση BPA 200 µg/ml.

Στο παρακάτω φάσμα (Σχήμα 5.27) συγκρίνονται τρία είδη νανοσωματιδίων με διαφορετικό μέγεθος ως προς την ικανότητα ενίσχυσης του σήματος Raman της δισφαινόλης A, συγκέντρωσης 50 µg/ml. Τα νανοσωματίδια του πειράματος 9 είχαν το μεγαλύτερο μέγεθος στα 135.3 ± 4.6 nm, του πειράματος 14 είχαν μεσαίο μέγεθος 109.3 ± 5.3 nm και του 11 είχαν το μικρότερο μέγεθος στα 84.8 ± 1.6 nm. Παρατηρείται ότι τα μικρότερα νανοσωματίδια (11) δεν είχαν καλό σήμα, σε αντίθεση με τα νανοσωματίδια του πειράματος 9 που ενίσχυσαν αποτελεσματικότερα το σήμα της BPA.



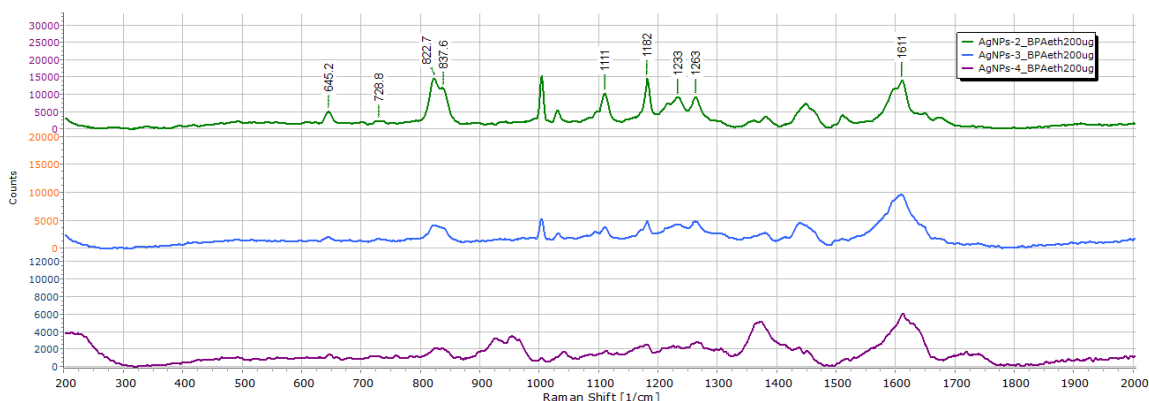
Σχήμα 5.27: Σύγκριση των φασμάτων Raman νανοσωματιδίων με διαφορετικό μέγεθος (9, 14 και 11) για συγκέντρωση BPA 50 µg/ml.

Στο παρακάτω φάσμα (Σχήμα 5.28) συγκρίνονται τρία είδη νανοσωματιδίων με διαφορετικό δείκτη πολυδιασποράς PDI, που λειτούργησαν ως υπόστρωμα SERS για την ανίχνευση δισφαινόλης A συγκέντρωσης 200 µg/ml. Τα νανοσωματίδια του πειράματος 10 είχαν το μεγαλύτερο PDI με τιμή 0.476 ± 0.05 , του πειράματος 1 είχαν τιμή PDI 0.343 ± 0.011 και του 2 είχαν τον μικρότερο δείκτη ίσο με 0.232 ± 0.020 . Παρατηρείται ότι τα νανοσωματίδια του πειράματος 2 είχαν το βέλτιστο σήμα, ενώ του πειράματος 10 έδωσαν το χειρότερο σήμα και δεν ανιχνεύθηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις BPA.



Σχήμα 5.28: Σύγκριση των φασμάτων Raman νανοσωματιδίων με διαφορετικό δείκτη πολυδιασποράς (1, 2 και 11) για συγκέντρωση BPA 200 µg/ml.

Στο παρακάτω φάσμα (Σχήμα 5.29) απεικονίζονται τρία είδη νανοσωματιδίων με διαφορετική τιμή ζ-δυναμικού που λειτούργησαν ως υπόστρωμα SERS για την ανίχνευση διασφαινόλης A συγκέντρωσης 200 µg/ml. Τα νανοσωματίδια του πειράματος 4 είχαν το μεγαλύτερο ζ-δυναμικό με τιμή $+25.6 \pm 0.7$ mV, του πειράματος 3 είχαν τιμή ζ-δυναμικού $+21.8 \pm 1.3$ mV και του 2 είχαν την μικρότερη τιμή ίση με $+18.3 \pm 1.0$ mV. Παρατηρείται ότι τα νανοσωματίδια του πειράματος 2 είχαν το βέλτιστο σήμα, τα οποία είχαν την μικρότερη τιμή ζ-δυναμικού.



Σχήμα 5.29: Σύγκριση των φασμάτων Raman νανοσωματιδίων με διαφορετικό ζ-δυναμικό (2, 3 και 4) για συγκέντρωση BPA 200 µg/ml.

5.3.5 Μοντέλο πρόβλεψης ανίχνευσης ελάχιστης συγκέντρωσης διαφαινόλης A με τη χρήση νανοσωματιδίων αργύρου ως υπόστρωμα SERS (Raman thresh)

Στον παρακάτω πίνακα (Σχήμα 5.30) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA για την ελάχιστη συγκέντρωση ανίχνευσης της BPA με χρήση των νανοσωματιδίων μέσω φασματοσκοπίας Raman. Από το quadratic μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι B, AB, BC, B² και C² και έχει προστεθεί ο όρος A²C. Πριν την προσθήκη των όρων αυτών, το τετραγωνικό μοντέλο είχε οδηγήσει σε μη σημαντικούς όρους, με p-value μοντέλου ίσο με 0.7427 (μεγαλύτερη από 0.05). Από τον παρακάτω πίνακα οι 3 από τις 5 μεταβλητές είναι σημαντικές (p-value μοντέλου=0.0221<0.05), ενώ η μεταβλητή AC είναι ασήμαντη (p-value>0.1). Η F-value του μοντέλου είναι 5.04 και δηλώνει ότι είναι σημαντικό σε σχέση με το θόρυβο, ενώ υπάρχει 2.21% πιθανότητα η τιμή F-value να είναι αποτέλεσμα του θορύβου. Η F-value του Lack-of-fit του μοντέλου ισούται με 6.00 και δείχνει ότι αυτό είναι ασήμαντο μπροστά στο γνήσιο σφάλμα και υπάρχει 30.47% πιθανότητα η F-value να έχει αυτήν την τιμή λόγω του θορύβου.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1.17	5	0.2338	5.04	0.0221	significant
A-AgNO ₃ 1M	0.4230	1	0.4230	9.12	0.0166	
C-Chitosan conc	0.4316	1	0.4316	9.30	0.0158	
AC	0.1554	1	0.1554	3.35	0.1046	
A ²	0.0037	1	0.0037	0.0797	0.7848	
A ² C	0.5525	1	0.5525	11.91	0.0087	
Residual	0.3712	8	0.0464			
Lack of Fit	0.3626	7	0.0518	6.00	0.3047	not significant
Pure Error	0.0086	1	0.0086			
Cor Total	1.54	13				

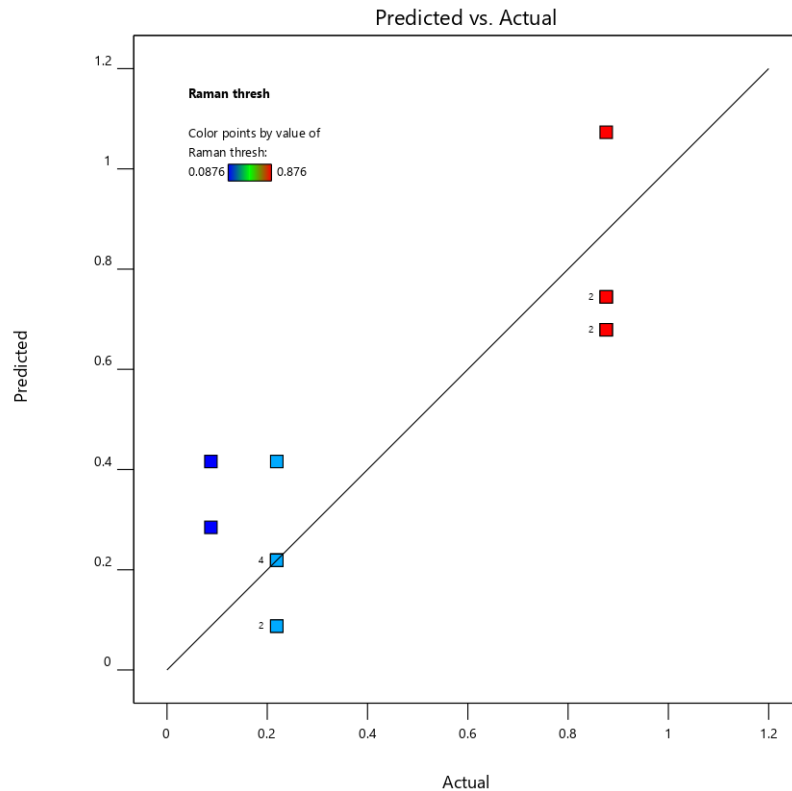
Σχήμα 5.30: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 4η απόκριση (συγκέντρωση ανίχνευσης BPA).

Σύμφωνα με τον επόμενο πίνακα (Σχήμα 5.31), η τιμή «Predicted R²» αποκλίνει από το «Adjusted R²» με διαφορά μεγαλύτερη από 0.2. αυτό αποτελεί ένδειξη ότι πιθανότατα χρειάζεται περαιτέρω αφαίρεση όρων από το μοντέλο. Η τιμή «Adequate Precision» είναι ικανοποιητική διότι είναι μεγαλύτερη από 4.

Std. Dev.	0.2154	R²	0.7590
Mean	0.4349	Adjusted R²	0.6084
C.V. %	49.53	Predicted R²	-0.1657
		Adeq Precision	6.9884

Σχήμα 5.31: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 4η απόκριση (συγκέντρωση ανίχνευσης BPA).

Διακρίνεται παρακάτω το διάγραμμα (Σχήμα 5.32) συσχέτισης προβλεπόμενων και πραγματικών τιμών.

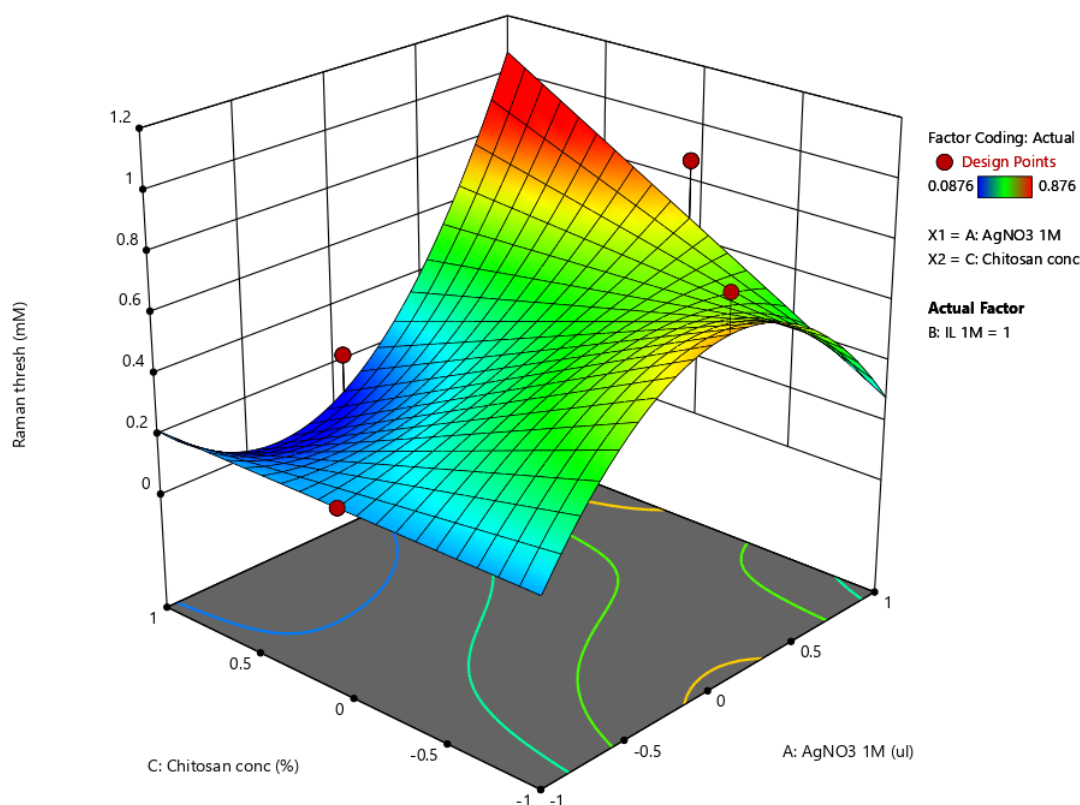


Σχήμα 5.32: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 4η απόκριση (συγκέντρωση ανίχνευσης BPA).

Η εξίσωση που περιγράφει την απόκριση ελάχιστη συγκέντρωση ανίχνευσης της BPA με χρήση νανοσωματιδίων ως υπόστρωμα είναι η παρακάτω.

$$Raman\ thresh = 0.4161 + 0.2299A - 0.3285C + 0.1971AC + 0.0329A^2 + 0.5256A^2C$$

Στη συνέχεια παρατίθενται το τρισδιάστατο γράφημα των επιφανειών απόκρισης Raman thresh συναρτήσει δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (Σχήμα 5.33).



Σχήμα 5.33: 3D επιφάνεια της ελάχιστης συγκέντρωσης BPA που ανιχνεύεται, με υπόστρωμα SERS τα νανοσωματίδια αργύρου, συναρτήσε των μεταβλητών A (ποσότητα του νιτρικού αργύρου) και C (περιεκτικότητα χιτοζάνης) για μέγιστη ποσότητα ΙΥ (250 μ l).

Από το παραπάνω γράφημα παρατηρείται ότι το κατάλληλο υλικό για την ανίχνευση της ελάχιστης συγκέντρωσης BPA μέσω φασματοσκοπίας Raman, είναι τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν με ποσότητα νιτρικού αργύρου μεταξύ των τιμών 150 και 200 μ l και περιεκτικότητα χιτοζάνης από 0.25 έως 0.4% w/v. Η ποσότητα του ΙΥ δεν είναι σημαντική για το μοντέλο και επομένως δεν επηρεάζει το γράφημα. Αυτό δεν ισχύει στην πραγματικότητα.

Τα νανοσωματίδια που έχουν την παραπάνω περιγραφή είναι αυτά που παράχθηκαν βάση των πειραμάτων 1, 2, 3, 6, 11 και 14 (Πίνακας 4.3). Με τα νανοσωματίδια αυτά ανιχνεύτηκαν οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις BPA, 0.219 mM και 0.0876 mM, σύμφωνα με τα φάσματα Raman. Η χαμηλότερη συγκέντρωση ανιχνεύτηκε με τη χρήση των νανοσωματιδίων του πειράματος 2, τα οποία παρασκευάστηκαν με 200 μ l AgNO_3 , 200 μ l ΙΥ και 0.25% w/v χιτοζάνη. Τα νανοσωματίδια αυτά έχουν μέγεθος 107.3 ± 2.1 nm, δείκτη PDI 0.232 ± 0.02 και ζ -δυναμικό 18.3 ± 1 mV, κατά απόλυτη τιμή.

Παρατηρείται επίσης ότι στο παραπάνω γράφημα για την μέγιστη ποσότητα αργύρου και την ελάχιστη συγκέντρωση χιτοζάνης, μειώνεται η συγκέντρωση ανίχνευσης της BPA. Τα νανοσωματίδια αυτής της περιγραφής είναι αυτά που παράχθηκαν βάση του πειράματος 9. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 250 μ l AgNO_3 , 200 μ l ΙΥ και 0.1% w/v χιτοζάνη. Τα νανοσωματίδια αυτά έχουν μέγεθος 135.3 ± 4.6 nm, δείκτη PDI 0.284 ± 0.021 και ζ -δυναμικό 21.6 ± 0.3 mV, κατά απόλυτη τιμή. Τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων αυτών είναι παρόμοια με του πειράματος 2, εκτός από το μέγεθος. Αυτό

υποδεικνύει ότι το κατάλληλο μέγεθος των νανοσωματιδίων για την ανίχνευση της ελάχιστης ποσότητας BPA είναι πιθανόν από 100 μέχρι 130 nm. Αυτό υποδεικνύεται και από τα φάσματα Raman της BPA στο οποίο συγκρίνονται τρία μεγέθη νανοσωματιδίων (Σχήμα 5.27). Είναι γνωστό ότι με την αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, αυξάνεται το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο το οποίο συμβάλλει στην ενίσχυση του σήματος SERS. Όμως τα νανοσωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους απορροφούν λιγότερη ακτινοβολία και την σκεδάζουν αποτελεσματικότερα, πράγμα που οδηγεί σε αδύναμα σήματα Raman Stampelcoskie et al., 2011; R. X. He et al., 2017. Το μέγεθος αυτό ίσως είναι αρκετά μεγάλο ώστε να ενισχύεται το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και άρα το σήμα Raman, όχι όμως τόσο μεγάλο ώστε να μειώνεται τελικά η ένταση του σήματος, λόγω φαινομένων που αναφέρονται παραπάνω.

Επιπλέον είναι ίσως πιο επιθυμητές οι μικρότερες τιμές του δείκτη πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων για την ανίχνευση της δισφαινόλης A μέσω φασματοσκοπίας Raman (Σχήμα 5.28). Τα νανοσωματίδια που ανιχνεύουν την χαμηλότερη συγκέντρωση BPA έχουν τους μικρότερους δείκτες PDI. Παράλληλα το ζ-δυναμικό, από τη στιγμή που τα νανοσωματίδια και στα 14 πειράματα εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές, πιθανότατα δεν έχει σημαντική επιρροή στην δυνατότητα ανίχνευσης της δισφαινόλης A.

6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επετεύχθη η ανάπτυξη κατάλληλων νανοσωματιδίων αργύρου που λειτουργούν ικανοποιητικά ως υπόστρωμα για την ανίχνευση της δισφαινόλης A με τη μέθοδο επιφανειακής ενίσχυσης της σκέδασης Raman (SERS).

Μελετήθηκε η σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου από δυο ιοντικά υγρά ειδικής αποστολής, το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο και το κιτρικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο. Τα ιοντικά υγρά επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν αναγωγικό, προστατευτικό και σταθεροποιητικό ρόλο για τα νανοσωματίδια αργύρου. Χρησιμοποιήθηκε ο νιτρικός άργυρος ως το αρχικό μεταλλικό άλας και το βιοπολυμερές χιτοζάνη ως σταθεροποιητικός και κατευθυντήριο παράγοντας για την ανάπτυξη των νανοσωματιδίων. Η προτεινόμενη πράσινη μέθοδος σύνθεσης, υπερέρχει άλλων συνήθων μεθόδων χημικής αναγωγής που προτείνονται, λόγω της σύνθεσης σε θερμοκρασία δωματίου και σε ένα σκεύος (one-pot synthesis) και της απουσίας τοξικών σταθεροποιητικών παραγόντων ή παραπροϊόντων.

Σχηματίστηκαν νανοσωματίδια αργύρου και από τα δύο είδη ιοντικών υγρών, όμως μόνο με τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν από το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο ανιχνεύτηκε δισφαινόλη A συγκέντρωσης 50 mg/ml σε διάλυμα αιθανόλης στην φασματοσκοπία Raman. Επομένως, επιλέχθηκε το ασκορβικό 2-υδροξυαιθυλαμμώνιο για την σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με σκοπό την ανίχνευση χαμηλότερης συγκέντρωσης δισφαινόλης A και ακολούθησε βελτιστοποίηση της διεργασίας μέσω πειραματικού σχεδιασμού.

Εξετάστηκε η επίδραση τριών ανεξάρτητων παραγόντων (η ποσότητα του διαλύματος μεταλλικού άλατος, του διαλύματος ιοντικού υγρού και η περιεκτικότητα της χιτοζάνης) στο μέγεθος, στον δείκτη πολυδιασποράς και στο ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων και στην ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση της δισφαινόλης A μέσω SERS (αποκρίσεις). Μέσω του πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken προέκυψαν 14 πειράματα παρασκευής νανοσωματιδίων αργύρου.

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού (UV-Vis), ενώ πληροφορίες για το μέγεθος και το ζ-δυναμικό τους ελήφθησαν από μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Για τα παραγόμενα AgNPs διακρίνεται ευρεία απορρόφηση UV-Vis στο διάστημα 380-500 nm. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανόν απέχουν από το σφαιρικό σχήμα και εμφανίζουν αιχμές και προεξοχές μέσω των οποίων ενισχύεται το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο σε μεγάλη περιοχή και η ζώνη συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων μεγαλώνει. Οι τιμές ζ-δυναμικού (18.2 ± 0.6 mV έως 26.7 ± 0.2 mV, κατά απόλυτη τιμή) είναι ενδεικτικές της σταθερότητας των νανοσωματιδίων και της μικρής τάσης για συσσώματωση. Το μέγεθος που κυμαίνεται από 84.8 ± 1.6 nm έως 143.4 ± 4.1 nm και οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς (0.232 ± 0.02 έως 0.476 ± 0.05) επιβεβαιώνουν την ικανότητα της μεθόδου να παράγει νανοσωματίδια μικρού σχετικά μεγέθους με ομοιόμορφη κατανομή.

Με την συμπλήρωση των αποτελεσμάτων στο λογισμικό Design Expert, αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν την σχέση των αποκρίσεων με τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Οι μαθηματικές εξισώσεις προβλέπουν το μέγεθος και τον δείκτη PDI συναρτήσει των ποσοτήτων του μεταλλικού άλατος, του ιοντικού υγρού και της περιεκτικότητας της χιτοζάνης.

Σύμφωνα με το μοντέλο προσέγγισης που προκύπτει για το μέγεθος, για σταθερή ποσότητα ιοντικού υγρού στην ελάχιστη τιμή 150 μl , το μέγεθος των νανοσωματιδίων μειώνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε χιτοζάνη και με μείωση της ποσότητας του AgNO_3 . Αυτό ίσως συμβαίνει καθώς η χιτοζάνη ως σταθεροποιητικός παράγοντας αποτρέπει τη συσσωμάτωση των σωματιδίων καθώς απορροφάται στην επιφάνειά τους. Ταυτόχρονα, παρατηρείται ότι για σταθερή συγκέντρωση χιτοζάνης στην μέγιστη τιμή (0.4% w/v) όταν αυξάνεται η ποσότητα του AgNO_3 , για χαμηλές ποσότητες ιοντικού υγρού, το μέγεθος των νανοσωματιδίων μεγαλώνει. Αυτό ίσως οφείλεται στην μειωμένη ποσότητα ιοντικού υγρού, το οποίο έχει προστατευτικό ρόλο για τα νανοσωματίδια, καθώς αποτρέπει τη συσσωμάτωσή τους σχηματίζοντας ένα ηλεκτροστατικό κέλυφος γύρω από αυτά.

Όσον αφορά τον δείκτη πολυδιασποράς συμπεραίνεται ότι για την μέγιστη ποσότητα ιοντικού υγρού (250 μl), ο δείκτης πολυδιασποράς μειώνεται με την μείωση της ποσότητας του νιτρικού αργύρου και με περιεκτικότητας χιτοζάνης 0.25% w/v. Η ελάχιστη τιμή του δείκτη PDI είναι και η επιθυμητή στην παρασκευή κολλοειδούς διασποράς νανοσωματιδίων με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους.

Στο μαθηματικό μοντέλο του ζ -δυναμικού υποδεικνύεται η πολυπλοκότητα του παράγοντα, το οποίο ίσως εξαρτάται περισσότερο από τους συνδυασμούς των ανεξάρτητων παραγόντων και επομένως δεν εκφράζεται σωστά η εξάρτησή του από την ποσότητα του AgNO_3 , του ιοντικού υγρού και την περιεκτικότητα της χιτοζάνης.

Τελικά σύμφωνα με τα φάσματα Raman, τα νανοσωματίδια των πειραμάτων 2 και 9 συνέβαλαν στην ανίχνευση της μικρότερης συγκέντρωσης δισφαινόλης A, που ήταν 0.09 mM. Τα νανοσωματίδια του πειράματος 2 παρασκευάστηκαν με ποσότητα νιτρικού αργύρου 200 μl , ιοντικού υγρού 200 μl και περιεκτικότητα χιτοζάνης 0.25% w/v. Είχαν μέγεθος 107.3 ± 2.1 nm, δείκτη PDI 0.232 ± 0.02 και ζ -δυναμικό $+18.3 \pm 1$ mV. Τα νανοσωματίδια του πειράματος 9 παρασκευάστηκαν με ποσότητα AgNO_3 250 μl , ιοντικού υγρού 200 μl και περιεκτικότητα σε χιτοζάνη 0.1% w/v. Είχαν μέγεθος 135.3 ± 4.6 nm, δείκτη PDI 0.284 ± 0.021 και ζ -δυναμικό $+21.6 \pm 0.3$ mV.

Μελλοντικές προοπτικές

Με την προτεινόμενη μέθοδο η μικρότερη συγκέντρωση δισφαινόλης A (BPA) που ανιχνεύτηκε μέσω της επιφανειακής ενίσχυσης της σκέδασης Raman ήταν 0.09 mM. Στην βιβλιογραφία έχει επιτευχθεί η ανίχνευση χαμηλότερων συγκεντρώσεων BPA, όπως με τη χρήση νανοσωματιδίων χρυσού Yang et al., 2017, με τα οποία ανιχνεύτηκε συγκέντρωση μέχρι και 4.3×10^{-9} mol/L και με νανοσωματίδια αργύρου τοποθετημένα σε φίλτρο με τα οποία ανιχνεύτηκε συγκέντρωση BPA έως 0.05 ng/ml Zhang et al., 2017.

Μελλοντικός στόχος αποτελεί η παραγωγή νέων νανοσωματιδίων αργύρου για την

ανίχνευση χαμηλότερων συγκεντρώσεων BPA που να φτάνουν κάτω από το όριο ειδικής μετανάστευσης που ορίζεται από την Ευρωπαϊκή Ένωση στην τιμή 0.05 mg BPA/kg τροφίμου “Κανονισμός (ΕΕ) 2018/213”, 2018. Μια ενδιαφέρουσα προοπτική είναι η χρήση της υδροχλωρικής κυστεαμίνης (cysteamine hydrochloride) σε συνδυασμό με τα νανοσωματίδια αργύρου τα οποία τοποθετούνται σε φίλτρο και χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα SERS Zhang et al., 2017. Η BPA συνδέεται με την κυστεαμίνη μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ των αμμωνιακών ιόντων και των υδροξυλομάδων και στη συνέχεια συνδέεται μέσω της θειόλης στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αργύρου. Με τη μέθοδο αυτή έχουν ανιχνευτεί χαμηλές συγκεντρώσεις BPA έως 0.05 ng/mL σε υδατικά διαλύματα.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να πραγματοποιηθούν μελέτες της μορφολογίας των νανοσωματιδίων αργύρου μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM), ώστε να μελετηθεί η επίδραση του σχήματός τους στην επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman και συγκεκριμένα στην ανίχνευση της διασφάνουλης Α.

Βιβλιογραφία

- Silva, S., Fernández-Luqueño, F., & López-Valdez, F. (2016). Silver nanoparticles (agnp) in the environment: A review of potential risks on human and environmental health. *Water, Air & Soil Pollution*, 227, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3022-9>
- Rucha, D., Mankad, V., Gupta, S., & Jha, P. (2012). Size distribution of silver nanoparticles: Uv-visible spectroscopic assessment. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 4, 30–34. <https://doi.org/10.1166/nnl.2012.1278>
- Ammari, H., Deng, Y., & Millien, P. (2016). Surface plasmon resonance of nanoparticles and applications in imaging. *Archive for Rational Mechanics and Analysis*, 220. <https://doi.org/10.1007/s00205-015-0928-0>
- Pryshchepa, O., Pomastowski, P., & Buszewski, B. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284, 102246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102246>
- Srikar, S., Giri, D., Pal, D. B., Mishra, P., & Upadhyay, S. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles: A review. *Green and Sustainable Chemistry*, 06, 34–56. <https://doi.org/10.4236/gsc.2016.61004>
- Kaabipour, S., & Hemmati, S. (2021). A review on the green and sustainable synthesis of silver nanoparticles and one-dimensional silver nanostructures. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 12, 102–136. <https://doi.org/10.3762/bjnano.12.9>
- Tzani, A., Koutsoukos, S., Koukouzelis, D., & Detsi, A. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using biodegradable protic ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 243, 212–218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.08.039>
- Macfarlane, D., Kar, M., & Pringle, J. (2017). *Fundamentals of ionic liquids: From chemistry to applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527340033>
- Tzani, A., Skarpalezos, D., Papadopoulos, A., Aravopoulou, D., Kleidas, I., Ioannou, E., Voutsas, E., Kyritsis, A., & Detsi, A. (2019). Synthesis of novel non-toxic naphthenic and benzoic acid ionic liquids. structure-properties relationship and evaluation of their biodegradability potential. *Journal of Molecular Liquids*, 296, 111927. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111927>
- Hayes, R., Warr, G. G., & Atkin, R. (2015). Structure and nanostructure in ionic liquids [PMID: 26028184]. *Chemical Reviews*, 115(13), 6357–6426. <https://doi.org/10.1021/cr500411q>
- Tzani, A., Elmaloglou, M., Kyriazis, C., Aravopoulou, D., Kleidas, I., Papadopoulos, A., Ioannou, E., Kyritsis, A., Voutsas, E., & Detsi, A. (2016). Synthesis and structure-properties relationship studies of biodegradable hydroxylammonium-based protic ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 224, 366–376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.09.086>

- Manoj Kumar, K., Sivaramakrishna, A., & Kari, V. (2016). "a short review on stable metal nanoparticles using ionic liquids, supported ionic liquids and poly (ionic liquids)". *Journal of Nanoparticle Research*, 18. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3409-y>
- He, Z., & Alexandridis, P. (2015). Nanoparticles in ionic liquids: Interactions and organization. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17. <https://doi.org/10.1039/C5CP01620G>
- Bartsch, R. A. (2003). Ionic liquids in synthesis edited by peter wasserscheid (institute for technical and macromolecular chemistry, aachen) and thomas welton (imperial college of science, london). *Journal of the American Chemical Society*, 125(39), 45–55, 488–491. <https://doi.org/10.1021/ja033540f>
- Anastas, P., Wasserscheid, P., & Stark, A. (2013). *Green solvents: Ionic liquids*. Wiley. <https://books.google.gr/books?id=K6RMDwAAQBAJ>
- Mudring, A.-V., Alammari, T., Bäcker, T., & Richter, K. (2009). Nanoparticle synthesis in ionic liquids. *ACS Symposium Series*, 1030, 177–188. <https://doi.org/10.1021/bk-2009-1030.ch012>
- dos Santos Lima, D., Gullon, B., Cardelle-Cobas, A., Brito, L. M., Rodrigues, K. A., Quelemes, P. V., Ramos-Jesus, J., Arcanjo, D. D., Plácido, A., Batziou, K., Quaresma, P., Eaton, P., Delerue-Matos, C., Carvalho, F. A. A., da Silva, D. A., Pintado, M., & de SA Leite, J. R. (2017). Chitosan-based silver nanoparticles: A study of the antibacterial, antileishmanial and cytotoxic effects. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 32(4), 397–410. <https://doi.org/10.1177/08839115166681329>
- Detsi, A., Kavetsou, E., Kostopoulou, I., Pitterou, I., Pontillo, A. R. N., Tzani, A., Christodoulou, P., Siliachli, A., & Zoumpoulakis, P. (2020). Nanosystems for the encapsulation of natural products: The case of chitosan biopolymer as a matrix. *Pharmaceutics*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070669>
- Nate, Z., Moloto, M., Mubiayi, P. K., & Mahlambi, P. (2018). Green synthesis of chitosan capped silver nanoparticles and their antimicrobial activity. *MRS Advances*, 3, 1–13. <https://doi.org/10.1557/adv.2018.368>
- Restrepo, C. V., & Villa, C. C. (2021). Synthesis of silver nanoparticles, influence of capping agents, and dependence on size and shape: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 15, 100428. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100428>
- Nhung, T., & Lee, S. (2014). Green synthesis of asymmetrically textured silver meso-flowers (agmfs) as highly sensitive sers substrates. *ACS applied materials & interfaces*, 6. <https://doi.org/10.1021/am506297n>
- Koukouzelis, D., Pontillo, A. R. N., Koutsoukos, S., Pavlatou, E., & Detsi, A. (2020). Ionic liquid – assisted synthesis of silver mesoparticles as efficient surface enhanced raman scattering substrates. *Journal of Molecular Liquids*, 306, 112929. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112929>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of instrumental analysis* (6th ed. /). Belmont (Calif.) : Thomson.
- Larkin, P. (2011a). Chapter 1 - introduction: Infrared and raman spectroscopy. In P. Larkin (Ed.), *Infrared and raman spectroscopy* (pp. 1–5). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386984-5.10001-1>
- Larkin, P. (2011b). Chapter 2 - basic principles. In P. Larkin (Ed.), *Infrared and raman spectroscopy* (pp. 7–25). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386984-5.10002-3>
- Ismail, K. (2015). *Fabrication and characterisation of sers substrates through photo-deposition of gold nanoparticles* (Doctoral dissertation). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4401.0963>

- Stamplecoskie, K. G., Scaiano, J. C., Tiwari, V. S., & Anis, H. (2011). Optimal size of silver nanoparticles for surface-enhanced raman spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, *115*(5), 1403–1409. <https://doi.org/10.1021/jp106666t>
- Cheng, L., Ma, C., Yang, G., You, H., & Fang, J. (2014a). Hierarchical silver mesoparticles with tunable surface topographies for highly sensitive surface-enhanced raman spectroscopy. *J. Mater. Chem. A*, *2*. <https://doi.org/10.1039/C3TA14674J>
- Leopold, N., Stefancu, A., Herman, K., Todor, I.-S., Iancu, S., Moisoiu, V., & Leopold, L. (2018). The role of adatoms in chloride-activated colloidal silver nanoparticles for surface-enhanced raman scattering enhancement. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *9*, 2236–2247. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.208>
- Sharma, B., Frontiera, R., Henry, A.-I., Ringe, E., & Duynes, R. (2012). SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today*, *15*, 16–25. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70017-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70017-2)
- Choi, N., Dang, H., Das, A., Sim, M. S., Chung, I. Y., & Choo, J. (2020). SERS biosensors for ultrasensitive detection of multiple biomarkers expressed in cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, *164*, 112326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112326>
- Grubisha, D. S., Lipert, R. J., Park, H.-Y., Driskell, J., & Porter, M. D. (2003). Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced raman scattering and immunogold labels [PMID: 14588035]. *Analytical Chemistry*, *75*(21), 5936–5943. <https://doi.org/10.1021/ac034356f>
- Shi, C., Zhang, Y., Gu, C., Seballos, L., & Zhang, J. Z. (2008). Low concentration biomolecular detection using liquid core photonic crystal fiber (LCPCF) SERS sensor. In I. Gannot (Ed.), *Optical fibers and sensors for medical diagnostics and treatment applications viii* (pp. 22–29). SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.760117>
- Benford, M. E., Chou, I.-H., Beier, H. T., Wang, M., Kameoka, J., Good, T. A., & Coté, G. L. (2008). In vitro detection of beta amyloid exploiting surface enhanced Raman scattering (SERS) using a nanofluidic biosensor. In T. Vo-Dinh & J. R. Lakowicz (Eds.), *Plasmonics in biology and medicine v* (pp. 131–135). SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.763913>
- Cheng, L., Ma, C., Yang, G., You, H., & Fang, J. (2014b). Hierarchical silver mesoparticles with tunable surface topographies for highly sensitive surface-enhanced raman spectroscopy. *J. Mater. Chem. A*, *2*, 4534–4542. <https://doi.org/10.1039/C3TA14674J>
- Álvarez-Puebla, R. A., & Liz-Marzán, L. M. (2010). Environmental applications of plasmon assisted raman scattering. *Energy Environ. Sci.*, *3*, 1011–1017. <https://doi.org/10.1039/C002437F>
- He, R. X., Liang, R., Peng, P., & Norman Zhou, Y. (2017). Effect of the size of silver nanoparticles on sers signal enhancement. *Journal of Nanoparticle Research*, *19*(8), 267. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3953-0>
- Qin, Y., Ji, X., Jing, J., Liu, H., Wu, H., & Yang, W. (2010). Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *372*, 172–176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.10.013>
- Leung, T. C.-Y., Wong, C. K., & Xie, Y. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles using biopolymers, carboxymethylated-curdlan and fucoidan. *Materials Chemistry and Physics*, *121*(3), 402–405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.02.026>
- Zain, N. M., Stapley, A., & Shama, G. (2014). Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers*, *112*, 195–202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.081>

- Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2019). Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 1823–1838. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014>
- Schug, T., & Birnbaum, L. (2014). Human health effects of bisphenol a. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6500-2_1
- Ullah, R., & Zheng, Y. (2015). Raman spectroscopy of ‘bisphenol a’. *Journal of Molecular Structure*, 1108. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.12.060>
- Yang, L., Chen, Y., Shen, Y., Yang, M., Li, X., Han, X., Jiang, X., & Zhao, B. (2017). Sers strategy based on the modified au nanoparticles for highly sensitive detection of bisphenol a residues in milk. *Talanta*, 179. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.055>
- Altuwair, I. (2018). Production of bisphenol a (bpa) by green technology. *Engineering Technology Open Access Journal*, 1. <https://doi.org/10.19080/ETOAJ.2018.01.555563>
- Pei Ying, L., Hsieh, C.-W., & Hsieh, S. (2017). Rapid and sensitive sers detection of bisphenol a using self-assembled graphitic substrates. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17030-9>
- Κανονισμός (εε) 2018/213. (2018). Retrieved September 23, 2021, from <http://data.europa.eu/eli/reg/2018/213/oj/ell>
- Roschi, E., Gellini, C., Ricci, M., Sanchez-Cortes, S., Focardi, C., Neri, B., Otero, J., López-Tocón, I., Smulevich, G., & Becucci, M. (2021). Surface-enhanced raman spectroscopy for bisphenols detection: Toward a better understanding of the analyte–nanosystem interactions. *Nanomaterials*, 11, 881. <https://doi.org/10.3390/nano11040881>
- Δεμέτζος, Κ. Ν. (2014). *Φαρμακευτική νανοτεχνολογία, βασικές αρχές και πρακτικές εφαρμογές*. Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ.
- Bhattacharjee, S. (2016). Dls and zeta potential – what they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Shard, A., Schofield, R., & Minelli, C. (2020). Ultraviolet–visible spectrophotometry. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00012-2>
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments* (9th ed.). John Wiley & Sons.
- Viswanath, V., Leo, V., Prabha, S., Potty, V., & Shanavas, J. (2016). Optimized production of tannase from cashew testa using aspergillus niger mtcc 5898. *Food Biotechnology*, 30, 249–262. <https://doi.org/10.1080/08905436.2016.1234392>
- Sun, C. H., Wang, M. L., Feng, Q., Liu, W., & Xu, C. X. (2015). Surface-enhanced raman scattering (sers) study on rhodamine b adsorbed on different substrates. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 89(2), 291–296. <https://doi.org/10.1134/S0036024415020338>
- Zhang, L., Zhou, L., Ji, W., Song, W., & Zhao, S. (2017). Cysteamine-assisted highly sensitive detection of bisphenol a in water samples by surface-enhanced raman spectroscopy with ag nanoparticle-modified filter paper as substrate. *Food Analytical Methods*, 10. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0762-5>