



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΠΡΑΣΙΝΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ
ΥΔΡΟΓΕΛΩΝ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΜΕ
ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ
ΑΡΓΥΡΟΥ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ ΜΑΛΛΙΑΡΑΚΗ

Διπλωματούχου Γεωλόγου Πανεπιστημίου Πατρών

ΕΠΙΒΛΕΨΗ:

Α. ΔΕΤΣΗ

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος 2023



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΠΡΑΣΙΝΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ
ΥΔΡΟΓΕΛΩΝ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΜΕ
ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ
ΑΡΓΥΡΟΥ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ ΜΑΛΛΙΑΡΑΚΗ

Διπλωματούχου Γεωλόγου Πανεπιστημίου Πατρών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Α. ΔΕΤΣΗ, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

Α. ΚΥΡΙΤΣΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π

Ε. ΠΑΥΛΑΤΟΥ, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος 2023

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας, Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να ερευνήσω ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, καθώς και την Υποψήφια Διδάκτορα Ιωάννα Πιττερού, για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ όσους με βοήθησαν στο εργαστήριο κάνοντας την ολοκλήρωση των πειραμάτων μια υπέροχη εμπειρία.

Περίληψη

Τα νανοσωματίδια αργύρου χρησιμοποιούνται σε διάφορους τομείς λόγω των αξιοσημείωτων οπτικών, ηλεκτρικών, μαγνητικών και αντιβακτηριακών ιδιοτήτων τους. Υπάρχουν πολυάριθμες μέθοδοι σύνθεσης, με εκείνες που έχουν πράσινο χαρακτήρα να αποκτούν αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω του χαμηλού κόστους, της βιοαποικοδομησιμότητας και της υψηλής απόδοσης.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η *in situ* σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου σε υδρογέλες αλγινικού, χρησιμοποιώντας έναν Φυσικό Βαθέως Ευτηκτικό Διαλύτη (Natural Deep Eutectic Solvent - NADES), που αποτελείται από γλυκόζη, γαλακτικό οξύ και νερό. Αυτό αποτελεί και το μέσο εκχύλισης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή εκχυλίσματος χαμομηλιού. Έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή, τα τερπενοειδή και οι φαινόλες είναι αποτελεσματικοί αναγωγικοί παράγοντες, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες φυτοχημικές ουσίες είναι αποτελεσματικοί σταθεροποιητές. Σε αυτές τις νανοσύνθετες υδρογέλες, το αλγινικό και το φυτικό εκχύλισμα ανάγουν τον νιτρικό άργυρο, ενώ το NADES δρα ως παράγοντας διασταύρωσης υπό την παρουσία ορατού φωτός. Μια πιθανή εφαρμογή των νέων υδρογελών που παρασκευάστηκαν είναι η ενσωμάτωσή τους σε σκευάσματα για την προστασία και την επούλωση πληγών.

Για την βελτιστοποίηση της διεργασίας, ο πειραματικός σχεδιασμός τύπου Box-Behnken χρησιμοποιήθηκε με το λογισμικό Design Expert για το τριπλό σημείο εξάρτησης. Οι παράμετροι που διερευνήθηκαν περιέλαβαν τη συγκέντρωση νιτρικού αργύρου (AgNO_3 , mM), την ποσότητα του εκχυλίσματος χαμομηλιού (% v/v) και τον χρόνο ανάδευσης (h), με αποκρίσεις την ικανότητα διόγκωσης (SR, %) και την ικανότητα συγκράτησης νερού (WRR, %). Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η ικανότητα διόγκωσης και συγκράτησης νερού των υδρογελών σε pH 5.5 στους 32°C. Η ικανότητα διόγκωσης έφτασε το 1100% μετά από 50 min, ενώ το ποσοστό συγκράτησης έφτασε στο 100% μετά από μία ώρα.

Επιπλέον, ο δομικός χαρακτηρισμός των υδρογελών πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR). Επίσης, προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων του εκχυλίσματος χαμομηλιού (Total Phenolic Content – Total Flavonoid Content). Όσον αφορά τα νανοσωματίδια, μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light

Scattering - DLS), προσδιορίστηκε υψηλό ζ- δυναμικό και σχετικά χαμηλός δείκτης πολυδιασποράς (PDI) που υποδηλώνουν την αυξημένη σταθερότητά τους, ενώ μέσω Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) αναλύεται το μέσο μέγεθος τους και η συγκέντρωσή τους.

Λέξεις – Κλειδιά: Νανοδομημένα αργύρου, Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης, Υδρογέλη, Αλγινικό, Εκχύλισμα χαμομηλιού, Πράσινη Νανοτεχνολογία

Abstract

Silver nanoparticles are extensively utilized in various sectors due to their remarkable optical, electrical, magnetic, and antibacterial properties. Numerous synthesis methods exist, with green methodologies gaining increasing research interest because of their low cost, biodegradability, and high yield.

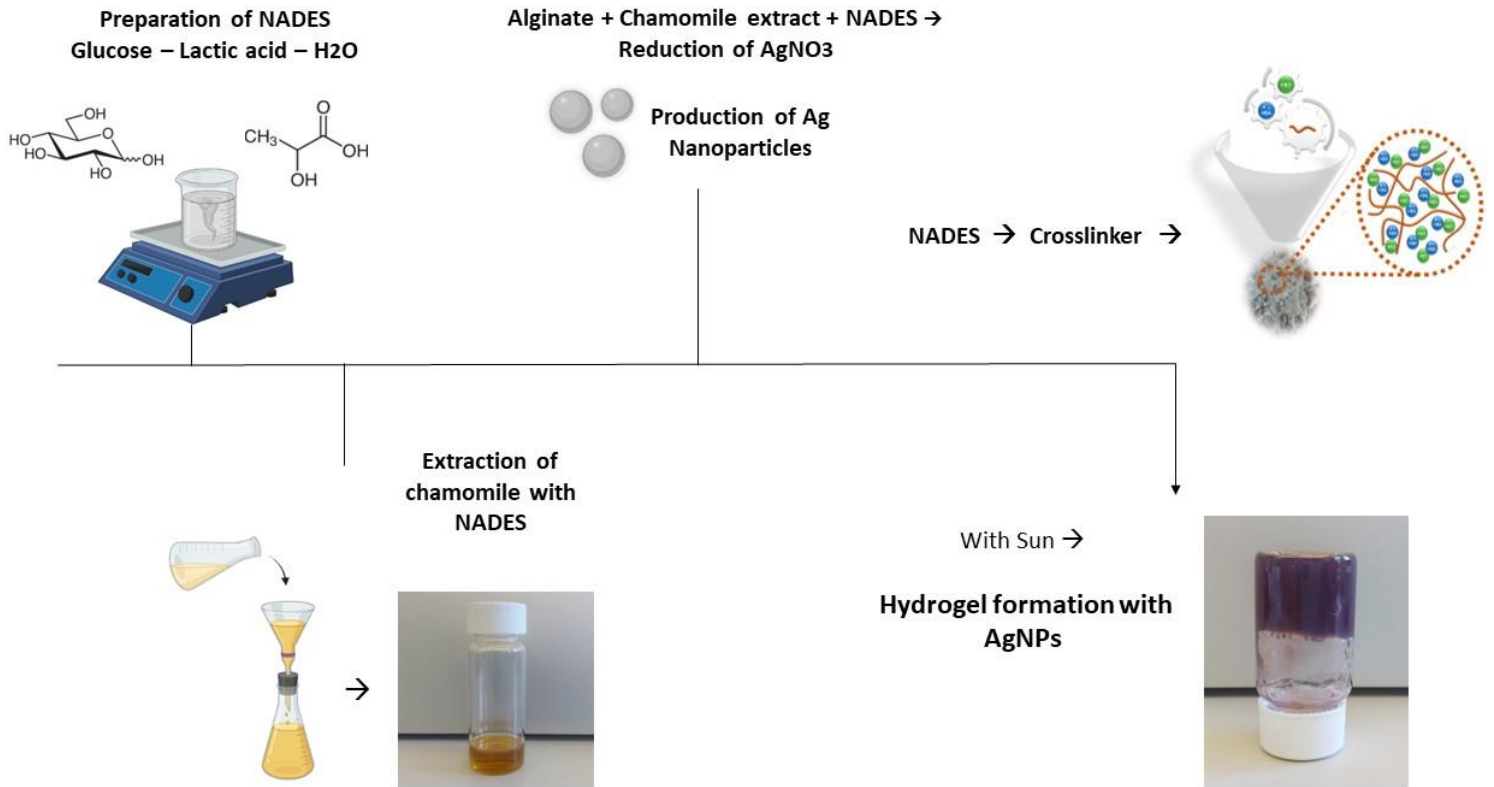
In this study, silver nanoparticles were synthesized *in situ* within alginate hydrogels using a Natural Deep Eutectic Solvent (NADES), composed of glucose, lactic acid, and water. This is also the extraction medium used to prepare chamomile extract. It has been demonstrated that flavonoids, terpenoids, and phenols are effective reducing agents, whereas proteins and other phytochemical substances are effective stabilizing agents. In these nanocomposite hydrogels, alginate and plant extract act as reducing agents to reduce the silver precursor compound, while NADES acts as a crosslinker, in the presence of sunlight. A potential application of these hydrogels is their incorporation in formulations for the protection and healing of wounds.

For the optimization of the process, a Box-Behnken-type experimental design was used in the Design Expert software for the triple dependence point. The investigated parameters included the concentration of silver nitrate (AgNO_3), the amount of chamomile and olive leaf extract, and the stirring time, with responses on the swelling capacity (%) and water retention capacity (%). By immersing dried hydrogels in a pH 5.5 solution of potassium hydrogen phosphate and potassium dihydrogen phosphate, the swelling and water retention capacity of the hydrogels were measured. The swelling capacity reached 1100% after 50 min, while the retention rate reached 100% after one hour.

Additionally, analyses were made concerning the structural characterization of the samples, using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Moreover, the total content of phenolic and flavonoid compounds of the chamomile extract (Total Phenolic Content – Total Flavonoid Content) were determined. Regarding the nanoparticles, using Dynamic Light Scattering (DLS), the high z-potential and the relatively low polydispersity index (PDI) indicate the increased stability of the dispersion, while through Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) the average size and concentration of the nanoparticles were estimated.

Key Words: Silver nanoparticles, Natural Deep Eutectic Solvent, Hydrogel, Alginic acid, Chamomile extract, Green Nanotechnology

Graphical Abstract



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	3
Περίληψη	4
Abstract.....	6
Graphical Abstract	8
Ευρετήριο Εικόνων.....	13
Ευρετήριο Διαγραμμάτων.....	15
Ευρετήριο Πινάκων	17
Ευρετήριο Εξισώσεων	18
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
1.1 Νανοτεχνολογία	19
1.1.1 Νανοςωματίδια	20
1.1.2 Νανοςωματίδια αργύρου.....	22
1.1.3 Σύνθεση νανοςωματιδίων αργύρου.....	25
1.1.3.1 Φυσικές μέθοδοι.....	26
1.1.3.2 Χημικές μέθοδοι.....	28
1.1.3.3 Πράσινες μεθοδολογίες.....	30
1.1.3.3.1 Φυτικά εκχυλίσματα.....	32
1.2 Υδρογέλες	36
1.2.1 Σύνθεση.....	36
1.2.2 Διασύνδεση	37
1.2.3 Κατηγορίες	39
1.2.4 Χαρακτηρισμός	40
1.2.5 Εφαρμογές	42
1.2.6 Επούλωση πληγών	43
1.2.7 Αλγινικό	44
1.3 Πράσινη Χημεία.....	46
1.3.1 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες – Deep Eutectic Solvents	47
1.3.1.1 Σύνθεση και ιδιότητες	48
1.3.1.2 Κατηγορίες	52
1.3.1.3 Εφαρμογές	54
1.3.2 Υδρογέλες με νανοςωματίδια αργύρου και Φυσικό Βαθέως Ευτηκτικό Διαλύτη	56
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	57

2.1 Σκοπός.....	57
2.2 Αντιδραστήρια	57
2.3 Όργανα και συσκευές.....	58
2.4 Μέθοδοι.....	58
2.4.1 Σύνθεση αλγινικού	58
2.4.2 Σύνθεση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη.....	59
2.4.3 Σύνθεση εκχυλίσματος χαμομηλιού	60
2.4.4 Σύνθεση υδρογελών με ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου.....	62
2.5 Πειραματικός σχεδιασμός	64
2.5.1 Προκαταρκτικά πειράματα.....	64
2.6 Χαρακτηρισμός υδρογελών.....	67
2.6.1 Ικανότητα διόγκωσης – Swelling Ratio	67
2.6.2 Ικανότητα συγκράτησης - Water Retention Ratio	69
2.6.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός – Dynamic Light Scattering (DLS)	70
2.6.4 Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis spectroscopy)	71
2.6.5 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	71
2.6.6 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασηματισμού Fourier (FT-IR)	73
2.6.7 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος χαμομηλιού (Total Phenolic Content – TPC)	73
2.6.8 Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων του εκχυλίσματος χαμομηλιού (Total Flavonoid Content – TFC).....	75
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	77
3.1 Πειραματικός σχεδιασμός	77
3.1.1 Ανάλυση ικανότητας διόγκωσης της υδρογέλης.....	78
3.1.2 Ανάλυση ικανότητας συγκράτησης της υδρογέλης	86
3.2 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering).....	94
3.3 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	95
3.4 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού Φασματοσκοπίας Υπερύθρου Μετασηματισμού Fourier (FT-IR).....	96
3.5 Αποτελέσματα αναλύσεων για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC).....	100
3.6 Αποτελέσματα αναλύσεων για το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).....	101
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	102

4.1	Μελλοντικές προτάσεις	103
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105

Ευρετήριο Ακρωνύμιων

- SPR = Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance)
- Ag NPs = Νανοσωματίδια αργύρου (Ag Nanoparticles)
- Crosslinker = Παράγοντας Διασταύρωσης
- Crosslinking = Διασύνδεση
- DES = Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης (Deep Eutectic Solvent)
- NADES = Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης (Natural Deep Eutectic Solvent)
- THEDES = Therapeutic Deep Eutectic Solvent
- HBA = Δέκτης Δεσμών Υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor)
- HBD = Δότης Δεσμών Υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor)
- AgNO₃ = Νιτρικός Άργυρος
- CaCl₂ = Χλωριούχο Ασβέστιο
- SR= Ικανότητα διόγκωσης υδρογέλης (Swelling Ratio)
- WRR= Ικανότητα συγκράτησης υδρογέλης (Water Retention Ratio)
- DLS = Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering)
- PDI = Δείκτης Πολυδιασποράς (Polydispersity Index)
- UV-Vis spectroscopy = Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού
- NTA = Nanoparticle Tracking Analysis
- FT-IR = Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (Fourier-transform infrared spectroscopy)
- TPC = Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content)
- TFC = Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content)
- h = ώρες (hours)
- min = λεπτά (minutes)

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Χαρακτηριστικές εικόνες νανοσωματιδίων αργύρου μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Ελέγχοντας τις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, παράγονται διαφορετικές μορφολογίες και σχήματα νανοσωματιδίων	25
Εικόνα 2: Πιθανός μηχανισμός αναγωγής των ιόντων αργύρου από τις φυτοχημικές ενώσεις του είδους <i>Matricaria chamomilla</i>	35
Εικόνα 3: Χημική δομή αλγινικού άλατος.	45
Εικόνα 4: Χαρακτηριστική απεικόνιση της egg-box δομής.....	45
Εικόνα 5: Οι δώδεκα αρχές της Πράσινης Χημείας	46
Εικόνα 6: Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι HBD και HBA βάσει βιβλιογραφίας.	49
Εικόνα 7: Φιαλίδιο με 10ml αλγινικού. Τοποθετώντας το ανάποδα διαπιστώνουμε την ρευστότητά του.	59
Εικόνα 8: Σύνθεση NADES. Δίνεται προσοχή στην διατήρηση της θερμοκρασίας στους 70°C.....	60
Εικόνα 9: Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης.	60
Εικόνα 10: NADES με την προσθήκη νερού.....	61
Εικόνα 11: NADES με άνθη χαμομηλιού.....	61
Εικόνα 12: Εκχύλισμα χαμομηλιού μέσω NADES.	61
Εικόνα 13: Διήθηση υπό κενό.	62
Εικόνα 14: 10ml Αλγινικού νατρίου.....	63
Εικόνα 15: Αλγινικό νάτριο με τη προσθήκη υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου.....	63
Εικόνα 16: Με την προσθήκη του εκχυλίσματος χαμομηλιού που περιέχει NADES, ξεκινά η διασταύρωση γεγονός που φαίνεται από την σταθεροποίηση της γέλης.....	63
Εικόνα 17: Τελικό δείγμα υδρογέλης με ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου. Είναι φανερό η διασταύρωση που λαμβάνει χώρα εξαιτίας του NADES με το εκχύλισμα, καθώς επίσης και η σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου λόγω του μωβ χρωματισμού.....	64
Εικόνα 18: Οι 15 διαφορετικές υδρογέλες που παρασκευάστηκαν βάσει του πειραματικού σχεδιασμού Box Behnken. Η διαφορά του χρώματος που παρατηρείται οφείλεται στις εκάστοτε διαφορετικές ποσότητες συστατικών, του κάθε πειράματος.	66
Εικόνα 19: Σχηματισμός γέλης μετά την προσθήκη υδατικού διαλύματος CaCl_2 περιεκτικότητας 1% w/v.	67
Εικόνες 20 - 21: Δείγματα προερχόμενα από τη λυοφιλίωση, όπου είναι φανερό η αφαίρεση της υγρασίας. Από αυτά επιλέγεται ένα μικρό τμήμα κυμαινόμενο από 0.1 – 0.3 gr τα οποία εμβαπτίζονται στο υδατικό διάλυμα $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$	68
Εικόνα 22: Τμήμα ξηρής γέλης.....	69
Εικόνα 23: Το ίδιο τμήμα εμβαπτισμένο στο υδατικό διάλυμα $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$. Φανερό είναι και η διόγκωση της υδρογέλης.	69
Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διαμόρφωσης που χρησιμοποιείται στο NTA.	72

Εικόνα 25: Ενδεικτικό διάγραμμα ζ- δυναμικού νανοσύνθετης υδρογέλης που παρασκευάστηκε με NADES και εκχύλισμα χαμομηλιού.	94
Εικόνα 26: Απεικόνιση της κίνησης των νανοσωματιδίων αργύρου μέσω NTA. Τα λευκά σημεία αντιπροσωπεύουν την αντανάκλαση των νανοσωματιδίων.	96

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Μηχανισμός χημικής αναγωγής και ανάπτυξης νανοσωματιδίων.	29
Διάγραμμα 2: Βασική δομή των φλαβονοειδών ενώσεων και οι κύριες κατηγορίες αυτών	34
Διάγραμμα 3: Σχηματική απεικόνιση της διασταύρωσης των πολυμερικών αλυσίδων, για τη σύνθεση υδρογελών	38
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα φάσεων δύο συστατικών, όπου $T_f \text{ real}$ είναι το μετρούμενο σημείο πήξης ενός μείγματος στην ευτηκτική σύνθεση, ενώ το $T_f \text{ ideal}$, είναι το θεωρητικό προβλεπόμενο σημείο πήξης για ένα ιδανικό μείγμα. $\Delta T_f = T_f(\text{real}) - T_f(\text{ideal})$	50
Διάγραμμα 5: Συσχέτιση συγκέντρωσης νιτρικού αργύρου με την ικανότητα διόγκωσης της υδρογέλης.	80
Διάγραμμα 6: Συσχέτιση περιεκτικότητας εκχυλίσματος συγκριτικά με το ποσοστό διόγκωσης.	81
Διάγραμμα 7: Συσχέτιση του χρόνου ανάδευσης συγκριτικά με την ικανότητα συγκράτησης νερού.....	82
Διάγραμμα 8: Συσχέτιση πραγματικών με προβλεπόμενων τιμών όσον αφορά την απόκριση της ικανότητας διόγκωσης.....	83
Διάγραμμα 9: Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στην ικανότητα διόγκωσης.	84
Διάγραμμα 10: Τρισδιάστατη απεικόνιση των ανεξάρτητων μεταβλητών A και B σχετικά με τον χρόνο ανάδευσης στις 2 h.....	85
Διάγραμμα 11: Συσχέτιση συγκέντρωσης νιτρικού αργύρου με την ικανότητα συγκράτησης της υδρογέλης.	87
Διάγραμμα 12: Συσχέτισης συγκράτησης νερού με τη περιεκτικότητα σε εκχύλισμα χαμομηλιού.	88
Διάγραμμα 13: Συσχέτιση του χρόνου ανάδευσης με την ικανότητα συγκράτησης νερού.	89
Διάγραμμα 14: Σύγκριση πραγματικών με τις προβλεπόμενες τιμές για το μοντέλο συγκράτησης νερού.....	90
Διάγραμμα 15: Συσχέτιση των ανεξάρτητων μεταβλητών στη σημαντικότητα του μοντέλου που αφορά την ικανότητα συγκράτησης.	91
Διάγραμμα 16: Τρισδιάστατη απεικόνιση των ανεξάρτητων μεταβλητών A και B σχετικά με τον χρόνο ανάδευσης στις 2 h.....	92

Διάγραμμα 17: Αποτελέσματα πειραματικής διαδικασίας που αφορούν το συνολικό πείραμα διόγκωσης και συγκράτησης νερού (swelling – retention) της υδρογέλης συγκριτικά με τον χρόνο. (Alg= Αλγινικό, Ag NPs= Νανοσωματίδια αργύρου, extract= εκχύλισμα χαμομηλιού).	93
Διάγραμμα 18: Σχηματική απεικόνιση της κατανομής του μέσου μεγέθους των νανοσωματιδίων αργύρου.	95
Διάγραμμα 19: Σύγκριση φασμάτων – Η μπλε γραμμή αποτελεί το δείγμα με αλγινικό 3% w/v και NADES 4 % v/v, ενώ η κόκκινη γραμμή είναι το δείγμα με αλγινικό 3% w/v και NADES 6% v/v.	97
Διάγραμμα 20: Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το φάσμα της υδρογέλης που αποτελείται από 3% w/v αλγινικό και 5.4 %v/v NADES, ενώ με πορτοκαλί χρώμα η υδρογέλη με τις βέλτιστες συνθήκες δηλαδή: 5mM [AgNO ₃], 5.4% v/v extract, 2 h. Οι δύο υδρογέλες έχουν ίδιο τρόπο διασταύρωσης, και η διαφορά τους είναι η παρουσία ή μη των νανοσωματιδίων αργύρου.	98
Διάγραμμα 21: Η κόκκινη γραμμή είναι η υδρογέλη διασυνδεδεμένη με διάλυμα CaCl ₂ 1% w/v (συμβατική υδρογέλη), ενώ η πράσινη είναι διασυνδεδεμένη με NADES και περιέχει νανοσωματίδια αργύρου (βέλτιστη υδρογέλη με συνθήκες: 5mM [AgNO ₃], 5.4% v/v extract, 2 h). Εκτός από διαφορετικό τρόπο διασταύρωσης, άλλη μία διαφορά τους είναι στην παρουσία ή μη των AgNPs.	98
Διάγραμμα 22: Απεικόνιση όλων των δειγμάτων που ελήφθησαν από τη μέθοδο FTIR. Τα δείγματα έχουν ως εξής: 1) πορτοκαλί γραμμή: 3% w/v αλγινικό, δ/μα CaCl ₂ 1% w/v, 2) ροζ γραμμή: 3% w/v αλγινικό, 4% v/v NADES, 3) πράσινη γραμμή: 3% w/v αλγινικό, 6% v/v NADES, 4) μωβ γραμμή: βέλτιστη υδρογέλη (5mM [AgNO ₃], 5.4% v/v extract, 2 hrs) και 5) μπλε γραμμή:NADES.	100

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Συνοπτικά οι κατηγορίες DES	53
Πίνακας 2: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.	58
Πίνακας 3: Όργανα και συσκευές.....	58
Πίνακας 4: Οι τρεις απαραίτητες ανεξάρτητες μεταβλητές, με τα καθορισμένα όρια που προκύπτουν από τα προκαταρκτικά πειράματα.....	65
Πίνακας 5: Πειραματικός σχεδιασμός	65
Πίνακας 6: Συνθήκες λειτουργίας του οργάνου Malvern Panalytical Nanosight NS300 για την παρούσα έρευνα.	72
Πίνακας 7: Παρακάτω παρατίθενται τα πέντε δείγματα που αναλύθηκαν με την μέθοδο FTIR. Αξίζει να σημειωθεί πως έγινε ανάλυση και στο εκχύλισμα χαμομηλιού αποτελούμενο από NADES.	73
Πίνακας 8: Αποτελέσματα αποκρίσεων των 15 παραγόμενων υδρογελών.....	77
Πίνακας 9: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Cubic που περιγράφει την απόκριση της διόγκωσης νερού (swelling ratio) στις υδρογέλες.....	78
Πίνακας 10: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του απλοποιημένου κυβικού μοντέλου στην ικανότητα διόγκωσης.	79
Πίνακας 11: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Cubic που περιγράφει την απόκριση της συγκράτησης νερού (retention ratio) στις υδρογέλες.	86
Πίνακας 12: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του απλοποιημένου κυβικού μοντέλου στην ικανότητα συγκράτησης.	87
Πίνακας 13: Καταγραφή των χαρακτηριστικών κορυφών απορρόφησης από τη μέτρηση FTIR.	99
Πίνακας 14: Αποτελέσματα ανάλυσης για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων	100
Πίνακας 15: Αποτελέσματα ανάλυσης για το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων	101

Ευρετήριο Εξισώσεων

$SR = W_t - W_d W_d \times 100\%$ (1).....	69
$WRR = W_s - W_d W_d SR \times 100\%$ (2).....	70
$A = A \text{ sample} - A \text{ blank}$ (3).....	74
$TPC = C_{gal} * V_{extr} * DF_m$ (4).....	74
$TFC = C_{catechine} * V_{extr} * DF_m$ (5).....	75
$Swelling = 691.57 + 52.75 * A + 260.00 * B - 11.25 * C - 169.50 * AC - 197.50 * BC + 237.43 * A^2 - 253.50 * A^2 B$ (6).....	79
$Retention = 59.14 + 4 * A + 40.50 * B - 1.50 * C = 20.86 * A^2 - 37.25 * A^2 B - 13.75 * A^2 C$ (7) ..	86

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Νανοτεχνολογία

Ένας από τους πλέον σημαντικούς επιστημονικούς κλάδους που αφορούν τον 21^ο αιώνα, είναι η Νανοτεχνολογία. Με τον φυσικό R. Feynman να αναφέρεται το 1959, στην δύναμη της νανοκλίμακας, αρχίζει να ξετυλίγεται η έρευνα γύρω από αυτήν [1]. Ως νανοκλίμακα ορίζεται το εύρος από 1 – 100 νανόμετρα (nm), δηλαδή σε αντιστοιχία τα 10^{-9} μέτρα. Αμέτρητοι ορισμοί έχουν δοθεί μέχρι σήμερα, με σκοπό την ακριβή περιγραφή των ιδιοτήτων και των βασικών προϋποθέσεων για την νανοτεχνολογία. Ένας από αυτούς έχει ως εξής: «Ο σχεδιασμός, χαρακτηρισμός, η παραγωγή και η εφαρμογή των υλικών, συσκευών και συστημάτων, με ελεγχόμενο χειρισμό μεγέθους και σχήματος στην νανοκλίμακα», ενώ ένας διαφορετικός αναφέρεται ως: «Ο σκόπιμος και ελεγχόμενος χειρισμός, η ακριβής τοποθέτηση, η μέτρηση, η μοντελοποίηση και η παραγωγή ύλης σε νανοκλίμακα προκειμένου να δημιουργηθούν υλικά, συσκευές και συστήματα με θεμελιωδώς νέες ιδιότητες και λειτουργίες». Δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στον ‘ελεγχόμενο χειρισμό’, γεγονός που κάνει την νανοτεχνολογία ξεχωριστή, εφόσον προσφέρει την δυνατότητα στους επιστήμονες να ελέγχουν την δομή των μορίων καθώς και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους, με αποτέλεσμα την δημιουργία νέων, βελτιωμένων και προηγμένων ιδιοτήτων στα τελικά υλικά [2].

Αξίζει να σημειωθεί, πως στην νανοκλίμακα παύουν να ισχύουν οι νόμοι της Κλασικής Φυσικής, τη θέση της οποίας, καταλαμβάνει πλέον η Κβαντομηχανική. Για κάθε υλικό, πρωτεύοντα ρόλο παίζει η δομή του και ο τρόπος που συνδέονται οι δομικές μονάδες, τα οποία θα καθορίσουν τις τελικές ιδιότητες. Η διαφορά με την νανοτεχνολογία οφείλεται στα κβαντικά φαινόμενα (φαινόμενα κλίμακας) που κυριαρχούν σε αυτή τη τάξη μεγέθους, καθώς επίσης και στον αυξημένο λόγο επιφάνειας προς όγκο. Επεξηγηματικότερα, έστω ότι ένας κύβος χωρίζεται σε μικρότερα τμήματα. Έτσι, αντί για έξι διαφορετικές επιφάνειες, κάθε μία εκ των οποίων μπορεί να δρα με το περιβάλλον, δημιουργούνται περισσότερες, διατηρώντας όμως τον όγκο σταθερό [3]. Ως αποτέλεσμα αυτού, τα νανοϋλικά, έχουν την δυνατότητα για περισσότερη χημική δραστηριότητα, γειτονικές αλληλεπιδράσεις και επιφανειοδραστικά φαινόμενα. Οι καινοφανείς ιδιότητες των νανοϋλικών (χημικές, μηχανικές, ηλεκτρικές, θερμικές, καταλυτικές, μαγνητικές), συγκριτικά με τα υλικά όγκου οφείλονται στο πολύ μικρό μέγεθός τους, χαρακτηριστικό τέτοιο, ώστε να θεωρούνται ότι βρίσκονται σε επιφανειακή κατάσταση [4]. Επιπλέον, όσο μικραίνουν

οι διαστάσεις και πλησιάζουν τις ατομικές κλίμακες, μπορεί να φτάσουν σε μέγεθος όπου οι επιφάνειες των σωματιδίων να απέχουν μεταξύ τους αποστάσεις συγκρίσιμες με το μήκος κύματος των ηλεκτρονίων. Το γεγονός αυτό αναφέρεται ως κβαντικό φαινόμενο κλίμακας [5].

Πολλοί συγγραφείς περιορίζουν το μέγεθος των νανοϋλικών στα 100 nm. Δικαιολογημένη η επιλογή αυτού του ανώτατου ορίου, από το γεγονός ότι ορισμένες φυσικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων πλησιάζουν εκείνα των υλικών όγκου, όταν το μέγεθός τους φτάσει σε αυτές τις τάξεις μεγέθους. Ωστόσο, αυτό το όριο ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του υλικού και δεν μπορεί να αποτελέσει τη βάση για μια τέτοια ταξινόμηση. Έτσι, επεκτείνεται στο 1 μm , με το εύρος υπομικρών να ταξινομείται ως νάνο [6].

Λόγω του περιορισμού στο μέγεθος, τουλάχιστον σε μια από τις διαστάσεις τους, αυτά τα υλικά διακρίνονται σε τέσσερις γενικές κατηγορίες [7]. Έτσι, νανοκρυσταλλικά υλικά με περιορισμούς και στις τρεις διαστάσεις ονομάζονται 0D υλικά με χαρακτηριστική μορφολογία σωματιδίων, νανοσφαιρών και μορίων. Τα 1D νανοϋλικά περιλαμβάνουν τους νανοσωλήνες, τις νανοίνες ενώ τα 2D αναφέρονται κυρίως σε λεπτά υμένα [8], ακολουθούμενα από 3D νανοδομές [9]. Ωστόσο, δεν παύουν να υπάρχουν και νανοαφρώδη υλικά (nanofoams), νανοδομημένες σκόνες (nanostructured powder), καθώς επίσης και τα νανοςύνθετα υλικά [7]. Περαιτέρω κατηγοριοποιήσεις αφορούν το σχήμα, τη σύσταση, την συσσωμάτωση και την ομοιομορφία [6].

1.1.1 Νανοσωματίδια

Οι καινοτόμες και ξεχωριστές ιδιότητες των νανοϋλικών είναι εφικτές μόνο όταν διατίθενται νανοδομές και νανοσωματίδια με επιθυμητό μέγεθος, σχήμα, μορφολογία και χημική σύνθεση. Ανάλογα με τις πρόδρομες ουσίες και τα υλικά που χρησιμοποιούνται, δύο κύριες μέθοδοι σύνθεσης νανοϋλικών επικρατούν, η top down και η bottom up [10]. Η πρώτη σχετίζεται με τον κατακερματισμό ενός συμπαγούς υλικού σε νανοδομές ή νανοσωματίδια. Χαρακτηρίζεται από την σχετική απλότητα της που αφορά τον διαχωρισμό ή την απομάκρυνση του συμπαγούς υλικού, έτσι ώστε να επέλθουν οι επιθυμητές ιδιότητες στη νανοκλίμακα. Ωστόσο, παρατηρούνται ατέλειες στην επιφανειακή δομή, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει σε επόμενο στάδιο. Κατά την bottom up ή self-assembly μέθοδο, γίνεται σύνθεση του υλικού με σημαντικό

πλεονέκτημα την αυτοοργάνωση που κυριαρχεί στη φύση, δηλαδή τις δυνάμεις που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα σε συγκεκριμένα μόρια, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να αυτοσυναρμολογηθούν σε πιο περίπλοκες δομές. Οι κινητήριες δυνάμεις που ωθούν τα μόρια, οφείλονται στην θερμοδυναμική και τις μοριακές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals αλλά και έλξη υδρόφιλων/υδρόφοβων τμημάτων), τα οποία στοχεύουν στην ελαχιστοποίηση των ενεργειακών καταστάσεων [11]. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στο μέγεθος των νανοσωματιδίων, αλλά και τις συνθήκες σύνθεσης όπως pH, φορτίο, θερμοκρασία έτσι ώστε να μην επέλθει συσσωμάτωση η οποία μπορεί να αποβεί τοξική.

Τα νανοσωματίδια μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με την προέλευσή τους και τον τρόπο σύνθεσής τους, σε οργανικά και ανόργανα. Στα μεν οργανικά νανοσωματίδια διακρίνεται μια υποκατηγορία που αφορά τα πολυμερικά νανοσωματίδια (δενδριμερή, μικκύλια, πρωτεϊνικά νανοσωματίδια, nanogels) καθώς και τα μη πολυμερικά νανοσωματίδια (νανοσωλήνες άνθρακα, φουλερένια, κβαντικές τελείες). Ενώ, όσον αφορά τα ανόργανα νανοσωματίδια είναι φανερό πως υπάγονται τα ημιαγώγιμα νανοσωματίδια (ZnO, ZnS και CdS), τα μαγνητικά (Co, Fe και Ni) και τα μεταλλικά νανοσωματίδια (Au, Ag, Cu και Al) [12], [13].

Πληθώρα νανοσωματιδίων κατασκευάζεται πλέον, καθώς εξαιτίας των ξεχωριστών ιδιοτήτων τους, χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορους κλάδους όπως: ηλεκτρονικά – τηλεπικοινωνίες, αυτοκινητοβιομηχανία, καταλύτες, ενέργεια, φαρμακευτική και επιστήμες υγείας [4], [6]. Όσον αφορά τις επιστήμες υγείας, είναι γνωστό πως η εφαρμογή συμβατικών θεραπευτικών παραγόντων εμφανίζει περιορισμούς όπως ανεπιθύμητες ενέργειες, μη επιλεκτικότητα και χαμηλή απόδοση. Ως εκ τούτου στο επίκεντρο των ερευνών είναι ο σχεδιασμός ενός καλά ελεγχόμενου και αποτελεσματικού συστήματος. Ο συνδυασμός των θεραπευτικών παραγόντων με νανοσωματίδια που επιδεικνύουν μοναδικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες, οδηγεί σε μια στοχευμένη στρατηγική για την καταπολέμηση ασθενειών [14]. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια με τη σειρά τους, παίζουν επιτακτικό ρόλο εξαιτίας των ευεργετικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν όχι μόνο στην θεραπεία αλλά και στην διάγνωση [15]. Ευγενή μέταλλα όπως ο χρυσός, ο άργυρος και η πλατίνα έχουν θεραπευτικές επιδράσεις, και η έρευνα εξελίσσεται όλο και περισσότερο γύρω από αυτά.

Η βιοσυμβατότητα, μη τοξικότητα, εύκολη σύνθεση αλλά και η δυνατότητα για επιφανειακή τροποποίηση καθιστούν τα μεταλλικά νανοσωματίδια μοναδικά όχι μόνο

για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αλλά όπως προαναφέρθηκε και για τη διάγνωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα νανοσωματίδια χρυσού (Au Nanoparticles – Au NPs) και αργύρου (Ag Nanoparticles - Ag NPs), τα οποία διαθέτουν μοναδικές οπτικές ιδιότητες που αφορούν τον συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR). Σχετίζεται άμεσα με την ανίχνευση υπερευαίσθητων και θεραπευτικών τεχνικών, απαραίτητες για τη θεραπεία νόσων όπως ο καρκίνος [16], [17]. Ο συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων είναι ένα φαινόμενο όπου τα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα της ζώνης αγωγιμότητας των μετάλλων, διεγείρονται από φωτόνια, προσπίπτοντος φωτός με ορισμένη γωνία πρόσπτωσης και μετατρέπονται σε πλασμόνια τα οποία στη συνέχεια διαδίδονται παράλληλα με την μεταλλική επιφάνεια [18]. Με σταθερό μήκος κύματος από τη πηγή φωτός και μια μεταλλική επιφάνεια, η συγκεκριμένη γωνία που ενεργοποιεί τον SPR εξαρτάται από τον δείκτη διάθλασης του υλικού κοντά στη μεταλλική επιφάνεια [19]. Οποιαδήποτε αλλαγή θα εμποδίσει την εμφάνιση SPR γεγονός που καθιστά δυνατή την ανίχνευση των αναλυτέων ουσιών. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται έτσι με τη μέτρηση των αλλαγών στο ανακλώμενο φως που λαμβάνεται σε έναν ανιχνευτή. Μέχρι στιγμής, διάφοροι τύποι βιοαισθητήρων SPR έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση σχετικών βιοδεικτών και τα νανοσωματίδια προσδίδουν αισθητή βελτίωση στην απόδοσή τους λόγω της μεγάλης επιφανειακής δραστηριότητάς τους [20].

1.1.2 Νανοσωματίδια αργύρου

Η ευρεία χρήση του αργύρου είναι γνωστή σε διάφορες μορφές και εφαρμογές όχι μόνο λόγω της υψηλής θερμικής και ηλεκτρικής αγωγιμότητας αλλά και της αντιβακτηριδιακής δράσης του. Βάσει ιστορικών στοιχείων, στην αρχαία Αίγυπτο και Ρώμη, ο άργυρος χρησιμοποιούνταν για την επικάλυψη δοχείων πόσιμου νερού, καθώς τα ιόντα του αργύρου είναι τοξικά για ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Επιπλέον, από την εποχή του Ιπποκράτη χρησιμοποιήθηκε στην επούλωση πληγών, στα έλκη και τις μολύνσεις [21]–[23]. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ο άργυρος δεν είναι επιβλαβής για τον ανθρώπινο οργανισμό και ως εκ τούτου θεωρείται ένα περιβαλλοντικά φιλικό αντιμικροβιακό [17]. Σήμερα πλέον, η έρευνα γύρω από τα νανοσωματίδια αργύρου εξελίσσεται συνεχώς, καθώς οι αντιμικροβιακές και αντιϊκές ιδιότητες τους έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές σε διάφορες εφαρμογές.

Κάποιες από τις εφαρμογές των νανοσωματιδίων του αργύρου αφορούν το περιβάλλον, με το φιλτράρισμα του νερού και του αέρα να είναι πρώτα στη λίστα [24]. Έρευνες έχουν δείξει πως ο άργυρος εμποτισμένος σε νανοκρυσταλλική μορφή σε κεραμικό φίλτρο, δρα θετικά στην απολύμανση του νερού συγκριτικά με ένα απλό φίλτρο [25]. Ο ρόλος των νανοσωματιδίων έγκειται στην αποτελεσματικότητα του φιλτραρίσματος και την αντιϊκή ικανότητα που προσθέτουν ενάντια στα αιωρούμενα σωματίδια. Ταυτόχρονα, στη βιομηχανία τροφίμων απαιτούνται καινοτόμες τεχνολογίες αντιμικροβιακής συσκευασίας για τη βελτίωση της διάρκειας ζωής των τροφίμων, με τα νανοσωματίδια αργύρου να θεωρούνται πολλά υποσχόμενα για την αναστολή της βακτηριακής μόλυνσης καθώς είναι ισχυρά βιοκτόνα ενάντια σε διάφορα παθογόνα όπως βακτήρια, μύκητες και ιούς. Εντούτοις, μεγάλη προσοχή δίνεται στην τυχούσα μετανάστευση του αργύρου από τις επιφάνειες της συσκευασίας στα τρόφιμα [26].

Λόγω της συνεχούς χρήσης των αντιβιοτικών, έχει γίνει επιτακτική η ανάγκη για εύρεση νέων ουσιών με την ίδια δράση. Στον τομέα της υγείας, ο άργυρος σε μορφή νανοσωματιδίων χρησιμοποιείται από την επικάλυψη εξοπλισμού που απαιτούν αποστείρωση όπως οι καθετήρες [27], μέχρι και ως θεραπευτικοί παράγοντες. Η κατανόηση του μηχανισμού των νανοσωματιδίων αργύρου είναι ζωτικής σημασίας, καθώς ενώ είναι αποδεδειγμένη η βακτηριοκτόνος δράση του, ο τρόπος με τον οποίο λαμβάνει χώρα είναι εν μέρει κατανοητός. Ωστόσο, πολλές θεωρίες έχουν προταθεί μέχρι σήμερα.

Οι κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων περιέχουν πρωτεΐνες που αποτελούνται από θείο και αμινοξέα, με τα οποία ο άργυρος μπορεί να αλληλοεπιδράσει λόγω ηλεκτροστατικής έλξης και να οδηγήσει τελικά στην αδρανοποίηση ολόκληρου του βακτηρίου. Επιπροσθέτως, τα ιόντα του αργύρου αντιδρούν με τον φωσφόρο και το θείο στο DNA, προκαλώντας προβλήματα στην αντιγραφή του και κατ' επέκταση στην αναπαραγωγή των κυττάρων, γεγονός που οδηγεί στην τελική νέκρωση αυτών [28], [29]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ενεργοποιείται μια σειρά δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS), που προκαλούν μια οξειδωτική καταπόνηση στα μικρόβια, οδηγώντας στον θάνατό τους [30]. Με αυτόν τον τρόπο, εφόσον καταστρέφεται η μεμβράνη, τα κύτταρα δεν έχουν πλέον την ικανότητα να απομακρύνουν τα ιόντα αργύρου και να περιορίσουν τη δράση τους. Επιπροσθέτως, το θετικό φορτίο της επιφάνειας των νανοσωματιδίων αργύρου είναι κρίσιμο για την προσκόλλησή τους στις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες [31]. Ένας άλλος

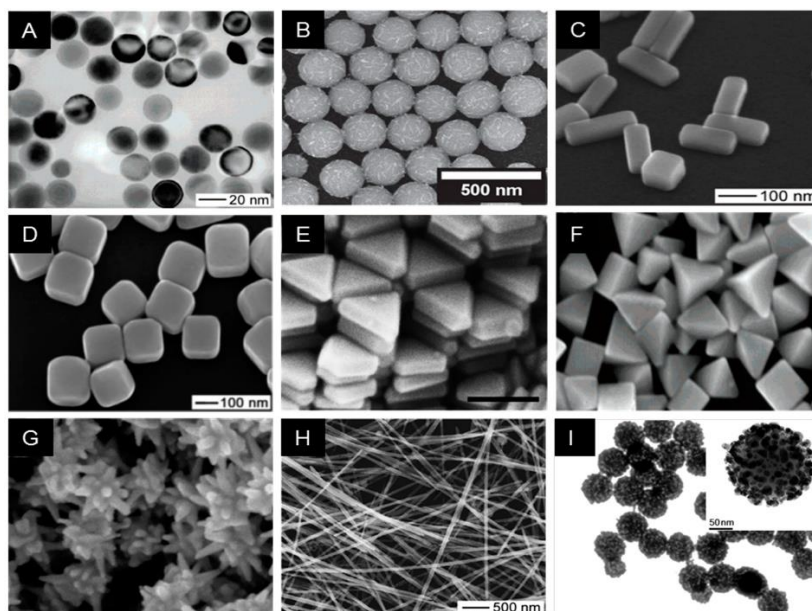
μηχανισμός της δράσης του αργύρου, είναι ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών από νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs), γεγονός που επιβεβαιώνεται από μελέτες συντονισμού spin των ηλεκτρονίων. Αναλυτικότερα, όταν έρχονται σε επαφή με βακτήρια, οι ελεύθερες ρίζες (άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα), έχουν την ικανότητα να βλάψουν την κυτταρική μεμβράνη, μετατρέποντας τη σε πορώδη, κάτι που θα οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο [13].

Νανοσωματίδια αργύρου έχουν ανασταλτικό χαρακτήρα σε μεγάλο φάσμα βακτηρίων. Τα βακτήρια έχουν διαφορετικές δομές μεμβράνης που επιτρέπουν μια γενική ταξινόμησή τους ως Gram-αρνητικά ή Gram-θετικά. Οι δομικές διαφορές έγκεινται στην οργάνωση του βασικού συστατικού της μεμβράνης, τη πεπτιδογλυκάνη, η οποία στα Gram-αρνητικά βακτήρια έχει πάχος 2-3 nm, ενώ στα Gram-θετικά βακτήρια είναι περίπου 30 nm [32]. Έρευνες έχουν δείξει πως τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν αποτελεσματική βακτηριοκτόνο δράση εξίσου και για Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια. Μερικά παραδείγματα στα Gram- αρνητικά αποτελούν τα *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* και *Vibrio*, ενώ στα Gram-θετικά ανήκουν τα είδη *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* και *Streptococcus* [27].

Οι πλέον σημαντικοί παράγοντες που αφορούν τα νανοσωματίδια αργύρου είναι το μέγεθος, το σχήμα και η μορφολογία της επιφάνειας [33]. Η αλλαγή στην δραστηριότητα και τις ιδιότητες των νανοσωματιδίων αποδίδεται στο μικρό μέγεθος τους συγκριτικά με το bulk υλικό, όπως προαναφέρθηκε. Όσο μικρότερο το μέγεθος, τόσο μεγαλύτερη η αναλογία επιφάνειας/όγκο, η ειδική επιφάνεια αυξάνεται και ως εκ τούτου, μεγαλύτερο ποσοστό ατόμων εμφανίζεται στην επιφάνεια όπου έρχεται σε επαφή με τα βακτήρια. Ακόμη, είναι ευρέως γνωστό, πως νανοσωματίδια μικρότερα των 10 nm έχουν υψηλότερο ποσοστό αλληλεπίδρασης με βακτήρια [27]. Σύμφωνα με τους Panáček et al., το pH αλλά και το είδος του αναγωγικού παράγοντα κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων, επηρεάζουν αντίστοιχα και το μέγεθος τους [34].

Αναλόγως του τρόπου σύνθεσης, το σχήμα των νανοσωματιδίων μπορεί να διαφέρει από σφαιρικό μέχρι τριγωνικό ή ραβδοειδές. Έχει αποδειχθεί πως νανοκύβοι αργύρου είναι πιο αποτελεσματικοί στην αντιβακτηριδιακή δράση τους, συγκριτικά με νανοσφαίρες ή νανοσύρματα [35]. Οι Pal et al., ερευνώντας την συσχέτιση μεγέθους – τοξικότητας, κατέληξαν στο συμπέρασμα, πως τριγωνικά νανοσωματίδια αργύρου είχαν ισχυρότερη βιοκτόνο δράση με το *E.coli*, σε σχέση νανοσωματίδια σχήματος

σφαίρας ή ράβδου [33]. Εν γένει, ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δίνεται στο σχήμα των νανοσωματιδίων και το είδος των βακτηρίων που αλληλοεπιδρούν, εφόσον όσο μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια έχουν, τόσο αυξάνεται η ικανότητα τους να δράσουν με τα βακτήρια και να οδηγήσουν στον θάνατό τους.



Εικόνα 1: Χαρακτηριστικές εικόνες νανοσωματιδίων αργύρου μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Ελέγχοντας τις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, παράγονται διαφορετικές μορφολογίες και σχήματα νανοσωματιδίων [36].

Ωστόσο, οι ιδιότητες των νανοσωματιδίων μπορούν να ενισχυθούν αλλάζοντας την λειτουργικότητά τους, με τη βοήθεια επικαλύψεων. Αυτές με τη σειρά τους επηρεάζουν, τη βιοδιαθεσιμότητα, την σταθερότητα, τη διαλυτότητα, την υδροφοβικότητα και το επιφανειακό φορτίο [37]. Ένα παράδειγμα όσον αφορά το τελευταίο, είναι επιθυμητό τα νανοσωματίδια να είναι θετικά φορτισμένα καθώς τείνουν να παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην κυκλοφορία του αίματος, συγκριτικά με τα αρνητικά φορτισμένα, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα εργαλεία χορήγησης φαρμάκων [38].

1.1.3 Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου

Πλήθος μεθόδων έχει αναπτυχθεί για την σύνθεση των νανοσωματιδίων, ώστε να καλύπτονται οι ολοένα αυξανόμενες απαιτήσεις, με τις κυριότερες να είναι η bottom

up και η top down όπως προαναφέρθηκε. Υπάρχουν φυσικές, χημικές, φωτοχημικές και βιολογικές μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων. Είναι φανερό πως οι φυσικές και χημικές είναι πιο απαιτητικές, επικίνδυνες και ενεργειακά ασύμφορες, συγκριτικά με τις βιολογικές μεθόδους που προσφέρουν υψηλή απόδοση και σταθερότητα [36]. Σε περαιτέρω διάκριση, οι μέθοδοι παρασκευής μπορούν να χωριστούν σε μεθόδους διασποράς και συμπύκνωσης. Οι μέθοδοι διασποράς βασίζονται στην καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος του υλικού (αφαίρεση με λέιζερ, καθοδικός διασκορπισμός και διασπορά ηλεκτρικού τόξου), και ανήκουν στην κατηγορία top down. Οι μέθοδοι συμπύκνωσης βασίζονται στη χημική αντίδραση δηλαδή, την αναγωγή σε διάλυμα, ακολουθούμενη από τον σχηματισμό και τη σταθεροποίηση νανοσωματιδίων, αντιπροσωπεύοντας τη bottom up προσέγγιση [39]. Διακρίνονται με τη σειρά τους σε μεθόδους υγρής φάσης όπως η μέθοδος sol gel αλλά και αέριας φάσης όπως η φυσική εναπόθεση ατμών. Οι μέθοδοι υγρής φάσης είναι σχετικά οικονομικές και προσφέρουν καλά ελεγχόμενες δομές σε εργαστηριακή κλίμακα, ενώ από την άλλη πλευρά, οι μέθοδοι αέριας φάσης ξεχωρίζουν για την υψηλή καθαρότητα των νανοσωματιδίων. Και στους δύο τρόπους, η κεντρική ιδέα είναι η πυρήνωση υπερκορεσμένων ειδών που παρασκευάζονται από πρόδρομες ενώσεις [40].

1.1.3.1 Φυσικές μέθοδοι

Από την top down οπτική παρασκευάζονται νανοσωματίδια μέσω των μεθόδων ιοντοβόλησης, τη λιθογραφία, τη μέθοδο εκκένωσης τόξου, και τις κυριότερες να είναι η εξάτμιση ή συμπύκνωση (vapor condensation), καθώς και η αφαίρεση με laser (laser ablation). Οι δύο τελευταίες προσεγγίσεις είναι σε θέση να συνθέσουν μεγάλες ποσότητες νανοσωματιδίων αργύρου με υψηλή καθαρότητα, χωρίς τη χρήση χημικών ουσιών που απελευθερώνουν τοξικές ουσίες και θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Ωστόσο, η συσσωμάτωση είναι συχνά μια μεγάλη πρόκληση επειδή δεν χρησιμοποιούνται σταθεροποιητικοί παράγοντες. Επιπλέον, και οι δύο προσεγγίσεις χαρακτηρίζονται από υψηλή κατανάλωση ενέργειας και απαιτούν σχετικά μεγαλύτερη διάρκεια σύνθεσης και πολύπλοκου εξοπλισμού, τα οποία αυξάνουν αντίστοιχα το κόστος λειτουργίας τους [36].

Πιο αναλυτικά, η μέθοδος αφαίρεσης με laser (laser ablation) βασίζεται στην ακτινοβόληση με παλμικό laser, ενός φύλλου αργύρου βυθισμένου σε ένα επιφανειοδραστικό ή υδατικό διάλυμα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ένας

παλμός laser υψηλής έντασης νανοδευτερολέπτου, αλληλοεπιδρά με ένα υλικό στόχο, όπου λαμβάνει χώρα εξάτμιση με αποτέλεσμα την παραγωγή πλάσματος [41]. Οι βασικές παράμετροι στην εξέλιξη του πλάσματος από ένα υλικό, είναι η ένταση της προσπίπτουσας δέσμης, το μήκος κύματος, η διάρκεια της έκθεσης, η απορρόφηση ενέργειας, η μεταφορά ενέργειας, η φύση του υλικού στόχου και η απόσταση μεταξύ του laser και του στόχου [42]. Έρευνες δείχνουν πως η αλλαγή στο μέγεθος των σωματιδίων επηρεάζεται άμεσα από την απορρόφηση του φωτός laser από τα σωματίδια, γεγονός που είναι γνωστό και ως κατακερματισμός [43]. Εξάγεται λοιπόν το συμπέρασμα ότι το μέγεθος των σωματιδίων αργύρου που συντίθεται, μπορεί να ελεγχθεί μεταβάλλοντας τις παραμέτρους του laser και του πλάσματος [44], [45].

Η τεχνική εξάτμισης-συμπύκνωσης χαρακτηρίζεται συνήθως από μια διαδρομή αέριας φάσης, όπου χρησιμοποιείται ένας σωληνοειδής κλίβανος για τη σύνθεση νανοσφαιρών σε ατμοσφαιρική πίεση [46]. Το κέντρο του σωληνοειδούς κλιβάνου περιέχει ένα δοχείο που φέρει την πηγή βασικού μετάλλου η οποία εξατμίζεται στο φέρον αέριο, επιτρέποντας την τελική σύνθεση των νανοσωματιδίων. Το μέγεθος, το σχήμα και η απόδοση αυτών, μπορούν να ελεγχθούν αλλάζοντας το σχεδιασμό των εγκαταστάσεων αντίδρασης. Ωστόσο, η σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με εξάτμιση-συμπύκνωση έχει πολλά μειονεκτήματα. Ο σωληνοειδής φούρνος καταλαμβάνει μεγάλο χώρο, καταναλώνει υψηλή ενέργεια αυξάνοντας τη θερμοκρασία περιβάλλοντος της μεταλλικής πηγής και απαιτεί μεγαλύτερη διάρκεια για να διατηρήσει τη θερμική του σταθερότητα. Για να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα, οι Jung et al. απέδειξαν ότι ένας κεραμικός θερμαντήρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με εξίσου υψηλή συγκέντρωση και απουσία συσσωματωμάτων [47].

Μια ακόμα σύγχρονη τεχνική είναι ο ιοντοβόληση (sputtering). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην εφαρμογή διαφοράς δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, σε ένα θάλαμο κενού υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου [48]. Ένα από τα αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα της μεθόδου, είναι η απλότητα αλλά και η καθαρότητα της διαδικασίας εφόσον δεν συμμετέχουν περαιτέρω πρόσθετα ή σταθεροποιητικοί παράγοντες. Είναι σημαντικό να μην παραλειφθούν και οι μέθοδοι της λιθογραφίας, όσο και της εκκένωσης τόξου. Η μεν πρώτη αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη νανοδομών, κάνοντας χρήση μιας εστιασμένης δέσμης φωτός ή ηλεκτρονίων προσφέροντας την δυνατότητα της ελεγχόμενης δομής. Όσον αφορά τη μέθοδο εκκένωσης τόξου, γίνεται χρήση ηλεκτροδίων αργύρου τα οποία βυθίζονται σε υδατικό

διάλυμα και εκκενώνονται. Εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης, τα ηλεκτρόδια τήκονται και ο ατμός του αργύρου συμπυκνώνεται, σχηματίζοντας έτσι τα νανοσωματίδια. Πρωτεύοντα ρόλο λαμβάνει το μέσο σύνθεσης καθώς επηρεάζει την κατανομή μεγέθους, την σταθεροποίηση αλλά και την καθαρότητα των νανοσωματιδίων [49], [50].

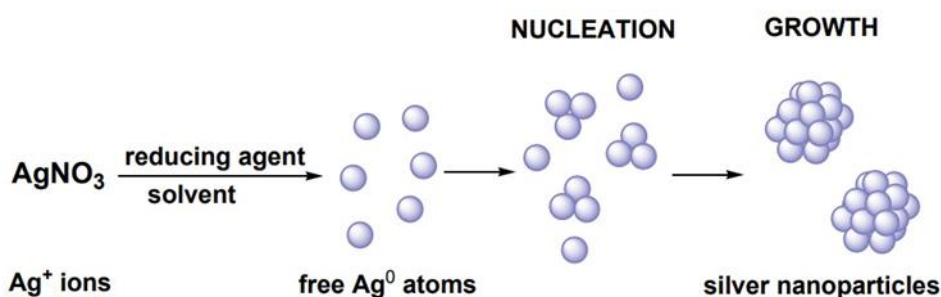
1.1.3.2 Χημικές μέθοδοι

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των χημικών μεθόδων αποτελούν οι πρόδρομες ουσίες μετάλλων, οι αναγωγικοί παράγοντες και οι παράγοντες σταθεροποίησης για την αποφυγή συσσωμάτωσης. Ενώ το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων συγκριτικά με τις φυσικές μεθόδους, είναι η υψηλή απόδοση, δε παύουν να είναι εξαιρετικά, τοξικές και επικίνδυνες [36]. Επιπλέον, τα σωματίδια που παρασκευάζονται δεν χαρακτηρίζονται για την καθαρότητά τους, εφόσον οι επιφάνειες τους είναι καλυμμένες με χημικές ουσίες [51]. Μερικές χαρακτηριστικές μέθοδοι είναι η χημική αναγωγή, οι ηλεκτροχημικές τεχνικές, οι χημικές μέθοδοι υποβοηθούμενες από ακτινοβολία καθώς και η πυρόλυση [52]. Τα νανοσωματίδια αργύρου συντίθενται χημικά και μέσω της μεθόδου Turkevich ή της σύνθεσης Brust–Schiffriin (BSS).

Διάφορα μεταλλικά άλατα χρησιμοποιούνται για την κατασκευή αντίστοιχων μεταλλικών νανοσωματιδίων, όπως χρυσός, άργυρος, σίδηρος, οξείδιο ψευδαργύρου, χαλκός, παλλάδιο, πλατίνα. Όσον αφορά τη πρόδρομη ουσία στη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου, χρησιμοποιείται ευρέως ο νιτρικός άργυρος (AgNO_3), λόγω του χαμηλού κόστους και της υψηλής απόδοσής του [53]. Επιπροσθέτως, οι παράγοντες αναγωγής και σταθεροποίησης δίνουν τη δυνατότητα για τροποποίηση, ώστε να επιτευχθούν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, όσον αφορά την κατανομή μεγέθους, το σχήμα και τον ρυθμό διασποράς. Οι ευρέως χρησιμοποιούμενοι αναγωγικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τα εξής: βοροϋδρίδιο, κιτρικό νάτριο, ασκορβικό οξύ, αλκοόλη, ενώσεις υδραζίνης, αιθυλενογλυκόλη, γλυκόζη, κιτρικό (μέθοδος Turkevich) και βοροϋδρίδιο του νατρίου (μέθοδος BSS) [36], [52].

Η κεντρική ιδέα γύρω από την χημική σύνθεση των νανοσωματιδίων αφορά ιόντα αργύρου (Ag^+) τα οποία ανάγονται σε υδατικό ή οργανικό διάλυμα, λαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο από τον αναγωγικό παράγοντα, μεταβαίνοντας έτσι σε κατάσταση μηδενικού σθένους (Ag^0). Έπειτα, ακολουθεί η πυρήνωση (nucleation) και η τελική

ανάπτυξη (growth) των νανοσωματιδίων, με την πυρήνωση να απαιτεί την πιο υψηλή ενέργεια ενεργοποίησης. Αποτέλεσμα αυτών, είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων που δίνουν μια χονδροειδή κολλοειδή διασπορά νανοσωματιδίων αργύρου. Η πυρήνωση και η ανάπτυξη, συνδέονται άμεσα με διάφορες παραμέτρους συμπεριλαμβανομένων της θερμοκρασίας, του pH, της συγκέντρωσης της πρόδρομης ουσίας, των αναγωγικών και σταθεροποιητικών παραγόντων και της μοριακής αναλογίας αυτών με την πρόδρομη ουσία. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH_4), ισχυρός αναγωγικός παράγοντας, ο οποίος ενώ βοηθάει στη σύνθεση μικρών μονοδιασπαρμένων κολλοειδών, εμποδίζει την παραγωγή AgNPs μεγαλύτερου μεγέθους. Η χρήση ενός ασθενέστερου αναγωγικού, όπως το κιτρικό, είχε ως αποτέλεσμα έναν πιο αργό ρυθμό αναγωγής, ο οποίος ωστόσο ήταν πιο ευνοϊκός για τον έλεγχο της κατανομής σχήματος και μεγέθους των NPs [54], [55]



Διάγραμμα 1: Μηχανισμός χημικής αναγωγής και ανάπτυξης νανοσωματιδίων [55].

Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων αργύρου, από τις πρώτες μεθόδους που περιγράφηκαν είναι η Lee- Meisel και η Creighton [55]. Είναι επίσης δυνατή, η σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου μέσω της μεθόδου Tollens, η οποία χρησιμοποιείται για δεκαετίες και αφορά την ηλεκτρολυτική εναπόθεση λεπτών υμενίων αργύρου (silver thin films) [56]. Ακόμη μια τεχνική, είναι η θερμολυτική μέθοδος. Το ξεχωριστό χαρακτηριστικό αυτής, είναι η απουσία αναγωγικών παραγόντων καθώς οι καρβοξυλικές ομάδες έχουν διττό ρόλο, του σταθεροποιητικού και του αναγωγικού παράγοντα. Η ελεγχόμενη θερμόλυση πλεονεκτεί στο γεγονός ότι εφαρμόζεται σε βιομηχανική κλίμακα με χαμηλό κόστος, και τα παραγόμενα προϊόντα έχουν καθαρότητα σε άργυρο μέχρι και 97% [57].

Το πλάσμα σε υδατικό διάλυμα, έχει την ικανότητα να αναγάγει τα ιόντα αργύρου, παράγοντας έτσι νανοσωματίδια χωρίς επιβλαβή παραπροϊόντα. Συνήθως γίνεται χρήση μιας επιφανειοδραστικής ουσίας ή ενός σταθεροποιητικού παράγοντα,

με την φρουκτόζη να παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα και στις δύο απαιτήσεις. Στόχος, είναι η αποφυγή της ανεξέλεγκτης σύνθεσης νανοσωματιδίων και συσσωμάτωσης. Ο κύριος μηχανισμός έγκειται στα ηλεκτρόνια που παράγονται από το πλάσμα, τα οποία εμφανίζονται μόνο σε ένα στρώμα 10nm μεταξύ πλάσματος και υγρού [58], [59].

1.1.3.3 Πράσινες μεθοδολογίες

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων μέσω πράσινων μεθοδολογιών είναι εξέχουσας σημασίας, καθώς δίνει λύσεις στα προβλήματα που προξενούν οι παραπάνω μέθοδοι, όπως το κόστος, η τοξικότητα και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Η κεντρική ιδέα βασίζεται στους πυλώνες της «πράσινης χημείας» όπου γίνεται χρήση βακτηρίων, μυκήτων, άλγεων και φυτών, για τις αντιδράσεις που είναι αναγκαίες όπως η αναγωγή των ιόντων και η σταθεροποίησή τους. Αυτοί οι αναγωγικοί παράγοντες μπορεί να είναι ένζυμα, βιομόρια, τερπενοειδή, φαινόλες κλπ. Η βασική διαδικασία αφορά την επώαση του άλατος του μετάλλου με τον αναγωγικό παράγοντα, σε κατάλληλο μέσο [60].

Η πράσινη σύνθεση μπορεί να διαχωριστεί σε δύο υποκατηγορίες:

- Τη βιοαναγωγή, κατά την οποία ιόντα μετάλλων μετατρέπονται χημικά σε πιο σταθερές μορφές. Πολλοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να αναγάγουν τα μεταλλικά ιόντα, με ταυτόχρονη οξείδωση ενός ενζύμου [61].
- Τη βιοαπορρόφηση, η οποία περιλαμβάνει τη δέσμευση μεταλλικών ιόντων από ένα υδατικό διάλυμα, στον ίδιο τον οργανισμό όπου δεν απαιτείται κατανάλωση ενέργειας. Ορισμένα βακτήρια, μύκητες και φυτά αποτελούνται από πεπτίδια ή τροποποιημένα κυτταρικά τοιχώματα, με τα οποία συνδέονται τα μεταλλικά ιόντα και είναι ικανά να σχηματίσουν σταθερά σύμπλοκα με τη μορφή νανοσωματιδίων [62].

Σχετικά με τους μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια, υπάρχουν δύο χαρακτηριστικές προσεγγίσεις: η ενδοκυτταρική και η εξωκυτταρική σύνθεση. Η ενδοκυτταρική σύνθεση περιλαμβάνει τρία κύρια βήματα: την παγίδευση, την αναγωγή και τη σταθεροποίηση και βασίζονται στην μεταφορά των μεταλλικών ιόντων στο μικροβιακό κυτταρικό τοίχωμα. Πιο αναλυτικά, ο μηχανισμός αφορά τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου κυτταρικού τοιχώματος και των θετικά φορτισμένων μεταλλικών ιόντων. Έπειτα, τα ένζυμα που

βρίσκονται μέσα στο κυτταρικό τοίχωμα αναγάγουν τα ιόντα σε μεταλλικά νανοσωματίδια και στη συνέχεια, αυτά διαχέονται μέσω του κυτταρικού τοιχώματος, γεγονός που το καθιστά εξαιρετικά σημαντικό [63], [64]. Η επιλογή του μικροοργανισμού, συνδέεται άμεσα με την θερμοκρασία ανάπτυξης, τον χρόνο σύνθεσης, τις παραμέτρους καλλιέργειας και με το είδος του μεταλλικού νανοσωματιδίου, καθώς πολλοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει αντίσταση σε μικρό αριθμό μετάλλων, περιορίζοντας έτσι την επιλογή του εκάστοτε οργανισμού [65]. Όσον αφορά την εξωκυτταρική σύνθεση, είναι γνωστό πως τα μεταλλικά ιόντα στην επιφάνεια των κυττάρων μετατρέπονται σε μεταλλικά νανοσωματίδια από μικροβιακά ένζυμα, κυρίως από νιτρική αναγωγάση (nitrate reductase) ή αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που προκαλούνται από την υδροκίνηση [64], [66]. Η νιτρική αναγωγάση συμμετέχει ενεργά στην μεταφορά ατόμων υδρογόνου, δημιουργώντας έτσι ένα αναγωγικό περιβάλλον [67]. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου, είναι η ευκολία στον χειρισμό και την ανάκτηση των νανοσωματιδίων που θα παραχθούν, για αυτό τον λόγο υπερτερεί της ενδοκυτταρικής [67]. Οι Lengke et. al απέδειξαν πως κατά την εξωκυτταρική σύνθεση, χρησιμοποιώντας το κυανοβακτήριο *Plectonema boryanum*, το μέγεθος και το σχήμα των νανοσωματιδίων μπορούσε να ελεγχθεί απλά μεταβάλλοντας την θερμοκρασία [68].

Πολλά είδη και στελέχη μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου όπως *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis* [69], *Trichoderma harzianum* [70], *Penicillium polonicum* [71]. Οι μύκητες πλεονεκτούν στο κομμάτι της σύνθεσης μεταλλικών νανοσωματιδίων εξαιτίας της υψηλής ανοχής σε περιβάλλοντα πλούσια σε μέταλλα, την έκκριση περισσότερων εξωκυτταρικών ενζύμων και την οικονομική βιωσιμότητα. Επιπροσθέτως, συγκριτικά με τα βακτηριακά συστήματα, οι μύκητες παρέχουν καλή παραγωγή βιομάζας και δεν απαιτούν πρόσθετα βήματα για την εκχύλιση, προσφέροντας παράλληλα νανοσωματίδια με ελεγχόμενο μέγεθος και μορφολογία [72]. Οι σημαντικές διακυμάνσεις στο μέγεθος, τη μονοδιασπορά και τις ιδιότητες τους οφείλονται στους διαφορετικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται από στελέχη μυκήτων. Διάφορα βιολογικά συστατικά τους παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των AgNPs, όπως αυτά που εξαρτώνται από τη νιτρική αναγωγάση, τις ξυλανάσες, ναφθοκινόνες και ανθρακοκινόνες, καθώς εμπλέκονται στην αναγωγή του πρόδρομου αργύρου. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί πως ορισμένες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από μύκητες μπορούν να λειτουργήσουν σαν παράγοντες επικάλυψης, για τον καλύτερα

ελεγχόμενο σχηματισμό των νανοσωματιδίων [73]. Οι συνθήκες επώασης, όπως τύποι πηγών αζώτου και άνθρακα, η θερμοκρασία και η πηγή φωτός, παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της σύνθεσης [67].

Τα άλγη όντας η μεγαλύτερη ομάδα φωτοαυτότροφων οργανισμών, είναι γνωστό ότι συσσωρεύουν ιόντα βαρέων μετάλλων και κατέχουν μια εξαιρετική ικανότητα να τα αναδιαμορφώνουν σε πιο εύπλαστες μορφές. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, τα άλγη έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την κατασκευή βιονανοϋλικών. Τα εκχυλίσματα άλγεων αποτελούνται από μια σειρά βιοδραστικών ενώσεων όπως αντιοξειδωτικά (πολυφαινόλες, τοκοφερόλες), και χρωστικών όπως καροτενοειδή (καροτίνη, ξανθοφύλλη), γλωροφύλλες, φυκοβιλίνες (φυκοκυανίνη, φυκοερυθρίνη) και πολυσακχαρίτες. Αυτές οι δυνητικά δραστικές ενώσεις έχουν χαρακτηριστεί ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες, οι οποίοι ελέγχουν αντιστοίχως το μέγεθος και το σχήμα των νανοσωματιδίων αργύρου [74]. Η σύνθεση των νανοσωματιδίων, περιλαμβάνει την παρασκευή εκχυλίσματος άλγεων, το διάλυμα πρόδρομου μετάλλου, και την τελική επώαση αυτών των δύο. Η αντίδραση ξεκινά με την ανάμειξη του υγρού εκχυλίσματος με το μοριακό διάλυμα του μετάλλου. Τυπικά η αλλαγή χρώματος του μείγματος αποτελεί την ορατή ένδειξη σύνθεσης νανοσωματιδίων, καθώς αντιπροσωπεύει την πυρήνωση, ακολουθούμενη από την τελική ανάπτυξη θερμοδυναμικά σταθερών νανοσωματιδίων. Τα βιοδραστικά μόρια των άλγεων υποστηρίζουν τις απαιτούμενες παραμέτρους για τη σύνθεση νανοσωματιδίων, όπως το pH, τη συγκέντρωση, τον χρόνο και τη θερμοκρασία. Η σύνθεση μέσω άλγεων μπορεί να είναι εξίσου ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική [75].

1.1.3.3.1 Φυτικά εκχυλίσματα

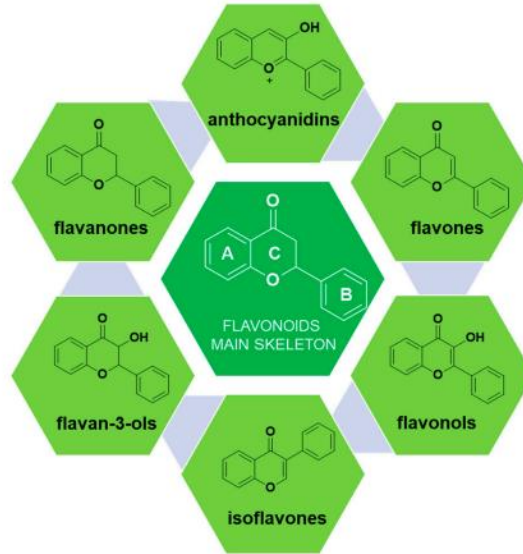
Παρά τα εμφανή πλεονεκτήματα των παραπάνω μεθόδων όσον αφορά την βιοδιαθεσιμότητα, το κόστος σύνθεσης αλλά και τον χρόνο, δεν παύουν να υπάρχουν αξιοσημείωτοι περιορισμοί. Εξετάζοντας τις παραπάνω μεθόδους εκτενέστερα, εξάγεται το συμπέρασμα πως απαιτούνται διαδικασίες πολλαπλών σταδίων, όπως η απομόνωση καλλιέργειας και η συντήρησή της, καθώς και το ότι τα λαμβανόμενα σωματίδια μπορεί να έχουν περιορισμένο μέγεθος αλλά και υπολείμματα από μικροοργανισμούς στην επιφάνειά τους. Αυτό όχι μόνο θα καθορίσει τις τελικές φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού, αλλά θα πυροδοτούσε πιθανές ανοσολογικές αντιδράσεις μετά την είσοδο στον οργανισμό. Για τον λόγο αυτό η σύνθεση

μεταλλικών νανοσωματιδίων χρησιμοποιώντας φυτά ή μέρη αυτών, προσελκύει μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον [60], [63].

Μέσα στο πλήθος των φυσικών βιοδραστικών ενώσεων που επικρατούν στα φυτά, οι δευτερογενείς μεταβολίτες και τα αντιοξειδωτικά συστατικά, αυξάνουν με τη σειρά τους το ενδιαφέρον για έρευνα στον τομέα των φυτοχημικών [76]. Οι φαινολικές ενώσεις είναι γνωστές ως οι πιο άφθονοι δευτερογενείς μεταβολίτες που παρουσιάζουν μεγάλη αντιοξειδωτική δράση [77]. Αυτό οφείλεται στη δομή τους που αποτελείται από μια ομάδα αρωματικών δακτυλίων οι οποίοι φέρουν τουλάχιστον μια ομάδα υδροξυλίου, γεγονός που βοηθά στην μεταφορά ηλεκτρονίων. Λόγω αυτού, έχουν τη δυνατότητα να προσφέρουν ηλεκτρόνια και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας έτσι την ικανότητα αυτών να βλάψουν τα κύτταρα μέσω οξειδωτικού στρες [78]. Επιπροσθέτως, εξαιτίας αυτής της δομής έρευνες έχουν δείξει πως εκχυλίσματα φυτών χρησιμοποιούνται ως αναγωγικοί παράγοντες για την πράσινη παραγωγή μεταλλικών νανοσωματιδίων [79]–[82].

Εν γένει, για την σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου, αρκεί μόνο η ανάμειξη του φυτικού εκχυλίσματος με το υδατικό διάλυμα άλατος του μετάλλου, σε θερμοκρασία δωματίου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου αποτελεσματικά διάφορα μέρη των φυτών όπως τα φύλλα, οι καρποί, τα άνθη και οι φλοιοί σε μορφή εκχυλίσματος. Τα φυτά παρουσιάζουν δραστικά συστατικά όπως τα φλαβονοειδή, τερπενοειδή, φαινολικά, αλκαλοειδή, και οι πολυσακχαρίτες που είναι αποτελεσματικοί αναγωγικοί παράγοντες, μη παραλείποντας ότι οι πρωτεΐνες και τα μόρια γλυκόζης με άλλα φυτοχημικά παίζουν τον ρόλο κάλυψης - σταθεροποίησης [83].

Ένας από τους μηχανισμούς πίσω από αυτή τη διεργασία οφείλεται στην ιδιότητα των φλαβονοειδών, υπό την έκθεση σε ηλιακό φως, να απορροφούν φωτόνια και να απελευθερώνουν ηλεκτρόνια μετά τη διέγερση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να σπάνε οι δεσμοί OH^- και να απελευθερώνονται στο μείγμα ιόντα H^+ , τα οποία ανάγουν τα ιόντα αργύρου σε σταθερό άργυρο [84]. Έχει επίσης επιβεβαιωθεί ότι κατά τον ταυτομερή μετασχηματισμό των φλαβονοειδών από την ενόλη- μορφή έως την κετο- μορφή, μπορεί να απελευθερωθεί ένα δραστικό άτομο υδρογόνου το οποίο ανάγει την μεταλλική πρόδρομη ένωση, σε μορφή νανοσωματιδίων [85]. Ακόμη, τα φαινολικά οξέα, πέραν της αντιοξειδωτικής δράσης τους, έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν ομάδες υδροξυλίου και καρβονυλίου, οι οποίες είναι ικανές να συνδέονται με μέταλλα και να αδρανοποιήσουν τα ιόντα μέσω χηλίωσης [86].



Διάγραμμα 2: Βασική δομή των φλαβονοειδών ενώσεων και οι κύριες κατηγορίες αυτών [87].

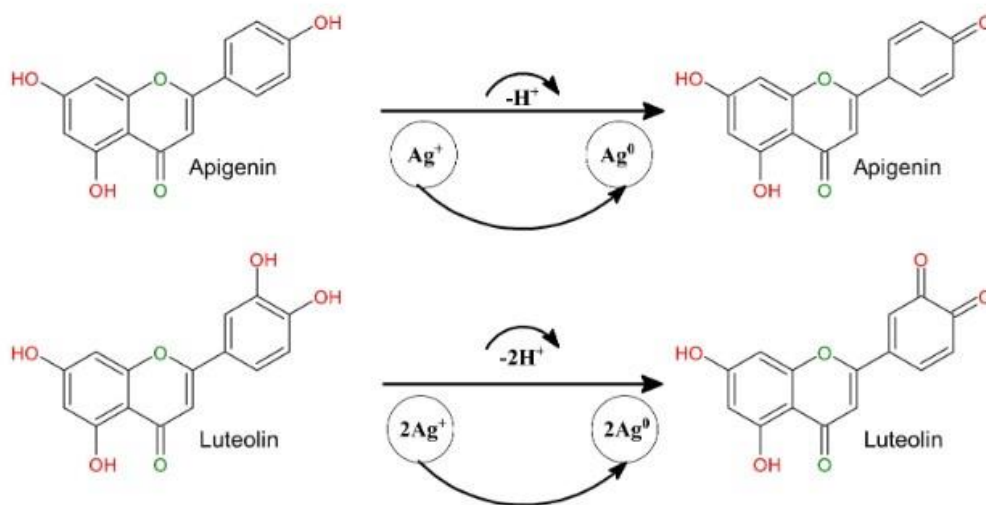
Εν ολίγοις, η συνολική διαδικασία που χαρακτηρίζει τη σύνθεση των μεταλλικών νανοσωματιδίων από τα φυτικά εκχυλίσματα μπορεί να χωριστεί σε τρεις κύριες φάσεις [85]:

- Η φάση ενεργοποίησης, όπου γίνεται η αναγωγή των μεταλλικών ιόντων με τη βοήθεια των συστατικών που προαναφέρθηκαν, και η πυρήνωση των ανηγμένων πλέον ατόμων του μετάλλου.
- Η φάση ανάπτυξης κατά την οποία τα μικρά νανοσωματίδια συνενώνονται αυθόρμητα σε σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους. Λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη των νανοσωματιδίων και περαιτέρω αναγωγή των μεταλλικών ιόντων. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως Ostwald ripening.
- Η φάση τερματισμού της διαδικασίας σύνθεσης, η οποία θα καθορίσει το τελικό σχήμα και μέγεθος των νανοσωματιδίων. Αυτό το σημείο χαρακτηρίζεται από την πιο ενεργειακά ευνοημένη κατάσταση των νανοσωματιδίων, με το φυτικό εκχύλισμα να έχει το κυρίαρχο ρόλο για την σταθεροποίησή τους.

Οι κύριοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τον σχηματισμό και την ποσότητα των νανοσωματιδίων είναι η φύση και η συγκέντρωση του εκχυλίσματος, η θερμοκρασία, το μεταλλικό άλας, το pH, η θερμοκρασία και ο χρόνος ανάδευσης. Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί σχετικά με τη σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων από διαφορετικά φυτικά εκχυλίσματα, προσφέροντας ένα ευρύ φάσμα μεγεθών και σχημάτων [88]. Το είδος του φυτού που επιλέγεται στην εκάστοτε εφαρμογή είναι

ζωτικής σημασίας, καθώς διαφορετικά είδη περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις και συνδυασμούς των προαναφερθέντων αναγωγικών παραγόντων [89].

Το είδος *Matricaria chamomilla* συγκεκριμένα, ανήκει στην οικογένεια Asteraceae και θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά καλλιεργούμενα φαρμακευτικά φυτά, καθώς περιλαμβάνει μια μεγάλη ομάδα από δραστικές ενώσεις. Το εκχύλισμα χαμομηλιού περιέχει τις πιο βιοδραστικές φαινολικές ενώσεις όπως πιγενίνη, απιγενίνη-7-Ο-γλυκοσίδη, λουτεολίνη και λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοσίδη (φλαβόνη), κερκετίνη και ρουτίνη (φλαβονόλες) [90]. Όλες χαρακτηρίζονται για την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση τους. Πληθώρα ερευνών έχει διεξαχθεί, όσον αφορά τη χρήση εκχυλίσματος χαμομηλιού για τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου [84], [91]. Μέσω μεθόδων χαρακτηρισμού (FTIR, DLS, NMR, TEM, XRD), αποδεικνύεται πως η αναγωγή των μεταλλικών ιόντων πραγματοποιείται από τις φυτοχημικές ουσίες που περιέχονται στο εκχύλισμα, και παράλληλα επικρατεί σταθεροποίηση. Αναλυτικότερα, οι Alshehri et al., υποστηρίζουν με βάση τις κορυφές στα φάσματα FTIR, την πιθανή συμβολή των υδροξυλικών ομάδων στη σύνθεση και σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων αργύρου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, πως τα φάσματα των AgNPs σε σκόνη και του χαμομηλιού, χαρακτηρίζονται από παρόμοιες κορυφές, δίνοντας έτσι έμφαση στην σύνθεση των νανοσωματιδίων, υποβοηθούμενη από βιομόρια. Επίσης, η παρουσία μορίων πρωτεΐνης στο είδος *Matricaria chamomilla* συγκεκριμένα, θεωρείται πως βοηθά την κάλυψη των νανοσωματιδίων [92].



Εικόνα 2: Πιθανός μηχανισμός αναγωγής των ιόντων αργύρου από τις φυτοχημικές ενώσεις του είδους *Matricaria chamomilla* [92].

1.2 Υδρογέλες

Ως υδρογέλες χαρακτηρίζονται τρισδιάστατες, διασυνδεδεμένες και υδρόφιλες πολυμερικές δομές, οι οποίες έχουν την ικανότητα να απορροφούν, να διογκώνονται και να συγκρατούν τεράστιες ποσότητες νερού ή υδατικών υγρών [93]. Ουσιαστικά, οι πολυμερικές αλυσίδες μονομερών ενώνονται μεταξύ τους με τη βοήθεια ενός παράγοντα διασταύρωσης (crosslinker). Τα πολυμερικά δίκτυα μπορεί να είναι υδροφοβικά ή υδροφιλικά, με τα τελευταία να προκαλούν τη διόγκωση της υδρογέλης, ενώ τα υδρόφοβα τμήματα να ελέγχουν τον ρυθμό διόγκωσης, καθώς και τις μηχανικές ιδιότητες [94]. Η ικανότητα συγκράτησης νερού οφείλεται στις λειτουργικές ομάδες όπως υδροξύλια (-OH), καρβοξύλια (-COOH), πρωτοταγείς αμιδικές (-CONH₂-) και σουλφονικές (-SO₃H) ομάδες. Εν γένει, τα κύρια συστατικά μια υδρογέλης είναι το μονομερές, ο εκκινητής, και ο διασυνδέτης και αντίστοιχα οι τελικές ιδιότητες προσαρμόζονται αναλόγως τις συγκεντρώσεις των συστατικών, τη θερμοκρασία αλλά και τον χρόνο αντίδρασης [95].

Η διασύνδεση (crosslinking) αποτελεί μία από τις κυριότερες παραμέτρους και οφείλεται σε φυσικούς ή χημικούς δεσμούς οι οποίοι σχηματίζουν ένα πλέγμα, δημιουργώντας σταυροδεσμούς στις αλυσίδες των μονομερών. Οι υδρογέλες μπορούν είτε να είναι χημικά σταθερές, είτε να υποβαθμιστούν και τελικά να διαλυθούν, διακρίνοντας τις σε χημικές ή 'μόνιμες' υδρογέλες και φυσικές ή 'αναστρέψιμες' υδρογέλες αντίστοιχα [96]. Η χρησιμότητα των υδρογελών έγκειται στα εξαιρετικά χαρακτηριστικά τους, και τη μεγάλη ποικιλία ενεργειών απόκρισης. Λίγες από τις εφαρμογές, είναι σε συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων, σε ικρίωματα ιστικής μηχανικής και ως βιοαισθητήρες, λόγω των βιομιμητικών ιδιοτήτων τους [97].

1.2.1 Σύνθεση

Τα απαιτούμενα δίκτυα συντίθενται από τα πολυμερή με διάφορες τεχνικές πολυμερισμού όπως ελευθέρων ριζών, συμπολυμερισμού, και διασταυρούμενης σύνδεσης (crosslinking). Σε γενικά πλαίσια, η σύνθεση των υδρογελών μπορεί να γίνει με τη σύνδεση των πολυμερικών αλυσίδων μέσω χημικής αντίδρασης, είτε με τη χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών, είτε με φυσικές αλληλεπιδράσεις όπως μοριακές εμπλοκές, όπου μεγάλη ποικιλία μονομερών επιτρέπουν τη σύνθεση υδρογελών με επιθυμητά χαρακτηριστικά και

ιδιότητες [98]. Η σύνθεση μπορεί να αποτελείται από ένα στάδιο όπου γίνεται ταυτόχρονος πολυμερισμός και διασταύρωση των πολυλειτουργικών μονομερών, ή σταδιακά με την παραγωγή πολυμερών με δραστικές ομάδες, οι οποίες μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους [99].

Σχετικά με τους τρόπους πολυμερισμού για τη παρασκευή υδρογελών, διακρίνονται μεταξύ άλλων, ο πολυμερισμός μάζας (bulk polymerization), ο πολυμερισμός διαλύματος (solution polymerization), εναιωρήματος (suspension polymerization) και ο πολυμερισμός γαλακτώματος (emulsion polymerization). Η ευρεία χρήση του πολυμερισμού μάζας οφείλεται στην ευκολία της μεθόδου, όπου απαιτούνται απλά τα μονομερή ή μονομερή σε διάλυμα και μια μικρή ποσότητα παράγοντα διασύνδεσης. Ξεκινώντας, οι εκκινητές που επικρατούν είναι το υπεριώδες φως, ακτινοβολία ή/ και χημικοί καταλύτες. Οι πολυμερικές πλέον υδρογέλες, παράγονται σε διάφορες μορφές συμπεριλαμβανομένων των μεμβρανών, film, σωματιδίων και γαλακτώματος [98], [99]. Ζωτικής σημασίας είναι ο έλεγχος του ρυθμού πολυμερισμού, καθώς παρατηρείται έντονη αύξηση του ιξώδους λόγω αυξανόμενης θερμοκρασίας.

Η αρχή του πολυμερισμού σε διάλυμα βασίζεται σε ιοντικά ή ουδέτερα μονομερή, μαζί με διαλύτη όπως αιθανόλη, αλκοόλη, ή νερό σε συνδυασμό με παράγοντα διασταύρωσης υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας για τον σχηματισμό της υδρογέλης. Μετά τον σχηματισμό, η υδρογέλη διαχωρίζεται από τις ακαθαρσίες που μπορεί να έχουν απομείνει, με τη χρήση απεσταγμένου νερού. Θεωρείται πιο εύκολη μέθοδος συγκριτικά με τον πολυμερισμό μάζας, καθόσον επικρατεί χαμηλότερο ιξώδες, μεταφέροντας έτσι μέσω ανάδευσης, ομοιόμορφα τη θερμότητα. Όμως, στον πολυμερισμό εναιωρήματος, χρησιμοποιούνται αδιάλυτα μονομερή και εκκινητές με χαμηλό υδρόφιλο παράγοντα, σε υδατικό διάλυμα. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η δημιουργία σταγονιδίων υδρογέλης, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται από το υπόλοιπο μείγμα [99].

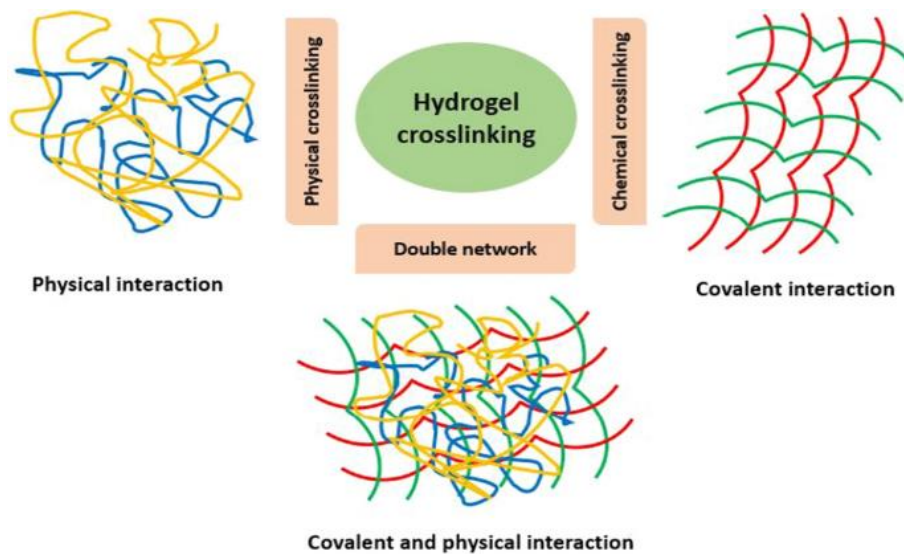
1.2.2 Διασύνδεση

Μολαταύτα, από τις κυριότερες και πιο σημαντικές παραμέτρους σύνθεσης υδρογελών είναι η διασύνδεση ή διασταύρωση. Αναλόγως της μεθόδου διασταύρωσης, διακρίνονται οι χημικές και φυσικές υδρογέλες, όπως προαναφέρθηκε. Οι μεν πρώτες καθορίζονται από μόνιμες συνδέσεις λόγω

ομοιοπολικής διασταύρωσης. Περιλαμβάνουν, κυρίως χημικές αντιδράσεις, τη χρήση ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας καθώς και του πολυμερισμού ελευθέρων ριζών [100]. Αντιθέτως, στις φυσικές επικρατεί μια παροδική διασταύρωση που προκύπτει είτε από εμπλοκές της πολυμερικής αλυσίδας, είτε από ιοντικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Όσον αφορά τις τελευταίες, τα πολυμερή αυτοοργανώνονται σε υδρόφοβα ή υδρόφιλα διαλύματα, εξαιτίας της αμφιφιλικής συγγένειας που παρουσιάζουν. Σύνθεση υδρογελών μέσω φυσικής διασταύρωσης, γίνεται και με τη μέθοδο της κρυστάλλωσης. Σε αυτή τη μέθοδο, οι πολυμερικές αλυσίδες μπορούν να συνθέσουν τις υδρογέλες, φτάνοντας στη θερμοκρασία κρυστάλλωσής τους [100].

Άμεσο επακόλουθο αυτών, είναι η υψηλή μηχανική αντοχή των χημικά διασυνδεδεμένων υδρογελών, σε αντίθεση με τις φυσικές που είναι σχετικά μαλακές και παρουσιάζουν αντιστρεψιμότητα από υγρό σε στερεό [97]. Παρόλα αυτά, και στις δύο κατηγορίες διακρίνεται μια ανομοιογένεια στο σύστημα, εξαιτίας των μοριακών εμπλοκών που δημιουργούν συστάδες, καταλήγοντας έτσι σε περιοχές με χαμηλή διόγκωση νερού [96].

Η πυκνότητα της διασύνδεσης (crosslinking density – CLD), συμβολίζει τον αριθμό των πολυμερικών αλυσίδων που έχουν συνδεθεί ανά μονάδα όγκου ολόκληρης της υδρογέλης. Με τη σειρά της επηρεάζει πολλές από τις ιδιότητες της υδρογέλης, όπως το μέτρο ελαστικότητας, την ικανότητα διόγκωσης αλλά και τον συντελεστή διάχυσης ενσωματωμένων μορίων ή σωματιδίων [101].



Διάγραμμα 3: Σχηματική απεικόνιση της διασταύρωσης των πολυμερικών αλυσίδων, για τη σύνθεση υδρογελών [102].

1.2.3 Κατηγορίες

Καθίσταται σαφές πως η κατηγοριοποίηση των υδρογελών μπορεί να επιτευχθεί με βάση την προέλευση, τη σύνθεση, τη διασταύρωση και το ιοντικό τους φορτίο [100]. Ξεκινώντας με βάση τη προέλευση, οι υδρογέλες διαχωρίζονται σε φυσικές, συνθετικές και ημι-συνθετικές. Οι φυσικές αποτελούνται από πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες όπως κυτταρίνη, αλγινικό, χιτοζάνη, υαλουρονικό οξύ και άλλες φυσικές πηγές. Παρουσιάζουν εγγενή βιοσυμβατότητα, βιοδραστικότητα, βιοαποικοδομησιμότητα αλλά σχετικά ασθενή μηχανική αντοχή. Αν και θεωρούνται ασφαλείς επιλογές, έρευνες έχουν δείξει τη πιθανότητα ανοσολογικού κινδύνου, ιδίως σε ευπαθή άτομα [103]. Από την άλλη πλευρά, οι συνθετικές υδρογέλες είναι αυτές που σχηματίζονται από τον πολυμερισμό μονομερών όπως, πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), πολυβινυλική αλκόολη (PVA) και συνθετικά βιοπολυμερή συμπεριλαμβανομένων πεπτιδίων και DNA. Παρά τον βιοσυμβατό χαρακτήρα τους, παρουσιάζουν καλύτερη μηχανική αντοχή, καλά καθορισμένη δομή με μεγάλη ποικιλία χημικών πόρων [100], [103]. Εκτός αυτών, υπάρχει και ο συνδυασμός φυσικών συστατικών με συνθετικά πολυμερή, με σκοπό την παρασκευή υβριδικών υδρογελών με χαρακτηριστικά όχι μόνο τη βιοδραστικότητα αλλά και τη ποικιλία στον χειρισμό λόγω των χημικών παραμέτρων τους [104].

Αναλόγως των πολυμερών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των υδρογελών, υπάρχει αντίστοιχη ταξινόμηση σε ομοπολυμερείς υδρογέλες, συμπολυμερείς και πολύ-πολυμερικές υδρογέλες ή διαδιεισδυτική υδρογέλη (Interpenetrating Networks - IPN). Η πρώτη κατηγορία σχετίζεται με υδρογέλες που βασίζονται σε ένα μονομερές, το οποίο είναι η βασική δομική μονάδα του πολυμερικού δικτύου. Τα ομοπολυμερή μπορεί να έχουν διασταυρούμενη δομή, κάτι που εξαρτάται από τη φύση του μονομερούς και την τεχνική πολυμερισμού. Τα συμπολυμερή με τη σειρά τους, κατασκευάζονται από δύο ή περισσότερα διαφορετικά είδη μονομερών, όπου τουλάχιστον ένα υδρόφιλο συστατικό περιέχεται κατά μήκος της αλυσίδας του πολυμερικού δικτύου. Το γεγονός αυτό, τους επιτρέπει περαιτέρω ταξινόμηση σε μπλοκ, εναλλασσόμενο ή τυχαίο συμπολυμερές, με βάση τη σύνθεση του μονομερούς. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η διαδιεισδυτική υδρογέλη αποτελείται από ένα πολυμερές δίκτυο ενσωματωμένο στις γραμμικές αλυσίδες των πολυμερών. Οι υδρογέλες IPN σχηματίζονται από δύο ή περισσότερα δίκτυα πολυμερών που συνδέονται μεταξύ τους με τη χρήση ενός παράγοντα διασταύρωσης (ή διασταύρωσης). Συγκριτικά με τις ομοπολυμερείς και συμπολυμερείς, οι υβριδικές

υδρογέλες IPN παρουσιάζουν υψηλότερη μηχανική αντοχή και ικανότητα διόγκωσης [100], [104], [105].

Παράλληλα ανάλογα με την εσωτερική δομή και τη χημική σύσταση των υδρογελών είναι γνωστό ότι χωρίζονται σε άμορφες, κρυσταλλικές και ημικρυσταλλικές. Όπως είναι φανερό οι άμορφες υδρογέλες αποτελούνται από ένα τυχαίο δομικό δίκτυο σε μοριακό επίπεδο, ενώ οι κρυσταλλικές χαρακτηρίζονται από μια συμπαγή δομή δικτύου πολυμερούς. Και σε αυτή τη περίπτωση οι ημικρυσταλλικές υδρογέλες είναι συνδυασμός των ανωτέρω κατηγοριών, αποτελούμενες από άμορφες περιοχές μέσα στο κρυσταλλικό δίκτυο [100]. Επιπροσθέτως, μπορεί να γίνει διαχωρισμός των υδρογελών βάσει και του ιοντικού φορτίου, σε ουδέτερες (μη ιοντικές), ιοντικές και αμφολυτικές υδρογέλες. Οι ιοντικές υδρογέλες διακρίνονται στις κατιοντικές και τις ανιοντικές, με τις πρώτες να έχουν θετικά φορτισμένες ομάδες όπως αμίνες, ενώ οι ανιοντικές αποτελούνται από αρνητικά φορτισμένες ομάδες όπως το καρβοξυλικό οξύ. Οι κατιοντικές υδρογέλες παρουσιάζουν αύξηση του ποσοστού διόγκωσης σε χαμηλό pH, σε αντίθεση με τις ανιονικές που το παρουσιάζουν σε υψηλό pH. Ωστόσο, οι αμφολυτικές υδρογέλες έχουν την ικανότητα να φέρουν εξίσου αρνητικό και θετικό φορτίο στην πολυμερική αλυσίδα, η οποία ισορροπεί στο ισοηλεκτρικό σημείο [95]. Περαιτέρω κατηγορίες αφορούν το μέγεθος των πόρων όπου διακρίνονται οι μη πορώδεις, μικροπορώδεις και υπερπορώδεις υδρογέλες καθώς και την τελική μορφή όπου μπορεί να είναι φιλμ, bulk υλικό ή γαλακτώματα [95], καθώς επίσης και στην απόκριση των υδρογελών σε εξωτερικά ερεθίσματα όπως pH, θερμοκρασία, πρωτεΐνες ή ακόμα και γλυκόζη [106].

1.2.4 Χαρακτηρισμός

Πολλές από τις ιδιότητες της υδρογέλης όπως η ικανότητα διόγκωσης, η ελαστικότητα, το ιξώδες, και η μηχανική αντοχή, καθορίζουν την λειτουργικότητα και την τελική εφαρμογή αυτής. Οι ιδιότητες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη διάσταση της αλυσίδας του πολυμερούς, τη σύνθεση, την κατανομή μεγέθους του πλέγματος, την αντοχή των χημικών δεσμών αλλά και του τρόπου με τον οποίο συνδέονται οι αλυσίδες αυτές. Οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι χαρακτηρισμού των υδρογελών, βασίζονται στην ρεολογία, τη σκέδαση, και τη μικροσκοπία για την εξαγωγή ή ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων φυσικοχημικών πληροφοριών. Πρακτικά, ο χαρακτηρισμός των υδρογελών γίνεται με δύο γενικούς τρόπους, είτε όταν είναι

ενυδατωμένες, με το νερό που περιέχουν, είτε όταν είναι αποξηραμένες. Ωστόσο, η δομή της αρχικής υδρογέλης μπορεί να διαφέρει από αυτή της ξηραμένης, καθώς κατά την ξήρανση τα μόρια του νερού εξατμίζονται, αφήνοντας έτσι κενό χώρο, γεγονός που οδηγεί σε συρρίκνωση του συνολικού συστήματος [101].

Οι υδρογέλες αποτελούν μαλακά, ιξωδοελαστικά υλικά, και η ρεολογία αποτελεί την πλέον κατάλληλη τεχνική για την στατική και δυναμική ιξωδοελαστική απόκριση. Στη ρεολογία, η κινητική ζελατινοποίησης και η ακαμψία της γέλης αποκαλύπτεται με την εφαρμογή μικρού πλάτους ταλαντευόμενης διάτμησης. Η διαδικασία είναι αρκετά απλή καθώς, τοποθετείται μικρή ποσότητα δείγματος (<1 gr), μεταξύ παράλληλων δίσκων και μια στρεπτική ταλάντωση δημιουργεί διατμητική τάση στο δείγμα, η οποία μετράται [107]. Επιπλέον, τα πειράματα ρεολογίας επιτρέπουν τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης του pH, των αλάτων αλλά και της θερμοκρασίας με την ζελατινοποίηση και τους μηχανισμούς σταθερότητας τη υδρογέλης.

Όταν οι προς εξέταση υδρογέλες είναι σε στερεή μορφή, ή έχουν μεγάλο ιξώδες ή είναι γενικά ελαστικές, οι τεχνικές της δοκιμής εφελκυσμού, της κόπωσης και της νανοδιείσδυσης λαμβάνουν χώρα [101]. Όσον αφορά τις ιδιότητες εφελκυσμού, είναι γνωστό πως εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του πολυμερούς, όπως και από την μέθοδο σύνθεσης. Οι Jeong – Yun Sun et al., σε δοκιμές μηχανικής αντοχής υδρογελών αλγινικού και πολυακρυλαμίδιου, ανακάλυψαν πως η χρήση παράγοντα διασταύρωσης, ενισχύει την ενέργεια θραύσης, την σκληρότητα και την ακαμψία [108].

Η ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών αποτελεί αναμφισβήτητη έναν από τους σημαντικότερους χαρακτηρισμούς για τη συνολική δομή. Παρουσιάζει το ποσοστό του νερού που απορροφάται από το πλέγμα της υδρογέλης, γεγονός που τροποποιεί αυτομάτως, την εσωτερική δομή και τις μηχανικές ιδιότητες. Οι υδρογέλες έχουν την ικανότητα να διογκώνονται, εκατοντάδες έως και χιλιάδες φορές το ξηρό βάρος τους, διατηρώντας την ισορροπία μεταξύ ελαστικών δυνάμεων και απορροφητικότητας [109]. Επηρεάζονται άμεσα από το pH, τους δεσμούς που επικρατούν στην εκάστοτε υδρογέλη, καθώς και το crosslinking και την υδροφοβικότητα [110]. Ουσιαστικά, τα μόρια νερού προσλαμβάνονται από τα υδροφιλικά τμήματα των υδρογελών, ενώ ταυτόχρονα οι ενδομοριακές δυνάμεις καθώς και τα υδροφοβικά τμήματα, συγκρατούν το πλέγμα. Όταν οι υδρογέλες αποτελούνται από μονομερή με ιοντικές λειτουργικές ομάδες, και έρθουν σε επαφή με διαλύτη συγκεκριμένου pH, οι ομάδες αυτές θα ιονιστούν αντιστοίχως. Ως επακόλουθο, δημιουργούνται ηλεκτροστατικές απώσεις

επηρεάζοντας την ικανότητα διόγκωσης – κατακράτησης του συστήματος [111]. Μια ενδιαφέρουσα έρευνα από τους Shaheen et al., δείχνει πως η ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών αλγινικού εξαρτάται από τις πολικές αλληλεπιδράσεις των μορίων νερού με τις καρβοξυλικές και υδροξυλικές ομάδες καθώς και τα μεταλλικά ιόντα. Επεξηγηματικότερα, όσα μεταλλικά ιόντα εμφανίζουν ισχυρούς δεσμούς με το αλγινικό, σχηματίζουν αντίστοιχα πυκνά διασυνδεδεμένες υδρογέλες, καθιστώντας λιγότερη τη συγγένειά τους με το νερό. Αντιθέτως, οι υδρογέλες με ασθενέστερους δεσμούς, επιτρέπουν την διείσδυση των μορίων νερού, διευκολύνοντας έτσι την επέκταση των πολυμερικών αλυσίδων [109].

1.2.5 Εφαρμογές

Το πλήθος των συστατικών που μπορούν να συνθέσουν μια υδρογέλη, και οι αντίστοιχες ιδιότητες που αποκτά μέσω αυτών, καθιστά τέτοια συστήματα κατάλληλα για διάφορες εφαρμογές. Οι ποικίλες αντιδράσεις σε εξωτερικά ερεθίσματα, διαχωρίζουν τις υδρογέλες σε συμβατικές και “έξυπνες” [100]. Είναι γνωστό πως χρησιμοποιούνται ευρέως σε κλάδους όπως της ιστικής μηχανικής, για την επούλωση πληγών, για αντιμικροβιακή δράση, αλλά ακόμα και για ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκων. Όλα έγκεινται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των υδρογελών όπως να διογκώνονται, να εγκλείουν σωματίδια στο τρισδιάστατο πλέγμα τους και να μπορούν να αντιδράσουν σε αλλαγές pH, θερμοκρασίας, μαγνητικού και ηλεκτρικού πεδίου [99]. Οι ιδιότητες τους μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν, συντονίζοντας τις λειτουργικές ομάδες, με σκοπό την κατασκευή καλύτερων μηχανικά υλικών με χαρακτηριστικά όπως αυτοϊαση (self healing) και εξαιρετική ευελιξία [99].

Χρήση υδρογελών λαμβάνει χώρα και σε περιπτώσεις διαχωρισμού ουσιών. Εξετάζονται σε αυτό το πλαίσιο, ως προσροφητικό υλικό για την απομάκρυνση βαφών και τοξικών βαρέων μετάλλων από το νερό που προκύπτει από λύματα βιομηχανιών κλωστοϋφαντουργίας και χρωματιστού χαρτιού. Είναι μια λειτουργική προσέγγιση λόγω της παρουσίας υδρόφιλων ομάδων στις υδρογέλες όπως -COOH, -OH, -CONH₂ [112].

Η εύπλαστη μορφή και η βιομιμητική μορφή των υδρογελών, τις καθιστούν εξαιρετικά χρήσιμες σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιούνται σε τεχνητά παρασκευάσματα οργάνων όπως νεφρών, σε ρομποτικές λαβές, βιοαισθητήρες, σε επούλωση πληγών και τεχνητό δέρμα. Εξαιτίας της καλής

μηχανικής σταθερότητας, και υψηλής διαπερατότητας σε οξυγόνο, είναι ιδανικοί υποψήφιοι για τη παρασκευή φακών επαφής. Μια ακόμη εφαρμογή βρίσκεται σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, όπως προαναφέρθηκε. Οι υδρογέλες έχουν την δυνατότητα να αυξήσουν της διαλυτότητα ενός φαρμάκου, μειώνοντας ταυτόχρονα την τοξικότητα του κατά την αποικοδόμηση [100]. Η υπό του στόματος χορήγηση, η εισπνοή και η διαδερμική οδός είναι από τους πιο συνήθεις τρόπους χορήγησης φαρμάκων. Ωστόσο, υδρογέλες χιτοζάνης έχουν εμφανίσει θετικά αποτελέσματα ακόμα και για την θεραπεία του γλαυκώματος [113]. Εν γένει, ενισχύοντας τις δυνατότητες του πολυμερούς, με την εισαγωγή αγωγίμων συστατικών, οι υδρογέλες καθίστανται αξιοσημείωτα ηλεκτροενεργά βιοϋλικά. Για περαιτέρω πληροφορίες, παρατίθενται οι αντίστοιχες βιβλιογραφίες [98]–[100], [113]–[115].

Ακόμα και σε κλάδους της γεωργίας και κηπουρικής, οι υδρογέλες σαν υπεραπορροφητικά τρισδιάστατα συστήματα, αποτελούν καινοτόμες λύσεις. Με άλλα λόγια, έρευνες δείχνουν πως η χρήση τους, ως συστήματα διαχείρισης για τη μείωση απώλειας λιπασμάτων και κατανάλωσης νερού, είναι αποτελεσματική. Μέσω της ικανότητας συγκράτησης νερού, υπάρχει ελεγχόμενη ποσότητα νερού για την άρδευση, παρατείνοντας έτσι και την κατακράτηση θρεπτικών ουσιών. Επιπλέον, οι υδρογέλες είναι συστήματα που δίνουν τη δυνατότητα εισαγωγής συγκεκριμένης ποσότητας λιπασμάτων. Άμεσο επακόλουθο αυτού, είναι η βελτίωση της δομής, της υφής, και της συνολικής ποιότητας του εδάφους [95].

1.2.6 Επούλωση πληγών

Μια εφαρμογή που θα αναλυθεί περαιτέρω στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι η επούλωση πληγών, η οποία αποτελεί μια πολύπλοκη και δυναμική διεργασία. Το δέρμα όντας το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος, το προστατεύει από εξωτερικούς κινδύνους, καθιστώντας έτσι την επούλωση του, μια διαδικασία που απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. Η υδρογέλη που λειτουργεί ως προσωρινό ικρίωμα, έως ότου θεραπευτεί η πληγή, θα πρέπει όχι μόνο να παρέχει προστασία αλλά να επιταχύνει και την επούλωση. Παρομοίως με τη λειτουργία του δέρματος, είναι σε θέση να απορροφά περίσσεια υγρών, διατηρώντας παράλληλα ένα υγρό μικροπεριβάλλον. Εφόσον, είναι το υλικό που έρχεται σε άμεση επαφή με τη πληγή, είναι απαραίτητο να χαρακτηρίζεται από μη τοξικότητα, βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητα [116].

Σε γενικό πλαίσιο, τα απαραίτητα χαρακτηριστικά του υλικού που θα χρησιμοποιηθεί για την επούλωση πληγών είναι τα εξής [114]:

- Διατήρηση της υγρασίας μεταξύ πληγής και επιδέσμου.
- Απορρόφηση περίσσιου εξιδρώματος και τοξινών που εκλύονται.
- Επιτρέπει την ανταλλαγή αερίων όπως οξυγόνο και υδρατμοί.
- Παροχή θερμομόνωσης για τη διατήρηση της βέλτιστης θερμοκρασίας.
- Συντήρηση της πληγής από εξωτερικές πηγές μόλυνσης.
- Παροχή εντελώς αποστειρωμένου περιβάλλοντος.
- Εύκολη αφαίρεση, χωρίς περαιτέρω τραύμα στην πληγή.

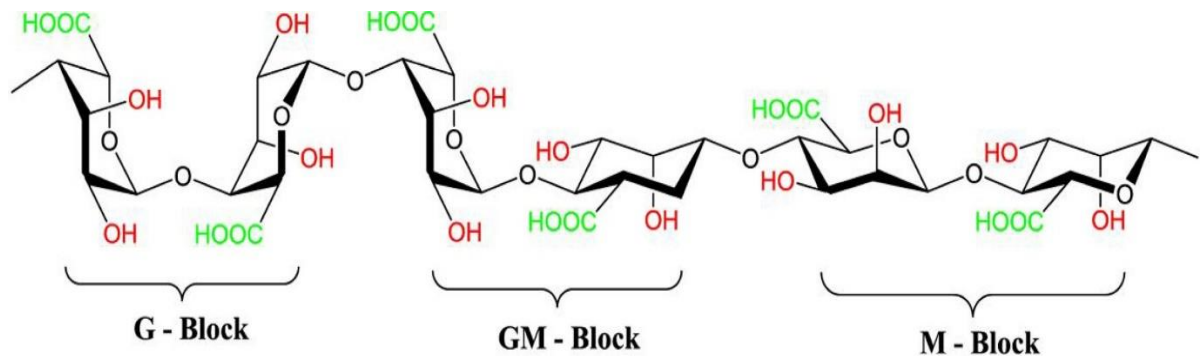
Άλλο ένα πλεονέκτημα που παρουσιάζουν οι υδρογέλες έναντι άλλων υλικών, είναι η ικανότητα ενσωμάτωσης διαφόρων βιοδραστικών παραγόντων. Δίνεται η δυνατότητα προσαρμογής των χαρακτηριστικών της υδρογέλης, προσθέτοντας αντισηπτικούς, αντιβιοτικούς και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Επιπλέον, μπορούν να ενσωματωθούν παράγοντες που επιταχύνουν την διαδικασία επούλωσης ή υποστηρίζουν την ικανότητα του δέρματος για ανάπλαση, μέσω αγγειογένεσης και επανεπιθηλιοποίησης [116].

1.2.7 Αλγινικό

Το αλγινικό αποτελεί έναν φυσικό ανιονικό πολυσακχαρίτη που βρίσκεται στα θαλάσσια φύκη (αλγινόφυτα) και ανήκουν στη κλάση *Phaeophyceae*. Το β-D-μανουρονικό οξύ (M) και το α-L-γλυκουρονικό οξύ (G), αποτελούν τις χημικές δομικές μονάδες που συνδέονται με 1-4 δεσμούς, σχηματίζοντας τη δομή των αλγινικών αλάτων [117]. Ενώ, τα συγκεκριμένα πολυμερή εξάγονται από τα καφέ θαλάσσια φύκη, έρευνες δείχνουν πως αλγινικά μπορούν να δημιουργηθούν και από βακτήρια όπως το *Azotobacter vinelandii* [118].

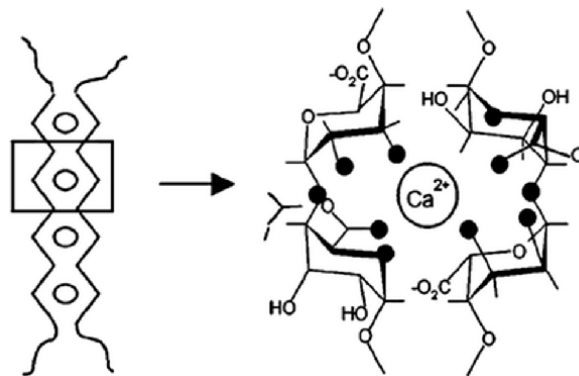
Είναι ευρέως γνωστό πως, η χρήση αλγινικού ως επίδεσμος επούλωσης, είναι αρκετά αποτελεσματική, καθώς αποτελεί ένα εξαιρετικά απορροφητικό και βιοδιασπώμενο υλικό. Μια ενεργή ανταλλαγή ιόντων ασβεστίου για ιόντα νατρίου στην επιφάνεια του τραύματος, οδηγεί σε ένα διαλυτό gel αλγινικού νατρίου που παρέχει ένα υγρό περιβάλλον στην περιοχή του τραύματος. Συμπερασματικά, η πληγή προστατεύεται και μειώνεται ο κίνδυνος ανάπτυξης μολύνσεων [119]. Επιπλέον, είναι ένα υλικό το οποίο αφαιρείται εύκολα χωρίς να προκαλεί κάποιον περαιτέρω

τραυματισμό, εξαιτίας της εξαιρετικά υδρόφιλης φύσης του αλγινικού gel, διευκολύνοντας και τον χρήστη [120].



Εικόνα 3: Χημική δομή αλγινικού άλατος [121].

Στη δομή, εμφανίζονται περιοχές διαδοχικών μονάδων μανουρονικού οξέος (M) ή γλυκουρονικού οξέος (G), είτε συνδυασμός αυτών. Ανάλογα με τη στοιχίση των M-block και G-block, τροποποιούνται και οι φυσικές ιδιότητες του αλγινικού. Είναι φυσικό επόμενο, το τελικό προϊόν να επηρεάζεται και από τον τρόπο σύνθεσης, την εξαγωγή από τα φύκη αλλά και το μοριακό βάρος των μονομερών [118]. Είναι γνωστό πως, το αλγινικό σε συνδυασμό με μια μικρή ποσότητα δισθενών κατιόντων όπως Ca^{2+} , παίρνει τη μορφή γέλης, καθώς αυτά αλληλεπιδρούν με τις καρβοξυλικές ομάδες που υπάρχουν στην αλγινική δομή. Οι ομάδες που υπάρχουν στο γλυκουρονικό οξύ, υποδεικνύουν μεγαλύτερη συγγένεια με τα κατιόντα, δίνοντας μια χαρακτηριστική δομή γνωστή ως “egg-box” [122]. Κατά αυτήν, κάθε μεταλλικό ιόν ενώνεται με τις καρβοξυλικές και υδροξυλικές ομάδες τεσσάρων G-μονομερών από δύο γειτονικές αλυσίδες των αλγινικών μακρομορίων [123].



Εικόνα 4: Χαρακτηριστική απεικόνιση της egg-box δομής [124].

Οι χρήσεις του αλγινικού στην ιατρική και βιοϊατρική είναι πολυάριθμες εξαιτίας της βιοσυμβατότητας, βιοαποικοδομησιμότητας, χαμηλής τοξικότητας και χαμηλού κόστους. Μερικά παραδείγματα αποτελούν οι μεμβράνες, οι υδρογέλες, τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, ακόμη και στη μηχανική των ιστών όπως αιμοφόρων αγγείων και νεύρων [125]. Η ανάλυση και επίγνωση της εσωτερικής δομής του αλγινικού, επιτρέπει την τροποποίηση λειτουργικών ομάδων όπως τις καρβοξυλικές ομάδες του γλυκουρονικού οξέος, με σκοπό την αποτελεσματικότερη απόδοση των τελικών προϊόντων. Έχει επίσης βρεθεί πως το αλγινικό νάτριο, δρα ως αναγωγικός και σταθεροποιητικός παράγοντας των ιόντων αργύρου [21], [126].

1.3 Πράσινη Χημεία

Το Ανθρωπόκαινο χαρακτηρίζεται ως η χρονική περίοδος πάνω στη Γη, όπου ο άνθρωπος έχει πλέον εξαιρετικά έντονη παρουσία, επηρεάζοντας τη με τέτοιο τρόπο ώστε να καταλήγει καταστροφική. Για αυτόν τον λόγο, γίνεται μεγάλη προσπάθεια να αντικατασταθούν οι τοξικές ουσίες που χρησιμοποιούνται καθημερινώς, με πιο βιώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον ουσίες αλλά και τεχνικές. Έτσι, όλα έγκεινται στους πυλώνες της πράσινης χημείας, η οποία ορίζεται ως ο σχεδιασμός χημικών προϊόντων και διεργασιών που μειώνουν ή εξαλείφουν τη χρήση ή την παραγωγή επικίνδυνων ουσιών. Οι δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας δίνουν οδηγίες σχετικά με τις πρώτες ύλες, την ενέργεια, τη συσχέτιση αποτελεσματικότητας και ασφάλειας, με στόχο τη μετάβαση προς τη βιωσιμότητα [127].



Εικόνα 5: Οι δώδεκα αρχές της Πράσινης Χημείας [128]

Για την ελαχιστοποίηση των κινδύνων για το περιβάλλον, στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής της κατασκευής υλικών, μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες μέθοδοι ελέγχου. Ο περιβαλλοντικός παράγοντας (E factor = μάζα αποβλήτων ανά μάζα προϊόντος, σε χιλιόγραμμα), χρησιμοποιείται πλέον για τον καλύτερο χαρακτηρισμό των προϊόντων [129]. Άλλες μέθοδοι αφορούν τη χρήση εναλλακτικών πρόδρομων ουσιών, καταλυτών, αντιδραστηρίων και εν γένει μικρότερες συνθέσεις για την αποφυγή δημιουργίας περισσότερων αποβλήτων. Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που αντιμετωπίζει ο κλάδος της Πράσινης Χημείας σχετίζεται με την εύρεση βιώσιμων και μη τοξικών διαλυτών, καθώς η πτητικότητα και η διαλυτότητά τους συνεισφέρουν στην ρύπανση του νερού, του αέρα και της Γης συνολικά [127]. Σήμερα, επικρατούν διάφοροι διαλύτες οι οποίοι παρουσιάζουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τους πλέον χρησιμοποιούμενους και είναι εξίσου αποτελεσματικοί χωρίς τον παράγοντα της τοξικότητας για το περιβάλλον και την υγεία. Η υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και βιοδιάσπαση είναι απαραίτητες για την προώθηση της χρήσης τους [130]. Αυτά τα είδη διαλυτών ονομάζονται πράσινοι διαλύτες με τα υπερκρίσιμα υγρά, το νερό, τα ιοντικά υγρά και τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες να είναι μερικά παραδείγματα αυτών [127].

1.3.1 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες – Deep Eutectic Solvents

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες είναι μια νέα σύνθεση ανάλογη των ιοντικών υγρών, καθόσον παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά και ιδιότητες. Αποτελούν συστήματα τα οποία σχηματίζονται από ένα ευτηκτικό μείγμα οξέων και βάσεων Lewis ή Brønsted και μπορούν να περιέχουν μια ποικιλία από ανιονικά και/ ή κατιονικά είδη. Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούν ένα συνδυασμό δύο ενώσεων, συνήθως μεγάλα μη συμμετρικά ιόντα, εκ των οποίων η μια είναι δέκτης δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor - HBA), ενώ η άλλη χαρακτηρίζεται ως δότης δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor - HBD) [131]. Αυτές οι δύο ενώσεις, αλληλοεπιδρούν μέσω εκτεταμένων δεσμών υδρογόνου με αποτέλεσμα η μετεγκατάσταση φορτίου που λαμβάνει χώρα να οδηγεί στην μείωση του σημείου τήξεως του μείγματος, συγκριτικά με τα σημεία τήξεως των επιμέρους συστατικών [132].

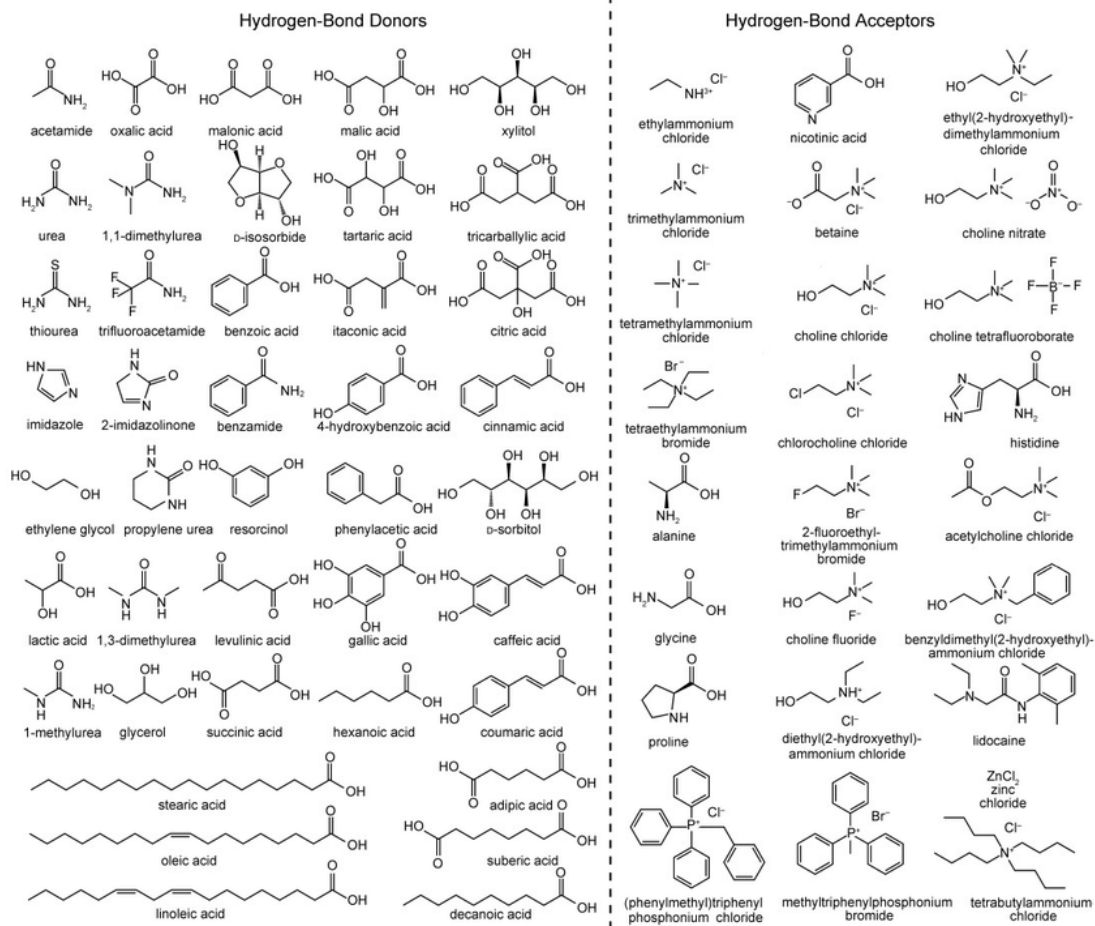
Μοναδικά χαρακτηριστικά των DESs, τα ξεχωρίζουν μέσα σε ένα πλήθος διαλυτών. Κάποια από αυτά είναι η ευελιξία στον σχεδιασμό τους, καθώς απαιτούνται δύο βιοδιασπώμενα συστατικά σε συγκεκριμένη αναλογία και η ανάμειξη τους σε

επιθυμητή θερμοκρασία, το χαμηλό κόστος, και το γεγονός ότι λειτουργούν συνεργιστικά με τα υπόλοιπα συστατικά κάτι που σημαίνει ότι δεν υπάρχει απώλεια ατόμων [131]. Έτσι, είναι φιλικά προς το περιβάλλον, παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα με ταυτόχρονη χημική και θερμική σταθερότητα, ενώ ακόμα χαρακτηρίζονται για το ευρύ φάσμα πολικότητας και τη χαμηλή πτητικότητα [130].

1.3.1.1 Σύνθεση και ιδιότητες

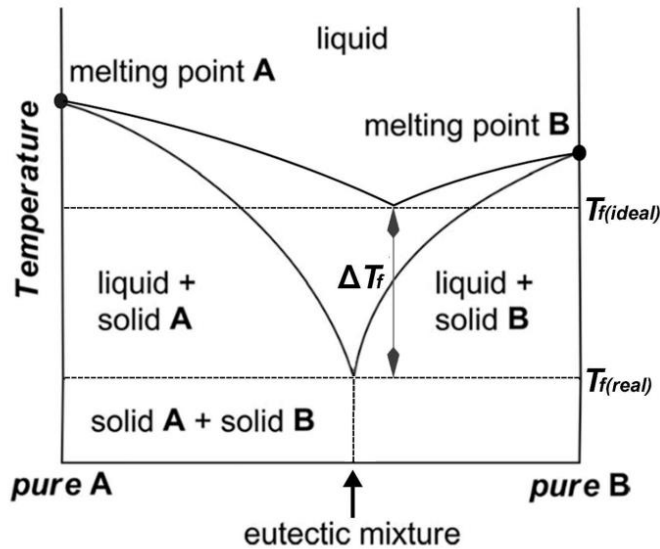
Εν γένει, η διαδικασία σύνθεσης είναι αρκετά απλή. Κατά την πιο κοινή μέθοδο, τα συστατικά θερμαίνονται και αναδεύονται συνεχώς σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, έως ότου σχηματιστεί ομοιογενές μείγμα. Στη μέθοδο της εξάτμισης, τα συστατικά του DES διαλύονται πρώτα σε νερό, το οποίο έπειτα εξατμίζεται υπό κενό στους 323 K. Το προκύπτον μείγμα διατηρείται σε ξηραντήρα μέχρι να επιτευχθεί σταθερό βάρος [133]. Στη μέθοδο λείανσης, τα στερεά συστατικά προστίθενται σε ένα γουδί και αλέθονται μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιογενές διαφανές υγρό [134]. Ακόμη, στη μέθοδο λυοφιλοποίησης, τα συστατικά διαλύονται πρώτα σε νερό (5% κ.β), και τα δύο υδατικά διαλύματα αναμειγνύονται και ψύχονται. Έπειτα, το δείγμα διατηρείται λυοφιλοποιημένο για να ληφθεί ομοιογενές και διαυγές υγρό [135].

Τα DESs χρησιμοποιούνται ως πιθανοί διαλύτες εξαιτίας των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους όπως η πυκνότητα, η επιφανειακή τάση, η αναμειξιμότητα και η πολικότητα. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα τους, είναι το ευρύ φάσμα των διαφορετικών συστατικών που χρησιμοποιούνται για την σύνθεσή του. Οι τελικές ιδιότητες, μπορούν να ελεγχθούν και να προσαρμοστούν, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς HBD και HBA σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες. Πέραν αυτών των παραγόντων, το τελικό αποτέλεσμα επηρεάζεται από την καθαρότητα των συστατικών, την θερμοκρασία, την περιεκτικότητα σε νερό καθώς και τη μέθοδο παρασκευής [136].



Εικόνα 6: Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι HBD και HBA βάσει βιβλιογραφίας [137].

Όπως είναι φανερό πολλές φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs καθορίζονται από την αλληλεπίδραση των επιμέρους συστατικών, και τους δεσμούς υδρογόνου που θα αναπτυχθούν. Αποτέλεσμα αυτών, είναι η σημαντική πτώση του σημείου τήξεως του συστήματος, γεγονός που δείχνει ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ HBD και HBA θεωρούνται περισσότερο ενεργειακά ευνοημένες, συγκριτικά με τις ενέργειες πλεγμάτων των καθαρών συστατικών [138]. Η ισχύς των δεσμών υδρογόνου με τη σειρά τους σχετίζονται άμεσα με τη θερμοκρασία και καθορίζουν την μετάβαση της φάσης, δηλαδή όσο ισχυρότερος είναι ο δεσμός τόσο μεγαλύτερη θα είναι η μείωση του σημείου τήξεως [139].



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα φάσεων δύο συστατικών, όπου $T_f \text{ real}$ είναι το μετρούμενο σημείο πήξης ενός μείγματος στην ευτηκτική σύνθεση, ενώ το $T_f \text{ ideal}$, είναι το θεωρητικό προβλεπόμενο σημείο πήξης για ένα ιδανικό μείγμα. $\Delta T_f = T_f(\text{real}) - T_f(\text{ideal})$ [140].

Η πυκνότητα του παραγόμενου DES είναι ζωτικής σημασίας για τον ρόλο του διαλύτη. Τα περισσότερα DESs, παρουσιάζουν μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό με τις αναφερόμενες στη βιβλιογραφία πυκνότητες, να κυμαίνονται από 0.785 – 1.63 g/cm³, σε θερμοκρασία δωματίου [140]. Επιπλέον, βάσει βιβλιογραφίας, φαίνεται πως η πυκνότητα σχετίζεται άμεσα με την μοριακή οργάνωση, γεγονός που εξηγείται από τη θεωρία ελεύθερου όγκου (the hole theory), κατά την οποία κάθε σύστημα DES αποτελείται από κενά που θα καθορίσουν την τελική πυκνότητα [141]. Έχει αποδειχθεί πως η μοριακή αναλογία είναι εξέχουσας σημασίας, καθώς οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ HBA και HBD είναι ο κινητήριος παράγοντας για την συνολική δομή του DES. Πιο αναλυτικά, η αύξηση των λειτουργικών ομάδων -OH από την πλευρά του HBD, οδηγεί σε μεγαλύτερο αριθμό δεσμών υδρογόνου. Παρόμοια τάση αναφέρθηκε όταν αυξήθηκε ο αριθμός των αρωματικών ομάδων ή αλκυλικών αλυσίδων των οργανικών οξέων [142]. Ως αποτέλεσμα αυτών, μειώνεται ο διαθέσιμος ελεύθερος όγκος και κατά συνέπεια αυξάνεται η πυκνότητα του DES. Ωστόσο, με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται μείωση της πυκνότητας, καθώς αυξάνεται το ποσοστό του ελεύθερου χώρου, γεγονός που καταλήγει σε πιο γρήγορη και εύκολη κίνηση των μορίων [143]. Επίσης, η προσθήκη νερού βρέθηκε να επηρεάζει το σύστημα, καθώς μειώνονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ HBA και HBD με αποτέλεσμα να μειώνεται αντίστοιχα και η πυκνότητα [144]. Όταν προστίθεται νερό σε DES, όλα τα είδη είναι ενυδατωμένα αλλά αναμένεται ότι τα ανιόντα θα είναι πιο στενά συνδεδεμένα με τα μόρια του νερού.

Μικρά ανιόντα όπως τα αλογονίδια είναι συνήθως πλήρως διαλυτοποιημένα. Για αυτό τον λόγο η κατανόηση της επίδρασης του νερού στις φυσικοχημικές ιδιότητες του συστήματος όπως πυκνότητα, ιξώδες και αγωγιμότητα είναι ζωτικής σημασίας [145].

Όσον αφορά το ιξώδες του DES, σχετίζεται εξίσου με τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η μοριακή δομή και αναλογία μεταξύ των συστατικών επηρεάζει σε τέτοιο βαθμό όπου έχει αποδειχθεί πως υψηλότερες μοριακές αναλογίες HBA:HBD έδειξαν υψηλότερα ιξώδη. Ενώ παράλληλα, με την αύξηση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας του HBD, αυξάνεται και το ιξώδες, γεγονός που δείχνει μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα. Βάσει ερευνών, έχει αποδειχθεί πως και η παρουσία αιθέρα επίσης βοηθά τη θερμική σταθερότητα [143]. Σχετικά με τον παράγοντα της θερμοκρασίας, υπάρχει η γενική παρατήρηση ότι το ιξώδες μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Σύμφωνα με τη θεωρία ελεύθερου όγκου, το ιξώδες εξαρτάται από την παρουσία οπών στα υγρά, όπου διευκολύνεται η κινητικότητα των μορίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ελέγχεται περισσότερο από τον παράγοντα του όγκου, παρά των αλληλεπιδράσεων μεταξύ HBA και HBD. Ωστόσο, η κατανομή του μεγέθους των οπών και του αντίστοιχου ελεύθερου όγκου εξαρτάται από τον τύπο και το μοριακό μέγεθος και των δύο συστατικών. Συμπληρωματικά, το ιξώδες μπορεί να ρυθμιστεί προσθέτοντας μια ελεγχόμενη ποσότητα νερού [134].

Η επιφανειακή τάση αναμένεται να ακολουθήσει παρόμοια πορεία με το ιξώδες, καθώς εξαρτάται αυστηρά από την ισχύ της διαμοριακής αλληλεπίδρασης που διέπει τον σχηματισμό του DES [141]. Η εντονότερη αλληλεπίδραση των δεσμών υδρογόνου αναλογεί στην διαμόρφωση συνεκτικών δυνάμεων, με αποτέλεσμα να επικρατούν στην επιφάνεια ισχυρότερες δυνάμεις, ώστε να αντιστέκονται σε εξωτερικές παραμέτρους [142]. Η ιοντική αγωγιμότητα είναι ακόμη μια χρήσιμη ιδιότητα, ιδίως στις περιπτώσεις όπου τα DESs χρησιμοποιούνται για ηλεκτροχημικές εφαρμογές. Πιο επεξηγηματικά, ποσοτικοποιεί πόσο εύκολα ένα υλικό άγει τη ροή ιόντων ή πόσο εύκολα το υλικό επιτρέπει τη ροή του ρεύματος. Οι Abbot et al., με βάση τη hole theory εξήγησαν πως ο ελεύθερος όγκος του DES μπορεί να αυξηθεί, μειώνοντας το μέγεθος των κατιόντων και αντικαθιστώντας τους δότες ηλεκτρονίων με φοριούχες ενώσεις. Έτσι, με την αύξηση του ελεύθερου όγκου, ελαττώνεται το ιξώδες ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται και η ιοντική αγωγιμότητα [146].

1.3.1.2 Κατηγορίες

Η πρώτη αναφορά για τους Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες γίνεται από τους Abbott et al. το 2003, με την ανάμειξη χλωριούχου χολίνης ChCl (HBA) και ουρίας (HBD). Αποδείχτηκε πως το σημείο πήξης του ευτηκτικού μείγματος είναι 12°C, το οποίο είναι πολύ χαμηλότερο από αυτά των επιμέρους συστατικών, (σημείο τήξεως χλωριούχου χολίνης = 302 °C και ουρίας = 133 °C), γεγονός που επιτρέπει στο μείγμα να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος [139].

Ο γενικός τύπος που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό των DES είναι ο εξής: Cat^+X^-zY , όπου ως Cat^+ θεωρείται οποιοδήποτε κατιόν αμμωνίου, φωσφορίου ή σουλφονίου και το X^- είναι μια βάση Lewis, γενικά ένα ανιόν αλογονιδίου. Τα πολύπλοκα ανιονικά είδη σχηματίζονται μεταξύ του X^- και ενός οξέος Y Lewis ή Brønsted (το z αναφέρεται στον αριθμό των μορίων Y που αλληλοεπιδρούν με το ανιόν) [132]. Οι κατηγοριοποιήσεις που έχουν προταθεί αφορούν κυρίως τη φύση και το είδος του δότη ηλεκτρονίων, με την καταγραφή τεσσάρων κύριων κατηγοριών:

1. Τύπου I DES: Αποτελείται από άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου και χλωριούχο μέταλλο. Μερικά παραδείγματα αποτελούν τα DES που σχηματίζονται από άλατα ιμιδαζολίου και διάφορα αλογονίδια μετάλλων όπως $ZnCl_2$, $FeCl_2$, $AgCl$, $CuCl_2$, $CdCl_2$, $LiCl$, $SnCl_2$ και $SnCl_4$. Τα μη ένυδρα αλογονίδια μετάλλων που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό DES τύπου I είναι πολύ λίγα και ως εκ τούτου, λιγότερα HBD διατίθενται για τον συνδυασμό αυτού του τύπου.
2. Τύπου II DES: Αυτός ο τύπος DES μπορεί να αποτελείται από άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου και ένυδρο χλωριούχο μέταλλο [147].
3. Τύπου III DES: Μπορεί να παρασκευαστεί χρησιμοποιώντας άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου ως HBA και HBD. Ο συγκεκριμένος τύπος έχει μελετηθεί ευρέως καθώς αποτελείται κυρίως από χλωριούχο χολίνη, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο HBA για το χαμηλό κόστος, τη μη τοξικότητα και τη βιοδιασπασιμότητά του. Οι HBD τύπου III είναι γενικά αλκοόλες, αμίδια, αμινοξέα, καρβοξυλικά οξέα και σάκχαρα [148]. Οι φυσικές ιδιότητες αυτού του τύπου DES εξαρτώνται από τη φύση του δότη δεσμού υδρογόνου, δίνοντας τη δυνατότητα προσαρμογής στην εκάστοτε εφαρμογή.
4. Τύπος IV DES: Αυτοί οι τύποι DES αποτελούνται από χλωριούχο μέταλλο (ιδιαίτερα χλωριούχο μέταλλο μεταπτώσεως) και HBD όπως αιθυλογλυκόλη, ουρία [149].

Τελευταία, έχει προταθεί και ένας επιπλέον τύπος DES, κατά τον οποίο ενώ παρουσιάζεται έντονη πτώση στα σημεία τήξεως, δεν υπάρχει ιοντική συνεισφορά. (Τύπου V DES) [150].

Πίνακας 1: Συνοπτικά οι κατηγορίες DES [131], [132], [150], [151]

Τύπος DES	Γενικός Τύπος χαρακτηρισμού	Όροι
I	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x$	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
II	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x \cdot y\text{H}_2\text{O}$	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe
III	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zRZ}$	Z = CONH ₂ , COOH, OH
IV	$\text{MCl}_x + \text{RZ} = \text{MCl}_{x-1}^+ \cdot \text{RZ} + \text{MCl}_{x+1}^-$	M=Al, Zn / Z = CONH ₂ , OH
V	Μη ιοντικά	HBD + HBA

Ωστόσο, διακρίνεται περαιτέρω κατηγοριοποίηση σχετικά με τις εφαρμογές αλλά και τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των DESs. NADES (Natural Deep Eutectic Solvent), είναι ο διαλύτης που αποτελείται από φυσικά συστατικά όπως οργανικά οξέα, σάκχαρα, αμινοξέα και ομάδες πρωτογενών μεταβολιτών. Τα NADES μπορούν να ομαδοποιηθούν σε: ιοντικά υγρά NADES (παρασκευασμένα από οξύ και βάση), ουδέτερα NADES (παρασκευασμένα μόνο από σάκχαρα ή σάκχαρα και πολυαλκοόλη), ουδέτερα NADES με οξέα (από ζάχαρη/ πολυαλκοόλη και οργανικά οξέα), ουδέτερα NADES με βάσεις (από ζάχαρη/πολυαλκοόλη και οργανικές βάσεις) και NADES με βάση αμινοξέα (που παράγονται από αμινοξέα και οργανικά οξέα/σάκχαρα) [152]. Τα NADES έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τα DES καθώς χαρακτηρίζονται για την χαμηλή ενέργεια σύνθεσης, τη μη τοξικότητα, το γεγονός ότι αποσυντίθεται εύκολα χωρίς να παράγουν τοξικά προϊόντα στο περιβάλλον, και την καλή απόδοση εκχύλισης, που ξεπερνά αυτή των συμβατικών πτητικών οργανικών διαλυτών [153]. Τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών καθώς λόγω της φυσικής προέλευσης των συστατικών είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμα. Επιπροσθέτως, παρουσιάζουν υψηλή σταθερότητα και διαλυτότητα, γεγονός που τους καθιστά πιο αποτελεσματικούς διαλύτες από τους οργανικούς. Σήμερα, το φάσμα των εφαρμογών είναι πολύ ευρύ και έρευνες έχουν δείξει πως φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, σάκχαρα και πεπτίδια έχουν εξαχθεί με επιτυχία

χρησιμοποιώντας μείγματα NADES [154]. Ωστόσο, η κύρια αδυναμία των NADES είναι

το ιξώδες και οι διακυμάνσεις στους τύπους των συστατικών που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των μειγμάτων τους [155].

Μια ακόμη κατηγορία αποτελούν τα THEDES (Therapeutic Deep Eutectic Solvents), όπου ένα από τα μέρη του μείγματος είναι ενεργό φαρμακευτικό συστατικό [151]. Τα THEDES φαίνονται να είναι πολλά υποσχόμενοι διαλύτες για την βελτίωση της διαλυτότητας των φαρμάκων, μια σημαντική παράμετρο όσον αφορά την απορρόφηση και τη διαπερατότητα. Εξαιτίας των χαρακτηριστικών τους, βρίσκουν πολλές εφαρμογές στον βιοϊατρικό και φαρμακευτικό τομέα, καθώς η εντερική απορρόφηση, η ελεγχόμενη απελευθέρωση και η αποτελεσματική μεταφορά μέσω του δέρματος έχει βελτιωθεί σημαντικά [133]. Σε μια μεγάλη ποικιλία ερευνών, χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έρευνα από τους Stott et al, οι οποίοι συνέθεσαν συστήματα THEDES με ιβουπροφαίνη (IBF) και επτά τερπένια για την αξιολόγηση της διείσδυσης της ιβουπροφαίνης μέσω της επιδερμικής μεμβράνης. Βρέθηκε πως ευτηκτικό μείγμα IBF:μενθόλη, οδήγησε σε τρεις φορές καλύτερη διείσδυση στην μεμβράνη συγκριτικά με την αντίστοιχη IBF σε μορφή σκόνης [156], [157].

1.3.1.3 Εφαρμογές

Όπως προαναφέρθηκε οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούν μια φιλική προς το περιβάλλον και μη τοξική προσέγγιση σε διάφορους κλάδους, συμπεριλαμβανομένων, της φαρμακευτικής, της επιστήμης τροφίμων, της κατάλυσης, της εκχύλισης αλλά και των ηλεκτροχημικών διεργασιών. Είναι γεγονός ότι διαλύτες χρησιμοποιούνται εκτενώς στη σύνθεση, τον διαχωρισμό ουσιών και την εκχύλιση [158]. Από την πλευρά της μεταφοράς φαρμάκων (drug delivery systems) είναι γνωστό πως τα εγκεκριμένα φάρμακα ή φάρμακα υπό ανάπτυξη είναι ελάχιστα υδατοδιαλυτά. Έρευνες έχουν δείξει πως THEDES χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση συστημάτων χορήγησης φαρμάκων και προτιμώνται για την μη τοξικότητα, την ευκολία σύνθεσης αλλά και την αύξηση της διαπερατότητας των φαρμάκων για διαδερμική χορήγηση [159].

Αξίζει να σημειωθεί ιδιαίτερα, η χρήση του DES και ιδίως NADES, στην εκχύλιση φυσικών συστατικών. Η δυνατότητα που προσφέρουν όσον αφορά την

τροποποίηση των συστατικών, επιτρέπει την ανάπτυξη καινοτόμων τεχνικών εκχύλισης. Τα NADES έχουν εξαιρετική διαλυτική ικανότητα και είναι συνήθως μη πτητικά. Οι Dai et al, έδειξαν πως τα συγκεκριμένα μπορούν να ενισχύουν την σταθερότητα των εκχυλισμένων φαινολικών ενώσεων. Μολονότι, υπερισχύει το χαρακτηριστικό της μη τοξικότητας των DES, αυτή η υπόθεση μπορεί να αληθεύει μόνο στην περίπτωση των NADES, τα οποία αποτελούνται από φυσικά συστατικά, κάνοντας τα εγγενώς μη τοξικά [160]. Αυτή η ιδιότητα σε συνδυασμό με τη βιοσυμβατότητα με βιοϋλικά, το NADES αποτελεί κατάλληλο διαλύτη για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων ακόμα και πρωτεϊνών, από διάφορους οργανισμούς, με καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τους συμβατικούς διαλύτες. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία γίνεται χρήση NADES ως μέσο για την εκχύλιση χαμομηλιού.

Εστιάζοντας στην παραγωγή χημικών με βάση φυσικές ουσίες, κάποιοι συνδυασμοί DES έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση βιοντίζελ. Ουσιαστικά το βιοντίζελ παρασκευάζεται από ζωικά λίπη, φυτικά έλαια ή βιομάζα όπως άλγη, μύκητες. Οι συμβατικές διαδικασίες για παρασκευή βιοντίζελ παρουσιάζουν περιορισμούς όπως παραγωγή αποβλήτων, κατανάλωση ενέργειας και σαπωνοποίηση λιπαρών οξέων, μεταξύ άλλων. Έτσι, η σύνθεση βιοντίζελ μέσω DES, έχει αποκαλύψει ότι παράγονται λιγότερα απόβλητα ενώ δεν απαιτούνται τόσο έντονες συνθήκες [161].

Έχει αποδειχθεί πως τα μέταλλα και τα μεταλλικά άλατα παρουσιάζουν υψηλή διαλυτότητα και ηλεκτρική αγωγιμότητα στα μείγματα DES. Ως εκ τούτου, θεωρείται καλή εναλλακτική για την εξαγωγή ή/και ανακύκλωση μετάλλων σε διάλυμα, τη διύλιση μεταλλεύματος και την ηλεκτροαπόθεση. Οι ξεχωριστές ιδιότητες των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών ενσωματώνουν διαδικασίες ανάκτησης, καθαρισμού και τήξης κράματος, για την παραγωγή υλικών τόσο από ακατέργαστες αλλά και ανακυκλωμένες πηγές [136].

Η χαμηλή πίεση ατμών και η υψηλή θερμική σταθερότητα, έχουν αποδειχτεί τα κατάλληλα χαρακτηριστικά για την δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα από βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες. Ενώ ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμα γνωστός η διαλυτότητα του CO₂ είναι λογικό να επηρεαστεί εξίσου από τη σύνθεση και τη μοριακή αναλογία των συστατικών, εκτός από τη θερμοκρασία και τη πίεση [162].

Εξίσου μεγάλης σημασίας είναι και η βιοκατάλυση, η οποία αποτελεί κλάδο της οργανικής χημείας που χρησιμοποιεί ένζυμα ή παρόμοια μικρόβια ως καταλύτες. Τα κύρια χαρακτηριστικά των DESs ως υγρά με την ικανότητα να υποστηρίζουν μεγάλη

ποικιλία υποστρωμάτων, ενζύμων και άλλων βιοδραστικών ενώσεων, τα καθιστούν δυνητικούς υποψηφίους για βιοκαταλύτες [136].

Μέσα στο πλήθος εφαρμογών που προαναφέρθηκαν, κομβικό ρόλο στη παρούσα διπλωματική εργασία, λαμβάνει ο βαθέως ευτηκτικός διαλύτης (DES) ως παράγοντας διασταύρωσης. Εν γένει, έχει παρατηρηθεί πως οι διαμοριακοί δεσμοί που μπορούν να δημιουργηθούν εξαιτίας του DES, το καθιστούν έναν μη τοξικό παράγοντα διασταύρωσης [163]. Αν και πάντα δίνεται προσοχή στα συστατικά και το ιξώδες του εκάστοτε διαλύτη, καθώς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη διασταύρωση του συστήματος, η λύση του DES δίνει το πλεονέκτημα, έναντι συμβατικών παραγόντων διασταύρωσης, αφού έρευνες δείχνουν πως οι ομοιοπολικά συνδεδεμένες ενώσεις δε μεταναστεύουν ούτε εξατμίζονται από τη πολυμερική μήτρα [164].

1.3.2 Υδρογέλες με νανοσωματίδια αργύρου και Φυσικό Βαθέως Ευτηκτικό Διαλύτη

Η ανεξέλεγκτη χρήση των αντιβιοτικών, έχει θέσει στην ερευνητική κοινότητα τα θεμέλια για την ανάπτυξη νέων καινοτόμων υλικών με αντίστοιχη δράση. Οι πράσινες μέθοδοι σύνθεσης, αυξάνονται ολοένα και περισσότερο εξαιτίας της βιοσυμβατότητας, χαμηλής κυτταροτοξικότητας και εν γένει της ασφάλειας που προσφέρουν. Στα πλαίσια αυτά, έρευνες έχουν γίνει για την σύνθεση υδρογελών από αλγινικό με ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου [165]–[167].

Όπως προαναφέρθηκε, τα νανοσωματίδια αργύρου ξεχωρίζουν για την αντιμικροβιακή τους δράση, ενώ παράλληλα οι υδρογέλες είναι το πλέον κατάλληλο υλικό για την επούλωση πληγών. Συμπερασματικά, ο συνδυασμός αυτών αποτελεί τον καλύτερο συνδυασμό για τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Ο χαρακτηρισμός αυτών των νανοςύνθετων υδρογελών είναι πολυπαραγοντικός. Αποτελείται από την ανάλυση του μεγέθους, του σχήματος και της τυχούσας συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων, και ακολουθείται από τους ρεολογικούς και μηχανικούς χαρακτηρισμούς της υδρογέλης. Εφόσον, συγκαταλέγονται στα βιοϋλικά, η ασφάλεια προς τον ανθρώπινο οργανισμό είναι υψίστης σημασίας. Δίνεται εξαιρετική προσοχή στο μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς η πιθανή κυτταροτοξικότητα που μπορεί να εμφανιστεί είναι ακόμα ένα θέμα προς εξέταση. Εν κατακλείδι, η χρήση βαθέων ευτηκτικών διαλυτών για τη συγκεκριμένη εφαρμογή, οδηγεί σε ένα ολοκληρωτικά πράσινο καινοτόμο υλικό. Με τη σειρά τους, βοηθούν στην εκχύλιση του χαμομηλιού, προσφέροντας τον αναγωγικό και σταθεροποιητικό παράγοντα που απαιτεί το σύστημα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στην *in situ* σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου σε υδρογέλες αλγινικού με τη χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NADES), ως εκχυλιστικό μέσο. Αναλυτικότερα, επιλέγεται NADES αποτελούμενο από γλυκόζη, γαλακτικό οξύ και νερό για την εκχύλιση του χαμομηλιού. Το παραγόμενο εκχύλισμα (NADES με τα συστατικά χαμομηλιού) χρησιμοποιείται για την αναγωγή της πρόδρομης ένωσης του νιτρικού αργύρου, καθώς επίσης και σαν παράγοντας σταθεροποίησης των νανοσωματιδίων που δημιουργούνται. Ένας επιπλέον αναγωγικός παράγοντας στο συγκεκριμένο σύστημα, αποτελεί το αλγινικό το οποίο είναι η βάση της υδρογέλης, δηλαδή το πολυμερές που απαιτείται για την δημιουργία ενός τρισδιάστατου πλέγματος. Όλα τα συστατικά λειτουργούν συνεργιστικά υπό την παρουσία ορατού φωτός. Ο συνδυασμός των παραπάνω οδηγεί στη σύνθεση υδρογελών με αντιμικροβιακό χαρακτήρα εξαιτίας του αργύρου, οι οποίες μπορούν μετέπειτα να έχουν δράση που αφορά την επούλωση πληγών.

Μέσω του λογισμικού Design Expert, πραγματοποιήθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός τύπου Box-Behnken, που οδηγεί στην βελτιστοποίηση των υδρογελών. Το επιλεγμένο μοντέλο χαρακτηρίζεται από τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές όπως τη συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου (σε mM), το εκχύλισμα χαμομηλιού (σε % v/v), καθώς και τον χρόνο ανάδευσης (σε h). Αντίστοιχα, οι αποκρίσεις που επιλέγουμε να εξετάσουμε είναι η ικανότητα διόγκωσης και συγκράτησης νερού της υδρογέλης. Επίσης διεξήχθησαν αναλύσεις που σχετίζονται με την αξιολόγηση των νανοσωματιδίων αργύρου (Nanoparticle Tracking Analysis, UV-Vis spectroscopy, Dynamic Light Scattering), καθώς και του εκχυλίσματος χαμομηλιού με το NADES (Fourier-transform infrared spectroscopy, Total Phenolic Compound – Total Flavonoid Compound TPC- TFC).

2.2 Αντιδραστήρια

Παρακάτω παρατίθενται όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Αυτά αφορούν, τη σύνθεση των υδρογελών, του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη, των νανοσωματιδίων αργύρου καθώς και του εκχυλίσματος χαμομηλιού.

Πίνακας 2: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Χημικός Τύπος</i>	<i>Προμηθευτής</i>
Αλγινικό Νάτριο	NaC ₆ H ₇ O ₆	Glentham life sciences
Γαλακτικό Οξύ (>80%)	C ₃ H ₆ O ₃	Labkem
Γλυκόζη	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma Aldrich
Όξινο Φωσφορικό Κάλιο	K ₂ HPO ₄	Penta
Δισόξινο Φωσφορικό Κάλιο	KH ₂ PO ₄	Penta
Νιτρικός Άργυρος	AgNO ₃	Goldsmith
Άνθη χαμομηλιού	-	-
Νερό (υπερκάθαρο)	H ₂ O	-

2.3 Όργανα και συσκευές

Όσα όργανα χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή όλων των πειραμάτων παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3: Όργανα και συσκευές.

<i>Όργανο – Συσκευή</i>	<i>Κατασκευαστής</i>	<i>Μοντέλο</i>
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210g)	KERN	ADJ 200-4
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Radleys	RR98072
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Lbx instruments	VO5 series
Αντλία κενού	Edwards	RV- 5
Λουτρό υπερήχων	witeg	WUC – AO2H
Probe υπερήχων	Sonics and Materials Inc	Vibra cell

2.4 Μέθοδοι

2.4.1 Σύνθεση αλγινικού

Ξεκινώντας με τη βάση της υδρογέλης, γίνεται χρήση αλγινικού όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 1.2.7. Έτσι, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα αλγινικού περιεκτικότητας 3% w/v, δηλαδή σε σφαιρική φιάλη των 100ml αναμειγνύονται 1.5 gr

αλγινικού νατρίου με 50ml υπερκάρθρου νερού. Η διάλυση του άλατος προκύπτει από την συνεχή ανάδευση του μαγνητικού αναδευτήρα, σε θερμοκρασία 70° C. Λόγω της μεγάλης αύξησης του ιζώδους, απαιτείται και μηχανική ανάδευση με τη χρήση ράβδου.



Εικόνα 7: Φιαλίδιο με 10ml αλγινικού. Τοποθετώντας το ανάποδα διαπιστώνουμε την ρευστότητά του.

2.4.2 Σύνθεση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη

Πρωτεύοντα ρόλο στα συγκεκριμένα πειράματα καταλαμβάνει ο φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης (NADES). Για την πλέον κατάλληλη επιλογή ως παράγοντα διασταύρωσης, προηγήθηκαν δοκιμές τριών διαφορετικών NADES, οι οποίες αφορούν τους συνδυασμούς φρουκτόζη – γλυκερόλη – νερό, βεταΐνη – γλυκόζη – νερό σε αναλογία 1:5:5 και γλυκόζη – γαλακτικό οξύ – νερό σε αναλογία 1:5:6.2. Διαπιστώθηκε πως η καλύτερη διασταύρωση με το αλγινικό γίνεται με το NADES αποτελούμενο από γλυκόζη – γαλακτικό οξύ και νερό (Glu:La:H₂O). Για την παρασκευή του γίνεται απλή ανάμειξη των συστατικών σε σφαιρική φιάλη των 100ml. Αναλυτικότερα, λαμβάνεται υπόψιν το γεγονός πως το ποσοστό του νερού οφείλεται στο εμπορικό διάλυμα γαλακτικού οξέος (80% DL Lactic acid – 20% H₂O), και έτσι αναμειγνύονται 4 gr γλυκόζης σε 12.49 gr γαλακτικού οξέος, με μαγνητικό αναδευτήρα στους 70 °C, έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές. Ο συγκεκριμένος διαλύτης αποκτά διττό ρόλο καθώς χρησιμοποιείται εν συνεχεία για την εκχύλιση του χαμομηλιού.



Εικόνα 8: Σύνθεση NADES. Δίνεται προσοχή στην διατήρηση της θερμοκρασίας στους 70 °C.



Εικόνα 9: Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης.

2.4.3 Σύνθεση εκχυλίσματος χαμομηλιού

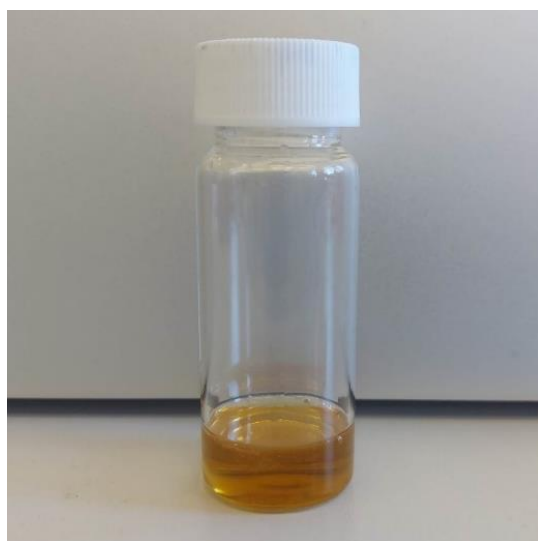
Για την εκχύλιση του χαμομηλιού, δύο συστατικά απαιτούνται: το χαμομήλι και ο φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης αποτελούμενος από γλυκόζη, γαλακτικό οξύ και νερό. Έτσι, προστίθενται 0.3 gr χαμομηλιού σε 14.93 gr NADES εκ των οποίων το 2% είναι υπερκάθαρο H₂O. Έπειτα, το δείγμα μεταφέρεται στο probe υπερήχων, με το φιαλίδιο να εισέρχεται σε παγόλουτρο ούτως ώστε να αποτραπεί η υπερθέρμανσή του, και η θέση του στη συσκευή είναι τέτοια ώστε να μην έρχεται σε επαφή το άκρο με τα τοιχώματα. Η ισχύς του οργάνου ρυθμίζεται στο 40% της μέγιστης ισχύος του (158Watt) για 20 min. Ολοκληρώνοντας, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό, όπου και λαμβάνεται το τελικό προϊόν εκχυλίσματος χαμομηλιού με τα συστατικά του NADES. Σημειώνεται πως η αποθήκευση του δείγματος γίνεται σε σκιερό μέρος, για να μην επηρεαστεί από το φως.



Εικόνα 10: NaDES με την προσθήκη νερού.



Εικόνα 11: NADES με άνθη χαμομηλιού.



Εικόνα 12: Εκχύλισμα χαμομηλιού μέσω NADES.

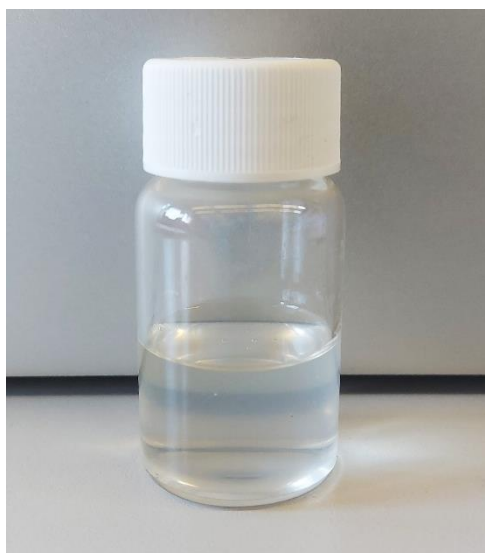


Εικόνα 13: Διήθηση υπό κενό.

2.4.4 Σύνθεση υδρογελών με ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου

Όσον αφορά την πρόδρομη ένωση του μετάλλου, παρασκευάζεται ένα stock υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου (AgNO_3) συγκέντρωσης 10mM, το οποίο επίσης φυλάσσεται σε σκιερό μέρος, καθόσον ο άργυρος είναι φωτοευαίσθητος. Η σύνθεση του πραγματοποιείται με την ομογενοποίηση μέσω vortex 16.98 mg AgNO_3 με 10 ml υπερκάθαρου νερού.

Έτσι, όλα τα συστατικά αναμειγνύονται κάθε φορά σε διαφορετικές αναλογίες προερχόμενες από τον πειραματικό σχεδιασμό που θα αναλυθεί παρακάτω. Πρώτα, προστίθεται ποσότητα υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου σε 10ml αλγινικού και γίνεται μηχανική ανάδευση. Έπειτα από 5 min προστίθενται ποσότητα εκχυλίσματος χαμομηλιού που αποτελείται από το NADES, ώστε να επέλθει ταυτόχρονα η διασταύρωση αλλά και η αναγωγή του αργύρου. Από τα πρώτα min ανάδευσης παρατηρείται η αλλαγή χρώματος, από λευκό σε γκρι και έπειτα μωβ, γεγονός χαρακτηριστικό για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων. Ο ρυθμός ανάδευσης ρυθμίζεται στα 200 rpm ενώ ο χρόνος ανάδευσης αλλάζει αναλόγως το εκάστοτε πείραμα.



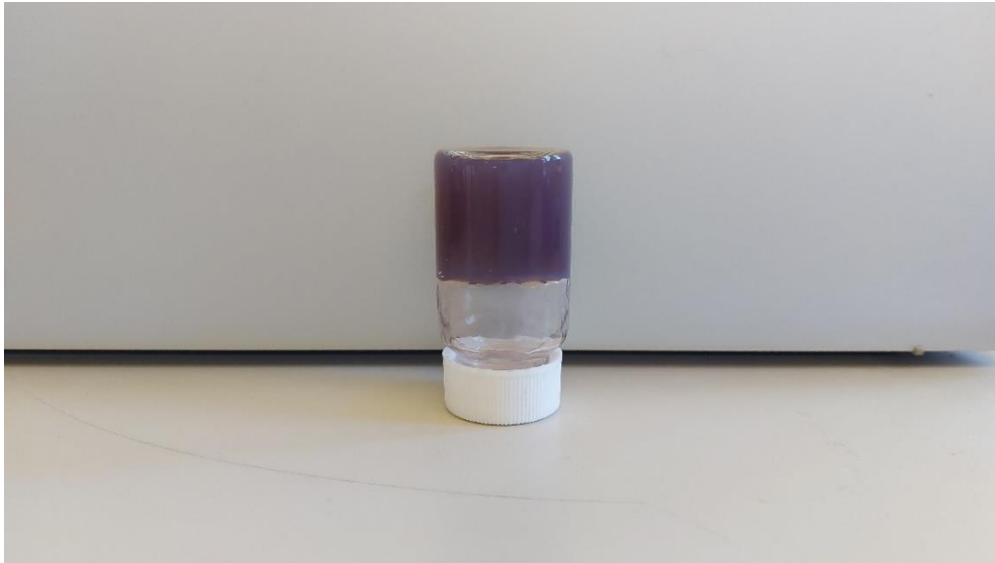
Εικόνα 14: 10ml Αλγινικού νατρίου.



Εικόνα 15: Αλγινικό νάτριο με τη προσθήκη υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου.



Εικόνα 16: Με την προσθήκη του εκχυλίσματος χαμομηλιού που περιέχει NADES, ξεκινά η διασταύρωση γεγονός που φαίνεται από την σταθεροποίηση της γέλης.



Εικόνα 17: Τελικό δείγμα υδρογέλης με ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου. Είναι φανερή η διασταύρωση που λαμβάνει χώρα εξαιτίας του NADES με το εκχύλισμα, καθώς επίσης και η σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου λόγω του μωβ χρωματισμού.

Οι παραγόμενες υδρογέλες φυλάσσονται στο ψυγείο (4 °C), σε συνθήκες αζώτου μέχρις ότου να μεταφερθούν για λυοφιλίωση. Κατά αυτήν την διαδικασία, αφαιρείται όλη η υγρασία του συστήματος, λαμβάνοντας έτσι τις υδρογέλες σε ξηρή μορφή για περαιτέρω ανάλυση.

2.5 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την βελτιστοποίηση της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιείται το λογισμικό Design Expert, όπου μέσω μαθηματικών μοντέλων δίνεται μια συνολική στατιστική μελέτη των πειραματικών αποκρίσεων. Ο πειραματικός σχεδιασμός που προτιμάται στα συγκεκριμένα πειράματα είναι τύπου Box-Behnken τριών επιπέδων. Αναλυτικότερα, επιλέγονται οι τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές να είναι η συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου (mM), η περιεκτικότητα σε εκχύλισμα χαμομηλιού (%v/v) και ο χρόνος ανάδευσης (h) με τις εξαρτημένες μεταβλητές δηλαδή τις αποκρίσεις, να αποτελούν την ικανότητα διόγκωσης και συγκράτησης της υδρογέλης.

2.5.1 Προκαταρκτικά πειράματα

Στόχος των προκαταρκτικών πειραμάτων είναι ο προσδιορισμός των ορίων εντός των οποίων θα μελετηθούν οι αντίστοιχες μεταβολές στις αποκρίσεις. Για αυτόν τον

λόγο, προηγήθηκε η διαδικασία κατά την οποία δοκιμάστηκαν τρία διαφορετικά DESs ούτως ώστε να βρεθεί ο πλέον κατάλληλος παράγοντας διασταύρωσης με το αλγινικό όπως αναφέρεται στην ενότητα 2.4.2 [168]. Η επιλογή των συγκεκριμένων έγινε καθώς έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί και στην βελτίωση εκχύλισης του χαμομηλιού. Αφού, καταλήξαμε στο NADES αποτελούμενο από γλυκόζη, γαλακτικό οξύ και νερό (1:5:6.2), στη πορεία προστέθηκαν 100μl αυτού σε 10ml αλγινικού, τα οποία δεν οδήγησαν όμως στην απαιτούμενη διασταύρωση. Έτσι, καταλήγουμε σαν κατώτατο όριο να είναι τα 400μl NADES και το ανώτατο επιλέγεται να είναι τα 600μl.

Πίνακας 4: Οι τρεις απαραίτητες ανεξάρτητες μεταβλητές, με τα καθορισμένα όρια που προκύπτουν από τα προκαταρκτικά πειράματα.

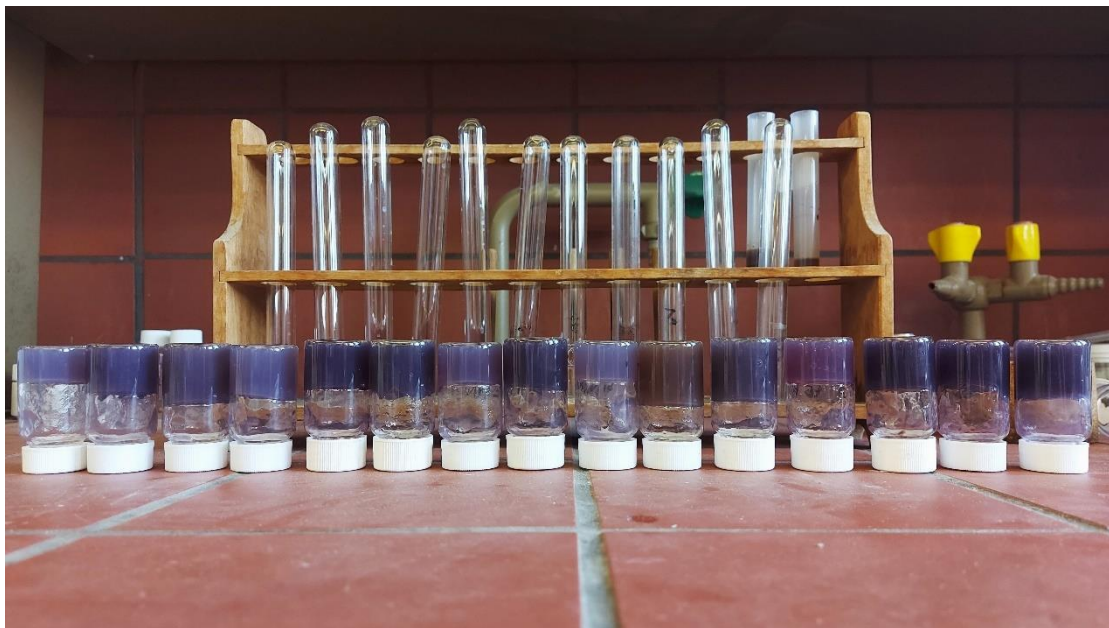
<i>Παράγοντες (factors)</i>	Κατώτατο όριο (-1)	Ενδιάμεσο σημείο (0)	Ανώτατο όριο (1)
<i>Ανεξάρτητες Μεταβλητές</i>			
<i>A: Συγκέντρωση νιτρικού αργύρου [AgNO₃] (mM)</i>	1	3	5
<i>B: Περιεκτικότητα σε εκχύλισμα χαμομηλιού (%v/v)</i>	4	5	6
<i>C: Χρόνος ανάδευσης (h)</i>	2	4	6

Έχοντας ορίσει τα απαιτούμενα όρια και τους παράγοντες προς εξέταση δημιουργείται μια σειρά από 15 πειράματα όπως παρατίθενται παρακάτω.

Πίνακας 5: Πειραματικός σχεδιασμός

		Factor 1	Factor 2	Factor 3
Std	Run	A: [AgNO ₃]	B: Chamomile extract	C: Time
		mM	%v/v	h
15	1	3	5	4
5	2	1	5	2
13	3	3	5	4
10	4	3	6	2

6	5	5	5	2
7	6	1	5	6
12	7	3	6	6
11	8	3	4	6
1	9	1	4	4
8	10	5	5	6
14	11	3	5	4
9	12	3	4	2
2	13	5	4	4
4	14	5	6	4
3	15	1	6	4



Εικόνα 18: Οι 15 διαφορετικές υδρογέλες που παρασκευάστηκαν βάσει του πειραματικού σχεδιασμού Box Behnken. Η διαφορά του χρώματος που παρατηρείται οφείλεται στις εκάστοτε διαφορετικές ποσότητες συστατικών, του κάθε πειράματος.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί, πως με το πέρας των 15 πειραμάτων για την σύνθεση των παραπάνω υδρογελών, προσδιορίστηκαν οι αποκρίσεις. Έτσι, μόλις ολοκληρώθηκαν τα πειράματα για την διόγκωση και συγκράτηση των υδρογελών, τα αποτελέσματα καταγράφηκαν στο πρόγραμμα, μέσα από το οποίο έγινε η

βελτιστοποίηση. Με τον όρο βελτιστοποίηση, γίνεται αναφορά στις τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών που απαιτούνται ούτως ώστε να προκύψουν οι βέλτιστες αποκρίσεις. Η υδρογέλη με αυτές τις συνθήκες εξετάστηκε με περαιτέρω αναλύσεις που θα εξηγηθούν παρακάτω.

2.6 Χαρακτηρισμός υδρογελών

Για τον ακριβέστερο χαρακτηρισμό των υδρογελών, παρασκευάζεται παράλληλα με τις υδρογέλες του πειραματικού σχεδιασμού, και μια συμβατική, η οποία χρησιμοποιεί ως παράγοντα διασταύρωσης διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2), και δεν περιέχει νανοσωματίδια αργύρου. Αναλυτικότερα, προστίθεται στάγδην, υδατικό διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου περιεκτικότητας 1% w/v, σε 10ml αλγινικού. Είναι γνωστό πως το CaCl_2 χρησιμοποιείται για την διασταύρωση των υδρογελών, κάτι που επιβεβαιώνεται στο συγκεκριμένο πείραμα, καθώς με το πέρας του ξεπλύματος για την απομάκρυνση της περίσσειας, είναι φανερός ο σχηματισμός της υδρογέλης [169].

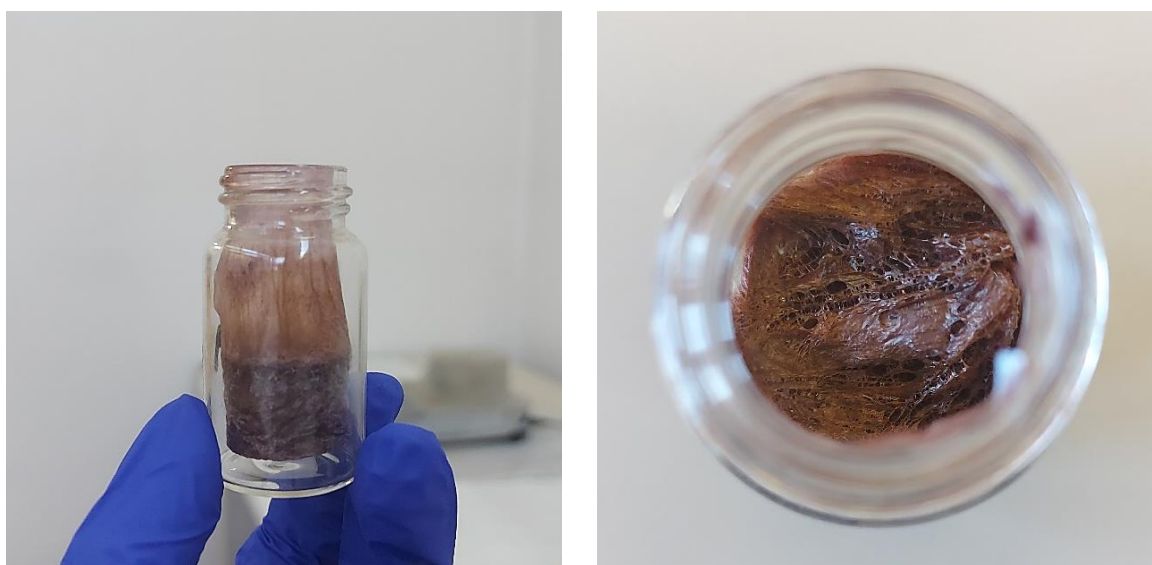


Εικόνα 19: Σχηματισμός γέλης μετά την προσθήκη υδατικού διαλύματος CaCl_2 περιεκτικότητας 1% w/v.

2.6.1 Ικανότητα διόγκωσης – *Swelling Ratio*

Από τα κυριότερα χαρακτηριστικά μιας υδρογέλης είναι η ικανότητα της να απορροφά νερό, καταλήγοντας έτσι σε διόγκωση. Κατά αυτή τη διαδικασία, μια ξηραμένη γέλη εισέρχεται σε υδατικό διάλυμα και μετράται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, η αύξηση της μάζας που παρατηρείται. Πιο αναλυτικά, εφόσον έχουν ληφθεί οι υδρογέλες από το στάδιο της λυοφιλίωσης, επιλέγεται ένα τμήμα αυτών και ζυγίζεται

το ξηρό βάρος. Έπειτα, εισάγεται σε διάλυμα όξινου και δισόξινου φωσφορικού καλίου ($K_2HPO_4 - KH_2PO_4$), με ρυθμιζόμενο pH ίσο με 5.5, μια τιμή που επιλέγεται καθώς προσομοιάζει τις συνθήκες της επιδερμίδας. Το διάλυμα αυτό καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος παραμένει σε επωαστήρα, στους 37 °C και σε 80 rpm.



Εικόνες 20 - 21: Δείγματα προερχόμενα από τη λυοφιλίωση, όπου είναι φανερή η αφαίρεση της υγρασίας. Από αυτά επιλέγεται ένα μικρό τμήμα κυμαινόμενο από 0.1 – 0.3 gr τα οποία εμβαπτίζονται στο υδατικό διάλυμα $K_2HPO_4 - KH_2PO_4$.

Η ζύγιση των εμβαπτισμένων τμημάτων γίνεται ανά 10 min, με πρώτο βήμα την απομάκρυνση του διαλύματος κάθε φορά μέσω διηθητικού χαρτιού. Η πειραματική διαδικασία συνεχίζεται έως ότου επέλθει η ολοκληρωτική αποσύνθεση της υδρογέλης.



Εικόνα 22: Τμήμα ξηρής γέλης.



Εικόνα 23: Το ίδιο τμήμα εμβαπτισμένο στο υδατικό διάλυμα $K_2HPO_4-KH_2PO_4$. Φανερή είναι και η διόγκωση της υδρογέλης.

Με το πέρας της καταγραφής των δεδομένων, η ικανότητα διόγκωσης (swelling ratio = SR) υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$SR = \left(\frac{Wt - Wd}{Wd} \right) \times 100\% \quad (1)$$

όπου το Wt αντιπροσωπεύει το βάρος της διογκωμένης υδρογέλης μετά το χρόνο t και το Wd είναι το βάρος της αποξηραμένης υδρογέλης στην έναρξη του πειράματος, αντίστοιχα [170]. Μετά την επίτευξη διόγκωσης ισορροπίας (swelling equilibrium), δηλαδή το μέγιστο ποσοστό διόγκωσης, κάθε δείγμα συνέχισε να ερευνάται για τα πειράματα συγκράτησης νερού.

2.6.2 Ικανότητα συγκράτησης - Water Retention Ratio

Η ικανότητα συγκράτησης της υδρογέλης, ακολουθεί την παραπάνω ιδιότητα της διόγκωσης. Κάθε υδρογέλη μόλις φτάσει το μέγιστο δυνατό ποσοστό διόγκωσης, ξεκινά να αποδιογκώνεται με έναν ρυθμό που εξαρτάται κάθε φορά από τα συστατικά που επηρεάζουν το τρισδιάστατο πλέγμα. Έτσι, μετράται ο ρυθμός συγκράτησης του νερού ή αλλιώς water retention ratio (WRR). Στη παρούσα εργασία, οι μετρήσεις για την συγκράτηση νερού διεξήχθησαν ανά 10 min, με την ίδια διαδικασία που αναλύθηκε προηγουμένως (Ενότητα 2.6.1).

Ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιείται για την εύρεση των ποσοστών είναι:

$$WRR = \left(\frac{W_s - W_d}{SR} \right) \times 100\% \quad (2)$$

όπου SR είναι το σημείο ισορροπίας το οποίο βρίσκεται από το βάρος της διογκωμένης γέλης εκείνη τη στιγμή μείον το αρχικό ξηρό βάρος. Ενώ W_s και W_d είναι τα βάρη της υδρογέλης μετά το χρόνο t και το βάρος της αποξηραμένης υδρογέλης, αντίστοιχα [170].

2.6.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός – Dynamic Light Scattering (DLS)

Η συγκεκριμένη ανάλυση αφορά την εύρεση του ζ-δυναμικού μέσω ηλεκτροφόρησης, του δείκτη πολυδιασποράς και ενός μέσου μεγέθους των νανοσωματιδίων που παρήχθησαν μέσα στην υδρογέλη, αναλύοντας την τυχαία θερμική κίνηση ή αλλιώς κίνηση Brown. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της κίνησης Brown, που εκμεταλλεύεται η μέθοδος DLS, είναι ότι τα μικρά σωματίδια κινούνται γρηγορότερα συγκριτικά με τα μεγαλύτερα σωματίδια. Η σχέση μεταξύ του μεγέθους του σωματιδίου και της ταχύτητάς του, ορίζεται από την εξίσωση Stokes – Einstein. Αναλυτικότερα, μια δέσμη λέιζερ διαπερνά το δείγμα και το όργανο μετρά τις διακυμάνσεις της έντασης του φωτός από τις συγκρούσεις των σωματιδίων σε συνάρτηση με το χρόνο. Όσο τα σωματίδια κινούνται το ένα γύρω από το άλλο, η ενισχυτική και αναιρετική συμβολή των φάσεων του σκεδαζόμενου φωτός λαμβάνουν χώρα, δηλαδή οι περιοχές αυτές θα αυξάνονται και θα μειώνονται σε ένταση [171]. Το όργανο Zetasizer υπολογίζει τον ρυθμό της έντασης της διακύμανσης αυτής και την χρησιμοποιεί ως δεδομένο στον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων.

Τα αποτελέσματα από μια μέτρηση DLS, δίνουν ένα διάγραμμα συσχέτισης, στο οποίο υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με τη διάχυση των σωματιδίων εντός του μετρούμενου δείγματος. Έτσι μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής διάχυσης D καθώς και η υδροδυναμική ακτίνα με τη βοήθεια της σχέσης Stokes - Einstein. Στη συγκεκριμένη μέθοδο αναλύεται η συνάρτηση συσχέτισης του χρόνου σκέδασης με το μέγεθος και την κατανομή των σωματιδίων, με σκοπό τον προσδιορισμό της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου και του δείκτη πολυδιασποράς PDI (polydispersity index). Κάθε μέτρηση προέρχεται από τρεις επαναλήψεις όπου υπολογίζεται ο μέσος όρος τους, για την επίτευξη της επαναληψιμότητας. Αξίζει να σημειωθεί πως η μεταβολή των μετρήσεων αυτών με το χρόνο, δείχνει τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων αργύρου [171].

Για αυτή την ανάλυση, αφήνονται οι ξηραμένες υδρογέλες για μια εβδομάδα σε 10ml υπερκάθαρου νερού, ούτως ώστε να ξεκινήσει η απελευθέρωση των νανοσωματιδίων από το πλέγμα. Έπειτα, λαμβάνονται 30 μL από κάθε υδρογέλη τα οποία αραιώνονται σε 20ml υπερκάθαρου νερού και μεταφέρονται στο λουτρό υπερήχων για περαιτέρω άνοιγμα των πολυμερικών αλυσίδων διευκολύνοντας έτσι την εύρεση των νανοσωματιδίων. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται σύριγγα για τον καλύτερο έλεγχο τροφοδοσίας του δείγματος στην κυψελίδα τύπου U (DTS 1070), και δίνεται προσοχή στην αποφυγή των φυσαλίδων καθώς μπορούν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα. Χρησιμοποιείται το όργανο Zetasizer Nano ZS 173 της εταιρείας Malvern, το οποίο συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου είναι εγκατεστημένο το αντίστοιχο λογισμικό. Αφού εισαχθεί η κυψελίδα στο όργανο επιλέγεται το κατάλληλο αρχείο SOP, από το οποίο δίνονται οι μετρήσεις για τον δείκτη πολυδιασποράς, το ζ-δυναμικό και το μέγεθος των νανοσωματιδίων.

2.6.4 Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis spectroscopy)

Η ανάλυση UV-Vis αφορά τον προσδιορισμό του φάσματος που θα δώσουν τα νανοσωματίδια αργύρου, για την πλέον βέλτιστη υδρογέλη. Αυτό γίνεται με τη μέτρηση της έντασης του φωτός που διέρχεται από ένα δείγμα σε σχέση με την ένταση του φωτός μέσα από ένα δείγμα αναφοράς ή ένα τυφλό δείγμα.

Βάσει βιβλιογραφίας είναι γνωστό πως αναμένεται μια απορρόφηση εύρους 400-500 nm. Στην ανάλυση UV-Vis, ακολουθούνται τα ίδια βήματα όπου οι ξηραμένες υδρογέλες παραμένουν για μια εβδομάδα μέσα σε 10ml υπερκάθαρου νερού. Σκοπός είναι ξανά η απελευθέρωση των νανοσωματιδίων αργύρου.

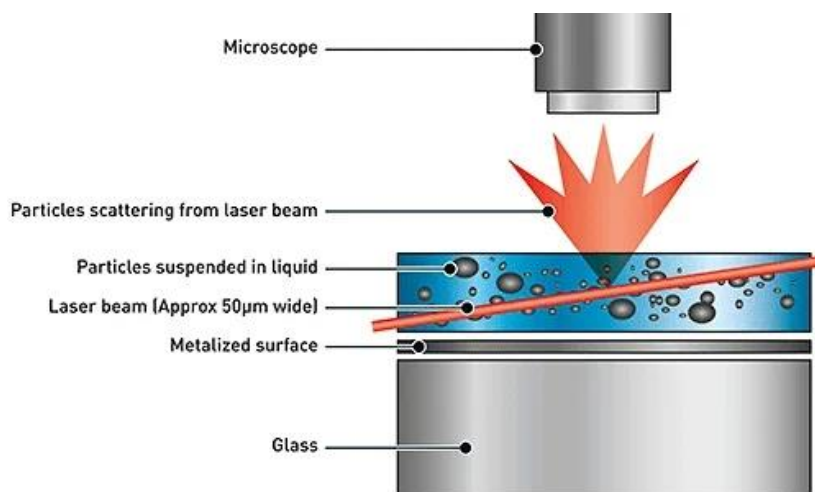
Ωστόσο, με το πέρας της μιας εβδομάδας δεν είχε επιτευχθεί ακόμα η απελευθέρωση των νανοσωματιδίων από το πλέγμα, καθόσον δεν εμφανίστηκε κάποια απορρόφηση στη μέτρηση. Αυτό το γεγονός, αποτελεί ένα πολύ αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των υδρογελών για την αντοχή τους και την αργή αποδέσμευση των νανοσωματιδίων.

2.6.5 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Το μέγεθος των παραγόμενων νανοσωματιδίων αργύρου είναι εξαιρετικά σημαντικό να μετρηθεί, καθώς όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.1.2, επηρεάζει

σε μεγάλο βαθμό το τελικό προϊόν. Εφόσον, στόχος της παρούσας έρευνας είναι η παρασκευή υδρογελών για επούλωση πληγών, δίνεται μεγάλη προσοχή ώστε τα νανοσωματίδια να μην είναι μικρότερα των 100nm καθώς υπάρχει κίνδυνος να περάσουν την επιδερμίδα, να συσσωρευτούν και να προκληθεί τοξικότητα [172].

Εν συντομία, κατά τη διάρκεια της μέτρησης NTA, τα νανοσωματίδια οπτικοποιούνται από το φως που διαχέεται όταν ακτινοβολούνται με δέσμη λέιζερ. Το διασκορπισμένο φως εστιάζεται από ένα μικροσκόπιο σε μια κάμερα που καταγράφει την κίνηση των σωματιδίων. Το λογισμικό NTA παρακολουθεί την τυχαία θερμική κίνηση κάθε σωματιδίου, γνωστή ως κίνηση Brown, για να καθορίσει τον συντελεστή διάχυσης που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μεγέθους κάθε σωματιδίου χρησιμοποιώντας την εξίσωση Stokes-Einstein [173], [174].



Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διαμόρφωσης που χρησιμοποιείται στο NTA.

Η διεξαγωγή της Nanoparticle Tracking Analysis, πραγματοποιείται με το όργανο Malvern Panalytical Nanosight NS300, όπου εισέρχεται επίσης με σύριγγα δείγμα από αραιωμένη υδρογέλη (10mg υδρογέλης/ 10ml υπερκάθαρου νερού). Περαιτέρω πληροφορίες για τις ρυθμίσεις του οργάνου παρατίθενται παρακάτω.

Πίνακας 6: Συνθήκες λειτουργίας του οργάνου Malvern Panalytical Nanosight NS300 για την παρούσα έρευνα.

Laser Type	Green
Number of frames	1498
Temperature	25oC
Viscosity	(Water) 0.9cP
Syringe Pump Speed	100

2.6.6 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Για την ακριβή ανάλυση των χημικών δομών που επικρατούν στην υδρογέλη, αλλά και τον χαρακτηρισμό των ενώσεων, επιλέγεται η Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier. Η ανάλυση αυτή βασίζεται στο γεγονός πως όταν η υπέρυθρη (IR) ακτινοβολία διέρχεται από ένα δείγμα, μέρος της ακτινοβολίας αυτής απορροφάται, ενώ το μέρος που διέρχεται από το δείγμα καταγράφεται. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί ενός μορίου θα απορροφήσουν επιλεκτικά την ακτινοβολία συγκεκριμένων μηκών κύματος, η οποία αλλάζει τη δονητική ενέργεια στον δεσμό. Ο τύπος της δόνησης (κάμψης = bend – έκτασης = stretch) που προκαλείται από την υπέρυθρη ακτινοβολία εξαρτάται από τα άτομα του δεσμού. Εφόσον, διαφορετικοί δεσμοί και λειτουργικές ομάδες απορροφούν διαφορετικές συχνότητες, η τελική απεικόνιση είναι διαφορετική για κάθε μόριο. Με αυτόν τον τρόπο, τα φάσματα είναι σαν τα δακτυλικά αποτυπώματα δηλαδή ουσιαστικά μοναδικά. Είναι μια πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αναγνώριση των δομών που επικρατούν μέσα σε ένα δείγμα, καθώς είναι μη καταστροφική, αρκετά γρήγορη αλλά και εξαιρετικά ακριβής [175].

Η διάταξη που χρησιμοποιείται είναι η FT-IR 4200 Jasco, όπου λαμβάνεται το φάσμα κυματαριθμών (cm^{-1}) μεταξύ 4000 cm^{-1} και 400 cm^{-1} συναρτήσει της αλληλεπίδρασης της κάθε ένωσης με την υπέρυθρη ακτινοβολία. Αναλύονται πέντε διαφορετικά δείγματα όπως παρατίθενται παρακάτω:

Πίνακας 7: Παρακάτω παρατίθενται τα πέντε δείγματα που αναλύθηκαν με την μέθοδο FTIR. Αξίζει να σημειωθεί πως έγινε ανάλυση και στο εκχύλισμα χαμομηλιού αποτελούμενο από NADES.

Δείγμα	Αλγινικό % w/v	NADES % v/v	Δ/μα CaCl_2 % w/v	$[\text{AgNO}_3]$ mM
1	3	4	-	-
2	3	6	-	-
3	3	-	1	
4	3	5.4	-	5

2.6.7 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος χαμομηλιού (Total Phenolic Content – TPC)

Όσον αφορά τη μέτρηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων, επιλέγεται η μέθοδος Folin-Ciocalteu και ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιείται το

γαλλικό οξύ [176]. Για την πειραματική διαδικασία, απαιτείται μια ποσότητα εκχυλίσματος χαμομηλιού που παρασκευάστηκε όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.4.2 καθώς και υπερκάθαρο νερό. Σε ένα δοχείο Eppendorf των 2ml, προστίθενται 75μL του εκχυλίσματος και 225 μL υπερκάθαρου νερού, ενώ παράλληλα παρασκευάζεται και ένα blank δείγμα το οποίο αποτελείται εξ 'ολοκλήρου από νερό. Έπειτα, προστίθενται 100 μL από το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu, και τα δείγματα φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος για πέντε min. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την προσθήκη 300 μL κορεσμένου διαλύματος Na₂CO₃, καθώς και 580 μL απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού και ακολουθείται ανάδευση με Vortex με σκοπό την πλήρη ομογενοποίηση. Τα δείγματα φυλάσσονται ξανά σε σκοτεινό μέρος, για μια ώρα.

Στη συνέχεια, μετριέται η απορρόφησή τους σε μήκος κύματος ίσο με 755 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η πραγματική απορρόφηση των δειγμάτων που προκύπτουν από το εκχύλισμα προκύπτει μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$A = A \text{ sample} - A \text{ blank} \quad (3)$$

όπου A sample ορίζεται ως η απορρόφηση του δείγματος που περιέχει εκχύλισμα και A blank ορίζεται ως η απορρόφηση του blank διαλύματος.

Αξίζει να επισημανθεί πως η πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές, για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας και τη μείωση σφάλματος. Συνεπώς, στους υπολογισμούς λαμβάνονται οι μέσες τιμές των εκάστοτε μετρήσεων απορρόφησης κάθε δείγματος.

Όταν ολοκληρωθούν οι μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο, καταγράφονται και υπολογίζονται τα αποτελέσματα βάσει της παρακάτω εξίσωσης:

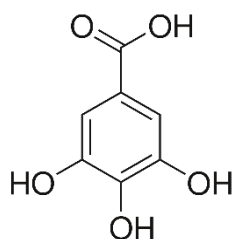
$$TPC = \frac{C_{gal} * V_{extr} * DF}{m} \quad (4)$$

Όπου C_{gallic acid eq} = η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg_{gal}/L)

V_{extr} = όγκος του εκχυλίσματος (L)

DF = παράγοντας αραίωσης

m = μάζα του χαμομηλιού που χρησιμοποιήθηκε για εκχύλιση



Γαλλικό οξύ

Ζύγιση gallic acid (g)	0.0038
Ποσότητα απ. Νερού (mL)	3.8
Συγκέντρωση διαλύματος γαλλικού οξέος (C = mg/ mL)	1

2.6.8 Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων του εκχυλίσματος χαμομηλιού (Total Flavonoid Content – TFC)

Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων γίνεται μέσω της μεθόδου του χλωριούχου αργιλίου και ως ένωση αναφοράς επιλέγεται η κατεχίνη. Αρχικά, ακολουθώντας τη διαδικασία που περιεγράφηκε για τη μέτρηση των φαινολικών ενώσεων, παρασκευάζεται ένα stock από το εκχύλισμα με τη διαφορά ότι αυτή τη φορά δεν είναι αραιωμένο. Έπειτα, σε ένα δοχείο Eppendorf 1.5 mL, προστίθενται 50 μL εκχυλίσματος και 30 μL NaNO_2 5%. Τα δείγματα αφήνονται για επώαση 6 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 60 μL AlCl_3 και τα δείγματα αναδεύονται με χρήση Vortex και αφήνονται για επώαση ακόμα 5 min. Με το πέρας των 5 min, γίνεται προσθήκη 300 μL NaOH , 1 M και 560 μL απεσταγμένο νερό και τα δείγματα αναδεύονται με χρήση Vortex.

Το σύστημα αφήνεται για επώαση 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκοτεινό μέρος. Τελικά, μετريέται η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος ίσο με 500 nm μέσω φασματοφωτόμετρου UV-Vis. Η πραγματική απορρόφηση των δειγμάτων που προκύπτουν από τα εκχυλίσματα προκύπτει ξανά από την παρακάτω εξίσωση:

$$A = A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}$$

Όπου A_{sample} ορίζεται ως η απορρόφηση του δείγματος που περιέχει εκχύλισμα και A_{blank} ορίζεται ως η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα δείγματα, πως και στην περίπτωση των φλαβονοειδών, τόσο από τα εκχυλίσματα, όσο και από το τυφλό διάλυμα, παρασκευάζονται εις τριπλούν, για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας και τον περιορισμό του σφάλματος. Συνεπώς, στους υπολογισμούς λαμβάνονται οι μέσες τιμές των εκάστοτε μετρήσεων απορρόφησης κάθε δείγματος.

Το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις προκύπτει μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

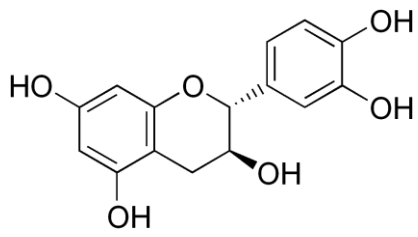
$$TFC = \frac{C_{\text{catechine}} * V_{\text{extr}} * DF}{m} \quad (5)$$

Όπου: $C_{\text{catechine}}$: η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε ισοδύναμα κατεχίνης ($\text{mg}_{\text{cat}}/\text{L}$)

V_{extr} : ο όγκος του εκχυλίσματος (L),

DF: ο παράγοντας αραιώσης (Dilution factor),

m: η μάζα του χαμομηλιού που χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση (g).



Κατεχίνη

Ζύγιση catechin (g)	0.0032
Ποσότητα απ. Νερού (mL)	3.2
Συγκέντρωση διαλύματος κατεχίνης (C = mg/ mL)	1

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Με χρήση του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken, προέκυψαν οι διαφορετικοί συνδυασμοί για τις ανεξάρτητες μεταβλητές και γίνεται καταγραφή των αποτελεσμάτων που αφορούν τις εξαρτημένες μεταβλητές που εξετάζονται, δηλαδή την ικανότητα διόγκωσης και συγκράτησης νερού, ούτως ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα αποκρίσεων των 15 παραγόμενων υδρογελών.

Std	Run	Factor 1 A: [AgNO ₃] mM	Factor 2 B: Chamomile extract % v/v	Factor 3 C: Time h	Response 1 Swelling %	Response 2 Retention %
15	1	3	5	4	500	25
5	2	1	5	2	743	91
13	3	3	5	4	718	70
10	4	3	6	2	1186	100
6	5	5	5	2	1220	95
7	6	1	5	6	1112	67
12	7	3	6	6	716	93
11	8	3	4	6	591	16
1	9	1	4	4	838	66
8	10	5	5	6	911	58
14	11	3	5	4	859	95
9	12	3	4	2	271	15
2	13	5	4	4	872	92
4	14	5	6	4	924	91
3	15	1	6	4	812	80
15	1	3	5	4	500	25
5	2	1	5	2	743	91

Αξίζει να υπογραμμισθεί πως οι τιμές που επιλέγονται να καταγραφούν στις αποκρίσεις αφορούν τα πρώτα 50 min για την ικανότητα διόγκωσης, ενώ για την ικανότητα συγκράτησης επιλέγονται τα 60 min της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον, σε όλες τις υδρογέλες η περιεκτικότητα σε αλγινικό διατηρείται σταθερή στα 3% w/v, ούτως ώστε το αλγινικό να μην επιδρά στις τελικές αποκρίσεις που εξετάζονται.

3.1.1 Ανάλυση ικανότητας διόγκωσης της υδρογέλης

Η ικανότητα διόγκωσης σε κάθε υδρογέλη είναι μείζονος σημασίας για τον χαρακτηρισμό των μηχανικών ιδιοτήτων της. Ουσιαστικά, όταν τα μόρια νερού διαχέονται στο πλέγμα της υδρογέλης, επέρχεται η χαλάρωση των αλυσίδων του πολυμερούς και τελικά η επέκταση του διασυνδεδεμένου δικτύου [177].

Στη συνέχεια ακολουθεί ο προσδιορισμός του μοντέλου πρόβλεψης όσον αφορά την ικανότητα διόγκωσης (swelling ratio). Αρχικά επιλέγεται το απλοποιημένο κυβικό μοντέλο (Reduced Cubic Model) για την στατιστική ανάλυση ANOVA, το οποίο αποτελείται από τους όρους A, B, C, AB, BC, AC, A², B², C² όπου A είναι η συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου (σε mM), B η περιεκτικότητα σε χαμομήλι (σε % v/v) και C ο χρόνος ανάδευσης (σε h). Για να είναι στατιστικά αληθές το μοντέλο, αφαιρούνται οι όροι που δεν εμφανίζονται ως στατιστικά σημαντικοί, δηλαδή αυτοί που παρουσιάζουν υψηλά p – values (> 0.05), καθώς επιδρούν αρνητικά σε ολόκληρο το μοντέλο.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο *Reduced Cubic* που περιγράφει την απόκριση της διόγκωσης νερού (swelling ratio) στις υδρογέλες.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	7.752E+05	7	1.107E+05	6.98	0.0100	<i>significant</i>
A-[AgNO ₃]	22260.50	1	22260.50	1.40	0.2748	
B-Chamomile extract	2.704E+05	1	2.704E+05	17.05	0.0044	
C-Time	1012.50	1	1012.50	0.0638	0.8078	
AC	1.149E+05	1	1.149E+05	7.25	0.0310	
BC	1.560E+05	1	1.560E+05	9.84	0.0165	
A ²	2.105E+05	1	2.105E+05	13.27	0.0083	
A ² B	1.285E+05	1	1.285E+05	8.10	0.0248	
Residual	1.110E+05	7	15861.10			
Lack of Fit	45599.05	5	9119.81	0.2788	0.8919	not significant
Pure Error	65428.67	2	32714.33			
Cor Total	8.863E+05	14				

Σύμφωνα με το συγκεκριμένο τροποποιημένο μοντέλο, δύο ενδείξεις φανερώνουν πως είναι στατιστικά σημαντικό, η F- value που έχει τιμή 6.98 και η p-value με τιμή 0.0100. Είναι γενικά αποδεκτό, οι τιμές p-value να είναι μικρότερες από 0.0500, ούτως ώστε να αποδίδουν στατιστικά σημαντικά μοντέλα. Σε αυτήν την περίπτωση τα AC, BC, A², A²B είναι οι σημαντικοί όροι μοντέλου. Τιμές μεγαλύτερες από 0.1000

υποδεικνύουν ότι οι όροι δεν είναι σημαντικοί, και είναι φανερό πως δεν εμφανίζονται τέτοιες τιμές στο συγκεκριμένο μοντέλο. Ωστόσο, όταν υπάρχουν πολλοί ασήμαντοι όροι (χωρίς να υπολογίζονται αυτοί που απαιτούνται για την υποστήριξη της ιεραρχίας), η αφαίρεση τους μπορεί να βελτιώσει το μοντέλο. Τέλος, η τιμή F της έλλειψης προσαρμογής (Lack of Fit), υποδηλώνει ότι δεν είναι σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα, συνεπώς το μοντέλο προσαρμόζεται κανονικά.

Η σχέση παλινδρόμησης που επιλέγεται για τη συγκεκριμένη ανάλυση σχετικά με τις ανεξάρτητες μεταβλητές A, B, C είναι το ακόλουθο:

$$\text{Swelling} = 691.57 + 52.75*A + 260.00*B - 11.25*C - 169.50*AC - 197.50*BC + 237.43*A^2 - 253.50*A^2B \quad (6)$$

Η εξίσωση αυτή είναι δομημένη ως προς τους κωδικοποιημένους παράγοντες (A,B,C) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση κάθε παράγοντα. Από προεπιλογή, τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων κωδικοποιούνται ως +1 και τα χαμηλά επίπεδα κωδικοποιούνται ως -1.

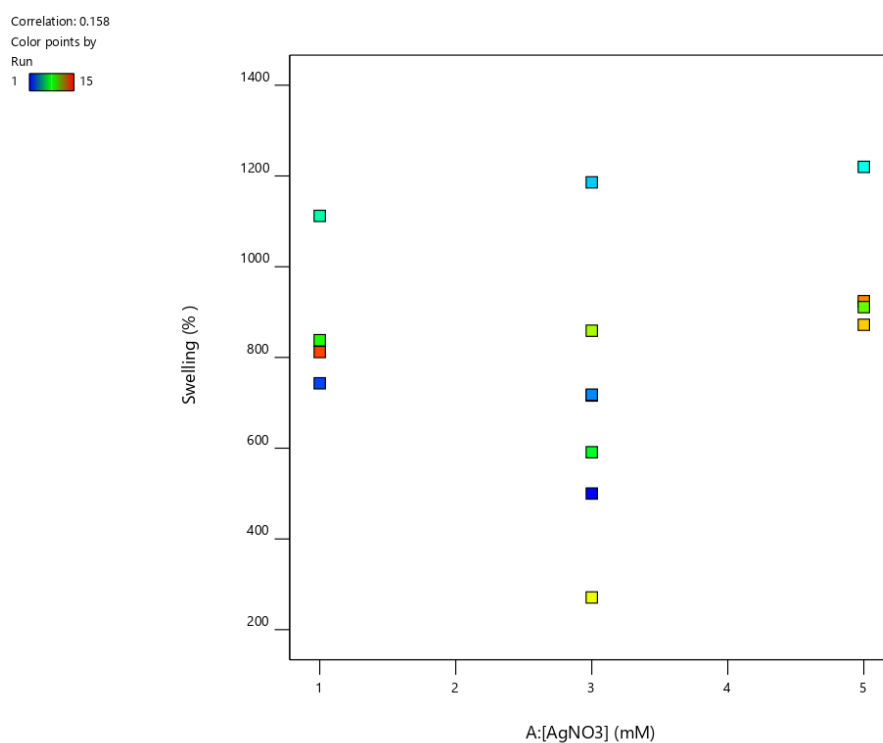
Αξίζει να επισημανθεί και το γεγονός πως η τιμή του προβλεπόμενου R² (Predicted R² = 0.5711) του μοντέλου για την ικανότητα διόγκωσης (swelling) είναι σε συμφωνία με το προσαρμοσμένο R² (Adjusted R² = 0.7295) με απόκλιση μικρότερη από 0.2 μονάδες, κρίνοντας έτσι την τιμή R² ικανοποιητική. Επιπροσθέτως, η τιμή Adequate Precision υπολογίζει την αναλογία του σήματος προς τον θόρυβο και επιθυμητές χαρακτηρίζονται οι τιμές μεγαλύτερες από 4. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, το μοντέλο παρουσιάζει αναλογία 9.972 γεγονός που υποδηλώνει ένα επαρκές σήμα και ότι το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιήγηση στον σχεδιαστικό χώρο, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του απλοποιημένου κυβικού μοντέλου στην ικανότητα διόγκωσης.

Std. Dev.	125.94		R²	0.8747
Mean	818.20		Adjusted R²	0.7495
C.V. %	15.39		Predicted R²	0.5711
			Adeq Precision	9.9721

Συνεχίζοντας, γίνεται περαιτέρω ανάλυση του πειραματικού σχεδιασμού με εξειδικευμένα γραφήματα.

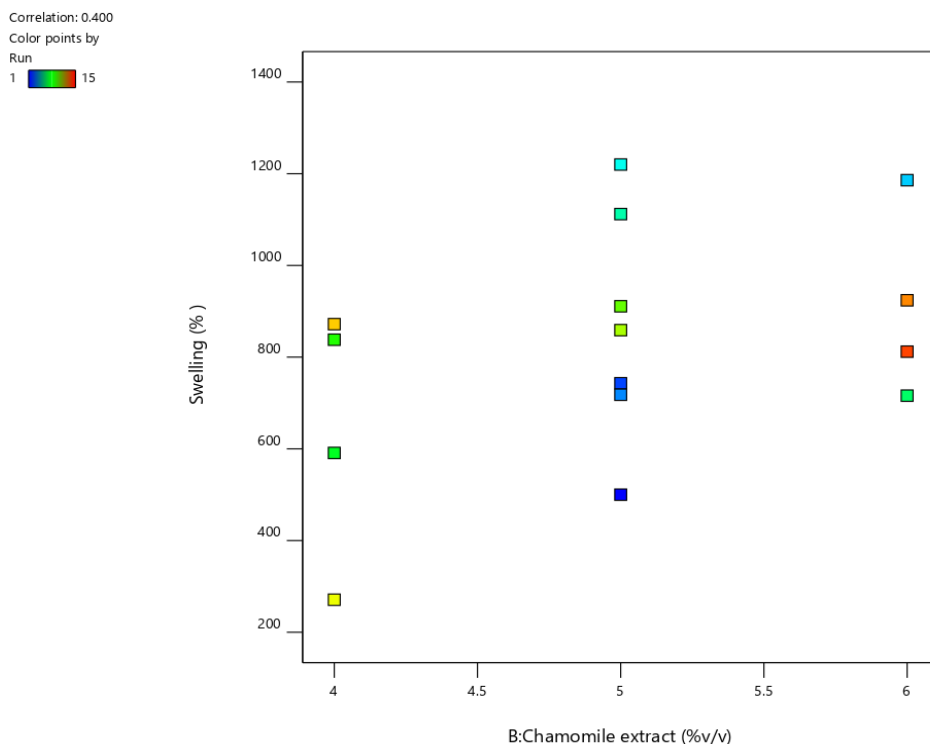
Αφού, ολοκληρώθηκε η διαδικασία για την επικαιροποίηση των στατιστικών μοντέλων που υποδηλώνουν σταθερές συνθήκες, έπεται η συσχέτιση της ικανότητας διόγκωσης της υδρογέλης, ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές, δηλαδή τη συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου σε mM, τη περιεκτικότητα εκχυλίσματος σε % v/v και τον χρόνο ανάδευσης σε hours.



Διάγραμμα 5: Συσχέτιση συγκέντρωσης νιτρικού αργύρου με την ικανότητα διόγκωσης της υδρογέλης.

Παρατηρώντας το διάγραμμα συσχέτισης της συγκέντρωσης του νιτρικού αργύρου συγκριτικά με το ποσοστό διόγκωσης, φαίνεται πως για υψηλότερες τιμές AgNO_3 επιτυγχάνεται μεγαλύτερη διόγκωση της υδρογέλης. Είναι φανερό πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του AgNO_3 , τόσο αυξάνεται και η παραγωγή νανοσωματιδίων. Κατά την ανάμιξη, τα μεταλλικά ιόντα υφίστανται ταχεία συμπλοκοποίηση με τις αλυσίδες του αλγινικού, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διασυνδεδεμένων δικτύων και τελικά, σκληρών υδρογελών [170], [178]. Κατά συνέπεια, αυτά τα νανοσωματίδια παγιδεύονται μέσα στο πλέγμα υδρογέλης, ενισχύοντας την αντοχή του. Επιπλέον, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του AgNO_3 , τα νανοσωματίδια απωθούν το ένα το άλλο λόγω επιφανειακού φορτίου, επιτρέποντας περισσότερο χώρο στα μόρια νερού να εγκλωβιστούν στο πλέγμα της υδρογέλης [179],

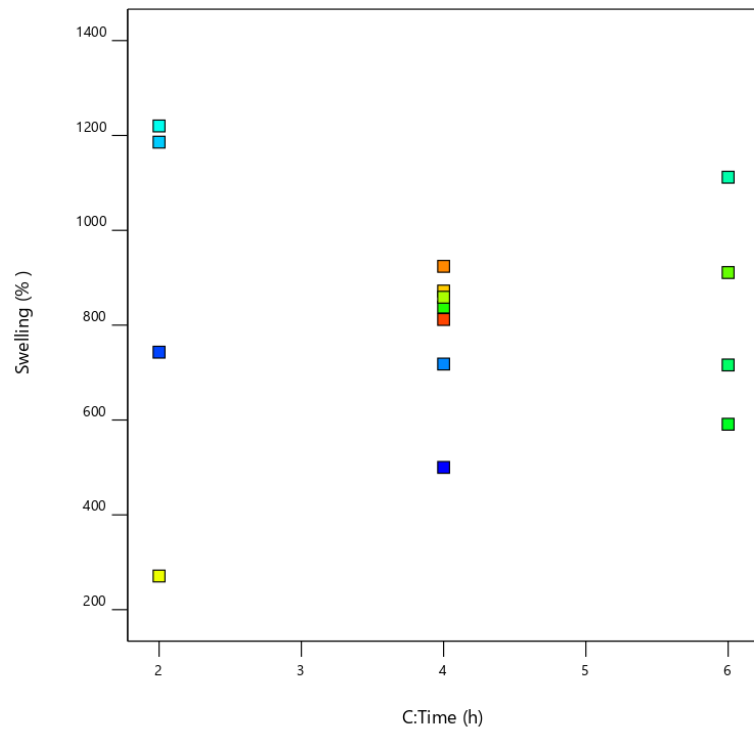
[180]. Ως αποτέλεσμα, οι υδρογέλες αποκτούν τη δυνατότητα να διογκώνονται συγκρατώντας μόρια νερού για περισσότερο χρονικό διάστημα χωρίς να χάνεται η συνοχή στο πλέγμα τους .



Διάγραμμα 6: Συσχέτιση περιεκτικότητας εκχυλίσματος συγκριτικά με το ποσοστό διόγκωσης.

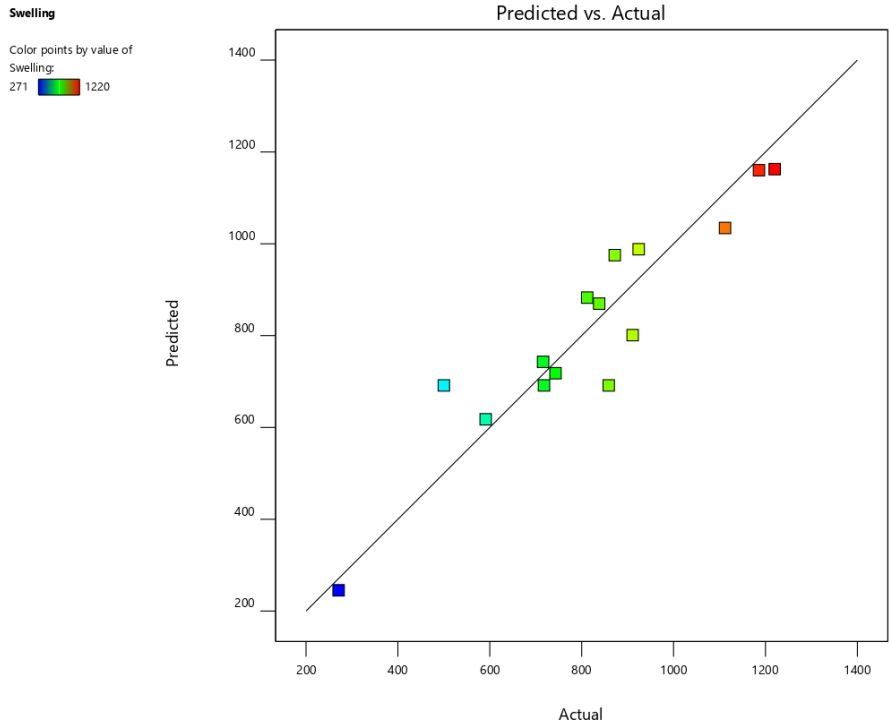
Συνεχίζοντας με την ανάλυση της περιεκτικότητας εκχυλίσματος σε σχέση με το ποσοστό διόγκωσης, είναι φανερό πως οι υδρογέλες με υψηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος χαμομηλιού εμφάνισαν βελτιωμένη διόγκωση ισορροπίας (swelling equilibrium) και δίκτυα μεγαλύτερης διάρκειας, υποδεικνύοντας ότι αυτές οι υδρογέλες έχουν πιο συγκροτημένο και καλά δομημένο πλέγμα λόγω της αυξημένης διασταύρωσης. Μια υψηλότερη αναλογία διόγκωσης προκαλείται επίσης από την παρουσία NADES, η οποία συμβάλλει στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Ταυτόχρονα, οι αλυσίδες του αλγινικού περιέχουν σημαντικό αριθμό υδροξυλομάδων που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου [181]. Εξίσου μεγάλης σημασίας είναι και η παρουσία του ηλιακού φωτός, το οποίο δρα σαν καταλύτης για την αναγωγή του AgNO_3 και τελικά την παραγωγή των νανοσωματιδίων με τη βοήθεια των φυτοχημικών του χαμομηλιού [179].

Correlation: -0.034
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 7: Συσχέτιση του χρόνου ανάδευσης συγκριτικά με την ικανότητα συγκράτησης νερού.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται μια τάση για καλύτερα ποσοστά συγκράτησης νερού, σε χρόνους ανάμειξης από 2 μέχρι 4 h.



Διάγραμμα 8: Συσχέτιση πραγματικών με προβλεπόμενων τιμών όσον αφορά την απόκριση της ικανότητας διόγκωσης.

Το παραπάνω διάγραμμα αντιπροσωπεύει την γραμμικότητα του μοντέλου που επιλέγεται, και αναφέρεται στο κατά πόσο οι πραγματικές μετρήσεις συγκλίνουν ή αποκλίνουν από τις προβλεπόμενες. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, εφόσον το μεγαλύτερο ποσοστό των μετρήσεων συγκλίνει προς την κεντρική διαγώνιο, σημαίνει πως το επιλεγμένο μοντέλο είναι επιτυχημένο.

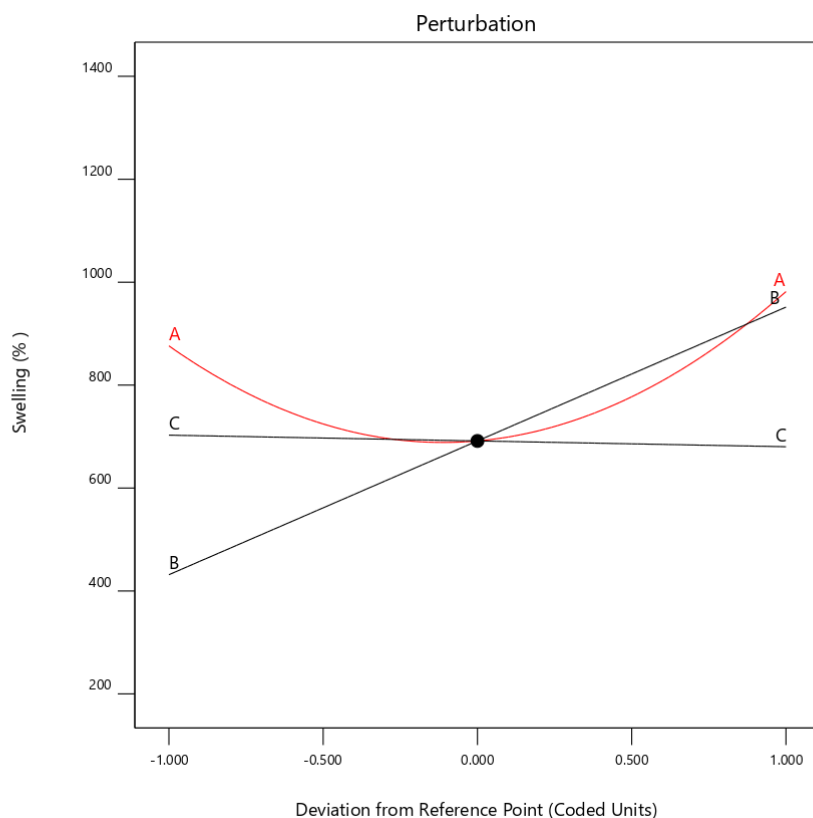
Factor Coding: Actual

Actual Factors

A: [AgNO₃] = 3

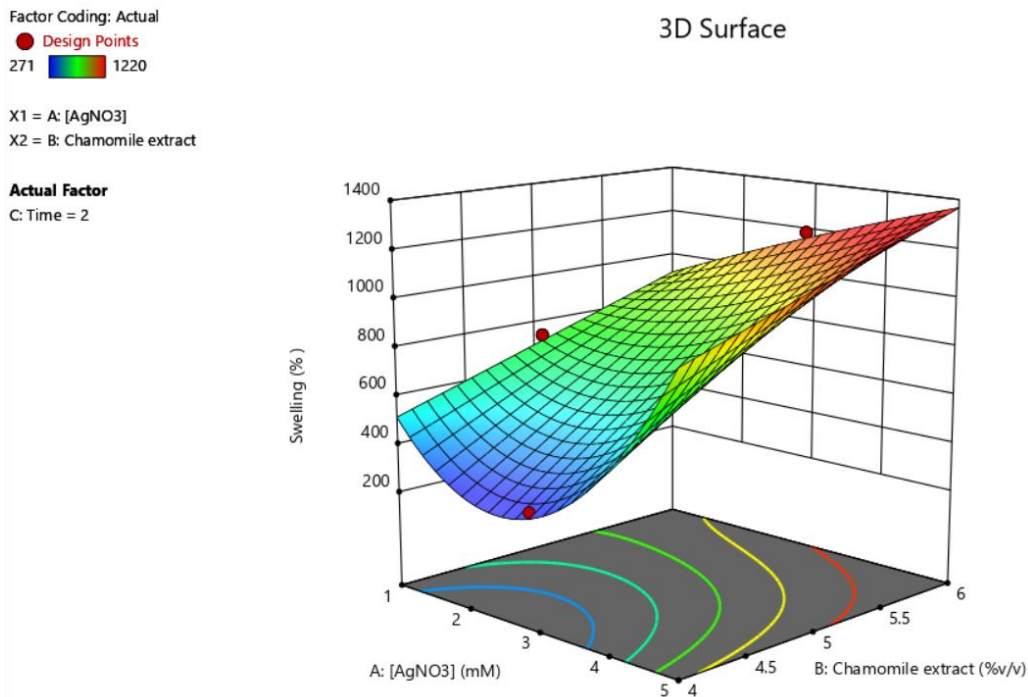
B: Chamomile extract = 5

C: Time = 4



Διάγραμμα 9: Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στην ικανότητα διόγκωσης.

Σε αυτό το διάγραμμα, περιγράφεται σε τι βαθμό είναι πεπλεγμένοι οι όροι του μοντέλου. Με άλλα λόγια, για τις κεντρικές τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών, όπως αναγράφονται και στο υπόμνημα (A: Συγκέντρωση AgNO₃ = 3 mM, B: Συγκέντρωση εκχυλίσματος χαμομηλιού = 5% v/v και C: χρόνος = 4 h), φαίνεται πως ο όρος A επηρεάζει περισσότερο τη βέλτιστη ικανότητα διόγκωσης της υδρογέλης. Εν γένει, όλοι οι όροι επηρεάζουν ο ένας τον άλλον αλλά και το τελικό σύστημα.



Διάγραμμα 10: Τρισδιάστατη απεικόνιση των ανεξάρτητων μεταβλητών A και B σχετικά με τον χρόνο ανάδευσης στις 2 h.

Το τρισδιάστατο γράφημα των ανεξάρτητων μεταβλητών, παρουσιάζει την κατανομή των τιμών που μπορούν να λάβουν τα συστατικά της υδρογέλης, στο χώρο. Με σταθερό χρόνο στις 2 h, είναι φανερό πως οι τιμές με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν καλύτερα ποσοστά διόγκωσης. Επεξηγηματικότερα, για τιμές εκχυλίσματος χαμομηλιού κυμαινόμενες από 5 έως 6 % v/v και αντίστοιχα τιμές συγκέντρωσης AgNO₃ από 3 έως 5 mM, το ποσοστό διόγκωσης της υδρογέλης είναι αρκετά υψηλό.

3.1.2 Ανάλυση ικανότητας συγκράτησης της υδρογέλης

Συνεχίζοντας για την ικανότητα συγκράτησης νερού παρατίθεται ο παρακάτω πίνακας με τις απαραίτητες πληροφορίες.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο *Reduced Cubic* που περιγράφει την απόκριση της συγκράτησης νερού (*retention ratio*) στις υδρογέλες.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	9294.58	6	1549.10	4.15	0.0340	<i>significant</i>
A-[AgNO ₃]	128.00	1	128.00	0.3431	0.5742	
B-Chamomile extract	6561.00	1	6561.00	17.59	0.0030	
C-Time	9.00	1	9.00	0.0241	0.8804	
A ²	1624.08	1	1624.08	4.35	0.0704	
A ² B	2775.13	1	2775.13	7.44	0.0259	
A ² C	378.13	1	378.13	1.01	0.3435	
Residual	2984.36	8	373.04			
Lack of Fit	467.69	6	77.95	0.0619	0.9962	not significant
Pure Error	2516.67	2	1258.33			
Cor Total	12278.93	14				

Παρατηρείται και στην περίπτωση της συγκράτησης νερού οι τιμές F-value και p-value, να δίνουν στατιστικά σημαντικά μοντέλα, καθώς παράλληλα η έλλειψη προσαρμογής θεωρείται μη σημαντική. Ειδοποιός διαφορά συγκριτικά με το παραπάνω μοντέλο, είναι η αφαίρεση διαφορετικών όρων ούτως ώστε να χαρακτηριστεί σημαντικό το μοντέλο. Όπως προαναφέρθηκε, επιλέγονται οι όροι που παρουσιάζουν τιμές μεγαλύτερες από 0.1000, γεγονός όμως που αλλάζει αναλόγως την εκάστοτε μεταβλητή που εξετάζεται. Στην προκειμένη περίπτωση οι επιλεγόμενοι στατιστικά σημαντικοί όροι είναι οι A², A²B και A²C.

Η σχέση παλινδρόμησης που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη ανάλυση είναι η εξής:

$$\text{Retention} = 59.14 + 4 * A + 40.50 * B - 1.50 * C = 20.86 * A^2 - 37.25 * A^2 B - 13.75 * A^2 C \quad (7)$$

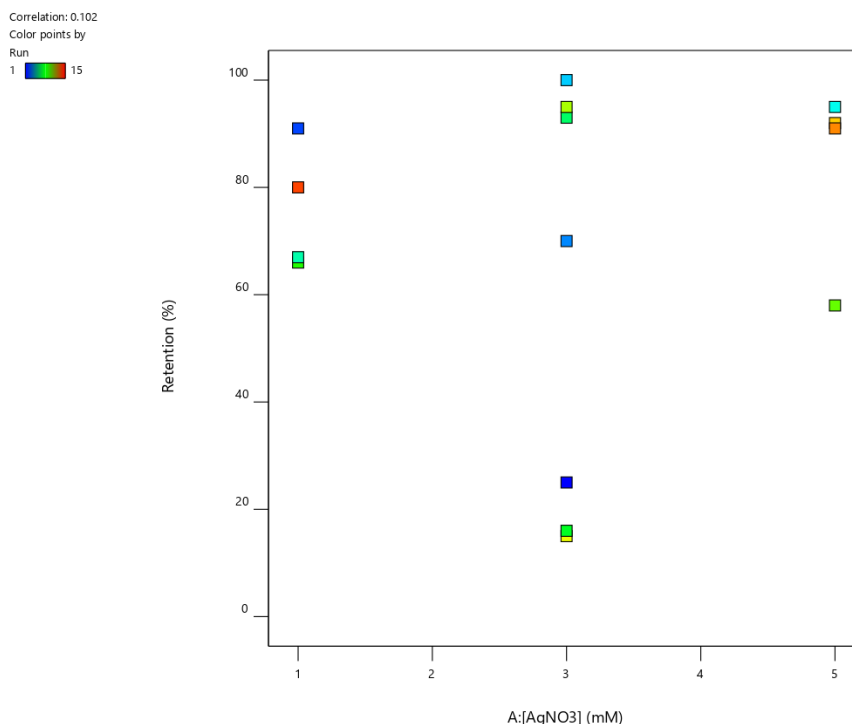
Όπως και στην περίπτωση της διόγκωσης έτσι και εδώ, η εξίσωση είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων συγκρίνοντας τους συντελεστές τους, για τη σημαντικότητα στο συνολικό μοντέλο.

Αξίζει να αναφερθεί πως και στην περίπτωση της συγκράτησης οι τιμές των Predicted R² αλλά και Adjusted R², έχουν διαφορά λιγότερο από δύο μονάδες.

Παράλληλα, η τιμή του adequate precision υπολογίζεται στις 6.366 μονάδες, γεγονός που δείχνει ένα επαρκές σήμα για το χρησιμοποιούμενο μοντέλο.

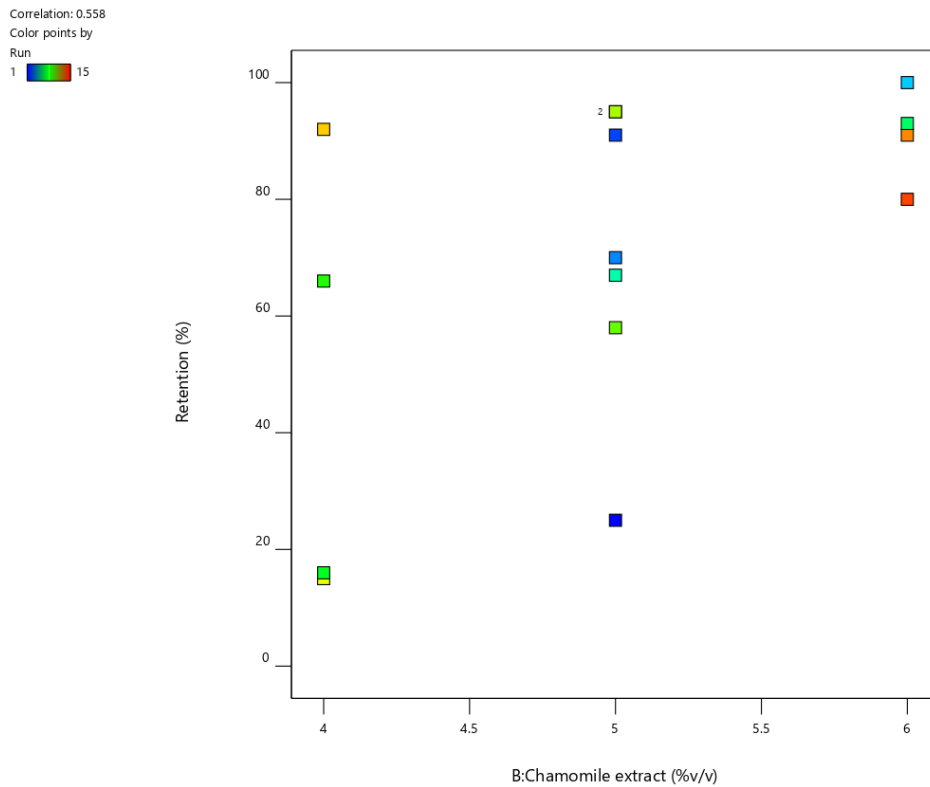
Πίνακας 12: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του απλοποιημένου κυβικού μοντέλου στην ικανότητα συγκράτησης.

Std. Dev.	19.31	R²	0.7570
Mean	70.27	Adjusted R²	0.5747
C.V. %	27.49	Predicted R²	0.5626
		Adeq Precision	6.3664



Διάγραμμα 11: Συσχέτιση συγκέντρωσης νιτρικού αργύρου με την ικανότητα συγκράτησης της υδρογέλης.

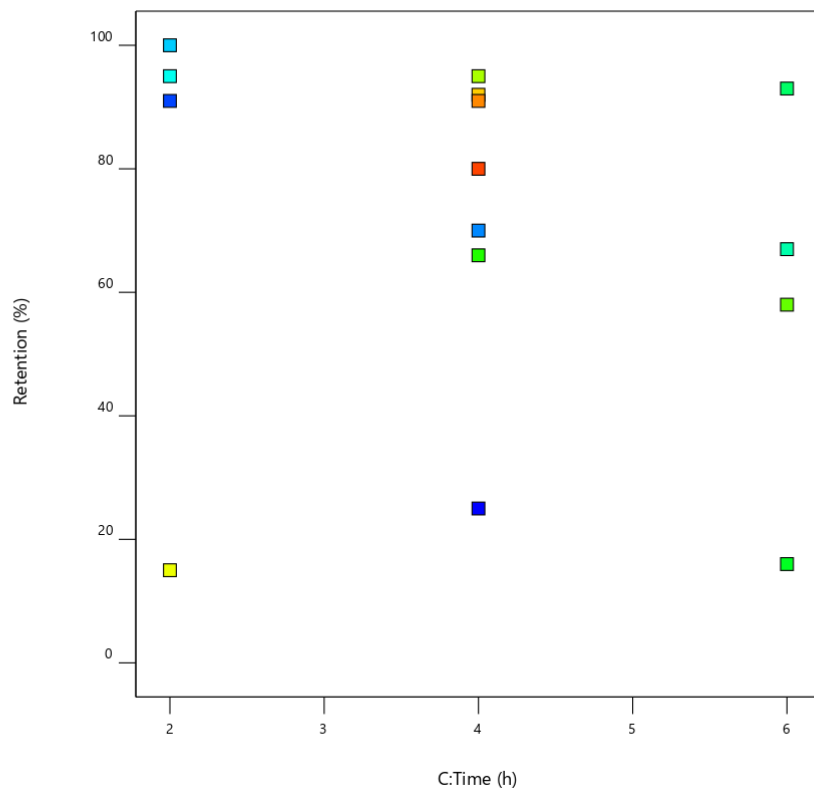
Όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της συγκράτησης νερού στην υδρογέλη, οι μεγαλύτερες ποσότητες νιτρικού αργύρου δίνουν ως αποτέλεσμα καλύτερα ποσοστά συγκράτησης, λόγω των δεσμών που δημιουργούνται μεταξύ των νανοσωματιδίων του αργύρου και των αλυσίδων του αλγινικού.



Διάγραμμα 12: Συσχέτισης συγκράτησης νερού με τη περιεκτικότητα σε εκχύλισμα χαμομηλιού.


Το εκχύλισμα χαμομηλιού, αποτελούμενο από τον διαλύτη NADES, δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι αποσκοπούν σε ένα πιο σταθερό πλέγμα. Όπως είναι φανερό και στο παραπάνω διάγραμμα, για τιμές εκχυλίσματος από 5 έως 6 % v/v, παρατηρούνται καλύτερα ποσοστά συγκράτησης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως όσο αυξάνεται το εκχύλισμα στο εσωτερικό της υδρογέλης, τόσο περισσότεροι δεσμοί αναπτύσσονται, με αποτέλεσμα τα μόρια νερού να συγκρατούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

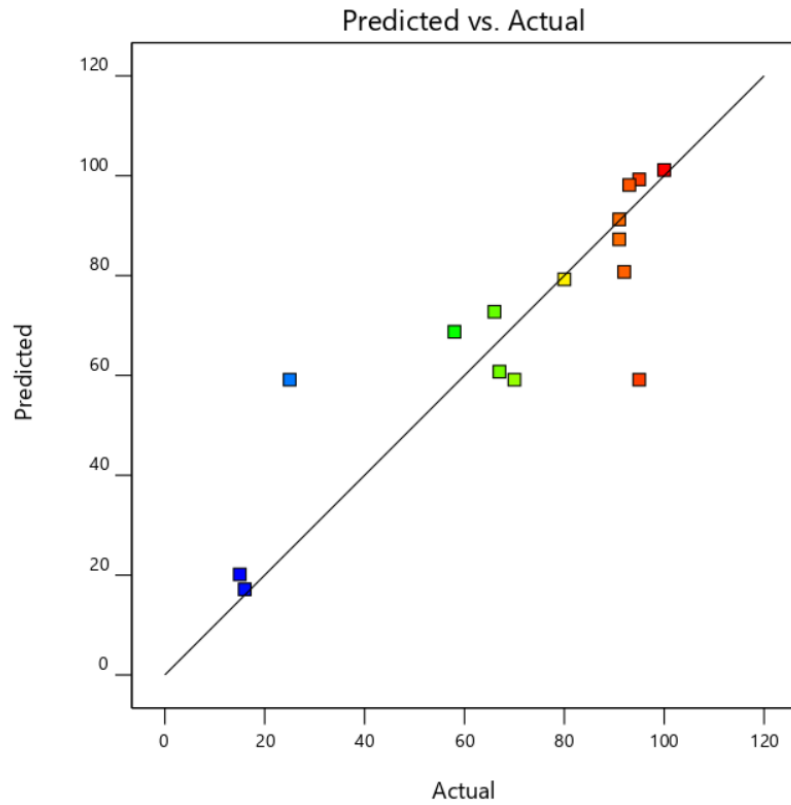
Correlation: -0.214
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 13: Συσχέτιση του χρόνου ανάδευσης με την ικανότητα συγκράτησης νερού.

Παρατηρώντας το διάγραμμα που αφορά τον χρόνο ανάδευσης, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως για μεγαλύτερους χρόνους ανάδευσης (6 h), επικρατεί μια ανομοιόμορφη κατανομή. Συμπεραίνοντας, είναι προτιμητέος ένας μέσος χρόνος ανάδευσης που κυμαίνεται από 2 έως 4 h.

Retention
Color points by value of
Retention:
15  100



Διάγραμμα 14: Σύγκριση πραγματικών με τις προβλεπόμενες τιμές για το μοντέλο συγκράτησης νερού.

Ξανά στην περίπτωση του μοντέλου για την ικανότητα συγκράτησης νερού, οι μετρήσεις συγκλίνουν σε μεγάλο βαθμό προς την κεντρική διαγώνιο, γεγονός που χαρακτηρίζει το μοντέλο επιτυχημένο.

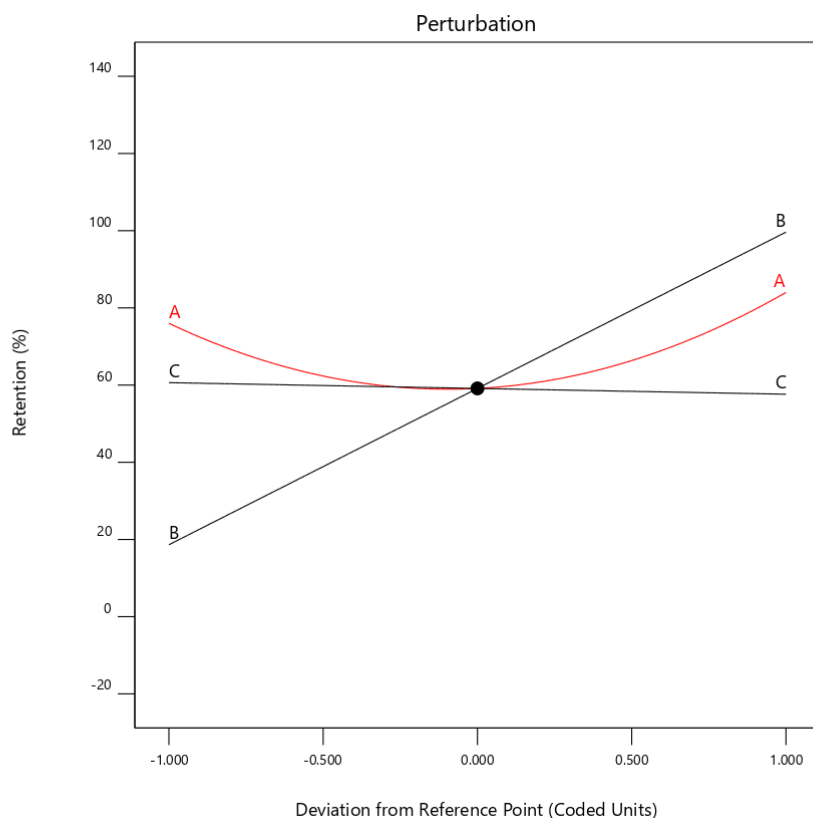
Factor Coding: Actual

Actual Factors

A: [AgNO₃] = 3

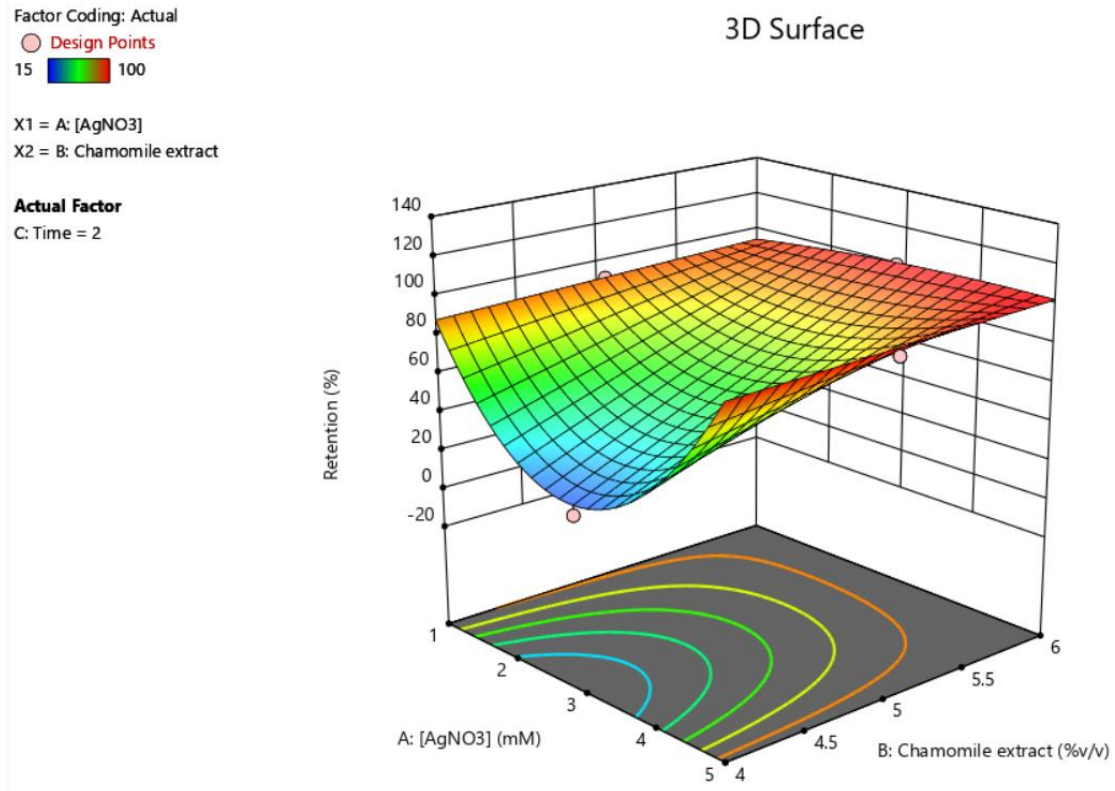
B: Chamomile extract = 5

C: Time = 4



Διάγραμμα 15: Συσχέτιση των ανεξάρτητων μεταβλητών στη σημαντικότητα του μοντέλου που αφορά την ικανότητα συγκράτησης.

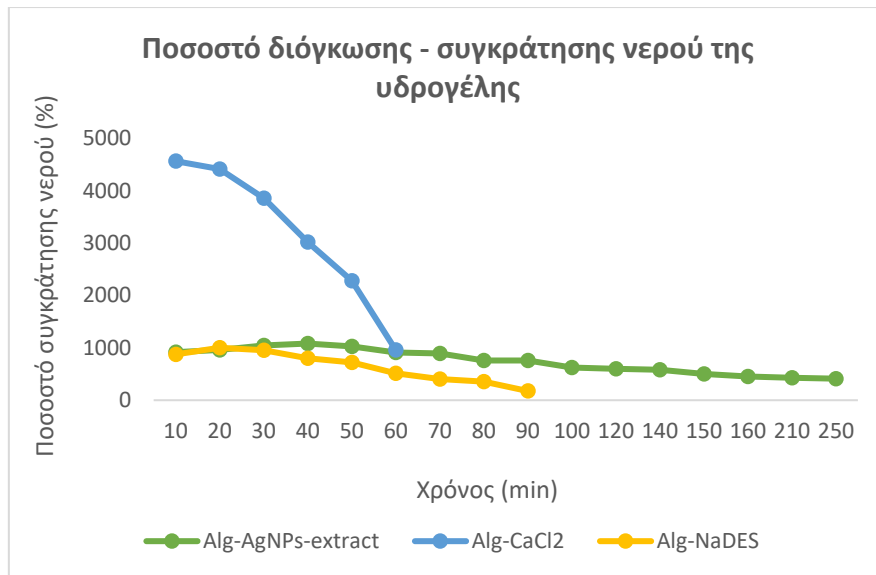
Οι όροι και σε αυτό το μοντέλο θεωρούνται πεπλεγμένοι, επηρεάζοντας ο ένας τον άλλον, με τη συγκέντρωση του AgNO₃ να καταλαμβάνει έναν ρόλο μείζονος σημασίας στην ικανότητα συγκράτησης της υδρογέλης.



Διάγραμμα 16: Τρισδιάστατη απεικόνιση των ανεξάρτητων μεταβλητών A και B σχετικά με τον χρόνο ανάδευσης στις 2 h.

Με σταθερό χρόνο ανάδευσης στις 2 h, οι τιμές με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν καλύτερα ποσοστά συγκράτησης νερού. Αναλυτικότερα, για τιμές εκχυλίσματος χαμομηλιού κυμαινόμενες από 5 έως 6 % v/v και αντίστοιχα τιμές συγκέντρωσης νιτρικού αργύρου 3 έως 5 mM, το ποσοστό συγκράτησης νερού της υδρογέλης είναι αρκετά υψηλό όπως και στην περίπτωση της ικανότητας συγκράτησης νερού.

Με την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, και της στατιστικής ανάλυσης που προαναφέρθηκε, ακολουθεί η επιβεβαίωση (confirmation) των απαραίτητων συνθηκών για ένα ολοκληρωμένο και επιτυχημένο μοντέλο. Με άλλα λόγια κατά το confirmation, το λογισμικό εξετάζει ποιες είναι οι βέλτιστες συνθήκες για την επιλεγμένη ανάλυση. Έτσι, προτείνονται ως βέλτιστες συνθήκες για την επικαιροποίηση του πειράματος, η συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου να είναι ίση με 5mM, η συγκέντρωση του εκχυλίσματος χαμομηλιού ίση με 5.4 %v/v και ο χρόνος ανάδευσης ίσος με 2 h.



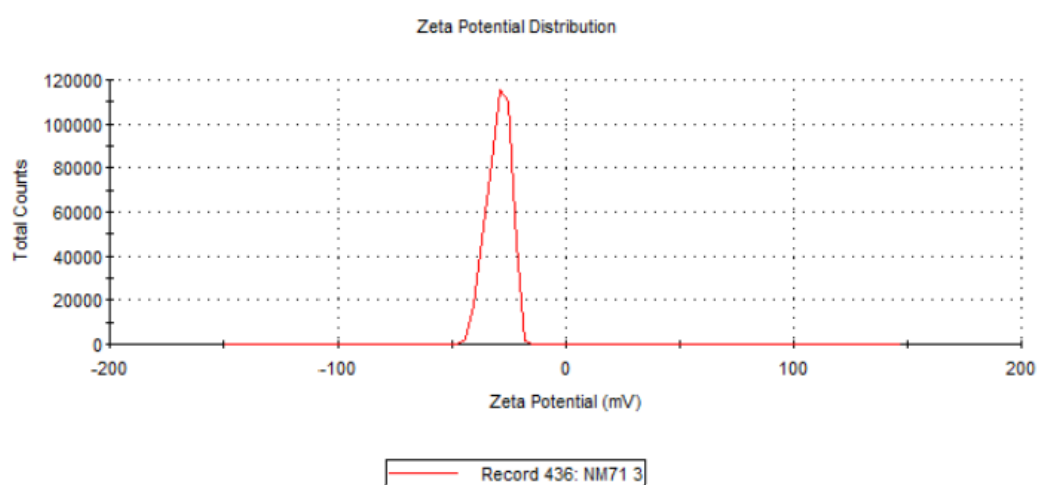
Διάγραμμα 17: Αποτελέσματα πειραματικής διαδικασίας που αφορούν το συνολικό πείραμα διόγκωσης και συγκράτησης νερού (*swelling – retention*) της υδρογέλης συγκριτικά με τον χρόνο. (Alg= Αλγινικό, Ag NPs= Νανοσωματίδια αργύρου, extract= εκχύλισμα χαμομηλιού).

Ολοκληρώνοντας, παρουσιάζεται το διάγραμμα που αφορά συνολικά τα πειράματα διόγκωσης και συγκράτησης νερού της υδρογέλης. Αξίζει να σημειωθεί, η μεγάλη διαφορά που παρουσίασαν οι συμβατικές υδρογέλες, διασυνδεδεμένες με CaCl₂ χωρίς τα νανοσωματίδια, συγκριτικά με αυτές που δεν περιλαμβάνουν νανοσωματίδια αλλά ως παράγοντα διασταύρωσης επιλέγεται NADES και αυτές που περιέχουν νανοσωματίδια.

Φαίνεται πως η συμβατική υδρογέλη χωρίς νανοσωματίδια (μπλε χρώμα), παρουσιάζει ένα ποσοστό διόγκωσης εξαιρετικά μεγάλο, ύψους 4500%, κάτι όμως που δεν διατηρείται σταθερό για αρκετή ώρα, καθώς επέρχεται πλήρης κατάρρευση του πολυμερικού πλέγματος μέσα στα πρώτα 60min. Η υδρογέλη μόνο με αλγινικό και NADES (κίτρινο χρώμα), παρουσιάζει καλά ποσοστά διόγκωσης αλλά και σε αυτή τη περίπτωση η αντοχή της χαρακτηρίζεται μικρή. Στον αντίποδα, οι υδρογέλες με νανοσωματίδια και NADES (πράσινο χρώμα), πλησιάζουν ένα ποσοστό διόγκωσης ύψους 1200% μετά από 40 min γεγονός που φανερώνει μια καλά διασυνδεδεμένη υδρογέλη με σταθερό πλέγμα, το οποίο διατηρείται για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (έως και 4 h).

3.2 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (*Dynamic Light Scattering*)

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 2.6.3, τα αποτελέσματα μιας μέτρησης DLS, δίνουν ένα διάγραμμα συσχέτισης, στο οποίο υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με τη διάχυση των σωματιδίων. Στη παρούσα εργασία, η μέτρηση έλαβε χώρα για την εύρεση του δυναμικού ζ (ηλεκτροκινητικό δυναμικό), που περιγράφει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των σωματιδίων σε ένα κolloειδές δείγμα. Αναλυτικότερα, το μέγεθος του δυναμικού ζ δίνει μια ένδειξη της δυναμικής σταθερότητας ενός συστήματος, δηλαδή αν όλα τα σωματίδια έχουν μεγάλη απόλυτη τιμή δυναμικού ζ, θα είχαν την τάση να απομακρύνονται μεταξύ τους αποτρέποντας έτσι τη δημιουργία κolloειδούς. Ωστόσο, αν τα σωματίδια έχουν τιμή δυναμικού ζ κοντά στο μηδέν, καμία δύναμη δεν επικρατεί ώστε να τα αποτρέψει από το να συσσωματωθούν. Για τον λόγο αυτό διαλύματα διασποράς με δυναμικό ζ πιο θετικό από +30mV ή πιο αρνητικό από -30mV θεωρούνται σταθερά [171]. Οι μετρήσεις από τα δείγματα που ελήφθησαν από τον πειραματικό σχεδιασμό, έδειξαν αρκετά σταθερά διαλύματα με ένα μέσο όρο δυναμικού ζ ίσο με -33 mV.

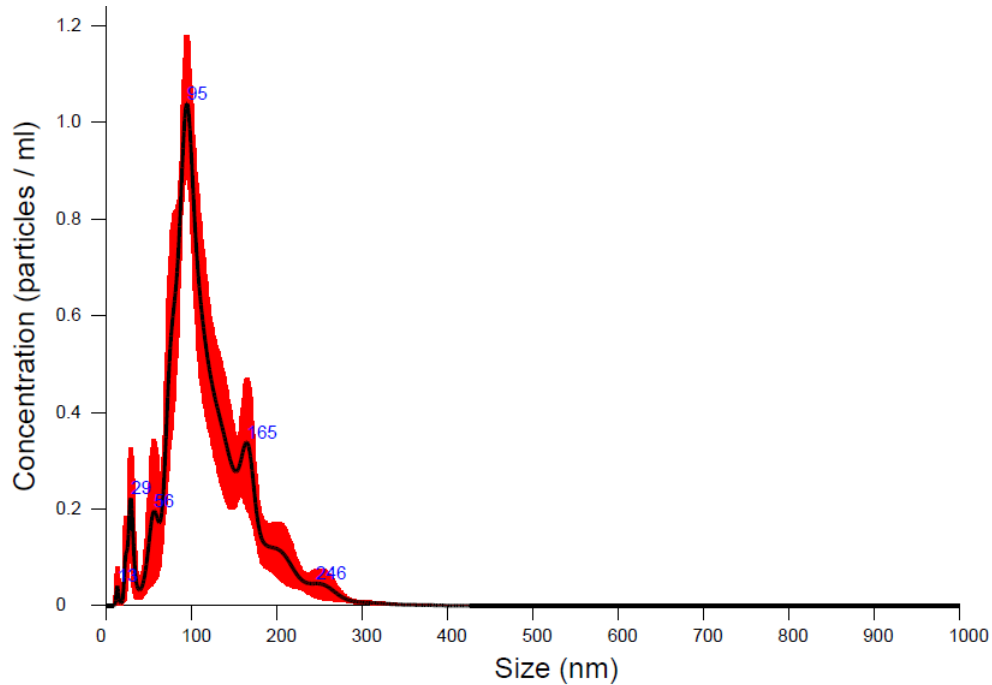


Εικόνα 25: Ενδεικτικό διάγραμμα ζ- δυναμικού νανοσύνθετης υδρογέλης που παρασκευάστηκε με NADES και εκχύλισμα χαμομηλιού.

Άλλος ένας λόγος που διεξήχθη η συγκεκριμένη ανάλυση, είναι η εύρεση του δείκτη PDI, ένα αδιάστατο στατιστικό μέγεθος που αντιπροσωπεύει το μέτρο της ομοιογένειας ή ανομοιογένειας των σωματιδίων. Λαμβάνει τιμές από 0 (πλήρης ομοιογένεια, μονοδιάσπαρτα σωματίδια) έως 1 (πλήρης ανομοιογένεια, πολυδιάσπαρτα σωματίδια). Ο μέσος όρος που λαμβάνεται είναι 0.547.

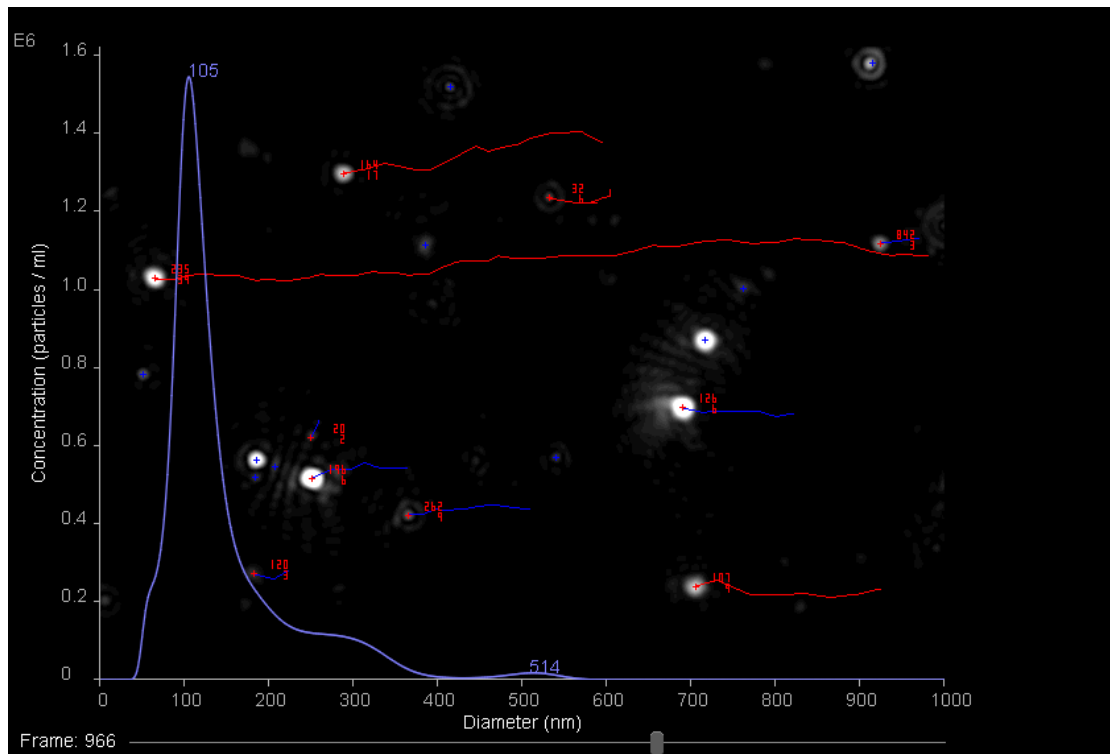
3.3 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)*

Βάσει του NTA, δίνονται αποτελέσματα που αφορούν το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων καθώς και της συγκέντρωσής τους μέσα στο διάλυμα που εξετάστηκε.



Διάγραμμα 18: Σχηματική απεικόνιση της κατανομής του μέσου μεγέθους των νανοσωματιδίων αργύρου.

Παρατηρείται ένα μέσο μέγεθος νανοσωματιδίων ίσο με 117.9 ± 2.7 nm και η συγκέντρωση των σωματιδίων στο διάλυμα ίση με $7.03e+07 \pm 7.95e+06$ particles/ml.

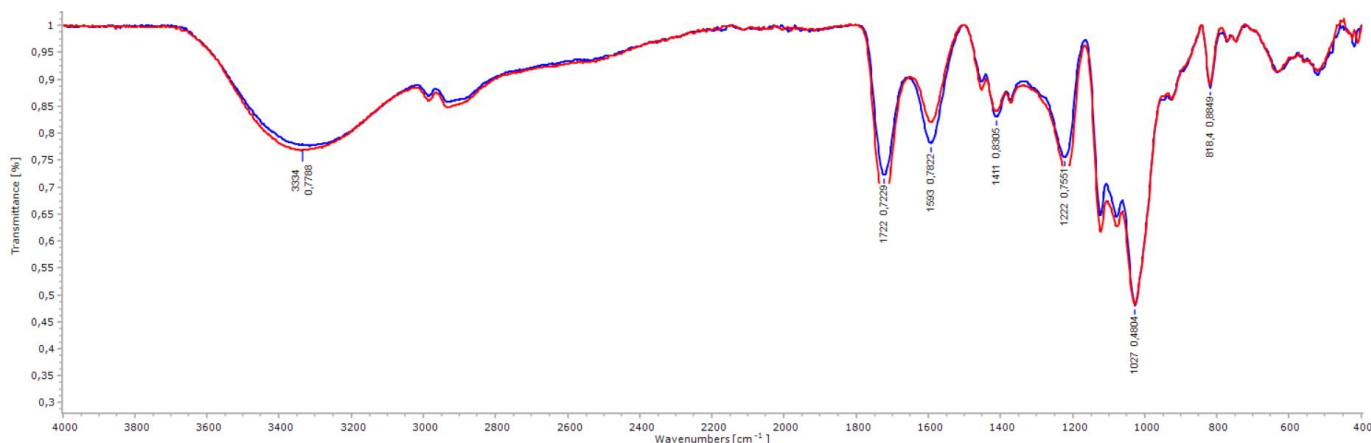


Εικόνα 26: Απεικόνιση της κίνησης των νανοσωματιδίων αργύρου μέσω NTA. Τα λευκά σημεία αντιπροσωπεύουν την αντανάκλαση των νανοσωματιδίων.

3.4 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού Φασματοσκοπίας Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Με τη μέθοδο FT-IR, αναλύθηκαν πέντε διαφορετικά δείγματα όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.6.6. Αρχίζοντας, αξίζει να αναφερθεί ο τρόπος που χαρακτηρίζεται κάθε διάγραμμα φάσματος που λαμβάνεται. Ο άξονας x απεικονίζει την ένταση των υπέρυθρων φασμάτων. Οι κορυφές, οι οποίες ονομάζονται επίσης ζώνες απορρόφησης, αντιστοιχούν στις διάφορες δονήσεις των ατόμων του δείγματος όταν αυτό εκτίθεται στην υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Για IR μεσαίου εύρους, ο αριθμός κύματος στο υπέρυθρο φάσμα απεικονίζεται μεταξύ 4000 και 400 cm^{-1} . Αντίστοιχα, ο άξονας y αντιπροσωπεύει την ποσότητα του υπέρυθρου φωτός που απορροφάται από το δείγμα που αναλύεται [182].

Επιπροσθέτως, διακρίνονται δύο χαρακτηριστικές περιοχές σε κάθε διάγραμμα. Η πρώτη αφορά τις ομαδικές συχνότητες που είναι χαρακτηριστικές λειτουργικών ομάδων όπως OH και εμφανίζονται πάνω από 1500 cm^{-1} . Η δεύτερη αφορά τις συχνότητες δακτυλικών αποτυπωμάτων όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως fingerprint region και είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικές για το μόριο στο σύνολό του. Αυτοί οι τύποι απορροφήσεων φαίνονται συνήθως κάτω από 1500 cm^{-1} [182].

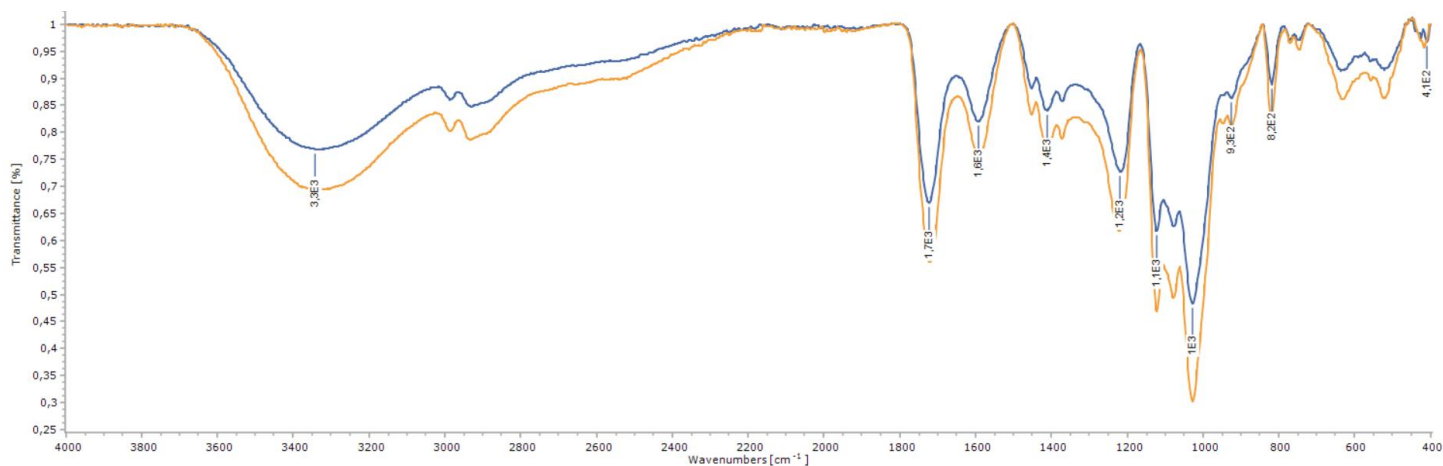


Διάγραμμα 19: Σύγκριση φασμάτων – Η μπλε γραμμή αποτελεί το δείγμα με αλγινικό 3% w/v και NADES 4 % v/v, ενώ η κόκκινη γραμμή είναι το δείγμα με αλγινικό 3% w/v και NADES 6% v/v.

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει την σύγκριση δύο δειγμάτων, που αποτελούν το ανώτατο και κατώτατο όριο της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος με το NADES (διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του αλγινικού), και επιλέχθηκαν στην ανάλυση βάσει Box – Behnken, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.5.1. Είναι φανερές οι ομοιότητες των δειγμάτων με ελάχιστες κορυφές να εμφανίζουν μεγαλύτερης έντασης φάσμα, γεγονός που εξηγείται από την μικρή αλλαγή στην συγκέντρωση του εκχυλίσματος.

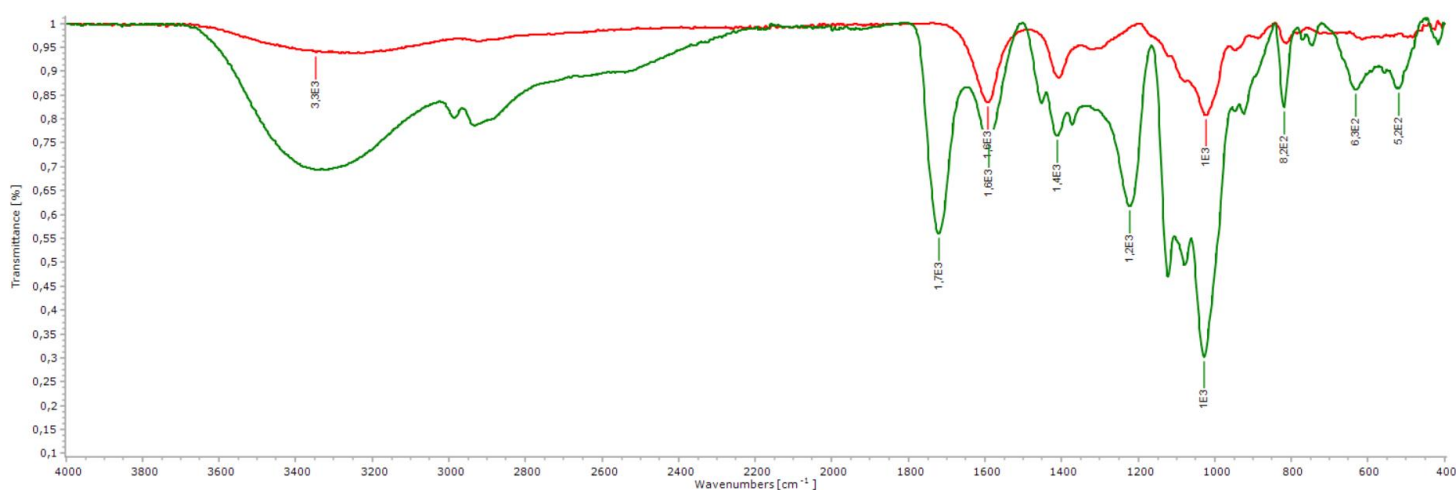
Αναλύοντας το διάγραμμα, διακρίνεται μια διευρυμένη κορυφή στα 3000 – 3600 cm^{-1} όπου βάσει βιβλιογραφίας, αποτελεί τη χαρακτηριστική κορυφή δόνηση τάσης (stretch) του δεσμού O-H (υδροξυλομάδες). Η μικρής έντασης απορρόφηση στα 2920 cm^{-1} προκύπτει από τους μεταβολίτες που δημιουργούνται από το εκχύλισμα χαμομηλιού [183]. Αντίστοιχα, οι κορυφές στα 1.593 και 1.411 cm^{-1} αντανakλούν την ασύμμετρη και συμμετρική έκταση από ομάδες καρβονυλίου (C=O) σε καρβοξυλικά ανιόντα. Οι κορυφές στα 818 cm^{-1} και 927 cm^{-1} αντιπροσωπεύουν τον δεσμό C-H του μανουρονικού οξέος και τον δεσμό C-H του γλυκουρονικού οξέος, αντίστοιχα, τα δύο κύρια συστατικά του αλγινικού όπως αναφέρεται και στην ενότητα 1.2.7 [184], [185].

Τα συστατικά του NADES (γλυκόζη και γαλακτικό οξύ), εμφανίζονται με τις χαρακτηριστικές κορυφές της γλυκόζης να είναι στα 1411 cm^{-1} για τη δόνηση κάμψης (bend) του δεσμού C-H και στα 1027 cm^{-1} για τη δόνηση τάσης του δεσμού C-O [186], ενώ του γαλακτικού οξέος στα 1722 cm^{-1} για την δόνηση τάσης του δεσμού C=O [185].



Διάγραμμα 20: Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το φάσμα της υδρογέλης που αποτελείται από 3% w/v αλγινικό και 5.4 %v/v NADES, ενώ με πορτοκαλί χρώμα η υδρογέλη με τις βέλτιστες συνθήκες δηλαδή: 5mM [AgNO₃], 5.4% v/v extract, 2 h. Οι δύο υδρογέλες έχουν ίδιο τρόπο διασταύρωσης, και η διαφορά τους είναι η παρουσία ή μη των νανοσωματιδίων αργύρου.

Στο συγκεκριμένο διάγραμμα γίνεται η σύγκριση ανάμεσα σε υδρογέλες που έχουν ίδια διασταύρωση δηλαδή το εκχύλισμα χαμομηλιού με το NADES, όμως η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός πως η μπλε γραμμή αποτελεί την υδρογέλη χωρίς νανοσωματίδια αργύρου ενώ η πορτοκαλί, αυτή που περιέχει νανοσωματίδια. Όπως διαφαίνεται, η υδρογέλη με τα νανοσωματίδια, δίνει μεγαλύτερης έντασης φάσματα συγκριτικά με την άλλη, κάτι που είναι φανερό από το βάθος των απορροφήσεων.



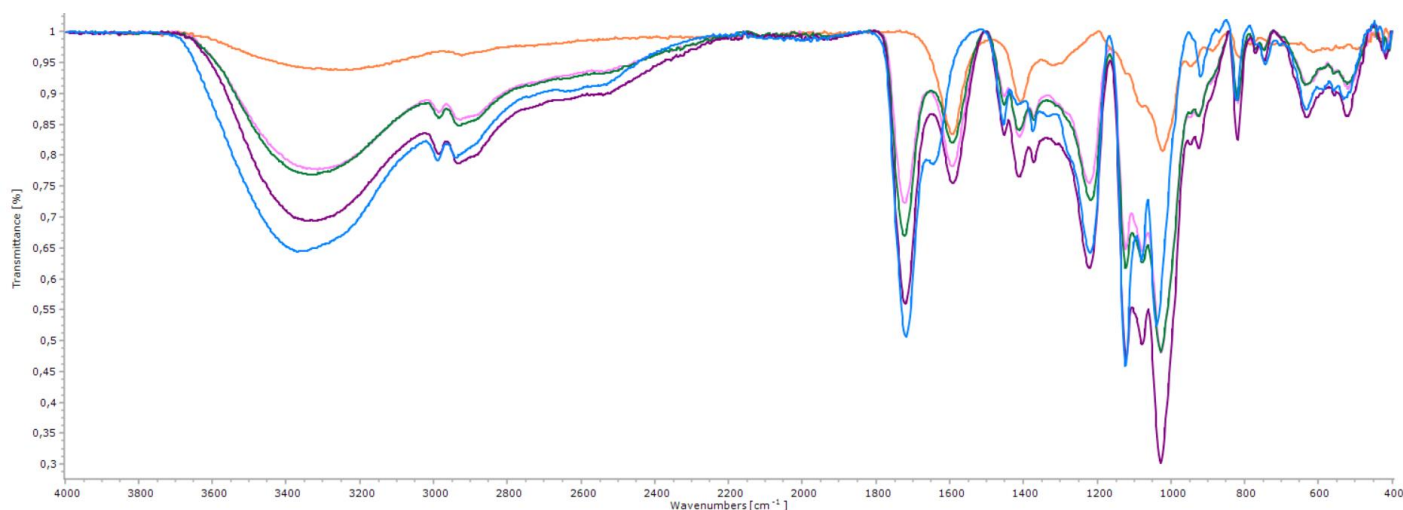
Διάγραμμα 21: Η κόκκινη γραμμή είναι η υδρογέλη διασυνδεδεμένη με διάλυμα CaCl₂ 1% w/v (συμβατική υδρογέλη), ενώ η πράσινη είναι διασυνδεδεμένη με NADES και περιέχει νανοσωματίδια αργύρου (βέλτιστη υδρογέλη με συνθήκες: 5mM [AgNO₃], 5.4% v/v extract, 2 h). Εκτός από διαφορετικό τρόπο διασταύρωσης, άλλη μία διαφορά τους είναι στην παρουσία ή μη των AgNPs.

Η σύγκριση του παρόντος διαγράμματος έγκειται ανάμεσα σε υδρογέλη με νανοσωματίδια (πράσινη) και τη συμβατική υδρογέλη χωρίς νανοσωματίδια (κόκκινη). Εκτός, από την απουσία ή μη των νανοσωματιδίων, μια ακόμα διαφορά είναι ο τρόπος διασταύρωσης, αφού η συμβατική διασυνδέεται με το CaCl₂, ενώ η βέλτιστη υδρογέλη διασυνδέεται μέσω του NADES.

Οι διαφορές τους είναι αρκετά έντονες γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στις διαφορετικές συνδέσεις που κάνει το αλγινικό με όλα τα συστατικά της βέλτιστης υδρογέλης, συγκριτικά με τις συνδέσεις που κάνει μόνο με το χλωριούχο ασβέστιο.

Πίνακας 13: Καταγραφή των χαρακτηριστικών κορυφών απορρόφησης από τη μέτρηση FTIR.

Χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης (cm ⁻¹)									
Δείγμα	-OH stretching	Stretching vibrations of aliphatic C-H	C=O bending	C=O Asymmetric stretching	C=O Symmetric stretching	C-N stretch aliphatic amines	C-O bending	C-H (Glucuronic acid)	C-H (Manuronic acid)
Αλγινικό 3% w/v - NADES 4 % v/v	3334	2900	1722	1593	1411	1222	1027	927	818
Αλγινικό 3% w/v - NADES 6 % v/v	3334	2900	1723	1593	1412	1218	1029	925	819
Αλγινικό 3% w/v - NADES 5.4 % v/v	3300	-	-	1593	1408	-	1024	-	-
Βέλτιστες συνθήκες 5mM [AgNO ₃], 5.4% v/v extract, 2 h	3321	2933	1721	1591	1412	1222	1028	924	819



Διάγραμμα 22: Απεικόνιση όλων των δειγμάτων που ελήφθησαν από τη μέθοδο FTIR. Τα δείγματα έχουν ως εξής: **1)** πορτοκαλί γραμμή: 3% w/v αλγινικό, δ/μα CaCl₂ 1% w/v, **2)** ροζ γραμμή: 3% w/v αλγινικό, 4% v/v NADES, **3)** πράσινη γραμμή: 3% w/v αλγινικό, 6% v/v NADES, **4)** μωβ γραμμή: βέλτιστη υδρογέλη (5mM [AgNO₃], 5.4% v/v extract, 2 hrs) και **5)** μπλε γραμμή: NADES.

3.5 Αποτελέσματα αναλύσεων για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC)

Ολοκληρώνοντας τη πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε στην ενότητα 2.6.7, παρατίθενται τα αποτελέσματα για την τιμή της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα ανάλυσης για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων.

<i>Εκχύλισμα χαμομηλιού</i>	TPC mgeq _{GAL} /g _{CHAMOMILE}	C_{GAL} (mg_{GAL}/mL) Συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος
		23.99 ± 0.76

3.6 Αποτελέσματα αναλύσεων για το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC)

Όσον αφορά τις φλαβονοειδείς ενώσεις, ακολουθεί ο πίνακας με τα αποτελέσματα συσχέτισης του εκχυλίσματος χαμομηλιού με την κατεχίνη.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα ανάλυσης για το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων.

<i>Εκχύλισμα χαμομηλιού</i>	TFC mgeq _{CAT} /g _{CHAMOMILE}	C_{CAT} (mg_{CAT}/mL) Συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε ισοδύναμα κατεχίνης
		3.69 ± 0.72

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μελέτη εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Ο Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης (NADES) αποτελούμενος από γλυκόζη, γαλακτικό οξύ και νερό δρα ως παράγοντας διασταύρωσης (crosslinker) για τον σχηματισμό της υδρογέλης αλγινικού.
- Το εκχύλισμα χαμομηλιού με χρήση του NADES ως εκχυλιστικό μέσο, ανάγει τον νιτρικό άργυρο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό νανοσωματιδίων αργύρου τα οποία απεικονίστηκαν μέσω Nanoparticle Tracking Analysis.
- Όσον αφορά τα νανοσωματίδια αργύρου, το μέσο ζ- δυναμικό ίσο με -33 mV , φανερώνει τη σταθερότητα του συστήματος.
- Ενώ έγινε μέτρηση μέσω UV-Vis Spectroscopy, δεν ήταν φανερή κάποια απορρόφηση, γεγονός που υποδεικνύει πως η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων που έχουν αποδεσμευθεί από την υδρογέλη είναι χαμηλή. Επομένως, το πλέγμα της υδρογέλης είναι αρκετά σταθερό και πυκνά διασυνδεδεμένο.
- Όσον αφορά την ικανότητα διόγκωσης της υδρογέλης, βρέθηκε πως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος χαμομηλιού και νιτρικού αργύρου, επιτυγχάνονται υψηλότερα ποσοστά διόγκωσης, πιθανόν λόγω των απωστικών τάσεων των νανοσωματιδίων που έχουν σχηματιστεί μέσα στα πλέγματα.
- Με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νιτρικό άργυρο, τόσο περισσότερα νανοσωματίδια αργύρου μπορούν να σχηματιστούν, γεγονός που οδηγεί στην απόθεση μεταξύ τους λόγω αύξησης του επιφανειακού φορτίου. Η απόθεση αυτή, δημιουργεί περισσότερο χώρο μέσα στο πλέγμα της υδρογέλης ούτως ώστε, τα μόρια νερού να συγκρατούνται για παραπάνω χρονικό διάστημα.
- Η ικανότητα συγκράτησης νερού ακολουθεί την ίδια πορεία, καταλήγοντας πως οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος και νιτρικού αργύρου δίνουν καλύτερα αποτελέσματα. Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί πως οι παραγόμενες υδρογέλες συσχετίστηκαν με υδρογέλες οι οποίες χρησιμοποιούν ως παράγοντα διασταύρωσης το χλωριούχο ασβέστιο, γνωστό από τη βιβλιογραφία για την δράση του ως παράγοντα διασταύρωσης σε υδρογέλες αλγινικού. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι πως οι υδρογέλες αυτές αν και είχαν εξαιρετικά μεγάλα ποσοστά διόγκωσης τα πρώτα λεπτά, αδυνατούσαν να συγκρατήσουν το νερό για περισσότερο χρόνο καθώς κατέρρεαν, σε αντίθεση με τις παραγόμενες

υδρογέλες οι οποίες έφτασαν ένα μέγιστο ποσοστό διόγκωσης έως και 1200% και διατηρούσαν σταθερό πλέγμα για έως και 40 min.

- Αναφορικά με τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων του εκχυλίσματος, βρίσκεται πως η συγκέντρωση του σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος είναι ίση με 0.144 mg_{gal}/ml, ενώ σε ισοδύναμα κατεχίνης είναι ίση με 0.088 mg_{CAT}/ml.

4.1 Μελλοντικές προτάσεις

Η παρούσα μελέτη φέρει θετικά αποτελέσματα σχετικά με την χρήση των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών και τα νανοσωματίδια αργύρου. Οι νανوسύνθετες υδρογέλες θα μπορούσαν να διευρυνθούν περαιτέρω όσον αφορά τη χρήση τους για επούλωση πληγών. Σε αυτό το πρίσμα, απαραίτητη είναι η μελέτη για την αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων αργύρου, καθώς και η εύρεση του κατάλληλου μεγέθους αυτών, ούτως ώστε να μην επέλθει κυτταροτοξικότητα. Έτσι, είναι ουσιώδες να πραγματοποιηθεί ο χαρακτηρισμός τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) ή ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM).

Συμπερασματικά, ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες θα μπορούσαν να είναι οι μελέτες που αφορούν τη συνθετική πορεία των νανοσωματιδίων αργύρου με τη χρήση διαφορετικών εκχυλισμάτων και συστατικών των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών.

Ολοκληρώνοντας, αξίζει να αναφερθεί η συμμετοχή στα παρακάτω συνέδρια:

- I.Pitterou, A. Tzavara, A.Malliaraki, A.Sklapani, A. Tzani, K.Tsiantas, A. Batrinou, C. Fountzoula, A. Kriebardis, P. Zoumpoulakis, A. Detsi, "Development and Optimization of a Green In Situ Synthesis of Silver Nanoparticles in Alginate Hydrogels", 3rd International Meeting on Deep Eutectic Systems, June 19-22, 2023, Lisbon, Portugal.
- I.Pitterou, A. Tzavara, A.Malliaraki, A. Tzani, K.Tsiantas, A. Batrinou, C. Fountzoula, A. Kriebardis, P. Zoumpoulakis, A. Detsi, "A step towards Green Nanotechnology: biomass-NADES extracts for the development of nanocomposite alginate-silver nanoparticles hydrogels", 10th International Conference on Sustainable Solid Waste Management. June 21-24, 2023 Chania, Greece.

- Pitterou, A. Tzavara, A. Malliaraki, E. M. Kousouli, A. Tzani, A. Detsi, "Development and Optimization of Green *In Situ* Synthesis of Silver Nanoparticles in Alginate Hydrogels", 12th Panhellenic Conference on Biomaterials of the Hellenic Society of Biomaterials, 15-17 December, 2022, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] R. P. Feynman, “Plenty of Room at the Bottom,” 1959.
- [2] Ramsden J. Jeremy, *Nanotechnology An Introduction*. 2011.
- [3] S. A. Saad and A. Elmahjubi, “Nanotechnology: Concepts, Importance and the Current State of Scientific Research,” AIJR Publisher, Dec. 2018, pp. 552–562. doi: 10.21467/proceedings.4.22.
- [4] Κ. Χαριτίδης, “Νανοδομές και νανοϋλικά,” 2011.
- [5] Α. Κυρίτσης, “Επιστήμη γυαλιών και νανοσύνθετων υλικών.” 2021.
- [6] C. Buzea, I. I. Pacheco, and K. Robbie, “Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity,” *Biointerphases*, vol. 2, no. 4, pp. MR17–MR71, Dec. 2007, doi: 10.1116/1.2815690.
- [7] M. Roy, “Nanocrystalline and Disordered Carbon Materials,” in *Functional Materials: Preparation, Processing and Applications*, Elsevier, 2011, pp. 675–706. doi: 10.1016/B978-0-12-385142-0.00017-9.
- [8] C. Daulbayev, F. Sultanov, B. Bakbolat, and O. Daulbayev, “0D, 1D and 2D nanomaterials for visible photoelectrochemical water splitting. A Review,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 45, no. 58. Elsevier Ltd, pp. 33325–33342, Nov. 27, 2020. doi: 10.1016/j.ijhydene.2020.09.101.
- [9] H. Zhao and Y. Lei, “3D Nanostructures for the Next Generation of High-Performance Nanodevices for Electrochemical Energy Conversion and Storage,” *Advanced Energy Materials*, vol. 10, no. 28. Wiley-VCH Verlag, Jul. 01, 2020. doi: 10.1002/aenm.202001460.
- [10] P. Beer and P. Singh, “TOP-DOWN AND BOTTOM-UP APPROACHES FOR SYNTHESIS OF NANOMATERIALS.”
- [11] G. A. Silva, “Introduction to nanotechnology and its applications to medicine,” *Surg Neurol*, vol. 61, no. 3, pp. 216–220, 2004, doi: 10.1016/j.surneu.2003.09.036.
- [12] A. Nicolae-Maranciuc, D. Chicea, and L. M. Chicea, “Ag Nanoparticles for Biomedical Applications—Synthesis and Characterization—A Review,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 10. MDPI, May 01, 2022. doi: 10.3390/ijms23105778.
- [13] P. Mathur, S. Jha, S. Ramteke, and N. K. Jain, “Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles,” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 46, no. sup1. Taylor and Francis Ltd., pp. 115–126, Oct. 31, 2018. doi: 10.1080/21691401.2017.1414825.
- [14] A. A. Yetisgin, S. Cetinel, M. Zuvin, A. Kosar, and O. Kutlu, “Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications,” *Molecules*, vol. 25, no. 9. MDPI AG, May 01, 2020. doi: 10.3390/molecules25092193.
- [15] P. G. Jamkhande, N. W. Ghule, A. H. Bamer, and M. G. Kalaskar, “Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications,” *Journal of Drug Delivery Science and*

- Technology*, vol. 53. Editions de Sante, Oct. 01, 2019. doi: 10.1016/j.jddst.2019.101174.
- [16] P. Singh, S. Pandit, V. R. S. S. Mokkapati, A. Garg, V. Ravikumar, and I. Mijakovic, "Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 7. MDPI AG, Jul. 06, 2018. doi: 10.3390/ijms19071979.
- [17] E. Amato *et al.*, "Synthesis, characterization and antibacterial activity against gram positive and gram negative bacteria of biomimetically coated silver nanoparticles," *Langmuir*, vol. 27, no. 15, pp. 9165–9173, Aug. 2011, doi: 10.1021/la201200r.
- [18] Y. Mao, Y. Bao, W. Wang, Z. Li, F. Li, and L. Niu, "Development and Application of Time-Resolved Surface Plasmon Resonance Spectrometer," *Am J Analyt Chem*, vol. 02, no. 05, pp. 589–604, 2011, doi: 10.4236/ajac.2011.25067.
- [19] X. Zhu and T. Gao, "Spectrometry," in *Nano-inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications*, Elsevier, 2018, pp. 237–264. doi: 10.1016/B978-0-12-815053-5.00010-6.
- [20] H. H. Nguyen, J. Park, S. Kang, and M. Kim, "Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications," *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 5. MDPI AG, pp. 10481–10510, May 05, 2015. doi: 10.3390/s150510481.
- [21] S. S. D. Kumar, N. K. Rajendran, N. N. Houreld, and H. Abrahamse, "Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 115. Elsevier B.V., pp. 165–175, Aug. 01, 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.003.
- [22] P. Mathur, S. Jha, S. Ramteke, and N. K. Jain, "Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles," *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 46, no. sup1. Taylor and Francis Ltd., pp. 115–126, Oct. 31, 2018. doi: 10.1080/21691401.2017.1414825.
- [23] E. McGillicuddy *et al.*, "Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology," *Science of the Total Environment*, vol. 575. Elsevier B.V., pp. 231–246, Jan. 01, 2017. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.041.
- [24] S. P. Deshmukh, S. M. Patil, S. B. Mullani, and S. D. Delekar, "Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review," *Materials Science and Engineering C*, vol. 97. Elsevier Ltd, pp. 954–965, Apr. 01, 2019. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.102.
- [25] V. A. Oyanedel-Craver and J. A. Smith, "Sustainable colloidal-silver-impregnated ceramic filter for point-of-use water treatment," *Environ Sci Technol*, vol. 42, no. 3, pp. 927–933, Feb. 2008, doi: 10.1021/es071268u.
- [26] M. Cushen, J. Kerry, M. Morris, M. Cruz-Romero, and E. Cummins, "Nanotechnologies in the food industry - Recent developments, risks and regulation," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 24, no. 1. pp. 30–46, Mar. 2012. doi: 10.1016/j.tifs.2011.10.006.

- [27] M. K. Rai, S. D. Deshmukh, A. P. Ingle, and A. K. Gade, “Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 112, no. 5. pp. 841–852, May 2012. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x.
- [28] S. P. Deshmukh, S. M. Patil, S. B. Mullani, and S. D. Delekar, “Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 97. Elsevier Ltd, pp. 954–965, Apr. 01, 2019. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.102.
- [29] I. X. Yin, J. Zhang, I. S. Zhao, M. L. Mei, Q. Li, and C. H. Chu, “The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 15. Dove Medical Press Ltd., pp. 2555–2562, 2020. doi: 10.2147/IJN.S246764.
- [30] Y. M. Long *et al.*, “Surface ligand controls silver ion release of nanosilver and its antibacterial activity against *Escherichia coli*,” *Int J Nanomedicine*, vol. 12, pp. 3193–3206, Apr. 2017, doi: 10.2147/IJN.S132327.
- [31] T. C. Dakal, A. Kumar, R. S. Majumdar, and V. Yadav, “Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles,” *Front Microbiol*, vol. 7, no. NOV, Nov. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01831.
- [32] J. R. Morones *et al.*, “The bactericidal effect of silver nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2346–2353, Oct. 2005, doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059.
- [33] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, “Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, no. 6, pp. 1712–1720, Mar. 2007, doi: 10.1128/AEM.02218-06.
- [34] A. Panáček *et al.*, “Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 33, pp. 16248–16253, Aug. 2006, doi: 10.1021/jp063826h.
- [35] X. Hong, J. Wen, X. Xiong, and Y. Hu, “Shape effect on the antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized via a microwave-assisted method,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, no. 5, pp. 4489–4497, Mar. 2016, doi: 10.1007/s11356-015-5668-z.
- [36] S. H. Lee and B. H. Jun, “Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 4. MDPI AG, Feb. 02, 2019. doi: 10.3390/ijms20040865.
- [37] Z. Ferdous and A. Nemmar, “Health impact of silver nanoparticles: A review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 7. MDPI AG, Apr. 01, 2020. doi: 10.3390/ijms21072375.
- [38] X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, “Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 9. MDPI AG, Sep. 13, 2016. doi: 10.3390/ijms17091534.

- [39] P. Slepíčka, N. S. Kasálková, J. Siegel, Z. Kolská, and V. Švorčík, “Methods of gold and silver nanoparticles preparation,” *Materials*, vol. 13, no. 1. MDPI, Jan. 01, 2020. doi: 10.3390/ma13010001.
- [40] M. Kim, S. Osone, T. Kim, H. Higashi, and T. Seto, “Synthesis of nanoparticles by laser ablation: A review,” *KONA Powder and Particle Journal*, vol. 2017, no. 34. Hosokawa Powder Technology Foundation, pp. 80–90, 2017. doi: 10.14356/kona.2017009.
- [41] P. Stavropoulos, C. Palagas, G. N. Angelopoulos, D. N. Papamantellos, and S. Couris, “Calibration measurements in laser-induced breakdown spectroscopy using nanosecond and picosecond lasers,” *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, vol. 59, no. 12, pp. 1885–1892, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.sab.2004.08.005.
- [42] C. Aragón and J. A. Aguilera, “Characterization of laser induced plasmas by optical emission spectroscopy: A review of experiments and methods,” *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, vol. 63, no. 9. pp. 893–916, Sep. 2008. doi: 10.1016/j.sab.2008.05.010.
- [43] S. Link, C. Burda, M. B. Mohamed, B. Nikoobakht, and M. A. El-Sayed, “Laser Photothermal Melting and Fragmentation of Gold Nanorods: Energy and Laser Pulse-Width Dependence,” *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 103, no. 9. American Chemical Society, 1999. doi: 10.1021/jp983141k.
- [44] A. Syafiuddin, Salmiati, M. R. Salim, A. Beng Hong Kueh, T. Hadibarata, and H. Nur, “A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges,” *Journal of the Chinese Chemical Society*, vol. 64, no. 7. Chinese Chemical Society Taiwan, pp. 732–756, Jul. 01, 2017. doi: 10.1002/jccs.201700067.
- [45] P. Nancy, J. James, S. Valluvadasan, R. A. V. Kumar, and N. Kalarikkal, “Laser-plasma driven green synthesis of size controlled silver nanoparticles in ambient liquid,” *Nano-Structures and Nano-Objects*, vol. 16, pp. 337–346, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.nanoso.2018.09.006.
- [46] F. E. Kruis, H. Fissan, and B. Rellinghaus, “Sintering and evaporation characteristics of gas-phase synthesis of size-selected PbS nanoparticles,” 2000. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/mseb
- [47] J. H. Jung, H. Cheol Oh, H. Soo Noh, J. H. Ji, and S. Soo Kim, “Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area,” *J Aerosol Sci*, vol. 37, no. 12, pp. 1662–1670, 2006, doi: 10.1016/j.jaerosci.2006.09.002.
- [48] J. Siegel, O. Kvítek, P. Ulbrich, Z. Kolská, P. Slepíčka, and V. Švorčík, “Progressive approach for metal nanoparticle synthesis,” *Mater Lett*, vol. 89, pp. 47–50, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.matlet.2012.08.048.
- [49] N. Baig, I. Kammakakam, W. Falath, and I. Kammakakam, “Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges,” *Materials Advances*, vol. 2, no. 6. Royal Society of Chemistry, pp. 1821–1871, Mar. 21, 2021. doi: 10.1039/d0ma00807a.
- [50] R. Tien *et al.*, “Novel Technique for Preparing a Nano-Silver Water Suspension by the Arc-Discharge Method,” 2008.

- [51] X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, “Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 9. MDPI AG, Sep. 13, 2016. doi: 10.3390/ijms17091534.
- [52] L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z. S. Chen, and G. Chen, “Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications,” *Drug Discovery Today*, vol. 20, no. 5. Elsevier Ltd, pp. 595–601, May 01, 2015. doi: 10.1016/j.drudis.2014.11.014.
- [53] A. Almatroudi, “Silver nanoparticles: Synthesis, characterisation and biomedical applications,” *Open Life Sciences*, vol. 15, no. 1. De Gruyter Open Ltd, pp. 819–839, Jan. 01, 2020. doi: 10.1515/biol-2020-0094.
- [54] X. Dong, X. Ji, H. Wu, L. Zhao, J. Li, and W. Yang, “Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction,” *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, no. 16, pp. 6573–6576, Apr. 2009, doi: 10.1021/jp900775b.
- [55] J. García-Barrasa, J. M. López-De-luzuriaga, and M. Monge, “Silver nanoparticles: Synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications,” *Central European Journal of Chemistry*, vol. 9, no. 1, pp. 7–19, 2011, doi: 10.2478/s11532-010-0124-x.
- [56] D. Yu and V. W. W. Yam, “Controlled synthesis of monodisperse silver nanocubes in water,” *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 41, pp. 13200–13201, Oct. 2004, doi: 10.1021/ja046037r.
- [57] Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, and M. Nakamoto, “Facile size-regulated synthesis of silver nanoparticles by controlled thermolysis of silver alkylcarboxylates in the presence of alkylamines with different chain lengths,” *J Colloid Interface Sci*, vol. 300, no. 1, pp. 169–175, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.jcis.2006.03.041.
- [58] V. Marina, T. Petros, G. Ruben, and V. Vasilis, “Synthesis and Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticles Produced by Turkevich Methods and Cold Atmospheric Plasma Co-supervisors,” 2019.
- [59] V. S. S. K. Kondeti, U. Gangal, S. Yatom, and P. J. Bruggeman, “Ag + reduction and silver nanoparticle synthesis at the plasma–liquid interface by an RF driven atmospheric pressure plasma jet: Mechanisms and the effect of surfactant ,” *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 35, no. 6, p. 061302, Nov. 2017, doi: 10.1116/1.4995374.
- [60] H. Chugh, D. Sood, I. Chandra, V. Tomar, G. Dhawan, and R. Chandra, “Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine,” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 46, no. sup1. Taylor and Francis Ltd., pp. 1210–1220, Oct. 31, 2018. doi: 10.1080/21691401.2018.1449118.
- [61] K. Deplanche, I. Caldelari, I. P. Mikheenko, F. Sargent, and L. E. Macaskie, “Involvement of hydrogenases in the formation of highly catalytic Pd(0) nanoparticles by bioreduction of Pd(II) using *Escherichia coli* mutant strains,” *Microbiology (N Y)*, vol. 156, no. 9, pp. 2630–2640, Sep. 2010, doi: 10.1099/mic.0.036681-0.

- [62] P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, and L. E. Macaskie, "Bioaccumulation of palladium by *Desulfovibrio desulfuricans*," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 77, no. 5, pp. 593–601, 2002, doi: 10.1002/jctb.606.
- [63] A. Rónavári *et al.*, "Green silver and gold nanoparticles: Biological synthesis approaches and potentials for biomedical applications," *Molecules*, vol. 26, no. 4, Feb. 2021, doi: 10.3390/molecules26040844.
- [64] N. I. Hulkoti and T. C. Taranath, "Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 121. Elsevier, pp. 474–483, Sep. 01, 2014. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.05.027.
- [65] N. Pantidos, "Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants," *J Nanomed Nanotechnol*, vol. 05, no. 05, 2014, doi: 10.4172/2157-7439.1000233.
- [66] N. L. Pacioni, C. D. Borsarelli, V. Rey, and A. v. Veglia, "Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles: A Mechanistic Perspective," in *Engineering Materials*, Springer Science and Business Media B.V., 2015, pp. 13–46. doi: 10.1007/978-3-319-11262-6_2.
- [67] L. Xu, Y. Y. Wang, J. Huang, C. Y. Chen, Z. X. Wang, and H. Xie, "Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety," *Theranostics*, vol. 10, no. 20. Ivyspring International Publisher, pp. 8996–9031, 2020. doi: 10.7150/thno.45413.
- [68] M. F. Lengke, M. E. Fleet, and G. Southam, "Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver(I) nitrate complex," *Langmuir*, vol. 23, no. 5, pp. 2694–2699, Feb. 2007, doi: 10.1021/la0613124.
- [69] J. G. Fernández *et al.*, "Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi," *Process Biochemistry*, vol. 51, no. 9, pp. 1306–1313, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.procbio.2016.05.021.
- [70] M. A. al Abboud, "Fungal biosynthesis of silver nanoparticles and their role in control of Fusarium wilt of sweet pepper and soil-borne fungi in vitro," *International Journal of Pharmacology*, vol. 14, no. 6, pp. 773–780, 2018, doi: 10.3923/ijp.2018.773.780.
- [71] S. Neethu, S. J. Midhun, E. K. Radhakrishnan, and M. Jyothis, "Green synthesized silver nanoparticles by marine endophytic fungus *Penicillium polonicum* and its antibacterial efficacy against biofilm forming, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*," *Microb Pathog*, vol. 116, pp. 263–272, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.micpath.2018.01.033.
- [72] A. K. Gade, P. Bonde, A. P. Ingle, P. D. Marcato, N. Durán, and M. K. Rai, "Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles," *J Biobased Mater Bioenergy*, vol. 2, no. 3, pp. 243–247, Sep. 2008, doi: 10.1166/jbmb.2008.401.
- [73] L. Devi and S. Joshi, "Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi," *J Microsc Ultrastruct*, vol. 3, no. 1, p. 29, 2015, doi: 10.1016/j.jmau.2014.10.004.

- [74] D. Sharma, S. Kanchi, and K. Bisetty, "Biogenic synthesis of nanoparticles: A review," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 12, no. 8. Elsevier B.V., pp. 3576–3600, Dec. 01, 2019. doi: 10.1016/j.arabjc.2015.11.002.
- [75] P. Khanna, A. Kaur, and D. Goyal, "Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 163. Elsevier B.V., Aug. 01, 2019. doi: 10.1016/j.mimet.2019.105656.
- [76] H. Noreen, N. Semmar, M. Farman, and J. S. O. McCullagh, "Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*," *Asian Pac J Trop Med*, vol. 10, no. 8, pp. 792–801, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.apjtm.2017.07.024.
- [77] N. Mokhtar, M. F. M. Nordin, and N. A. Morad, "Total phenolic content, total flavonoid content and radical scavenging activity from zingiber zerumbet rhizome using subcritical water extraction," *International Journal of Engineering, Transactions B: Applications*, vol. 31, no. 8, pp. 1421–1429, Aug. 2018, doi: 10.5829/ije.2018.31.08b.34.
- [78] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra, "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health," *Pharmacognosy Reviews*, vol. 4, no. 8. pp. 118–126, Jul. 2010. doi: 10.4103/0973-7847.70902.
- [79] R. A. Gonçalves, R. P. Toledo, N. Joshi, and O. M. Berengue, "Green synthesis and applications of zno and tio2 nanostructures," *Molecules*, vol. 26, no. 8. MDPI AG, 2021. doi: 10.3390/molecules26082236.
- [80] R. D. Rivera-Rangel, M. P. González-Muñoz, M. Avila-Rodriguez, T. A. Razo-Lazcano, and C. Solans, "Green synthesis of silver nanoparticles in oil-in-water microemulsion and nano-emulsion using geranium leaf aqueous extract as a reducing agent," *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 536, pp. 60–67, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.07.051.
- [81] A. A. Alyamani, S. Albukhaty, S. Aloufi, F. A. Almalki, H. Al-Karagoly, and G. M. Sulaiman, "Green fabrication of zinc oxide nanoparticles using phlomis leaf extract: Characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity and antibacterial properties," *Molecules*, vol. 26, no. 20, Oct. 2021, doi: 10.3390/molecules26206140.
- [82] Y. S. Liu, Y. C. Chang, and H. H. Chen, "Silver nanoparticle biosynthesis by using phenolic acids in rice husk extract as reducing agents and dispersants," *J Food Drug Anal*, vol. 26, no. 2, pp. 649–656, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.jfda.2017.07.005.
- [83] E. Bulut and M. Özacar, "Rapid, facile synthesis of silver nanostructure using hydrolyzable tannin," *Ind Eng Chem Res*, vol. 48, no. 12, pp. 5686–5690, Jun. 2009, doi: 10.1021/ie801779f.
- [84] A. A. Alshehri and M. A. Malik, "Phytomediated photo-induced green synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria chamomilla* L. and its catalytic activity against rhodamine B," *Biomolecules*, vol. 10, no. 12, pp. 1–24, Dec. 2020, doi: 10.3390/biom10121604.

- [85] V. v Makarov *et al.*, “‘Green’ Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants,” 2014.
- [86] V. K. Vidhu, S. A. Aromal, and D. Philip, “Green synthesis of silver nanoparticles using *Macrotyloma uniflorum*,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 83, no. 1, pp. 392–397, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.saa.2011.08.051.
- [87] D. Skarpalezos and A. Detsi, “Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 9, no. 19. MDPI AG, Oct. 01, 2019. doi: 10.3390/app9194169.
- [88] A. K. Mittal, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, “Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts,” *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 2. pp. 346–356, Mar. 2013. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.003.
- [89] K. S. Mukunthan and S. Balaji, “Cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) speeds up the synthesis of silver nanoparticles,” *Int J Green Nanotechnol Biomed*, vol. 4, no. 2, pp. 71–79, 2012, doi: 10.1080/19430892.2012.676900.
- [90] V. Gupta, P. Mittal, P. Bansal, S. L. Khokra, and D. Kaushik, “Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*-A Review,” 2010. [Online]. Available: www.ijpsdr.com
- [91] E. Dogru, A. Demirbas, B. Altinsoy, F. Duman, and I. Ocsoy, “Formation of *Matricaria chamomilla* extract-incorporated Ag nanoparticles and size-dependent enhanced antimicrobial property,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 174, pp. 78–83, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.07.024.
- [92] A. A. Alshehri and M. A. Malik, “Phytomediated photo-induced green synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria chamomilla* L. and its catalytic activity against rhodamine B,” *Biomolecules*, vol. 10, no. 12, pp. 1–24, Dec. 2020, doi: 10.3390/biom10121604.
- [93] Brannon-Peppas L, “Preparation and characterization of crosslinked hydrophilic networks. Absorbent Polymer Technology,” in *Absorbent Polymer Technology, Studies in Polymer Sci* 8:46–66, 1990.
- [94] Y. Zhang, C.-Y. Won, and C.-C. Chu, “Synthesis and Characterization of Biodegradable Network Hydrogels Having Both Hydrophobic and Hydrophilic Components with Controlled Swelling Behavior,” 1999.
- [95] S. Thakur, V. K. Thakur, and O. A. Arotiba, “History, Classification, Properties and Application of Hydrogels: An Overview,” 2018, pp. 29–50. doi: 10.1007/978-981-10-6077-9_2.
- [96] A. S. Hoffman, “Hydrogels for biomedical applications,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. SUPPL. pp. 18–23, Dec. 2012. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010.
- [97] M. Bustamante-Torres, D. Romero-Fierro, B. Arcentales-Vera, K. Palomino, H. Magaña, and E. Bucio, “Hydrogels classification according to the physical or chemical interactions and as stimuli-sensitive materials,” *Gels*, vol. 7, no. 4. MDPI, Dec. 01, 2021. doi: 10.3390/gels7040182.

- [98] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review," *Journal of Advanced Research*, vol. 6, no. 2. Elsevier B.V., pp. 105–121, 2015. doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [99] P. Sikdar *et al.*, "Recent advances in the synthesis of smart hydrogels," *Materials Advances*, vol. 2, no. 14. Royal Society of Chemistry, pp. 4532–4573, Jul. 21, 2021. doi: 10.1039/d1ma00193k.
- [100] T. C. Ho *et al.*, "Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine," *Molecules*, vol. 27, no. 9. MDPI, May 01, 2022. doi: 10.3390/molecules27092902.
- [101] V. S. Raghuwanshi and G. Garnier, "Characterisation of hydrogels: Linking the nano to the microscale," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 274. Elsevier B.V., Dec. 01, 2019. doi: 10.1016/j.cis.2019.102044.
- [102] S. , H. M. , A. M. et al. Zafar, "Role of crosslinkers for synthesizing biocompatible, biodegradable and mechanically strong hydrogels with desired release profile," *Polym. Bull.* 79, 9199–9219, 2022.
- [103] Y. Zhang and Y. Huang, "Rational Design of Smart Hydrogels for Biomedical Applications," *Frontiers in Chemistry*, vol. 8. Frontiers Media S.A., Feb. 04, 2021. doi: 10.3389/fchem.2020.615665.
- [104] S. Park and K. M. Park, "Engineered polymeric hydrogels for 3D tissue models," *Polymers*, vol. 8, no. 1. MDPI AG, 2016. doi: 10.3390/polym8010023.
- [105] H. Suo, D. Zhang, J. Yin, J. Qian, Z. L. Wu, and J. Fu, "Interpenetrating polymer network hydrogels composed of chitosan and photocrosslinkable gelatin with enhanced mechanical properties for tissue engineering," *Materials Science and Engineering C*, vol. 92, pp. 612–620, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.07.016.
- [106] N. A. Peppas, B. v. Slaughter, and M. A. Kanelberger, "Hydrogels," in *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set*, Elsevier, 2012, pp. 385–395. doi: 10.1016/B978-0-444-53349-4.00226-0.
- [107] D. K. Baby, "Rheology of hydrogels," in *Rheology of Polymer Blends and Nanocomposites: Theory, Modelling and Applications*, Elsevier, 2019, pp. 193–204. doi: 10.1016/B978-0-12-816957-5.00009-4.
- [108] J. Y. Sun *et al.*, "Highly stretchable and tough hydrogels," *Nature*, vol. 489, no. 7414, pp. 133–136, Sep. 2012, doi: 10.1038/nature11409.
- [109] A. Shaheen, M. Maswal, and A. A. Dar, "Synergistic effect of various metal ions on the mechanical, thixotropic, self-healing, swelling and water retention properties of bimetallic hydrogels of alginate," *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 627, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.127223.
- [110] N. A. Peppas and A. S. Hoffman, "Hydrogels."
- [111] P. Sikdar *et al.*, "Recent advances in the synthesis of smart hydrogels," *Materials Advances*, vol. 2, no. 14. Royal Society of Chemistry, pp. 4532–4573, Jul. 21, 2021. doi: 10.1039/d1ma00193k.
- [112] G. Z. Kyzas and N. K. Lazaridis, "Reactive and basic dyes removal by sorption onto chitosan derivatives," *J Colloid Interface Sci*, vol. 331, no. 1, pp. 32–39, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.jcis.2008.11.003.

- [113] N. H. N. Do, Q. T. Truong, P. K. Le, and A. C. Ha, “Recent developments in chitosan hydrogels carrying natural bioactive compounds,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 294. Elsevier Ltd, Oct. 15, 2022. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119726.
- [114] E. Caló and V. v. Khutoryanskiy, “Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products,” *European Polymer Journal*, vol. 65. Elsevier Ltd, pp. 252–267, 2015. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.
- [115] C. Zhou *et al.*, “Advances and challenges in conductive hydrogels: From properties to applications,” *Eur Polym J*, vol. 177, p. 111454, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111454.
- [116] F. Fan, S. Saha, and D. Hanjaya-Putra, “Biomimetic Hydrogels to Promote Wound Healing,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9. Frontiers Media S.A., Sep. 20, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.718377.
- [117] V. Hegde, U. T. Uthappa, T. Altalhi, H.-Y. Jung, S. S. Han, and M. D. Kurkuri, “Alginate based polymeric systems for drug delivery, antibacterial/microbial, and wound dressing applications,” *Mater Today Commun*, vol. 33, p. 104813, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.mtcomm.2022.104813.
- [118] N. M. Sanchez-Ballester, B. Bataille, and I. Soulairol, “Sodium alginate and alginic acid as pharmaceutical excipients for tablet formulation: Structure-function relationship,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 270. Elsevier Ltd, Oct. 15, 2021. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118399.
- [119] C. Weller, “Interactive dressings and their role in moist wound management,” in *Advanced Textiles for Wound Care: A Volume in Woodhead Publishing Series in Textiles*, Elsevier Inc., 2009, pp. 97–113. doi: 10.1533/9781845696306.1.97.
- [120] J. Stojkowska, D. Kostić, Ž. Jovanović, M. Vukašinović-Sekulić, V. Mišković-Stanković, and B. Obradović, “A comprehensive approach to in vitro functional evaluation of Ag/alginate nanocomposite hydrogels,” *Carbohydr Polym*, vol. 111, pp. 305–314, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.063.
- [121] M. G. Dekamin *et al.*, “Alginic acid: A mild and renewable bifunctional heterogeneous biopolymeric organocatalyst for efficient and facile synthesis of polyhydroquinolines,” *Int J Biol Macromol*, vol. 108, pp. 1273–1280, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.050.
- [122] J. T. Oliveira and R. L. Reis, “Hydrogels from polysaccharide-based materials: Fundamentals and applications in regenerative medicine,” in *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications*, Elsevier Ltd., 2008, pp. 485–514. doi: 10.1533/9781845694814.4.485.
- [123] D. Li *et al.*, “Egg-box structure in cobalt alginate: A new approach to multifunctional hierarchical mesoporous N-doped carbon nanofibers for efficient catalysis and energy storage,” *ACS Cent Sci*, vol. 1, no. 5, pp. 261–269, Aug. 2015, doi: 10.1021/acscentsci.5b00191.
- [124] P. M. Bedê, M. H. P. da Silva, A. B. H. da Silva Figueiredo, and P. V. Finotelli, “Nanostructured magnetic alginate composites for biomedical applications,” *Polimeros*, vol. 27, no. 4, pp. 267–272, Oct. 2017, doi: 10.1590/0104-1428.2267.

- [125] J. Stojkowska, D. Kostić, Ž. Jovanović, M. Vukašinović-Sekulić, V. Mišković-Stanković, and B. Obradović, “A comprehensive approach to in vitro functional evaluation of Ag/alginate nanocomposite hydrogels,” *Carbohydr Polym*, vol. 111, pp. 305–314, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.063.
- [126] A. S. Montaser *et al.*, “Preparation and characterization of alginate/silver/nicotinamide nanocomposites for treating diabetic wounds,” *Int J Biol Macromol*, vol. 92, pp. 739–747, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.050.
- [127] P. Anastas and N. Eghbali, “Green Chemistry: Principles and Practice,” *Chem Soc Rev*, vol. 39, no. 1, pp. 301–312, Dec. 2010, doi: 10.1039/b918763b.
- [128] E. Harrison and I. Dekker, “Designing & Facilitating a Bioeconomy in the Capital Regional District Learning Through the Lenses of Biomimicry, Industrial Symbiosis, and Green Chemistry.” [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/351060324>
- [129] O. v. Kharissova, B. I. Kharisov, C. M. O. González, Y. P. Méndez, and I. López, “Greener synthesis of chemical compounds and materials,” *Royal Society Open Science*, vol. 6, no. 11. Royal Society Publishing, Nov. 01, 2019. doi: 10.1098/rsos.191378.
- [130] L. Lomba, C. B. García, M. P. Ribate, B. Giner, and E. Zuriaga, “Applications of deep eutectic solvents related to health, synthesis, and extraction of natural based chemicals,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 11, no. 21. MDPI, Nov. 01, 2021. doi: 10.3390/app112110156.
- [131] S. P. Ijardar, V. Singh, and R. L. Gardas, “Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents,” *Molecules*, vol. 27, no. 4. MDPI, Feb. 01, 2022. doi: 10.3390/molecules27041368.
- [132] E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, “Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications,” *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 21. American Chemical Society, pp. 11060–11082, Nov. 12, 2014. doi: 10.1021/cr300162p.
- [133] S. P. Ijardar, V. Singh, and R. L. Gardas, “Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents,” *Molecules*, vol. 27, no. 4. MDPI, Feb. 01, 2022. doi: 10.3390/molecules27041368.
- [134] C. Florindo, F. S. Oliveira, L. P. N. Rebelo, A. M. Fernandes, and I. M. Marrucho, “Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids,” *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 2, no. 10, pp. 2416–2425, Oct. 2014, doi: 10.1021/sc500439w.
- [135] M. C. Gutiérrez, M. L. Ferrer, C. R. Mateo, and F. del Monte, “Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures,” *Langmuir*, vol. 25, no. 10, pp. 5509–5515, May 2009, doi: 10.1021/la900552b.
- [136] B. B. Hansen *et al.*, “Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications,” *Chemical Reviews*, vol. 121, no. 3. American Chemical Society, pp. 1232–1285, Feb. 10, 2021. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00385.

- [137] Y. Nahar and S. C. Thickett, “Greener, faster, stronger: The benefits of deep eutectic solvents in polymer and materials science,” *Polymers*, vol. 13, no. 3. MDPI AG, pp. 1–24, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/polym13030447.
- [138] C. A. Nkuku and R. J. LeSuer, “Electrochemistry in deep eutectic solvents,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, no. 46, pp. 13271–13277, Nov. 2007, doi: 10.1021/jp075794j.
- [139] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, and V. Tambyrajah, “Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures,” *Chemical Communications*, no. 1, pp. 70–71, 2003, doi: 10.1039/b210714g.
- [140] P. Kalhor and K. Ghandi, “Deep eutectic solvents for pretreatment, extraction, and catalysis of biomass and food waste,” *Molecules*, vol. 24, no. 22. MDPI AG, Nov. 06, 2019. doi: 10.3390/molecules24224012.
- [141] Q. Zhang, K. de Oliveira Vigier, S. Royer, and F. Jérôme, “Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications,” *Chem Soc Rev*, vol. 41, no. 21, pp. 7108–7146, Oct. 2012, doi: 10.1039/c2cs35178a.
- [142] M. H. Shafie, R. Yusof, and C. Y. Gan, “Synthesis of citric acid monohydrate-choline chloride based deep eutectic solvents (DES) and characterization of their physicochemical properties,” *J Mol Liq*, vol. 288, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.111081.
- [143] A. Basaiahgari, S. Panda, and R. L. Gardas, “Effect of Ethylene, Diethylene, and Triethylene Glycols and Glycerol on the Physicochemical Properties and Phase Behavior of Benzyltrimethyl and Benzyltributylammonium Chloride Based Deep Eutectic Solvents at 283.15–343.15 K,” *J Chem Eng Data*, vol. 63, no. 7, pp. 2613–2627, Jul. 2018, doi: 10.1021/acs.jced.8b00213.
- [144] D. Lapeña, F. Bergua, L. Lomba, B. Giner, and C. Lafuente, “A comprehensive study of the thermophysical properties of reline and hydrated reline,” *J Mol Liq*, vol. 303, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2020.112679.
- [145] C. Ma, A. Laaksonen, C. Liu, X. Lu, and X. Ji, “The peculiar effect of water on ionic liquids and deep eutectic solvents,” *Chemical Society Reviews*, vol. 47, no. 23. Royal Society of Chemistry, pp. 8685–8720, Dec. 07, 2018. doi: 10.1039/c8cs00325d.
- [146] A. P. Abbott, “Model for the conductivity of ionic liquids based on an infinite dilution of holes,” *ChemPhysChem*, vol. 6, no. 12, pp. 2502–2505, 2005, doi: 10.1002/cphc.200500283.
- [147] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, and R. K. Rasheed, “Ionic liquid analogues formed from hydrated metal salts,” *Chemistry - A European Journal*, vol. 10, no. 15, pp. 3769–3774, Aug. 2004, doi: 10.1002/chem.200400127.
- [148] Eric. Lichtfouse, Jan. Schwarzbauer, and D. (Environmental chemist) Robert, *Environmental chemistry: green chemistry and pollutants in ecosystems*. Springer, 2005.
- [149] P. Kalhor and K. Ghandi, “Deep eutectic solvents for pretreatment, extraction, and catalysis of biomass and food waste,” *Molecules*, vol. 24, no. 22. MDPI AG, Nov. 06, 2019. doi: 10.3390/molecules24224012.

- [150] D. Tolmachev *et al.*, “Computer Simulations of Deep Eutectic Solvents: Challenges, Solutions, and Perspectives,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 2. MDPI, Jan. 01, 2022. doi: 10.3390/ijms23020645.
- [151] J. Serna-Vázquez, M. Z. Ahmad, G. Boczkaj, and R. Castro-Muñoz, “Latest insights on novel deep eutectic solvents (DES) for sustainable extraction of phenolic compounds from natural sources,” *Molecules*, vol. 26, no. 16. MDPI AG, Aug. 02, 2021. doi: 10.3390/molecules26165037.
- [152] Y. H. Choi and R. Verpoorte, “Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents,” *Current Opinion in Food Science*, vol. 26. Elsevier Ltd, pp. 87–93, Apr. 01, 2019. doi: 10.1016/j.cofs.2019.04.003.
- [153] H. Vanda, Y. Dai, E. G. Wilson, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, “Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents,” *Comptes Rendus Chimie*, vol. 21, no. 6, pp. 628–638, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.crci.2018.04.002.
- [154] F. Chemat *et al.*, “Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects,” *Molecules*, vol. 24, no. 16. MDPI AG, Aug. 19, 2019. doi: 10.3390/molecules24163007.
- [155] N. P. E. Hikmawanti, D. Ramadan, I. Jantan, and A. Mun’im, “Natural deep eutectic solvents (Nades): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development,” *Plants*, vol. 10, no. 10. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/plants10102091.
- [156] J. M. Marques Silva, R. L. Reis, A. Paiva, A. Rita, and C. Duarte, “Design of functional therapeutic deep eutectic solvents based on choline chloride and ascorbic acid,” 2018. [Online]. Available: <http://pubs.acs.org>
- [157] M. S. Álvarez and Y. Zhang, “Sketching neoteric solvents for boosting drugs bioavailability,” *Journal of Controlled Release*, vol. 311–312. Elsevier B.V., pp. 225–232, Oct. 01, 2019. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.09.008.
- [158] L. B. Santos, R. S. Assis, J. A. Barreto, M. A. Bezerra, C. G. Novaes, and V. A. Lemos, “Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 146. Elsevier B.V., Jan. 01, 2022. doi: 10.1016/j.trac.2021.116478.
- [159] T. Yin, J. Wu, J. Yuan, and X. Wang, “Therapeutic deep eutectic solvent based on osthole and paeonol: Preparation, characterization, and permeation behavior,” *J Mol Liq*, vol. 346, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.molliq.2021.117133.
- [160] D. Skarpalezos and A. Detsi, “Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 9, no. 19. MDPI AG, Oct. 01, 2019. doi: 10.3390/app9194169.
- [161] H. Zhao and G. A. Baker, “Ionic liquids and deep eutectic solvents for biodiesel synthesis: A review,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 88, no. 1. John Wiley and Sons Ltd, pp. 3–12, 2013. doi: 10.1002/jctb.3935.
- [162] L. F. Zubeir, D. J. G. P. van Osch, M. A. A. Rocha, F. Banat, and M. C. Kroon, “Carbon Dioxide Solubilities in Decanoic Acid-Based Hydrophobic Deep

- Eutectic Solvents,” *J Chem Eng Data*, vol. 63, no. 4, pp. 913–919, Apr. 2018, doi: 10.1021/acs.jced.7b00534.
- [163] S. Bednarz *et al.*, “Polymerization-crosslinking of renewable itaconic acid in water and in deep eutectic solvents,” *Eur Polym J*, vol. 95, pp. 241–254, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.08.020.
- [164] M. Zdanowicz, R. Jędrzejewski, and R. Pilawka, “Deep eutectic solvents as simultaneous plasticizing and crosslinking agents for starch,” *Int J Biol Macromol*, vol. 129, pp. 1040–1046, May 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.103.
- [165] N. Rescignano, R. Hernandez, L. D. Lopez, I. Calvillo, J. M. Kenny, and C. Mijangos, “Preparation of alginate hydrogels containing silver nanoparticles: a facile approach for antibacterial applications,” *Polym Int*, vol. 65, no. 8, pp. 921–926, Aug. 2016, doi: 10.1002/pi.5119.
- [166] J. Venkatesan *et al.*, “Antimicrobial and anticancer activities of porous chitosan-alginate biosynthesized silver nanoparticles,” *Int J Biol Macromol*, vol. 98, pp. 515–525, May 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.120.
- [167] S. S. D. Kumar, N. K. Rajendran, N. N. Houreld, and H. Abrahamse, “Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 115. Elsevier B.V., pp. 165–175, Aug. 01, 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.003.
- [168] M. Jablonský, A. Škulcová, and J. Šima, “Use of deep eutectic solvents in polymer chemistry—a review,” *Molecules*, vol. 24, no. 21. MDPI AG, 2019. doi: 10.3390/molecules24213978.
- [169] H. Lu, J. A. Butler, N. S. Britten, P. D. Venkatraman, and S. S. Rahatekar, “Natural antimicrobial nano composite fibres manufactured from a combination of alginate and oregano essential oil,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.3390/nano11082062.
- [170] A. Shaheen, M. Maswal, and A. A. Dar, “Synergistic effect of various metal ions on the mechanical, thixotropic, self-healing, swelling and water retention properties of bimetallic hydrogels of alginate,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 627, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.127223.
- [171] N. Π.-Φ. Ε. Α. Παυλάτου, “ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ.” 2022.
- [172] Z. B. Nqakala, N. R. S. Sibuyi, A. O. Fadaka, M. Meyer, M. O. Onani, and A. M. Madiehe, “Advances in nanotechnology towards development of silver nanoparticle-based wound-healing agents,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 20. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms222011272.
- [173] N. Comfort, K. Cai, T. R. Bloomquist, M. D. Strait, A. W. Ferrante, and A. A. Baccarelli, “Nanoparticle Tracking Analysis for the Quantification and Size Determination of Extracellular Vesicles.”
- [174] S. N. Kharat and V. D. Mendhulkar, ““synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using Elephantopus scaber leaf

- extract,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 62, pp. 719–724, May 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.02.024.
- [175] D. Peak, “FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY.”
- [176] A. Blainski, G. C. Lopes, and J. C. P. De Mello, “Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L.,” *Molecules*, vol. 18, no. 6, pp. 6852–6865, Jun. 2013, doi: 10.3390/molecules18066852.
- [177] C. Vasile, D. Pamfil, E. Stoleru, and M. Baican, “New developments in medical applications of hybrid hydrogels containing natural polymers,” *Molecules*, vol. 25, no. 7. MDPI AG, 2020. doi: 10.3390/molecules25071539.
- [178] T. Wang *et al.*, “Polyvinyl Alcohol/Sodium Alginate Hydrogels Incorporated with Silver Nanoclusters via Green Tea Extract for Antibacterial Applications,” *Des Monomers Polym*, vol. 23, no. 1, pp. 118–133, Jan. 2020, doi: 10.1080/15685551.2020.1804183.
- [179] S. Basu, H. S. Samanta, and J. Ganguly, “Green synthesis and swelling behavior of Ag-nanocomposite semi-IPN hydrogels and their drug delivery using *Dolichos biflorus* Linn,” *Soft Mater*, vol. 16, no.1, pp. 7–19, Jan. 2018, doi: 10.1080/1539445X.2017.1368559.
- [180] E. M. Ahmed and F. S. Aggor, “Swelling kinetic study and characterization of crosslinked hydrogels containing silver nanoparticles,” *J Appl Polym Sci*, vol. 117, no. 4, pp. 2168–2174, Aug. 2010, doi: 10.1002/app.31934.
- [181] B. Li, M. Zhou, M. Cheng, J. Liu, X. Xu, and X. Xie, “Rapid preparation of ZnO nanocomposite hydrogels by frontal polymerization of a ternary DES and performance study,” *RSC Adv*, vol. 12, no. 20, pp. 12871–12877, Apr. 2022, doi: 10.1039/d2ra01626e.
- [182] “Innovative Solutions for Materials Analysis”.
- [183] M. Thirunavoukkarasu, U. Balaji, S. Behera, P. K. Panda, and B. K. Mishra, “Biosynthesis of silver nanoparticle from leaf extract of *Desmodium gangeticum* (L.) DC. and its biomedical potential,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 116, pp. 424–427, 2013, doi: 10.1016/j.saa.2013.07.033.
- [184] Helmiyati, G. Novientri, G. H. Abbas, and E. Budianto, “Nanocomposite hydrogel-based biopolymer modified with silver nanoparticles as an antibacterial material for wound treatment,” *J Appl Pharm Sci*, vol. 9, no. 11, pp. 1–9, 2019, doi: 10.7324/JAPS.2019.91101.
- [185] P. Torres, M. Balcells, E. Cequier, and R. Canela-Garayoa, “Effect of four novel bio-based DES (Deep Eutectic Solvents) on hardwood fractionation,” *Molecules*, vol. 25, no. 9, May 2020, doi: 10.3390/molecules25092157.
- [186] C. Adina, F. Fetea, and C. Socaciu, “Application Of FTIR Spectroscopy For A Rapid Determination Of Some Hydrolytic Enzymes Activity On Sea Buckthorn Substrate Genetic moderators of maternal prenatal affect on stress reactivity and temperament in infants View project.” [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/230744319>