ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

ΠΡΑΣΙΝΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ *Stichococcus sp.*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Λάλα Χριστίνα Μαρία

Επιβλέπουσα:

Διομή Μαμμά, Επικ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024 στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Ε.Μ.Π.) υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κα. Διομής Μαμμά.

Κατά τη διάρκεια του έτους απέκτησα πολλή επιστημονική γνώση και εμπειρία στο χώρο του εργαστηρίου που αποτελούν σημαντικά εφόδια για την μετέπειτα πορεία μου. Επιπλέον, εξοικειώθηκα με την αναζήτηση επιστημονικών ευρημάτων και τη συγγραφή επιστημονικών κειμένων. Ακόμα, αξιοσημείωτη υπήρξε η μύηση στο ομαδικό πνεύμα και τη συνεργασία με τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου οδηγώντας σε ένα ολοκληρωμένο κλίμα επαγγελματισμού και αλληλεγγύης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του εργαστηρίου που με βοήθησαν στην προσπάθεια αυτή και ήταν δίπλα μου στην οποιαδήποτε δυσκολία, και συγκεκριμένα την μεταδιδακτορικό ερευνήτρια Στέλλα Καλαντζή, την υποψήφια διδάκτωρ Ζαφειρία Λεμονή και τον Βασίλη Βάσσο. Επιπλέον, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον φίλο και συνάδελφο Αριστοτέλη Αργυρόπουλο. Η συμβολή τους ήταν ανεκτίμητη καθώς ήταν πάντα πρόθυμοι να με καθοδηγήσουν και να προσφέρουν τις πολύτιμες συμβουλές τους. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου ξεχωριστά, που προσέφεραν επίσης τη βοήθειά τους όποτε την χρειαζόμουν.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, τους φίλους και την οικογένειά μου, που μου στάθηκαν κατά τη διάρκεια αυτού του έτους δείχνοντας απόλυτη κατανόηση και προσφέροντας την υποστήριξή τους.

Χριστίνα Μαρία Λάλα

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2024

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο την πράσινη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) με χρήση εκχυλίσματος από το μικροφύκος *Stichococcus sp*. και τον προσδιορισμό των παραμέτρων που επηρεάζουν τα τελικά χαρακτηριστικά των AgNPs.

Τα AgNPs διαθέτουν ιδιαίτερες φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες, που τα καθιστούν χρήσιμα σε εφαρμογές της βιοϊατρικής, του περιβάλλοντος, της επιστήμης των υλικών κλπ. Οι συμβατικές φυσικές και χημικές μέθοδοι σύνθεσής τους απαιτούν υψηλά ποσά ενέργειας και χρησιμοποιούν επικίνδυνα χημικά αντίστοιχα. Έτσι, η έρευνα έχει στραφεί σε πράσινες μεθόδους σύνθεσης. Τα μικροφύκη αποτελούν πηγή βιοδραστικών μορίων τα οποία λειτουργούν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες κατά τη σύνθεση των AgNPs. Επιπλέον, αναπτύσσονται γρήγορα, οικονομικά και είναι ανθεκτικά.

Οι παράμετροι σύνθεσης των AgNPs που μελετήθηκαν ήταν το pH, η θερμοκρασία T, η συγκέντρωση νιτρικού αργύρου ($AgNO_3$), η αναλογία κατ' όγκο $AgNO_3$ προς εκχύλισμα μικροφύκους και τέλος η επίδραση της ακτινοβολίας λευκού φωτός, με τη χρήση πειραματικού σχεδιασμού τύπου Plackett-Burman. Τα χαρακτηριστικά των AgNPs προσδιορίστηκαν με χρήση των μεθόδων φασματομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), της φασματοσκοπίας εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος Αργού (ICP-OES) ενώ η παρουσία μορίων επικάλυψης, δηλαδή το capping, επιβεβαιώθηκε μέσω της φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Επιπλέον, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των AgNPs μέσω της τεχνικής μικροαραίωσης (Broth microdilution) έναντι βακτηριακών κυττάρων *E. Coli*. Τέλος, διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση των AgNPs με το μακρομόριο DNA μέσω φασματομετρίας στο υπεριώδες φάσμα.

Η ανάλυση του πειραματικού σχεδιασμού για τα τελικά χαρακτηριστικά των AgNPs υπέδειξαν ως βέλτιστη τη χρήση αλκαλικών τιμών pH (9.0), χαμηλών θερμοκρασιών (25°C), υψηλών αναλογιών σε κυτταρικό εκχύλισμα (1:1 v/v), υψηλών συγκεντρώσεων νιτρικού αργύρου (9mM), και την ακτινοβολία λευκού φωτός. Παρόλα αυτά, από τα διαφορετικά πειράματα που διεξήχθηκαν, καλύτερα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν για συνθήκες pH=9, T=25°C, Συγκέντρωση $AgNO_3$=1mM, Αναλογία $AgNO_3$/Εκχυλίσματος 1:1 και παρουσία φωτός με χαρακτηριστικά: Απορρόφηση στο UV-Vis=0.410 σε μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης λ_{max}=415nm, Z-δυναμικό -30.5±3.7 mV, Υδροδυναμική διάμετρο= 181.65±20.66 nm, δείκτη πολυδιασποράς= 0.419±0.051 και απόδοση μετατροπής αργύρου σε AgNPs ίση με 38.18%. Τα παραγόμενα AgNPs σε αυτές τις συνθήκες ελέγχθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση και βρέθηκε ότι σε συγκέντρωση 51.25 mg/L και 25.63 mg/L προκλήθηκε αναστολή του βακτηρίου *E. Coli* σε ποσοστό ~88%. Η αλληλεπίδραση με το ctDNA επιβεβαιώθηκε φασματομετρικά, εντοπίζοντας το φαινόμενο του υπερχρωμισμού και προσδιορίστηκε η σταθερά συγγένειας K_{app} ίση με 12635 L/mol, που αντιστοιχεί σε αλληλεπίδραση των AgNPs στην περιοχή της αύλακας του ctDNA. Ως βέλτιστος χρόνος αντίδρασης προσδιορίστηκε το διάστημα 72 ώρες μεταξύ των 12, 24 και 48 και 72 ωρών, με τελικά χαρακτηριστικά:

υδροδυναμική διάμετρο= 133.6±7.2nm, ζ-δυναμικό -36.15±1.5mV, δείκτη ποδυδιασποράς (PDI)= 0.374±0.022 και απόδοση 91%.

Η φασματοσκοπία FTIR επιβεβαίωσε την παρουσία βιοδραστικών μορίων που σταθεροποιούν και επικαλύπτουν τα AgNPs και υπέδειξε την παρουσία πρωτεϊνών, φαινολών και λιπιδίων.

Συμπερασματικά, η σύνθεση AgNPs με τη χρήση κυτταρικού εκχυλίσματος του μικροφύκους *Stichococcus sp*. είναι δυνατή και συνοδεύεται από ενθαρρυντικά χαρακτηριστικά και βιολογική δράση που τα καθιστούν υποψήφια προς περαιτέρω έρευνα.

Λέξεις Κλειδιά: Νανοσωματίδια αργύρου, πράσινη σύνθεση, μικροφύκη, *Stichococcus sp*., εσωκυτταρικό υγρό, εκχύλισμα, αντιβακτηριακές ιδιότητες, αλληλεπίδραση με DNA, πειραματικός σχεδιασμός.

ABSTRACT

The aim of the present thesis is the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the extract of the microalga *Stichococcus sp*. and the investigation of the parameters that affect the final characteristics of AgNPs.

AgNPs' special physical, chemical and biological properties make them useful in biomedicine, environmental applications, material science etc. Conventional physical and chemical synthesis methods have high energy requirements and use hazardous chemicals respectively. Consequently, current research focuses on green synthesis methods. Microalgae are a source of bioactive molecules, which act as reducing and stabilizing agents in the synthesis of AgNPs. Additionally, they grow rapidly, are low-cost and resilient.

There was a simultaneous examination of AgNPs' synthesis parameters, which are the pH of the silver nitrate solution, the synthesis temperature, the concentration of silver nitrate solution, the volume ratio of the silver nitrate solution to the extract liquid and exposure to light, using a Plackett-Burman experimental design. The final characteristics of AgNPs were determined via ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), dynamic light scattering (DLS), inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) while Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to determine the biomolecules responsible for the reduction, stabilization and capping of the synthesized AgNPs. The antibacterial activity was specified against *E. Coli* bacterial cells, using the Broth microdilution technique. Also, the interaction between AgNPs and DNA was investigated with ultraviolet spectroscopic measurement.

The experimental design analysis revealed that the optimal conditions for synthesizing AgNPs were achieved in alkalic pH (9.0), room temperature T=25°C, light exposure, increased $AgNO_3$ concentration (9mM) and increased volume ratio of $AgNO_3$ to extract (1:1 v/v). However, the experiment with the optimal characteristics of synthesized AgNPs was conducted under conditions of alkalic pH=9, T=25°C, $AgNO_3$ concentration 1mM, volume ratio of $AgNO_3$ to extract 1:1 and with the presence of light. The measurements showed UV-Vis absorption equal to 0.41 with λ_{max}=415nm, zeta potential=-30.5±3.7mV, zeta-average= 181.65±20.66 nm, PDI value=0.419±0.051 and yield=38.18%. The produced AgNPs were examined for their antibacterial activity, and it was found that concentrations of 51.25 and 25.63 mg/L caused the inhibition of *E. Coli* growth in ~88%. The interactions between AgNPs and ctDNA were detected with ultraviolet spectroscopy and the hyperchromic effect was taking place, while the association constant (K_{app}) of AgNPs with ctDNA was found to be 12635 L/mol, indicating groove binding interactions. The optimal incubation time between 12, 24, 48 and 72h was discovered as 72h due to the smallest size and the greatest absorption and yield and final characteristics: Z-average=133.6±7.2nm, z-potential -36.15±1.5mV, PDI value= 0.374±0.022 and yield=91%.

FTIR spectroscopy confirmed the presence of bioactive molecules in the samples of the extract and the synthesized AgNPs, that led to the reduction, stabilization and capping of AgNPs, and indicated the presence of proteins, phenols and lipids.

In conclusion, AgNPs' synthesis using the cell extract of microalga *Stichococcus sp*. is possible and accompanied with encouraging characteristics and biological activity, making synthesized AgNPs suitable candidates for further research.

Key-Words: Silver Nanoparticles (AgNPs), green synthesis, microalgae, *Stichococcus sp*., intracellular liquid, extract, antibacterial properties, interaction with DNA, experimental Design.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **5**

ABSTRACT **7**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ 16

1.1 Νανοεπιστήμη και Νανοτεχνολογία 16

1.2 Νανοσωματίδια 17

1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες 21

1.3.1 Οπτικές ιδιότητες 21

1.3.2 Μαγνητικές ιδιότητες 23

1.3.3 Μηχανικές ιδιότητες 23

1.3.4 Θερμικές Ιδιότητες 24

1.3.5 Καταλυτικές ιδιότητες 24

1.4 Χαρακτηρισμός 25

1.4.1 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός 25

1.4.2 Χημικός και Δομικός Χαρακτηρισμός 27

1.4.3 Οπτικοηλεκτρονικός Χαρακτηρισμός 29

1.5 Νανοσωματίδια Αργύρου 30

1.5.1 Άργυρος και Νιτρικός Άργυρος 30

1.5.2 Ιδιότητες- Εφαρμογές AgNPs 31

1.5.3 Αντιβακτηριακές Ιδιότητες 34

1.5.4 Τοξικότητα 35

1.6 Μέθοδοι σύνθεσης Νανοσωματιδίων Αργύρου 36

1.6.1 Φυσικές Μέθοδοι 38

1.6.2 Χημικές Μέθοδοι 38

1.6.3 Βιολογικές Μέθοδοι 39

1.7 Μικροφύκη 41

1.7.1 Γενικά στοιχεία 41

1.7.2 Μικροφύκος *Stichococcus sp.* 43

1.8 Σύνθεση AgNPs με χρήση μικροφυκών 44

1.8.1 Σύνθεση με χρήση εξωκυτταρικού υγρού 46

1.8.2 Σύνθεση με χρήση ολόκληρου κυττάρου 46

1.8.3 Σύνθεση με χρήση ζωντανής καλλιέργειας κυττάρων 46

1.8.4 Σύνθεση με χρήση εκχυλίσματος βιομορίων 46
1.9 Παράμετροι σύνθεσης AgNPs 47
1.9.1 Θερμοκρασία 47
1.9.2 pH 47
1.9.3 Συγκέντρωση βιομάζας-εκχυλίσματος 47
1.9.4 Συγκέντρωση διαλύματος πρόδρομης ένωσης αργύρου 48
1.9.5 Ένταση φωτός 48
1.9.6 Χρόνος επώασης 48
1.10 Σκοπός μελέτης 49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και μέθοδοι 50
2.1 Μικροοργανισμοί 50
2.2 Χημικά αντιδραστήρια-Αναλώσιμα υλικά 50
2.3 Όργανα και Συσκευές 50
2.4 Καλλιέργεια S*tichococcus sp.* 52
2.4.1 Θρεπτικό μέσο 52
2.4.2 Ανάπτυξη S*tichococcus sp.* 53
2.4.3 Έλεγχος ανάπτυξης S*tichococcus sp.* 54
2.4.4 Μελέτη επίδρασης αναλογίας όγκου καλλιέργειας/φιάλης στην ανάπτυξη 55
2.5 Προετοιμασία εκχυλίσματος βιομάζας 55
2.5.1 Μέτρηση πρωτεΐνης εκχυλίσματος 55
2.5.2 Μέτρηση χλωροφύλλης και καροτενοειδών 56
2.6 Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με χρήση εκχυλίσματος βιομάζας 56
2.7 Πειραματικός σχεδιασμός Blackett-Burman 58
2.8 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων αργύρου 60
2.8.1 Φασματομετρία UV-Vis 60
2.8.2 Δυναμική σκέδαση φωτός- DLS 60
2.8.3 Φασματοσκοπία εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος Αργού (ICP-OES) 60
2.8.4 Υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR) 61
2.8.5 Χρόνος επώασης AgNPs 61
2.9 Βιολογική δράση νανοσωματιδίων 61
2.9.1 Αντιμικροβιακές ιδιότητες 62
2.9.2 Αλληλεπίδραση AgNPs-DNA 63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα και συζήτηση 64

3.1 Μελέτη ανάπτυξης *Stichococcus sp.* 64
3.2 Μέτρηση βιοδραστικών ενώσεων εκχυλίσματος 66
3.2.1 Πρωτεΐνες εκχυλίσματος 66
3.2.2 Χλωροφύλλες και καροτενοειδή εκχυλίσματος 66
3.3 Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου 66
3.3.1 Φάσματα UV-Vis 68
3.3.2 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) 72
3.3.3 Φασματοσκοπία εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος Αργού (ICP-OES) 74
3.4 Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman 76
3.4.1 Απορρόφηση UV-Vis 78
3.4.2 Z-δυναμικό 82
3.4.3 Υδροδυναμική διάμετρος 86
3.4.4 Δείκτης πολυδιασποράς 89
3.4.5 Απόδοση 93
3.4.6 Βελτιστοποίηση πειραματικού σχεδιασμού 95
3.5 Επίδραση χρόνου επώασης στη σύνθεση AgNPs 96
3.5.1 Φάσμα UV-Vis 97
3.5.2 DLS 98
3.5.3 ICP-OES 99
3.6 Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR) 100
3.7 Αντιβακτηριακές ιδιότητες Νανοσωματιδίων αργύρου 103
3.8 Αλληλεπίδραση DNA-AgNPs 105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συμπεράσματα 108
4.1 Γενικά συμπεράσματα 108
4.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα 112
Βιβλιογραφία **113**
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: Αποτελέσματα DLS **121**

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Διαστάσεις μορίων και κυττάρων και σύγκριση με το μέγεθος νανοδομών [1] 16
Εικόνα 2: Ταξινόμηση νανοσωματιδίων με βάση τις διαστάσεις τους σε A) 0D, B) 1D, C) 2D, D) 3D[2] 17
Εικόνα 3: Ταξινόμηση νανοσωματιδίων με βάση το σχήμα τους[7] 19
Εικόνα 4: Ταξινόμηση νανοσωματιδίων με βάση τη σύστασή τους σε A) οργανικά, B) ανόργανα και C) αποτελούμενα από άνθρακα 20
Εικόνα 5: Ταλάντωση ηλεκτρονιακού νέφους νανοσωματιδίων εξαιτίας του φαινομένου συντονισμού επιφάνειας πλασμονίου[10] 22
Εικόνα 6: Φορτισμένο σωματίδιο σε ηλεκτρολύτη [29] 29
Εικόνα 7: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης ιόντων Αργύρου με τα μικροβιακά κύτταρα και θανάτωσή τους[32] 31
Εικόνα 8: Εφαρμογές νανοσωματιδίων αργύρου στο πεδίο της βιοϊατρικής τεχνολογίας [24] 34
Εικόνα 9: Ταξινόμηση σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου σε A) top-down προσέγγιση η οποία περιλαμβάνει τις φυσικές μεθόδους σύνθεσης και B) bottom-up προσέγγιση η οποία περιλαμβάνει τις χημικές και βιολογικές μεθόδους σύνθεσης [37] 37
Εικόνα 10: Μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου μέσω A) χημικής προσέγγισης, B) φυσικής προσέγγισης και C) βιολογικής προσέγγισης[24] 37
Εικόνα 11: Είδη φυκών ανάλογα με το χρώμα τους [45] 42
Εικόνα 12: Μορφολογία κυττάρων του στελέχους Stichococcus sp. με παρατήρηση στο μικροσκόπιο[52] 44
Εικόνα 13: Μηχανισμός αναγωγής ιόντων αργύρου Ag^{+} προς Ag^{0} [37] 45
Εικόνα 14: Προσεγγίσεις σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου με χρήση μικροφυκών [41] 45
Εικόνα 15: Παράμετροι σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου με χρήση φυκών [41] 49
Εικόνα 16: Καλλιέργεια *Stichococcus sp.* 54
Εικόνα 17: Παρατήρηση *Stichococcus sp.* με οπτικό μικροσκόπιο 54
Εικόνα 18: Διάλυμα $AgNO_3$ και εκχυλίσματος βιομάζας κατά την ανάμιξή τους 57
Εικόνα 19: Διάλυμα $AgNO_3$ και εκχυλίσματος βιομάζας κατά την ανάμιξη (υποκίτρινο χρώμα) και μετά τη σύνθεση νανοσωματιδίων (καφέ-κόκκινο χρώμα) 68
Εικόνα 20: Φάσμα FTIR κυτταρικού εκχυλίσματος 102
Εικόνα 21: Φάσμα FTIR νανοσωματιδίων αργύρου 103

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Φάσμα απορρόφησης στο UV-Vis νανοσωματιδίων χρυσού (Au) συναρτήσει του μεγέθους τους[12] 22
Διάγραμμα 2: Μελέτη επίδρασης αναλογίας όγκου καλλιέργειας/φιάλης στην ανάπτυξη του μικροφύκους 64
Διάγραμμα 3: Καμπύλη ανάπτυξης *Stichococcus sp.* 65
Διάγραμμα 4: Φάσμα Uv-Vis πειραμάτων σύνθεσης AgNPs από τη συνθήκη 1-12. 70
Διάγραμμα 5: Προσαρμογή πραγματικών σημείων μέγιστης απορρόφησης στο τροποποιημένο μοντέλο πρόβλεψης 80
Διάγραμμα 6:3D διαγράμματα επίδρασης A)pH-C($AgNO_3$), B) T-C($AgNO_3$), C)T-Φως/Σκοτάδι, D)Ratio-C($AgNO_3$) στην μέγιστη απορρόφηση 81
Διάγραμμα 7: Προσαρμογή πραγματικών σημείων ζ-δυναμικού στο τροποποιημένο μοντέλο πρόβλεψης 84
Διάγραμμα 8: 3D διαγράμματα επίδρασης A) pH-C, B) pH-Ratio, C) T-C, D) Ratio-C, E) Φως/Σκοτάδι-C στο ζ-δυναμικό 85
Διάγραμμα 9: Προσαρμογή πραγματικών σημείων υδροδυναμικής διαμέτρου στο τροποποιημένο μοντέλο πρόβλεψης 88
Διάγραμμα 10: 3D διάγραμμα επίδρασης των A) C-T, B) T-Ratio, C) T-Φως/Σκοτάδι, D) Ratio-Φως/Σκοτάδι στην υδροδυναμική διάμετρο 89
Διάγραμμα 11: Προσαρμογή πραγματικών σημείων δείκτη πολυδιασποράς στο μοντέλο πρόβλεψης 91
Διάγραμμα 12: 3D διαγράμματα επίδρασης των A) pH-Ratio, B) C-Φως/Σκοτάδι, C) Ratio-Φως/Σκοτάδι στην τιμή του δείκτη πολυδιασποράς 92
Διάγραμμα 13: Προσαρμογή πραγματικών σημείων απόδοσης στο μοντέλο πρόβλεψης 94
Διάγραμμα 14: 3D διάγραμμα επίδρασης των A) pH-C, B) pH- Ratio στην απόδοση 95
Διάγραμμα 15: Φάσματα απορρόφησης AgNPs με χρόνους αντίδρασης 12, 24, 48 και 72 ώρες 97
Διάγραμμα 16: Μέγιστη απορρόφηση συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης 98
Διάγραμμα 17: Γραφική αναπαράσταση αναστολής ανάπτυξης του *E. Coli* για διαφορετικές συγκεντρώσεις AgNPs. 104
Διάγραμμα 18: Φάσμα απορρόφησης UV A) διαλυμάτων AgNPs και B) διαλυμάτων ctDNA-AgNPs διαδοχικών αραιώσεων ως προς AgNPs και διαλύματος καθαρού ctDNA. 105
Διάγραμμα 19: Προσαρμογή δεδομένων εξίσωσης Benesi-Hilderbrand για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_{app} 107

Διάγραμμα Π. 1:Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 1 121
Διάγραμμα Π. 2: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 2 122
Διάγραμμα Π. 3: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 3 122
Διάγραμμα Π. 4: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 4 123
Διάγραμμα Π. 5: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 5 124
Διάγραμμα Π. 6: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 6 124
Διάγραμμα Π. 7: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 7 125
Διάγραμμα Π. 8: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 8 126
Διάγραμμα Π. 9: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 9 126

Διάγραμμα Π. 10: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 10 127
Διάγραμμα Π. 11: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 11 128
Διάγραμμα Π. 12: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 12 128
Διάγραμμα Π. 13: Ζ-δυναμικό πειράματος 1 129
Διάγραμμα Π. 14: Ζ-δυναμικό πειράματος 2 130
Διάγραμμα Π. 15: Ζ-δυναμικό πειράματος 3 130
Διάγραμμα Π. 16: Ζ-δυναμικό πειράματος 4 131
Διάγραμμα Π. 17: Ζ-δυναμικό πειράματος 5 132
Διάγραμμα Π. 18: Ζ-δυναμικό πειράματος 6 132
Διάγραμμα Π. 19: Ζ-δυναμικό πειράματος 7 133
Διάγραμμα Π. 20: Ζ-δυναμικό πειράματος 8 134
Διάγραμμα Π. 21: Ζ-δυναμικό πειράματος 9 134
Διάγραμμα Π. 22: Ζ-δυναμικό πειράματος 10 135
Διάγραμμα Π. 23: Ζ-δυναμικό πειράματος 11 136
Διάγραμμα Π. 24: Ζ-δυναμικό πειράματος 12 136
Διάγραμμα Π. 25: Μέση υδροδυναμική διάμετρος για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 12 ώρες ... 137
Διάγραμμα Π. 26: Μέση υδροδυναμική διάμετρος για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 24 ώρες ... 138
Διάγραμμα Π. 27: Μέση υδροδυναμική διάμετρος για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 48 ώρες ... 138
Διάγραμμα Π. 28: Μέση υδροδυναμική διάμετρος για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 72 ώρες ... 139
Διάγραμμα Π. 29: Ζ-δυναμικό για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 12 ώρες 140
Διάγραμμα Π. 30: Ζ-δυναμικό για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 24 ώρες 141
Διάγραμμα Π. 31: Ζ-δυναμικό για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 48 ώρες 141
Διάγραμμα Π. 32: Ζ-δυναμικό για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 72 ώρες 142

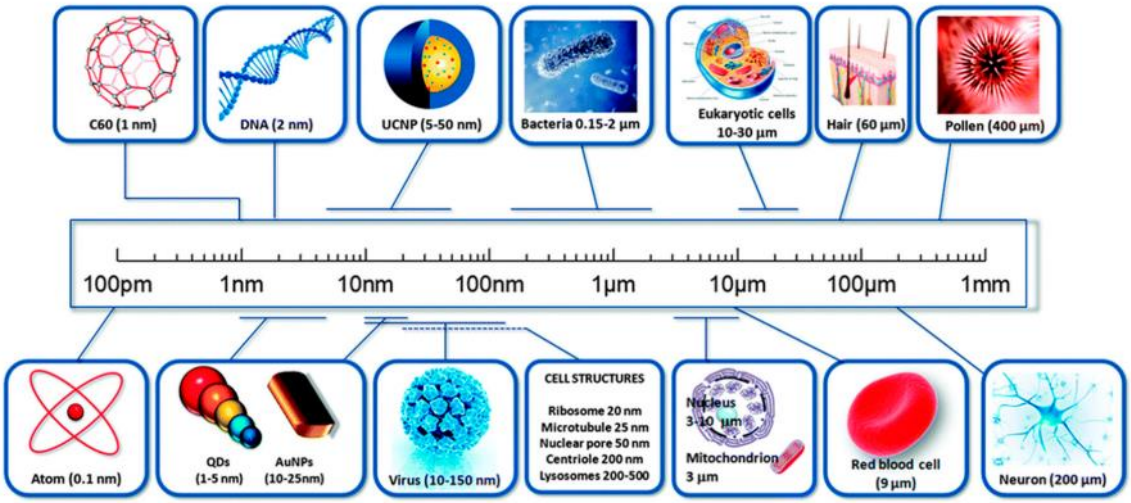
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ταξινόμηση στελέχους μικροφύκους *Stichococcus sp.* [48] 43
Πίνακας 2: Όργανα και συσκευές 51
Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικού μέσου BG-11 52
Πίνακας 4: Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων. 52
Πίνακας 5: Σύσταση διαλύματος βιταμινών. 53
Πίνακας 6: Ποσότητες των διαλυμάτων stock για την παρασκευή τελικού διαλύματος βιταμινών. 53
Πίνακας 7: Ανεξάρτητες μεταβλητές πειραματικού σχεδιασμού και τα αντίστοιχα επίπεδα 59
Πίνακας 8:Εξαρτημένες μεταβλητές πειραματικού σχεδιασμού 59
Πίνακας 9: Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman 59
Πίνακας 10: Σύσταση θρεπτικού μέσου LB βακτηρίου *E. coli* 62
Πίνακας 11: Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman 67
Πίνακας 12: Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης λ_{max} πειραμάτων 1-12 71
Πίνακας 13: Αποτελέσματα μετρήσεων δείκτη πολυδιασποράς, υδροδυναμικής διαμέτρου και ζ-δυναμικού για τα πειράματα 1-12 72
Πίνακας 14: Συγκέντρωση αργύρου μετρούμενων διαλυμάτων ICP-OES 75
Πίνακας 15: Πειραματικός σχεδιασμός σύνθεσης AgNPs και αποτελέσματα μετρήσεων 76
Πίνακας 16: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης της μέγιστης απορρόφησης στο φάσμα UV-Vis 79
Πίνακας 17: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης της μέγιστης απορρόφησης στο UV-Vis 79
Πίνακας 18: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης του ζ-δυναμικού 83
Πίνακας 19: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης του ζ-δυναμικού 83
Πίνακας 20: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης της υδροδυναμικής διαμέτρου 87
Πίνακας 21: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης της υδροδυναμικής διαμέτρου 87
Πίνακας 22: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης του δείκτη πολυδιασποράς 90
Πίνακας 23: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης του δείκτη πολυδιασποράς 91
Πίνακας 24: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης της απόδοσης 93
Πίνακας 25: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης της απόδοσης 94
Πίνακας 26: Βέλτιστες συνθήκες ανεξάρτητων μεταβλητών και ταυτόχρονη βελτιστοποίηση εξαρτημένων μεταβλητών (Desirability=0.749) 96
Πίνακας 27: Αποτελέσματα επίδρασης χρόνου αντίδρασης στον δείκτη πολυδιασποράς, την υδροδυναμική διάμετρο και το ζ-δυναμικό των AgNPs 99
Πίνακας 28: Απόδοση σχηματισμού AgNPs για χρόνους αντίδρασης 12, 24, 48 και 72 ώρες 99

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

1.1 Νανοεπιστήμη και Νανοτεχνολογία

Ως Νανοεπιστήμη ορίζεται ο κλάδος της επιστήμης που ασχολείται με τη μελέτη της ύλης σε επίπεδο διαστάσεων στη νανοκλίμακα, δηλαδή μορίων και ατόμων με μέγεθος της τάξης των 10^{-9} m. Για το σκοπό αυτό απαιτείται η συνεισφορά πολλών επιστημών, όπως η Φυσική, η επιστήμη των Υλικών και η Βιολογία. Συγκεκριμένα, οι δομές οι οποίες μελετώνται βρίσκονται εντός του εύρους των 1-100 nm σε τουλάχιστον μία από τις διαστάσεις τους (Εικόνα 1)[1]. Σε αυτό το εύρος μεγέθους οι κλασικοί νόμοι της Φυσικής δεν ισχύουν με τον ίδιο τρόπο όπως στην μακρο-κλίμακα [2]. Αντιθέτως, η συμπεριφορά των νανοϋλικών αρχίζει να ερμηνεύεται με βάση τους νόμους της Κβαντικής Φυσικής[3]. Με τον όρο Νανοτεχνολογία εννοείται η τεχνολογία που αξιοποιεί σε πρακτικές εφαρμογές τα υλικά αυτού του μεγέθους, τα νανοϋλικά, και τις ιδιότητες που τα χαρακτηρίζουν [1]. Μάλιστα, σύμφωνα με την Εθνική Πρωτοβουλία Νανοτεχνολογίας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (National Nanotechnology Initiative-NNI) ως Νανοτεχνολογία μπορεί να οριστεί η επιστήμη η οποία περιλαμβάνει την έρευνα και ανάπτυξη τεχνολογίας σε ατομικό ή μοριακό επίπεδο και στο εύρος των 1-100nm, τη δημιουργία δομών και συστημάτων καινοτόμων χαρακτηριστικών λόγω του μικρού μεγέθους τους, καθώς και την εφικτότητα χειρισμού της ύλης αυτών των διαστάσεων [4].



Εικόνα 1: Διαστάσεις μορίων και κυττάρων και σύγκριση με το μέγεθος νανοδομών [1]

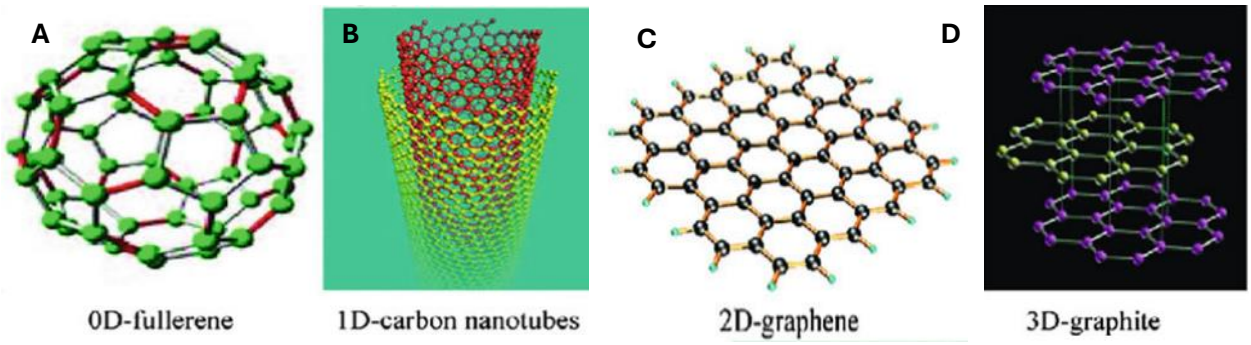
Εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους, τα νανοϋλικά εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες συγκριτικά με τα ίδια υλικά στην μακροκλίμακα. Τέτοιες ιδιότητες αποτελούν οι οπτικές, ηλεκτρικές και μαγνητικές ιδιότητες [5], [6]. Επομένως, οι καινοτόμες δομές που προσφέρει η Νανοεπιστήμη και Νανοτεχνολογία βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς επιστημονικούς τομείς όπως είναι η Φυσική, η Χημεία, η Βιολογία, η Ιατρική, η Μηχανική και η Πληροφορική [1], [2]. Επιπλέον, η χρήση τους στη

βιομηχανία είναι ήδη διαδεδομένη με εφαρμογές σε τομείς όπως η ενέργεια, η γεωργία, οι τηλεπικοινωνίες, η μεταφορά, η ηλεκτρονική κλπ. [5]

Τα νανοϋλικά ταξινομούνται με βάση χαρακτηριστικά όπως τις διαστάσεις τους, τη σύστασή τους, το πορώδες, την τοξικότητά τους καθώς και την προέλευσή τους. [5]

Σε σχέση με τις διαστάσεις, τα νανοϋλικά χωρίζονται στις εξής κατηγορίες (Εικόνα 2): [2], [5]

- 0D (Zero Dimensional) που αφορά υλικά όπου καμία διάστασή τους δεν βρίσκεται εκτός της νανοκλίμακας. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι κβαντικές τελείες (Quantum Dots-QD) και τα φουλερένια.
- 1D (One Dimensional) για υλικά που μόνο μία διάστασή τους είναι μεγαλύτερη από εύρος της νανοκλίμακας. Σε αυτά ανήκουν οι δομές των νανοσωλήνων, νανοϊνών, νανοκαλωδίων κλπ.
- 2D (Two Dimensional) για υλικά όπου δύο από τις διαστάσεις τους βρίσκονται εκτός της νανοκλίμακας όπως είναι οι δομές από λεπτά φιλμ (nanofilms), νανοεπικαλύψεις (nanocoatings) και νανοφύλλα (nanosheets) .
- 3D (Three Dimensional) όπου σε αυτήν την κατηγορία καμία διάσταση του υλικού δεν βρίσκεται στη νανοκλίμακα. Τα υλικό αποτελείται από μικρότερες μονάδες που ανήκουν σε μία από τις παραπάνω κατηγορίες. Παραδείγματα τέτοιων δομών αποτελεί η διασπορά νανοσωματιδίων, οι δέσμες νανοϊνών ή νανοκαλωδίων και τα πολλαπλά στρώματα από 2D νανοϋλικά όπως ο γραφίτης.



Εικόνα 2: Ταξινόμηση νανοσωματιδίων με βάση τις διαστάσεις τους σε A) 0D, B) 1D, C) 2D, D) 3D[2]

1.2 Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια αποτελούν το δομικό λίθο των νανοϋλικών. Ως νανοσωματίδια (Nanoparticles-NPs) ορίζονται τα σωματίδια αυτά που το μέγεθός τους βρίσκεται εντός του εύρους των 1-100nm σε όλες τις διαστάσεις τους [7]. Εντάσσονται στην κατηγορία των αιωρούμενων σωματιδίων

(Particulate Matter-PM) των οποίων το μέγεθος βρίσκεται εντός της νανοκλίμακας, δηλαδή των λεπτόκοκκων σωματιδίων UFPs (ultrafine particles). Επίσης, θεωρούνται υποκατηγορία των κολλοειδών σωματιδίων. [8]

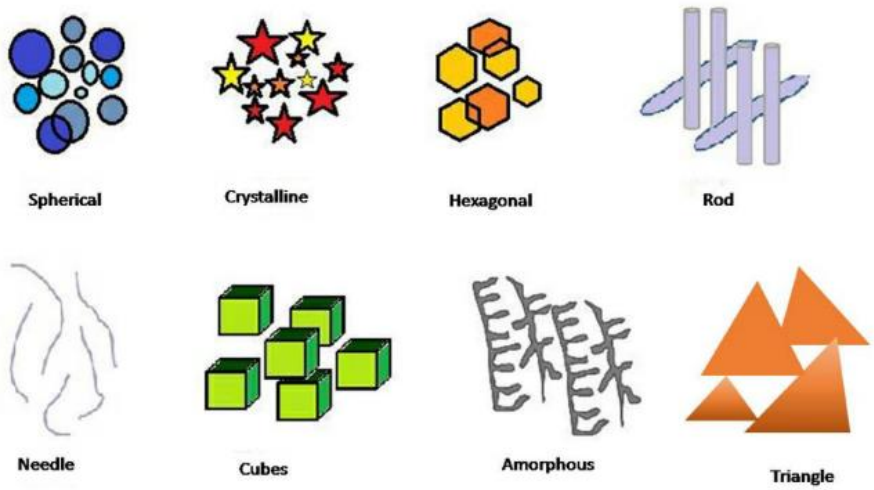
Τα νανοσωματίδια διαθέτουν ξεχωριστές ιδιότητες σε σχέση με τα συμβατικά υλικά της μακρο-κλίμακας εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους αλλά και της μεγάλης επιφάνειας που καταλαμβάνουν σε σχέση με τον μικρό τους όγκο [6], [8]. Ο λόγος σφαιρικής επιφάνειας προς σφαιρικό όγκο σε ένα νανοσωματίδιο θα πρέπει να υπερβαίνει τα 60 m^2/cm^3[5].

Τα νανοσωματίδια αποτελούνται από δύο ή τρία στρώματα [8]:

- Το επιφανειακό στρώμα (Surface Layer) που προσδίδει λειτουργικότητα στα NPs μέσω ιόντων μετάλλων, επιφανειοδραστικών ουσιών, πολυμερών ή μικρών μορίων,
- Το στρώμα κελύφους (Shell Layer) που προστίθενται συνήθως σκοπίμως στα NPs κατά την προετοιμασία και έχει διαφορετική δομή από αυτήν του πυρήνα και
- Τον πυρήνα (Core) που αποτελεί το κέντρο των NPs.

Σχετικά με το σχήμα τους, τα νανοσωματίδια μπορούν να λάβουν διάφορες μορφές ανάλογα τον τρόπο ή τον οργανισμό με τη βοήθεια του οποίου έχουν συντεθεί. Για παράδειγμα, συνήθως είναι σφαιρικά ή τριγωνικά όταν προέρχονται από μύκητες, σφαιρικά ή σε σχήμα ράβδου από φύκη, εξαγωνικά, τετραγωνικά και σφαιρικά από βακτήρια ενώ έχουν κρυσταλλική μορφή ή να είναι άμορφα (Εικόνα 3)[7]. Επιπλέον, το σχήμα το οποίο μπορεί να λάβει ένα νανοσωματίδιο εξαρτάται και από τις συνθήκες και τη μέθοδο σύνθεσης [2].

Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα το εσωτερικό τμήμα τους να είναι κούφιο με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις νανοσφαίρες, τα φουλερένια και τις νανοκάψουλες. [2]

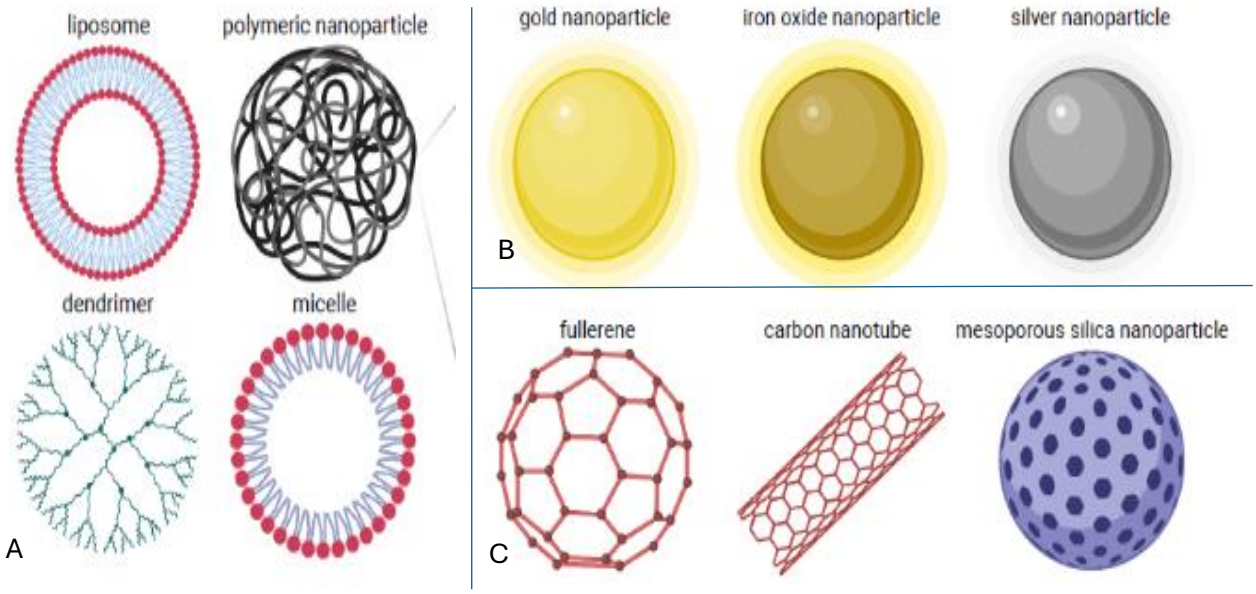


Εικόνα 3: Ταξινόμηση νανοσωματιδίων με βάση το σχήμα τους[7]

Σε ό,τι αφορά τη σύστασή τους, τα νανοσωματίδια αποτελούνται από (Εικόνα 4)[2],[9]:

- Άνθρακα (Carbon-Based) στα οποία ο άνθρακας μπορεί να βρεθεί σε ποικίλες μορφές και φάσεις. Παραδείγματα αποτελούν τα φουλερένια και οι κβαντικές τελείες (QDs). Μεγαλύτερων διαστάσεων νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα αποτελούν οι νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon Nanotubes-CNTs), το γραφένιο κ.α.
- Ανόργανα υλικά (Inorganic-Based) που περιλαμβάνουν νανοσωματίδια από μέταλλα και τα οξείδιά τους,
- Οργανικά υλικά (Organic Based) όπου σε αυτά συμπεριλαμβάνονται δομές όπως τα πολυμερικά νανοσωματίδια, τα μικκύλια, τα δενδριμερή και τα λιποσώματα,
- Βιολογικά νανοϋλικά (Bionanomaterials) δηλαδή νανοϋλικά που συναντώνται σε οργανισμούς όπως οι ιοί καθώς και το DNA που αποτελεί 1D νανοϋλικό .

Ακόμα, μηδενικής αλλά και μεγαλύτερης διάστασης νανοϋλικά μπορούν να υπάρξουν σε σύνθετα υλικά. Σε αυτά συνυπάρχουν πάνω από δύο φάσεις μία εκ των οποίων πρέπει να είναι εντός νανοκλίμακας. Οι νανοδομές εντός του σύνθετου υλικού αποτελούνται είτε από άνθρακα, είτε από ανόργανα είτε από οργανικά υλικά.



Εικόνα 4: Ταξινόμηση νανοσωματιδίων με βάση τη σύστασή τους σε Α) οργανικά, Β) ανόργανα και C) αποτελούμενα από άνθρακα

Εν συνεχεία, τα νανοϋλικά ταξινομούνται με βάση το πορώδες τους σε [5], [2]:

i. μικροπορώδη(<2nm),
ii. μεσοπορώδη(2-50nm) και
iii. μακροπορώδη(>50nm).

Ακόμα ένας διαχωρισμός των νανοϋλικών αφορά την προέλευσή τους δηλαδή εάν απαντώνται στη φύση ή εάν προέκυψαν ή συντέθηκαν στη βιομηχανία. Επομένως, χωρίζονται στις εξής κατηγορίες [2]:

i. φυσικά (naturally produced), τα οποία παράγονται από τους οργανισμούς
ii. συνθετικά (engineered), τα οποία παράγονται από τις βιομηχανίες με καλώς καθορισμένες ιδιότητες και για συγκεκριμένες εφαρμογές,
iii. τυχαίως συνθετικά (incidental), τα οποία προκύπτουν κατά τη διάρκεια βιομηχανικών διεργασιών ως παραπροϊόντα.

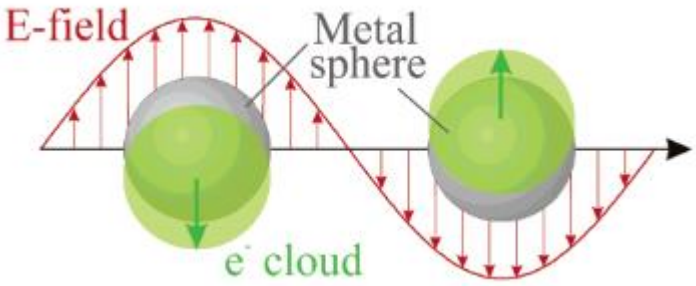
1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Σε σχέση με τα συμβατικά υλικά μεγαλύτερων διαστάσεων, τα νανοϋλικά παρουσιάζουν ορισμένες ξεχωριστές ιδιότητες που τα έχουν καταστήσει αντικείμενο έρευνας και χρησιμοποιούνται σε πολλές εφαρμογές. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται στο μικρό μέγεθος αλλά και στον μεγάλο λόγο επιφάνειας προς όγκο καθώς και στα επιφανειακά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα όταν το μεγαλύτερο μέρος των ατόμων βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Συγκριτικά, τα υλικά στην μακρο-κλίμακα δεν διαθέτουν μεγάλο ποσοστό των ατόμων τους στην επιφάνεια και επομένως οι φυσικοχημικές ιδιότητες δεν εξαρτώνται γενικά από το μέγεθος του υλικού. Επιπλέον, τα μικρά μεγέθη που εξετάζονται στην περίπτωση των νανοσωματιδίων οδηγούν στην εμφάνιση κβαντικών φαινομένων και άρα σε ενδιαφέρουσες οπτικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες. Στην παρούσα εργασία, θα αναφερθούν οι βασικές ιδιότητες που επηρεάζονται από τη διαφορετική διαμόρφωση των NPs, όπως είναι οι οπτικές, οι μαγνητικές, οι μηχανικές, οι καταλυτικές και οι θερμικές ιδιότητες. [2]

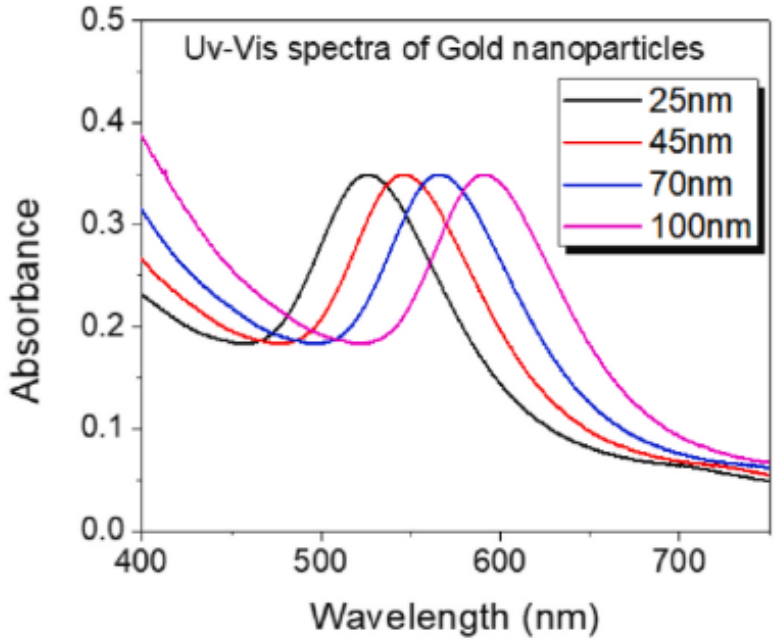
1.3.1 Οπτικές ιδιότητες

Στα μικρά νανοσωματίδια και κυρίως στα μεταλλικά νανοσωματίδια, οι οπτικές ιδιότητες όπως η απορρόφηση και η εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, εμφανίζονται όταν λαμβάνει χώρα κάποια μεταφορά ηλεκτρονίου μεταξύ της ζώνης σθένους και της ζώνης αγωγιμότητας. Συγκεκριμένα, απορρόφηση ακτινοβολίας συμβαίνει όταν ένα ηλεκτρόνιο σθένους διεγείρεται από το υψηλότερο κατειλημμένο τροχιακό (HOMO) προς το χαμηλότερο μη-κατειλημμένο τροχιακό (LUMO) και το αντίστροφο για την εκπομπή [3]. Με την αλλαγή του μεγέθους των σωματιδίων οι οπτικές ιδιότητες αλλάζουν εξαιτίας ενός φαινόμενου που ονομάζεται Φαινόμενο συντονισμού επιφάνειας πλασμονίου (Surface plasmon resonance- SPR) [3], [5]. Σύμφωνα με αυτό το φαινόμενο, λαμβάνει χώρα συντονισμός μεταξύ των εξωτερικών ηλεκτρονίων του σωματιδίου και των φωτονίων συγκεκριμένου μήκους κύματος του ηλεκτρικού πεδίου [3]. Τα φωτόνια διεγείρουν τα ηλεκτρόνια σθένους του σωματιδίου με αποτέλεσμα αυτά να μετακινούνται σε σχέση με τον πυρήνα. Αναλυτικότερα, η μετακίνηση αυτή προσπαθεί να αποκατασταθεί μέσω της δύναμης Coulomb μεταξύ ηλεκτρονιακού νέφους και πυρήνα του σωματιδίου. Τελικά, δημιουργείται ταλάντωση του ηλεκτρονιακού νέφους σε σχέση με το επίπεδο του πυρήνα όπως παριστάνεται στην Εικόνα 5 οδηγώντας σε έντονη απορρόφηση φωτός και φαινόμενα σκέδασης [10], [11]. Ως πλασμόνιο εννοείται ακριβώς το κύμα αυτό που δημιουργείται από τα ηλεκτρόνια σθένους[11]. Η μεταβολή αυτή στις οπτικές ιδιότητες των σωματιδίων διαφορετικού μεγέθους μπορεί να παρατηρηθεί μέσω του χρώματος των διαλυμάτων αυτών των νανοσωματιδίων [3]. Για παράδειγμα οι νανοσφαίρες χρυσού στα 100nm έχουν κίτρινο χρώμα, στα 50nm πράσινο-κίτρινο χρώμα, στα 25nm κόκκινο χρώμα ενώ ο άργυρος εμφανίζει πορτοκαλί απόχρωση στα 200nm, ανοιχτό μπλε στα 90nm και μπλε στα 40nm σε λεπτό φιλμ[3], [5]. Γενικά, με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων η μέγιστη απορρόφηση μετακινείται σε χαμηλότερα μήκη κύματος

(Διάγραμμα 1)[5], [12]. Με την μεταβολή του μεγέθους επίσης μπορούν να συμβούν μεταβολές σε ιδιότητες όπως η φωτοκατάλυση και η φωταύγεια [3] [5].



Εικόνα 5: Ταλάντωση ηλεκτρονιακού νέφους νανοσωματιδίων εξαιτίας του φαινομένου συντονισμού επιφάνειας πλασμονίου[10]



Διάγραμμα 1: Φάσμα απορρόφησης στο UV-Vis νανοσωματιδίων χρυσού (Au) συναρτήσει του μεγέθους τους[12]

Σχετικά με τις ηλεκτρονικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, αυτές σχετίζονται με το μικρό τους μέγεθος που γίνεται συγκρίσιμο με το μήκος κύματος De Broglie των ηλεκτρονίων. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι ενεργειακές στάθμες αρχίζουν να γίνονται κβαντισμένες και εμφανίζονται φαινόμενα

που μπορούν να αξιοποιηθούν σε ηλεκτρονικές και οπτικοηλεκτρονικές εφαρμογές πχ. Τρανζίστορς.[3]

1.3.2 Μαγνητικές ιδιότητες

Με τη μείωση του μεγέθους, υλικά που στη μακρο-κλίμακα δεν εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες μπορούν να εμφανίσουν στη νανοκλίμακα. Τέτοια υλικά αποτελούν για παράδειγμα ο χρυσός (Au) και η πλατίνα (Pt) [5]. Συγκεκριμένα, τα νανοϋλικά αποκτούν ιδιότητες υπερμαγνητικών υλικών, δηλαδή υλικών που μαγνητίζονται υπό την παρουσία μαγνητικού πεδίου αλλά απομαγνητίζονται όταν αυτό πάψει πια να ασκείται [13]. Σε αυτά τα υλικά, με τη μείωση του μεγέθους μειώνονται και οι ξεχωριστές περιοχές μαγνητισμού. Κάτω από μία κρίσιμη τιμή μεγέθους, απομένει μόλις μία περιοχή στην οποία περιέχονται όλα τα διανύσματα μαγνητικής ροπής προσανατολισμένα προς την ίδια κατεύθυνση. Αυτό δημιουργεί έντονο μαγνητισμό με την άσκηση ενός μαγνητικού πεδίου, σε πολύ μικρό χρόνο καθιστώντας τα υπερπαραμαγνητικά υλικά χρήσιμα σε εφαρμογές [14]. Η μαγνητική συμπεριφορά επηρεάζεται από θερμικά φαινόμενα όπου συγκεκριμένα υπάρχει μια θερμοκρασία μετάπτωσης μεταξύ υπερπαραμαγνητικών και φερομαγνητικών υλικών ανάλογη με το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού. Όσο αυξάνεται το μέγεθος τόσο αυξάνεται και η θερμοκρασία αυτή [14]. Κλασικά φερομαγνητικά υλικά αποτελούν ο Σίδηρος (Fe) , το Κοβάλτιο (Co) και το Νικέλιο (Ni) ενώ το πιο μαγνητικό υλικό που απαντάται στη φύση είναι οξείδιο του σιδήρου (II,III) Fe_3O_4 και για αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μορφή υπερπαραμαγνητικού νανοϋλικού σε εφαρμογές [13]. Η ιδιότητα νανοσωματιδίων να παρουσιάζουν υπερπαραμαγνητισμό τους επιτρέπει να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές βιοϊατρικής όπως τη μεταφορά φαρμάκων, για απεικονιστικούς και διαγνωστικούς σκοπούς (π.χ. MRI) κ.α.[5].

1.3.3 Μηχανικές ιδιότητες

Τα νανοϋλικά εμφανίζουν επίσης διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες σε σχέση με τα ίδια υλικά στη μακροσκοπική κλίμακα, γεγονός που οφείλουν στην ιδιαίτερη διαμόρφωσή τους και τα επιφανειακά τους χαρακτηριστικά. Τα υλικά αυτά έχουν τη τάση να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αλλά και με άλλες επιφάνειες επομένως επιδεικνύουν πλεονεκτήματα στη χρήση τους ως υλικά επιφανειακής τροποποίησης καθώς και για τη βελτίωση μηχανικών ιδιοτήτων σε νανοκατασκευές και νανοκατεργασίες. Μηχανικές ιδιότητες που επηρεάζονται από το μέγεθος των σωματιδίων και χρήζουν περαιτέρω έρευνας για την αξιολόγηση των νανοσωματιδίων, αποτελούν η σκληρότητα, το μέτρο ελαστικότητας, η τριβή και η διεπιφανειακή συγγένεια. Οι δυνάμεις που ασκούνται κατά την αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων είτε μεταξύ τους είτε με κάποια επιφάνεια είναι οι ασθενείς δυνάμεις Van Der Waals (VDW) καθώς και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Στην προσπάθεια να ερμηνευτούν οι δυνάμεις αυτές με τις οποίες αλληλεπιδρούν τα νανοσωματίδια έχουν αναπτυχθεί ορισμένες θεωρίες. Πιο γνωστή είναι η DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) καθώς και η

JKR (Johnson–Kendall–Roberts) και η DMT (Derjaguin–Muller–Toporov) που ασχολούνται κυρίως με τη συγγένεια (Adhesion) μεταξύ των αλληλοεπιδρώντων επιφανειών. [15]

Για κρυσταλλικά μεταλλικά νανοσωματίδια όπως τα νανοσωματίδια χρυσού συμμετρίας six-fold βρέθηκε ότι η σκληρότητα και το μέτρο ελαστικότητας αυξήθηκε εξαιτίας του σχηματισμού διαταραχών σε συγκεκριμένους κρυσταλλογραφικούς προσανατολισμούς. [15]

Στην περίπτωση σύνθετων υλικών, η προσθήκη νανοϋλικών βελτιώνει τις μηχανικές ιδιότητες. Οι μηχανικές ιδιότητες συνδέονται με το μέγεθος και τη μορφολογία των κόκκων του υλικού. Τα μικρά νανοσωματίδια μπορούν να προστεθούν σε υλικά μήτρας για να μειώσουν το πορώδες, να αυξήσουν τη σχετική πυκνότητα ή ακόμα και να οδηγήσουν σε σμίκρυνση του μεγέθους των κόκκων ή να εμποδίσουν την μη ομαλή ανάπτυξή τους. Με αυτόν τον τρόπο τα νανοσωματίδια οδηγούν σε υλικά με βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες. [16]

1.3.4 Θερμικές Ιδιότητες

Τα μεταλλικά νανοσωματίδια παρουσιάζουν υψηλή θερμική αγωγιμότητα, ανάλογη του μεγέθους, του σχήματος και των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους [17]. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα νανοσωματίδια συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο μέρος της μάζας τους στην επιφάνειά τους, στην οποία λαμβάνει χώρα η μεταφορά θερμότητας. Μάλιστα, ακόμα και στη στερεή τους μορφή συχνά έχουν πολύ μεγαλύτερη θερμική αγωγιμότητα από ότι άλλα ρευστά. Παράδειγμα αποτελεί ο χαλκός με αγωγιμότητα περίπου 700 φορές μεγαλύτερη από ότι το νερό. Επιπλέον, η ιδιότητα αυτή αξιολογείται σε ρευστά στα οποία είναι διαλυμένα τα νανοσωματίδια, δηλαδή νανορευστά, όπου παρατηρείται πάλι ενισχυμένη μεταφορά θερμότητας συγκριτικά με τα συμβατικά ρευστά. Συνήθως η διασπορά των νανοσωματιδίων γίνεται σε υγρά όπως το νερό, η αιθυλενογλυκόλη ή άλλα έλαια [18]. Στα νανορευστά, η θερμική αγωγιμότητα επηρεάζεται από παράγοντες όπως η συγκέντρωση σε νανοσωματίδια, τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, το μέσο διασποράς, η θερμοκρασία και άλλα [17].

1.3.5 Καταλυτικές ιδιότητες

Οι καταλυτικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων οφείλονται στο μικρό τους μέγεθος και τον υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο που οδηγεί σε συγκέντρωση περισσότερων ατόμων στην επιφάνεια. Τα άτομα αυτά συνδέονται ασθενώς με το υπόλοιπο πλέγμα ατόμων και επομένως τα σωματίδια αποκτούν υψηλή ενέργεια επιφάνειας και δραστικότητα που τους επιτρέπει να καταλύουν πολλές χημικές αντιδράσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο Χρυσός (Au) που στην φυσική του μορφή είναι από τα λιγότερο δραστικά μέταλλα ενώ σε διαστάσεις νανοκλίμακας εμφανίζει ενδιαφέρουσες καταλυτικές ιδιότητες. Παράγοντες που επηρεάζουν τις ιδιότητες αυτές των νανοσωματιδίων, είναι το μέγεθος και το σχήμα τους, η κατανομή τους, η προετοιμασία του μέσου στο οποίο εναποτίθενται καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης. Γενικώς, όσο μικρότερο το

μέγεθος και πιο στενή η κατανομή μεγέθους, τόσο πιο υψηλή η δραστικότητα που παρατηρείται. Επιπλέον, έχει σημασία να γίνεται κατάλληλη προετοιμασία του υποστρώματος και εναπόθεση των νανοσωματιδίων σε αυτό, ώστε να αποφευχθεί η συσσωμάτωσή τους. Επίσης, οι καταλυτικές ιδιότητες εξαρτώνται από τον τύπο του υποστρώματος και των νανοσωματιδίων.[19]

1.4 Χαρακτηρισμός

Για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων χρησιμοποιείται πληθώρα τεχνικών με στόχο τον προσδιορισμό βασικών μεγεθών που καθορίζουν τη χρήση και τις εφαρμογές στις οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα εν λόγω υλικά [20]. Χαρακτηριστικά τα οποία μετρούνται είναι: το μέγεθος (Υδροδυναμική διάμετρος μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός-DLS, διάμετρος μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης-TEM), το σχήμα (μέσω μικροσκοπίας TEM,SEM και AFM), το επιφανειακό φορτίο (δυναμικό zeta μέσω DLS), τα οπτικά χαρακτηριστικά (με χρήση φασματομετρικών τεχνικών UV-Vis και φασματοφθορισμομετρίας), η χημική δομή (μέσω FTIR και Raman φασματομετρίας), η κρυσταλλική δομή (μέσω περίθλασης ακτινών X-XRD), η ποσοτική σύσταση (χρήση φασματομετρίας εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος Αργού- ICP) και οι θερμικές ιδιότητες (χρήση θερμοβαρυμετρίας-TG, θερμιδομετρίας)[21]. Στην παρούσα εργασία θα αναλυθούν οι πιο συχνά εφαρμοζόμενες τεχνικές σε νανοσωματίδια ανάλογα με το είδος του χαρακτηριστικών που προσδιορίζουν.

1.4.1 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός

Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων και είναι σημαντικός διότι αυτά τα χαρακτηριστικά επηρεάζουν τις ιδιότητες των υλικών αυτών [18]. Για την αξιολόγησή τους χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM), η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) και η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

- Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης-SEM

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) αποτελεί μία χρήσιμη μέθοδο μικροσκοπίας με στόχο τον προσδιορισμό του μεγέθους, του σχήματος και των επιφανειακών χαρακτηριστικών των νανοσωματιδίων [20], [22]. Η αρχή λειτουργίας του SEM βασίζεται στον βομβαρδισμό του υλικού με δέσμη πρωτογενών ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας από το οποίο εκπέμπονται κυρίως τα δευτερογενή (secondary) ηλεκτρόνια και τα οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered). Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια δίνουν πληροφορίες για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του υλικού ενώ τα οπισθοσκεδαζόμενα για τη σύστασή του, ανάλογα με την ένταση τους. Η μέθοδος

χρησιμοποιείται ευρέως καθώς η προετοιμασία του δείγματος και η απόκτηση εικόνων είναι σχετικά απλή και γρήγορη διαδικασία [22]. Επιπλέον, το SEM παρέχει πληροφορίες για τον βαθμό καθαρότητας του δείγματος αλλά και τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων. Ακόμα, δίνεται η δυνατότητα συνδυασμού της μικροσκοπίας SEM με φασματοφωτόμετρο ακτινών Χ διασποράς ενέργειας (EDX) για τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης της επιφάνειας. Περιορισμό της μικροσκοπίας SEM αποτελεί η αδυναμία προσδιορισμού της εσωτερικής δομής των σωματιδίων ενώ διαθέτει χαμηλότερη ευκρίνεια (3-20nm) σε σχέση με άλλες μεθόδους χαρακτηρισμού όπως το TEM [20].

- Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης-TEM

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) αποτελεί μία διαδεδομένη τεχνική για τη μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων στη νανοκλίμακα, το μέγεθος των κόκκων, την κατανομή μεγεθών και τον προσδιορισμό της μορφολογίας [20]. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας η οποία διαπερνά το δείγμα και δίνει πληροφορίες για το εσωτερικό της δομής του, έχοντας ως πλεονέκτημα την υψηλή ευκρίνεια και την ποικιλία σε μεγεθύνσεις, με ευαισθησία που φτάνει έως και τα 0,2nm [23]. Η δέσμη ηλεκτρονίων αλληλεπιδρά με τα άτομα του υλικού και προκύπτουν τα μη σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια που διαπερνούν το δείγμα, καθώς και τα σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια. Στη συνέχεια όλα τα είδη ηλεκτρονίων εστιάζονται μέσω κατάλληλων ηλεκτρομαγνητικών φακών και ανιχνεύονται σε οθόνη φθορισμού που βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια του δείγματος [3], [24]. Έτσι, λαμβάνεται μια εικόνα που αποτελείται από φωτεινές (από τα ηλεκτρόνια που διαπέρασαν την επιφάνεια) και σκοτεινές περιοχές(από τα ηλεκτρόνια που δεν διαπέρασαν την επιφάνεια), οι οποίες οδηγούν σε συμπεράσματα σχετικά με την πυκνότητα του υλικού στα διαφορετικά του σημεία [3]. Η μικροσκοπία TEM παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς όπως το κόστος, η χρήση υψηλού κενού, η προετοιμασία του δείγματος που απαιτεί μεγάλο χρόνο και ιδιαίτερους χειρισμούς ενώ παράλληλα το δείγμα πρέπει να είναι σε μορφή πολύ λεπτής φλοίδας [20] [23].

- Δυναμική σκέδαση φωτός-DLS

Η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) είναι μία τεχνική που επιτρέπει τον προσδιορισμό της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου των σωματιδίων και της κατανομής του μεγέθους τους. Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στις αλλαγές στην ένταση του σκεδαζόμενου φωτός σε συνάρτηση με το χρόνο, που φτάνει στο δείγμα μέσω laser, εξαιτίας της κίνησης Brown σωματιδίων σε αιώρημα. Η κίνηση Brown είναι η τυχαία κίνηση των σωματιδίων προς οποιαδήποτε κατεύθυνση κατά την οποία τα μεγαλύτερα σωματίδια κινούνται πιο αργά και σκεδάζουν περισσότερο φως σε σχέση με τα μικρότερα σωματίδια, ενώ ακόμα και μικρή ποσότητα συσσωματωμάτων ή ύπαρξη ακαθαρσιών μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερες τιμές κατανομής μεγέθους. Η ταχύτητα της κίνησης Brown υπολογίζεται έμμεσα μέσω μέτρησης του συντελεστή διάχυσης D από τον οποίο

προσδιορίζεται η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων με τη βοήθεια της εξίσωσης Stokes-Einstein. Συνήθως, το μέγεθος των σωματιδίων που βρίσκεται μέσω του DLS είναι μεγαλύτερο από αυτό που προσδιορίζεται από το TEM, το οποίο πιθανώς οφείλεται στην κίνηση Brown. Η κατανομή μεγέθους προσδιορίζεται μέσω του συντελεστή πολυδιασποράς (Polydispersity Index-PDI) ο οποίος λαμβάνει τιμές από το 0 έως το 1, όπου 0 σημαίνει υψηλή ομοιογένεια νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθος ενώ 1 υψηλή ανομοιογένεια. Η τεχνική DLS είναι μία από τις πιο δημοφιλείς για τον υπολογισμό του μεγέθους και της κατανομής του μεγέθους καθώς παρέχει γρήγορες μετρήσεις σε ένα εύρος σωματιδίων από 1nm-1μm και επιπλέον είναι οικονομική. [24]

1.4.2 Χημικός και Δομικός Χαρακτηρισμός

Ο χημικός και δομικός προσδιορισμός του υλικού που μελετάται αποτελεί έναν από τους βασικούς στόχους κατά τη σύνθεση ενός υλικού έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ο επιτυχής σχηματισμός του, η ποιότητά του και οι τυχόν αλλοιώσεις που μπορεί να έχει υποστεί. Για τον σκοπό αυτό στην περίπτωση νανοσωματιδίων εφαρμόζονται τεχνικές όπως η φασματοσκοπία FTIR, όπου προσδιορίζονται οι λειτουργικές ομάδες που απαρτίζουν το υλικό, η περίθλαση ακτινών Χ, που βοηθά στον προσδιορισμό των μορφολογικών χαρακτηριστικών του κρυστάλλου καθώς και η μέτρηση του ζ-δυναμικού, με στόχο την ανάδειξη της σταθερότητας των νανοσωματιδίων. Οι παραπάνω τεχνικές αναλύονται στη συνέχεια:

- Fourier Transform-Infrared Radiation (FTIR)

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR) αποτελεί μία μέθοδο προσδιορισμού της χημικής δομής δειγμάτων με χρήση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπέρυθρου (4000-400cm^{-1}). Το λαμβανόμενο φάσμα παρουσιάζει κορυφές απορρόφησης από τις χαρακτηριστικές ομάδες δεσμών των μορίων του δείγματος εξαιτίας των δονητικών και περιστροφικών ενεργειών που αποκτούν μέσω της ακτινοβόλησης. Επομένως, το φάσμα FTIR αποτελεί ‘’δαχτυλικό αποτύπωμα’’ για κάθε ουσία. Η τεχνική πλεονεκτεί ως γρήγορη και ευαίσθητη για τον προσδιορισμό της σύστασης του υλικού που μετράται, την ποσότητα που περιέχεται στο δείγμα μέσω μέτρησης του μεγέθους των κορυφών και επίσης επιτρέπει τον προσδιορισμό της ποιότητάς του εντοπίζοντας ατέλειες, ακαθαρσίες, πιθανή οξείδωση του υλικού ή και αποσύνθεσή του. Γενικά, η μέθοδος αφορά τον δομικό χαρακτηρισμό οργανικών ενώσεων επομένως στην περίπτωση μεταλλικών νανοσωματιδίων χρησιμοποιείται για την εύρεση των μορίων που είναι υπεύθυνα για την σύνθεσής τους και τα επικαλύπτουν. [20], [24], [25]

- X-Ray Diffraction (XRD)

Η περίθλαση ακτινών Χ (XRD) αποτελεί μέθοδο προσδιορισμού της μορφολογίας ενός υλικού σε ό,τι αφορά τα κρυσταλλογραφικά χαρακτηριστικά όπως τη δομή και το μέγεθος του κρυστάλλου και τις παραμέτρους του πλέγματος. Κατά την τεχνική αυτή το δείγμα ακτινοβολείται με ακτίνες Χ όπου ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων στη μοναδιαία κυψελίδα του πλέγματος, προκαλείται και αντίστοιχη περίθλαση ακτινών. Από το μοτίβο των δεσμών περίθλασης μπορεί να γίνει ταυτοποίηση του υλικού μέσω σύγκρισης με υλικά αναφοράς και επιπλέον μπορούν να προσδιοριστούν τυχόν ακαθαρσίες. Επίσης, με τη βοήθεια των εξισώσεων Debye-Scherer είναι δυνατός ο υπολογισμός του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού. Το φάσμα που λαμβάνεται αποτελείται από κορυφές των οποίων η θέση εξαρτάται από την μεταφραστική συμμετρία (translational symmetry) και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού ενώ η ένταση των κορυφών αποκαλύπτει την θέση των ατόμων και την ηλεκτρονιακή πυκνότητα της μοναδιαίας κυψελίδας. Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται σε άμορφα υλικά και σε πολύ μικρά νανοσωματίδια (<3nm) καθώς οι κορυφές που λαμβάνονται είναι πεπλατυσμένες. [18], [20], [24]

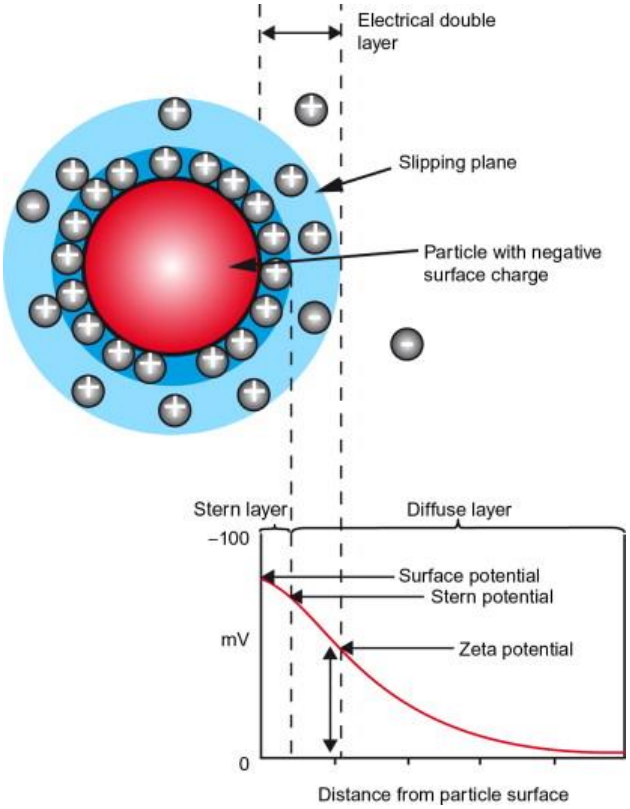
- Ζ-Δυναμικό (Zeta Potential)

Το ζ-δυναμικό αποτελεί έναν από τους χαρακτηρισμούς που είναι απαραίτητοι για τον προσδιορισμό της κατάστασης συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων. Για την μέτρηση του χρησιμοποιείται το όργανο DLS. Η αρχή λειτουργίας του οργάνου για την μέτρηση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ένα φορτισμένο σωματίδιο εντός ηλεκτρολύτη αποκτάει ένα στρώμα ιόντων αντίθετου φορτίου από αυτό που έχει το σωματίδιο (Εικόνα 6). Το στρώμα αυτό, συνδέεται ισχυρά με το σωματίδιο και ονομάζεται Stern layer. Ένα δεύτερο στρώμα ιόντων σχηματίζεται εξωτερικά του στρώματος Stern, το οποίο συνδέεται ασθενέστερα και ονομάζεται στοιβάδα διάχυσης. Τα δύο αυτά στρώματα συνολικά αποτελούν την ηλεκτρική διπλοστοιβάδα του σωματιδίου και διαχωρίζονται από το εξωτερικό περιβάλλον μέσω του επίπεδου ολίσθησης. Τα ιόντα εντός της διπλοστοιβάδας κινούνται μαζί με το σωματίδιο ενώ τα ιόντα εκτός αυτής παραμένουν ως έχει στο μέσο διασποράς. Το ηλεκτροστατικό δυναμικό που σχηματίζεται στο επίπεδο ολίσθησης ονομάζεται ζ-δυναμικό και σχετίζεται με το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων. Για τη μέτρηση του, ασκείται ηλεκτρικό πεδίο στο δείγμα και μετράται η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων μέσω ταχυμετρίας Laser Doppler (LDV) και τελικά υπολογίζεται το ζ-δυναμικό μέσω της εξίσωσης Henry. Νανοσωματίδια με δυναμικό μεταξύ -10 και +10 mV θεωρούνται ουδέτερα ως προς το φορτίο τους ενώ νανοσωματίδια με δυναμικό μεγαλύτερο από +30 και μικρότερο από -30 mV θεωρούνται ισχυρά φορτισμένα. [26]

Επίσης, οι τιμές δυναμικού άνω των +30 mV και κάτω των -30 mV υποδεικνύουν σταθερά σωματίδια που αποτρέπουν την μεταξύ τους συσσωμάτωση λόγω των ισχυρών απώσεων [27].

- Φασματοσκοπία εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος Αργού (ICP-OES)

Η τεχνική ICP-OES χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ανόργανων ουσιών όπως τα μέταλλα. Χρησιμοποιείται πλάσμα, το οποίο διεγείρει τα άτομα και τα ιόντα του μετρούμενου δείγματος και η εκπεμπόμενη ακτινοβολία συλλέγεται από τον ανιχνευτή του οργάνου. Το φάσμα που λαμβάνεται αναλύεται ώστε να βρεθεί το είδος του υλικού που περιέχεται στο δείγμα. Η ένταση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται, προσδιορίζει τη συγκέντρωση του δείγματος. Αναλυτικότερα, το δείγμα εισέρχεται στο όργανο με τη βοήθεια περιστατικής αντλίας και μετατρέπεται σε αερόλυμα μέσω εκνεφωτή. Για την παραγωγή του πλάσματος, αρχικά αέριο Αργό εισέρχεται στον θάλαμο του οργάνου και ασκείται υψηλής συχνότητας ηλεκτρικό ρεύμα σε πηνίο. Με την δημιουργία ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, το αέριο Αργό ιονίζεται και έτσι δημιουργείται το πλάσμα. Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του πλάσματος είναι υψηλή και η θερμοκρασία του φτάνει τους 10000K. Η θερμότητα χρησιμοποιείται για την διέγερση των ηλεκτρονίων του δείγματος.[28]



Εικόνα 6: Φορτισμένο σωματίδιο σε ηλεκτρολύτη [29]

1.4.3 Οπτικοηλεκτρονικός Χαρακτηρισμός

Ο πιο συνηθισμένος και χρήσιμος οπτικός χαρακτηρισμός σε νανοσωματίδια είναι η φασματομετρική τεχνική UV- Vis που περιλαμβάνει τη λήψη φάσματος απορρόφησης στην περιοχή

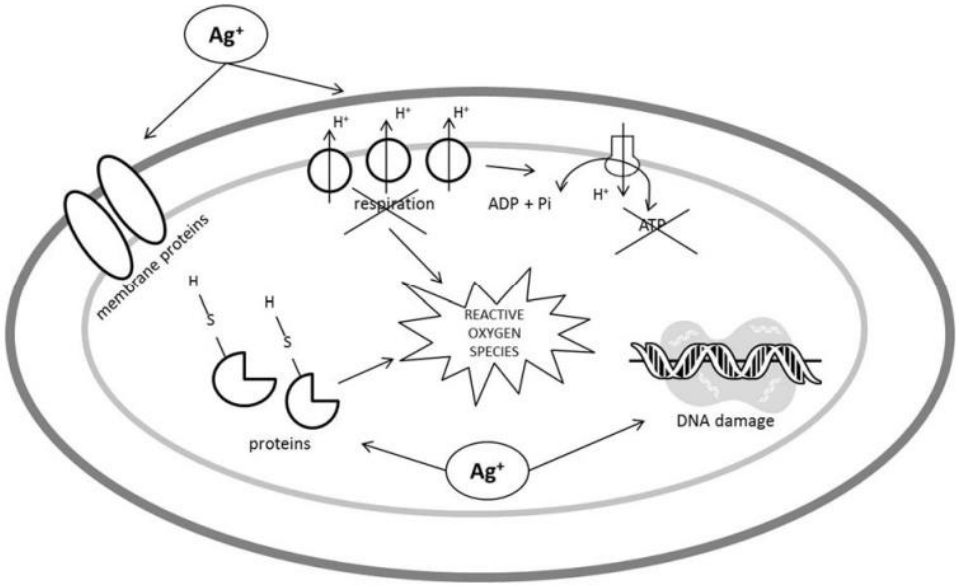
του ορατού (380-780nm) και εγγύς υπεριώδους φωτός (170-380nm). Η μέτρηση της απορρόφησης ποσοτικοποιείται σε συγκέντρωση δείγματος μέσω του νόμου Lambert-Beer [30]. Αποτελεί μία από τις πρωταρχικές μετρήσεις που διεξάγονται σε νανοσωματίδια ώστε να ελεγχθεί η σύνθεση και η σταθερότητά τους. Επιπλέον, ως τεχνική πλεονεκτεί ως γρήγορη, απλή, φθηνή, ευαίσθητη, μη καταστρεπτική και εκλεκτική σε διαφορετικά είδη νανοσωματιδίων. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.3.1, τα διαφορετικά νανοσωματίδια αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα μήκη κύματος ενώ λαμβάνει χώρα το φαινόμενο συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές απεικονίζονται με κορυφές μέγιστης απορρόφησης, τα χαρακτηριστικά των οποίων εξαρτώνται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων, το βαθμό συσσωμάτωσής τους και το διηλεκτρικό μέσο [30],[20].

1.5 Νανοσωματίδια Αργύρου

1.5.1 Άργυρος και Νιτρικός Άργυρος

Ο άργυρος αποτελεί ένα πολυτελές, ελατό και όλκιμο μέταλλο που χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα (5000 Π.Χ.) και ανήκει στην $11^{η}$ ομάδα και $5^{η}$ περίοδο του περιοδικού πίνακα. Ο ατομικός του αριθμός είναι 47 και το ατομικό του βάρος 107,880 g/mol ενώ η ηλεκτρονιακή του δομή είναι η $[Kr]4d^{10}5s^{1}$. Αποτελεί ένα διαμαγνητικό υλικό ενώ κατέχει την υψηλότερη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα και οπτική διαθλασιμότητα από κάθε άλλο μέταλλο. Επιπλέον, το σημείο τήξης και ζέσης αντίστοιχα είναι 961,9 και 2212 °C και είναι σταθερό στο νερό και το οξυγόνο. Οι πιο συνηθισμένες οξειδωτικές καταστάσεις στις οποίες βρίσκεται το άτομο του αργύρου είναι η 0 και η +1 και λιγότερο συχνά μπορεί να αποκτήσει καταστάσεις +2 και +3. Ο άργυρος διαλύεται στο νιτρικό οξύ και σχηματίζει το άλας του νιτρικού αργύρου ($AgNO_3$) που είναι ένα διαφανές κρυσταλλικό υλικό, διαλυτό στο νερό και φωτοευαίσθητο [31]. Σήμερα, ο άργυρος χρησιμοποιείται για την κατασκευή νομισμάτων, για ηλεκτρικές και ηλεκτρονικές εφαρμογές και για κοσμήματα [32]. Η χρήση του αργύρου για την θεραπεία και την αποφυγή μολύνσεων τοποθετείται ήδη από τον $4^{ο}$ αιώνα π.Χ., ενώ συναντάται στην ιατρική βιβλιογραφία του $17^{ου}$ και $18^{ου}$ αιώνα. Ιστορικές πηγές αναφέρουν πως Πέρσες βασιλιάδες χρησιμοποιούσαν μόνο αργυρά δοχεία για να πίνουν νερό καθώς όχι μόνο αποτελούσε πολύτιμο υλικό αλλά διατηρούσε το νερό φρέσκο. Επιπλέον, το άλας νιτρικού αργύρου χρησιμοποιούνταν τον $18^{ο}$ αιώνα τοπικά ως θεραπεία για μολυσμένες πληγές και χορηγούνταν ως φάρμακο για το στομαχικό έλκος. Άλλες εφαρμογές του αργύρου αφορούσαν τη χρήση σε εγκαύματα. Κατά τη διάρκεια του $2^{ου}$ παγκοσμίου πολέμου, η άνοδος των αντιβιοτικών οδήγησε σε έκλειψη των εφαρμογών του αργύρου για τον περιορισμό των μολύνσεων [33]. Σήμερα, με την παραγωγή και τη χρήση πολλών συνθετικών οργανικών και μη ενώσεων και την διαφυγή τους στο περιβάλλον αλλά και λόγω της αλόγιστης χρήσης αντιβιοτικών, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντίστασης στα αντιβιοτικά. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός

Υγείας προειδοποιεί για τους κινδύνους που ενέχει το γεγονός αυτό [34]. Επομένως, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του αργύρου έχουν αποκτήσει και πάλι ενδιαφέρον και μελετώνται σχετικά με τις δυνατότητες τους σε αυτόν τον τομέα. Στην Εικόνα 7 παριστάνεται ο τρόπος με τον οποίο ο άργυρος επιδρά στα βακτηριακά κύτταρα και τα εξοντώνει. Συγκεκριμένα, τα ιόντα αργύρου αλληλεπιδρούν με θειόλες στην επιφάνεια των μικροοργανισμών και αντικαθιστούν το Υδρογόνο και έτσι εμποδίζουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων και την αναπνοή του κυττάρου. Αυτό οδηγεί σε απενεργοποίηση των λειτουργειών της μεμβράνης και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Άλλες θεωρίες αναφέρονται στην πρόσδεση των ιόντων αργύρου σε μεμβρανικές πρωτεΐνες, προκαλώντας διαρροή ιόντων, γεγονός που επιτρέπει την είσοδο των ιόντων αργύρου στο κύτταρο και την αλληλεπίδραση τους με τα νουκλεϊκά οξέα. Επιπλέον, τα ιόντα αυτά μπορούν να προάγουν τη σύνθεση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Συνολικά, με τους μηχανισμούς αυτούς εμποδίζονται οι φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου και προκαλούνται φθορές και αλλοιώσεις σε αυτό [32] .



Εικόνα 7: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης ιόντων Αργύρου με τα μικροβιακά κύτταρα και θανάτωσή τους[32]

1.5.2 Ιδιότητες- Εφαρμογές AgNPs

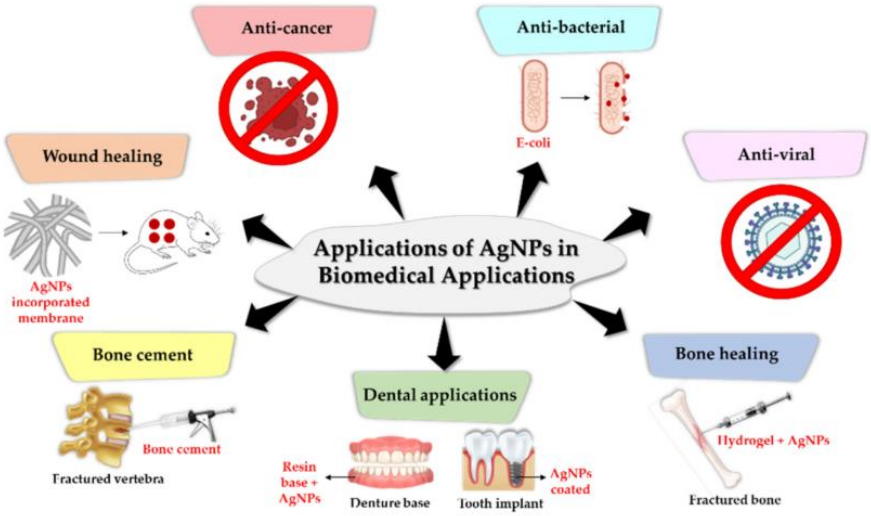
Οι μοναδικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων αργύρου, που οφείλονται στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, το μικρό μέγεθος, την χημεία της επιφάνειας, το σχήμα κ.α. έχουν ανοίξει το δρόμο για ένα πλήθος εφαρμογών στις οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν. Πέρα από τις γνωστές οπτικές-ηλεκτρονικές και καταλυτικές ιδιότητες των AgNPs, αυτά παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες που τους επιτρέπουν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές της ιατρικής και βιοϊατρικής (Εικόνα 8). Τέτοιες ιδιότητες αποτελούν οι αντιβακτηριακές, αντιιικές, αντιμυκητιακές,

αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές όπως παρουσιάζονται στη συνέχεια, εκ των οποίων οι αντιβακτηριακές τους επιτρέπουν να αξιοποιούνται σε εφαρμογές επούλωσης τραυμάτων, εμφυτευμάτων και αποκατάστασης τμημάτων του ανθρώπινου σώματος. Επιπλέον, τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) έχουν εφαρμογές στην βιοϊατρική όπου χρησιμοποιούνται στην βιοαπεικόνιση και στους βιοαισθητήρες. Άλλες εφαρμογές των AgNPs περιλαμβάνουν τη βιομηχανία υγιεινής, την αποθήκευση τροφίμων, τις περιβαλλοντικές εφαρμογές και την κλωστοϋφαντουργία. [20]

- Αντιβακτηριακές: Τα AgNPs μπορούν να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, η οποία έχει αναπτυχθεί λόγω της υπερβολικής χρήσης τους. Τα AgNPs έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στην αναστολή της ανάπτυξης τόσο των Gram-θετικών όσο και των Gram-αρνητικών βακτηρίων. [24]
- Αντιικές: Τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) έχουν επιδείξει αξιόλογη δράση ως αντιικοί παράγοντες, προσφέροντας νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις σε περιπτώσεις όπου τα συμβατικά αντιικά φάρμακα αποτυγχάνουν. Παραδείγματα της αντιικής δράσης των AgNPs περιλαμβάνουν τη χρήση τους κατά του HIV-1, του ιού του έρπητα (HSV-1, HSV-2) και του δάγκειου ιού (DEN-2). [24], [34]
- Αντιμυκητιακές: Τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) έχουν αποδειχθεί ότι διαθέτουν ισχυρές αντιμυκητιακές ιδιότητες, όπως επιβεβαιώνουν μελέτες που εξέτασαν διάφορους μύκητες και ποικίλες συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων από διαφορετικές πηγές. Η ανάγκη για νέα αντιμυκητιακά φάρμακα πηγάζει από τον περιορισμένο αριθμό διαθέσιμων φαρμάκων, καθιστώντας τα AgNPs μια ελκυστική εναλλακτική λύση, καθώς είναι βιοσυμβατά και έχουν χαμηλή τοξικότητα για τον άνθρωπο. [20]
- Αντιφλεγμονώδεις: Τα AgNPs έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητά τους να καταστείλουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις μειώνοντας τη δράση φλεγμονωδών δεικτών και συμβάλλοντας θετικά στα πρώτα στάδια της επούλωσης πληγών και τραυμάτων. Παραδείγματα δοκιμών σε πειραματόζωα έδειξαν μείωση φλεγμονής, ταχύτερη επούλωση και βελτίωση των αισθητικών χαρακτηριστικών των πειραματόζωων. [20]
- Αντικαρκινικές: Η πολυπλοκότητα της ασθένειας του καρκίνου, σε συνδυασμό με την ύπαρξη πολλών διαφορετικών ειδών αλλά και οι παρενέργειες που ακολουθούν τις χρησιμοποιούμενες χημειοθεραπευτικές μεθόδους, έχουν οδηγήσει στη συνεχή αναζήτηση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων. Τα AgNPs έχουν επιδείξει θετικά σημεία ως αντικαρκινικοί παράγοντες σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε σειρές καρκινικών κυττάρων όπως οι HepG2 και MCF-7 και η σειρά καρκινικών κυττάρων του κόλον HCT116. Τα νανοσωματίδια αυτά, σφαιρικού σχήματος και μεγέθους 10 και 20 nm αντίστοιχα οδηγούν σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και σε απόπτωση των καρκινικών γονιδίων. [20], [24]
- Αντι-αγγειογενικές: In vitro και in vivo μοντέλα έχουν δείξει την ικανότητα των AgNPs να εμφανίζουν αντι-αγγειογενικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, νανοσωματίδια αργύρου που

συντέθηκαν βιολογικά ελέγχθηκαν ως προς τη δράση τους σε σειρά κυττάρων (BRECs) και βρέθηκε ότι καταστείλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετάσταση των κυττάρων. [20]

- Επούλωση οστών: Τα AgNPs χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με άλλα υλικά στην επούλωση οστών με τη χρήση προσθετικών και εμφυτευμάτων οστού που έχει υποστεί τραύμα. Τα νανοσωματίδια συμβάλλουν με τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες αποτρέποντας την μόλυνση από βακτήρια και επιτρέποντας την ομαλή επούλωση του οστού. [24]
- Οστικό τσιμέντο: Η χρήση των νανοσωματιδίων αργύρου στο οστικό τσιμέντο που χρησιμοποιείται στην σπονδυλοπλαστική επίσης αποσκοπεί στην ασφαλή αντικατάσταση τραυματισμένων τμημάτων του σώματος με τεχνητά μέλη και την αποφυγή μολύνσεων κατά την διαδικασία αυτή. [24]
- Οδοντιατρικές εφαρμογές: Αντίστοιχα, στην οδοντιατρική τα AgNPs μπορούν να συνδυαστούν με τα οδοντιατρικά βιοϋλικά ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη βιολογικών φιλμ βακτηρίων που αυξάνουν τον κίνδυνο για αποτυχία εμφυτευμάτων και άλλες ασθένειες στα δόντια και τα ούλα. [24]
- Καθετήρες: Τα AgNPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υλικά επικάλυψης σε καθετήρες (κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες, ουροκαθετήρες) χάρη στην ιδιότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων που μπορούν να περάσουν μέσω του καθετήρα στο σύστημα του οργανισμού. [24]
- Επούλωση τραύματος: Τα νανοσωματίδια αργύρου μπορούν να συμβάλλουν στην θεραπεία τραυμάτων ως μέσο μεταφοράς φαρμάκου στην περιοχή του τραύματος. [24]
- Διάγνωση ασθενειών: Τα νανοσωματίδια αργύρου χρησιμοποιούνται στην βιοαπεικόνιση για την διάγνωση ασθενειών εξαιτίας του φαινόμενου του συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR). Έτσι, τα AgNPs χρησιμοποιούνται στην διάγνωση και θεραπεία και επιπλέον δίνεται η δυνατότητα για σύνθεσή τους έτσι ώστε να διαθέτουν αυξημένη ακουστική ανακλασιμότητα που οδηγεί σε πιο φωτεινές και καθαρές εικόνες.[20]
- Βιοαισθητήρες: Τα AgNPs έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοαισθητήρες, για παράδειγμα στην κλινική ανίχνευση του ορού p53 που βρίσκεται σε είδη καρκινώματος. [20]



Εικόνα 8: Εφαρμογές νανοσωματιδίων αργύρου στο πεδίο της βιοϊατρικής τεχνολογίας [24]

1.5.3 Αντιβακτηριακές Ιδιότητες

Τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης σε ό,τι αφορά τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες καθώς σήμερα η παρουσία όλο και περισσότερων ανθεκτικών μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά γίνεται εντονότερη και προκαλεί δυσκολία στην θεραπεία των ασθενών [24]. Τα AgNPs αποτελούν πιθανή και οικονομική λύση στο πρόβλημα αυτό και φαίνεται πως τα βακτήρια δεν αναπτύσσουν ανθεκτικότητα έναντι σε αυτά [34]. Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες που παρουσιάζουν εξαρτώνται από το είδος του βακτηρίου αλλά και τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων όπως το μέγεθος και το σχήμα[20]. Μπορούν να προσβάλλουν θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια όμως φαίνεται να υπάρχει αποτελεσματικότερη παρεμπόδιση στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, γεγονός που ίσως οφείλεται στο παχύτερο κυτταρικό τοίχωμά τους [24]. Επιπλέον, το μέγεθος των AgNPs παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση με αυτήν να είναι μεγαλύτερη με μείωση του μεγέθους [20]. Για μέγεθος μικρότερο των 10 nm παρατηρήθηκε ενισχυμένη αναστολή αφού η κινητική ανάπτυξη βρέθηκε μικρότερη ενώ σε μέγεθος περίπου 5 nm βρέθηκε η βέλτιστη αναστολή [34]. Σχετικά με το σχήμα, που επηρεάζει την αντιβακτηριακή δράση, έρευνα έδειξε ότι μεταξύ τριγωνικών, σφαιρικών και σωματιδίων τύπου ράβδου, μεγαλύτερη δράση είχαν τα τριγωνικά και στη συνέχεια τα σφαιρικά νανοσωματίδια, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στον αριθμό των εδρών των κρυσταλλικών δομών τους[21]. Επιπλέον, η αντιβακτηριακή δράση ενισχύεται στην περίπτωση θετικά φορτισμένων νανοσωματιδίων συγκριτικά με ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα νανοσωματίδια καθώς η έλξη μεταξύ θετικών σωματιδίων και της αρνητικά φορτισμένης βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης είναι μεγαλύτερη [21].

Ο τρόπος με τον οποίο δρουν τα νανοσωματίδια αργύρου στο βακτηριακό κύτταρο φαίνεται πως είναι πολυεπίπεδος, Αρχικά, τα AgNPs τρυπούν το κυτταρικό τοίχωμα, αποτρέπουν την ομαλή

μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου του τοιχώματος και εμποδίζουν την κυτταρική αναπνοή και την αντιγραφή αφού προκαλούν ζημιές σε πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Επιπλέον, οδηγούν στην δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και επομένως οξειδωτικού στρες στο κύτταρο το οποίο πιθανόν προκαλείται από τα παγιδευμένα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα. Ταυτόχρονα, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα αδυνατούν να αποτοξικοποιήσουν τα κύτταρο καθώς βασίζονται σε ομάδες θειολών για να λειτουργήσουν, οι οποίες έχουν καταληφθεί από ιόντα αργύρου. Η συνεχής αύξηση σε ROS οδηγεί σε καταστροφικές συνέπειες για την εσωτερική δομή του κυττάρου και συχνά οδηγεί σε απόπτωσή του. Ένας άλλος μηχανισμός που έχει προταθεί, γνωστός ως ‘’zombie effect’’, υποστηρίζει ότι με τον κυτταρικό θάνατο ενός βακτηρίου, τα νεκρά τμήματά του όπως RNA,DNA και πρωτεΐνες συνδέονται με τα AgNPs. Τα AgNPs τα περικλείουν έτσι που οδηγούνται σε άλλα ζωντανά βακτηριακά κύτταρα και τα οποία εξοντώνουν με ενισχυμένη δράση. [34]

1.5.4 Τοξικότητα

Τα νανοσωματίδια αργύρου απαντώνται πλέον σε πολλά προϊόντα και χρησιμοποιούνται σε πληθώρα εφαρμογών από τους ανθρώπους. Για το λόγο αυτό, η γνώση της επίδρασης που έχουν στους οργανισμούς και το περιβάλλον γενικότερα είναι σημαντική και κρίνεται απαραίτητο να προσδιορίζεται εάν η έκθεση στα AgNPs είναι ασφαλής [35]. Γενικά, μιλώντας για τοξικότητα, σημασία έχει η δόση η οποία λαμβάνεται και κάτω από ποιο όριο θεωρείται ασφαλής (50-150 μg/kg), όμως η παρατεταμένη έκθεση ακόμα και σε ασφαλείς συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση και επιπτώσεις στον οργανισμό. Στην περίπτωση των AgNPs τα μορφολογικά και φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά παίζουν ρόλο στο κατά πόσον θα προκαλέσουν τοξικότητα στον οργανισμό. Για παράδειγμα, όσο μικρότερο το μέγεθος των νανοσωματιδίων τόσο μεγαλύτερος ο κίνδυνος για τοξική δράση αφού τα μικρά σωματίδια μπορούν να εισέλθουν ευκολότερα εντός των κυττάρων και να κατανεμηθούν σε μεγαλύτερες περιοχές προκαλώντας σοβαρότερες ζημιές σε όργανα σε σχέση με μεγαλύτερα σωματίδια που πρέπει να περάσουν τα κανάλια ιόντων [36]. Οι ζωντανοί οργανισμοί εκτίθενται στα AgNPs μέσω της αναπνοής, του δέρματος και της κατάποσης. Τοξικές αντιδράσεις που μπορούν να εμφανιστούν από την έκθεση αυτή περιλαμβάνουν καρδιοαναπνευστικά προβλήματα, προβλήματα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, ζημιές στον ηπατικό και δερματικό ιστό [35].

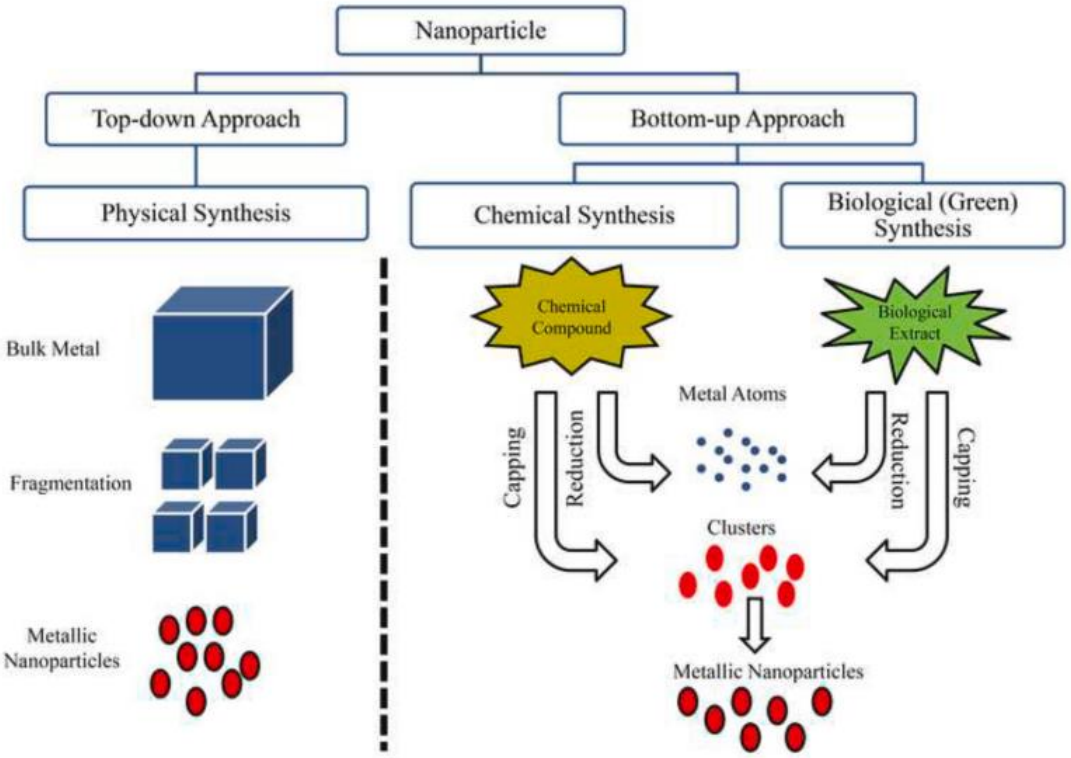
Ο βασικός μηχανισμός μέσω του οποίου δρουν τοξικά τα AgNPs είναι η απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου που καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα και οδηγούν σε κυτταρική απόπτωση. Τα AgNPs οξειδώνονται παρουσία οξυγόνου και δημιουργούνται ιόντα Ag+ που οδηγούν σε ακόμα περισσότερα ROS και τελικά σε οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, ο αμυντικός μηχανισμός που διαθέτει το κύτταρο ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες, δηλαδή το στρες ενδοπλασματικού δικτύου, εμποδίζεται επίσης από τα νανοσωματίδια και οδηγεί σε ξεδιπλωμένες ή λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες και σε συγκόλλησή τους. Ακόμα, τα AgNPs έχει βρεθεί πως καταστέλλουν τις

μιτοχονδριακές λειτουργίες, διεισδύουν στα ηπατικά κύτταρα παράγοντας ROS και προκαλούν την οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών αλλά και την αλλοίωση του DNA. [36]

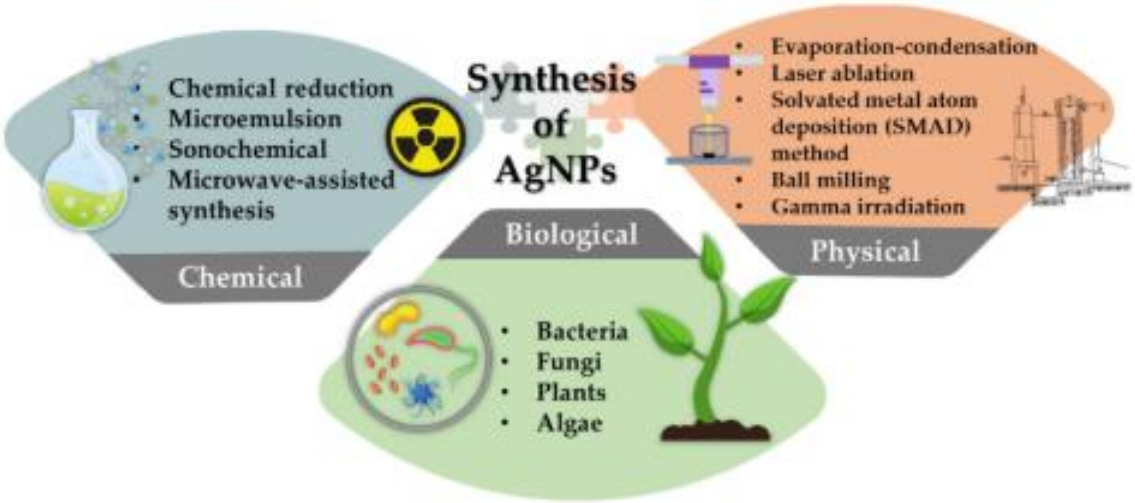
1.6 Μέθοδοι σύνθεσης Νανοσωματιδίων Αργύρου

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω τριών διαφορετικών τρόπων: με φυσική σύνθεση, με χημική σύνθεση και με βιολογική σύνθεση. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούν φυσικές μεθόδους υπάγονται στην κατηγορία της ‘’top-down’’ προσέγγισης ενώ οι χημικές και βιολογικές μέθοδοι στις ‘’bottom-up’’ προσεγγίσεις (Εικόνα 9). Με τον όρο top-down εννοείται η χρήση χύδην υλικών των οποίων το μέγεθος μειώνεται με φυσικούς τρόπους έτσι ώστε να αποκτηθεί λεπτόκοκκο υλικό αποτελούμενο από τα μεταλλικά σωματίδια. Στην περίπτωση της bottom-up προσέγγισης, άτομα και μόρια δημιουργούν συστάδες μέσω της διαδικασίας της πυρήνωσης και ανάπτυξης, που τελικά αποκτούν το μέγεθος νανοσωματιδίων. Με τις τεχνικές που περιλαμβάνει η προσέγγιση bottom-up είναι δυνατή η σύνθεση νανοσωματιδίων με τη χρήση πρόδρομων αλάτων. Γενικά, οι φυσικές μέθοδοι έχουν ως πλεονέκτημα το χρόνο που απαιτείται για τη σύνθεση και την απουσία χημικών που μπορεί να είναι επιβλαβή για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Ωστόσο, έχουν χαμηλή απόδοση σε σχέση με τις χημικές μεθόδους. Οι χημικές μέθοδοι είναι αποδοτικές και έχουν χαμηλό κόστος όμως σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιούν επιζήμια χημικά. Για το λόγο αυτό, οι βιολογικές μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων έχουν αποκτήσει όλο και μεγαλύτερη θέση καθώς υπάρχει ανάγκη για προσεγγίσεις που δεν χρησιμοποιούν τοξικά και μολυσματικά για το περιβάλλον υλικά και που συνάδουν με το αντικείμενο της Πράσινης Χημείας. [20], [24], [36]

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα είδη της φυσικής, της χημικής και της βιολογικής σύνθεσης (Εικόνα 10).



Εικόνα 9: Ταξινόμηση σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου σε Α) top-down προσέγγιση η οποία περιλαμβάνει τις φυσικές μεθόδους σύνθεσης και Β) bottom-up προσέγγιση η οποία περιλαμβάνει τις χημικές και βιολογικές μεθόδους σύνθεσης [37]



Εικόνα 10: Μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου μέσω Α) χημικής προσέγγισης, Β) φυσικής προσέγγισης και C) βιολογικής προσέγγισης[24]

1.6.1 Φυσικές Μέθοδοι

Στις φυσικές μεθόδους ανήκουν οι εξής βασικές τεχνικές: η εξάτμιση-συμπύκνωση (evaporation-condensation), η παλμική αφαίρεση με laser (Laser ablation method), η μέθοδος εκφόρτισης ηλεκτρικού τόξου (Arc discharge method) και η άλεση με σφαίρες (ball milling) ενώ υπάρχουν κάποιες επιπλέον τεχνικές όπως η διασπορά διαλελυμένων μεταλλικών ατόμων (Solvated Metal Atom Dispersion) και η ακτινοβολία γάμα. [24], [38]

- Εξάτμιση-Συμπύκνωση: Η μέθοδος απαιτεί τη χρήση ενός κυλινδρικού φούρνου ατμοσφαιρικής πίεσης. Αρχικά, το υλικό ατμοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και εισέρχεται στον φούρνο και στη συνέχεια φτάνει στο υπόστρωμα όπου τα σωματίδια σχηματίζουν πρώτα πυρήνες και στη συνέχεια αναπτύσσονται. Με τη μείωση της θερμοκρασίας οι ατμοί δημιουργούν νανοσωματίδια σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η μέθοδος απαιτεί μεγάλη χρονική διάρκεια και υψηλή ενεργειακή κατανάλωση. [24]
- Μέθοδος εκφόρτισης ηλεκτρικού τόξου: Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται δύο ηλεκτρόδια αργύρου τα οποία είναι βυθισμένα σε υγρό αδρανούς αερίου όπως He, Ar, Ne. Διαμέσου των ηλεκτροδίων ασκείται συνεχές ρεύμα που δημιουργεί το ηλεκτρικό τόξο και λόγω των υψηλών θερμοκρασιών το μέταλλο ατμοποιείται και μετατρέπεται σε μικρά σωματίδια που ύστερα συμπυκνώνονται και συλλέγονται. [38]
- Παλμική αφαίρεση με laser: Με τη μέθοδο αυτή, το υγρό δείγμα πρόδρομης ένωσης ακτινοβολείται από δέσμη laser και με δημιουργία νέφους πλάσματος σχηματίζονται οι πυρήνες μεταλλικών σωματιδίων και τελικά τα νανοσωματίδια. Ο διαλύτης στον οποίο βρίσκεται η αρχική μορφή του Αργύρου μπορεί να είναι είτε νερό είτε κάποιος οργανικός διαλύτης. Παράγοντες που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοσωματιδίων είναι το μήκος κύματος του laser, η διάρκεια των παλμών, ο διαλύτης και η παρουσία ή μη επιφανειοδραστικών ενώσεων. [24]
- Άλεση με σφαίρες: Σε αυτήν τη μέθοδο χρησιμοποιούνται σφαίρες ώστε να πραγματοποιηθεί μηχανική θραύση του μετάλλου σε μικρότερα μέρη μέχρι να αποκτήσει διαστάσεις νανοσωματιδίων. Η διασπορά των παραγόμενων νανοσωματιδίων εξαρτάται από παράγοντες όπως ο χρόνος άλεσης, η ταχύτητα περιστροφής και το μέγεθος των σφαιρών. Επιπλέον, η ποιότητά τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την ατμόσφαιρα και το λόγο σφαιρών και σκόνης μετάλλου. [24], [37]

1.6.2 Χημικές Μέθοδοι

Στις χημικές μεθόδους ανήκουν τεχνικές όπως η χημική αναγωγή, η τεχνική μικρογαλακτώματος, η σύνθεση με τη βοήθεια μικροκυμάτων και η ηχοχημική μέθοδος. Η χρήση χημικών μέσων αποτελεί την πιο κοινή προσέγγιση για τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου. Παρόλα αυτά, επειδή ακριβώς περιλαμβάνει επιβαρυντικές ουσίες για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, παρουσιάζει περιορισμούς σε ό,τι αφορά τις εφαρμογές στις οποίες μπορεί να αξιοποιηθεί. [24]

- Χημική Αναγωγή: Αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο μεταξύ των χημικών μεθόδων εξαιτίας της απλότητας που την χαρακτηρίζει. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται οργανικά ή ανόργανα αναγωγικά μέσα όπως το κιτρικό νάτριο, το NaBH4, η πολυαιθυλενογλυκόλη (PVP) και το αντιδραστήριο Tollen. Με τη χρήση των αναγωγικών μέσων τα ιόντα αργύρου (Ag^+) ανάγονται σε στοιχειακό Άργυρο (Ag^0). Με την προσθήκη τους στο διάλυμα της πρόδρομης ένωσης αργύρου, ο ρυθμός της αντίδρασης οξειδοαναγωγής είναι μεγάλος και οδηγεί στην δημιουργία μεγάλου αριθμού πυρήνων μετάλλου και επομένως σε πολλά μικρά νανοσωματίδια. Αργοί ρυθμοί αντίδρασης οδηγούν σε συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων το οποίο μπορεί να αποτραπεί με χρήση σταθεροποιητικών ενώσεων.
- Τεχνική μικρογαλακτώματος: Κατά την τεχνική αυτή χρησιμοποιείται επιφανειοδραστικός παράγοντας ώστε να σταθεροποιήσει τη διασπορά δύο μη αναμίξιμων φάσεων όπως τη διασπορά ελαίου σε νερό ή τη διασπορά νερού σε έλαιο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι δύο φάσεις που διασπείρονται η μία στην άλλη είναι ο αναγωγικός παράγοντας και η πρόδρομη ένωση αργύρου προς σχηματισμό μικκυλίων. Έτσι, πραγματοποιείται σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου. Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται είναι είτε ανιονικές όπως το SDS, κατιονικές όπως το PVP ή μη ιονικές όπως το Triton X-100.
- Ηχοχημική μέθοδος: Η μέθοδος αυτή κάνει χρήση υπερήχων σε διάλυμα πρόδρομης ένωσης αργύρου, όπου προκαλεί ένα τοπικό ‘’hot spot’’. Συγκεκριμένα, η ακτινοβόληση με υπερήχους οδηγεί στην εμφάνιση του φαινομένου σπηλαίωσης όπου σχηματίζονται και αυξάνονται σε μέγεθος φυσαλίδες και έπειτα καταρρέουν. Το φαινόμενο αυτό επιδρά στην επιφάνεια των σωματιδίων και έτσι παράγονται οι νανοδομές. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση είναι η θερμοκρασία, το pH, η πίεση κ.α. Η μέθοδος πλεονεκτεί λόγω της απλής εφαρμογής της και της ικανότητάς της να ελέγχει το μέγεθος των AgNPs μέσω χρήσης διαφορετικών συγκεντρώσεων πρόδρομων ενώσεων.
- Μέθοδος υποβοηθούμενη από μικροκύματα: Με τη βοήθεια των μικροκυμάτων αντί συμβατικών μεθόδων θέρμανσης, επιτυγχάνεται πιο ομοιογενής θέρμανση του διαλύματος και επομένως σχηματισμός μικρότερων και πιο ομοιόμορφων ως προς το μέγεθος νανοσωματιδίων αργύρου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα μικροκύματα προσφέρουν καλύτερο έλεγχο στη διαδικασία της πυρήνωσης και τα βήματα ανάπτυξης κατά τη σύνθεση των AgNPs. Το διάλυμα περιέχει την πρόδρομη ένωση Αργύρου, αναγωγικά μέσα για την μετατροπή των Ag^+ σε Ag^0 και σταθεροποιητικούς παράγοντες.

1.6.3 Βιολογικές Μέθοδοι

Οι βιολογικές μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων αποτελούν τις πιο απλές, φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους. Αυτό συμβαίνει καθώς χρησιμοποιούνται μη τοξικά αντιδραστήρια όπως εκχυλίσματα από φυτά και βιομόρια προερχόμενα από καλλιέργειες μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται προς αυτόν το στόχο είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και τα άλγη. [24], [39]

- Μέθοδοι βασισμένες σε βακτήρια: Η σύνθεση AgNPs που βασίζεται σε βακτήρια μπορεί να γίνει είτε εξωκυτταρικά είτε εσωκυτταρικά ανάλογα με το σημείο στο οποίο αυτά παράγονται. Γενικά, η πρόδρομη ένωση αργύρου όπως ο νιτρικός άργυρος ανάγεται από Ag^{+} σε Ag^{0} από αναγωγάσες που εξαρτώνται από το NADH του βακτηρίου. Οι αναγωγάσες λαμβάνουν τα ηλεκτρόνια από το NADH που μετατρέπεται σε NAD^{+}. Με την αναγωγή των ιόντων αργύρου το ένζυμο οξειδώνεται. Η εξωκυτταρική βιοσύνθεση προτιμάται ως πιο απλή μέθοδος στην ανάκτηση των AgNPs. Στην εσωκυτταρική βιοσύνθεση, η πρόδρομη ένωση παγιδεύεται εντός του βακτηρίου, ανάγεται και επικαλύπτεται και σε αυτό συνεισφέρουν σημαντικά το κυτταρικό τοίχωμα και οι δραστικές ενώσεις που βρίσκονται σε αυτό όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες κ.α. Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων επιτυγχάνεται μέσω πρωτεϊνών και πεπτιδίων που επικαλύπτουν τα νανοσωματίδια. Τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοσωματιδίων όπως το μέγεθος και το σχήμα εξαρτώνται από το είδος του βακτηρίου, τη θερμοκρασία, το pH και τη συγκέντρωση του υποστρώματος . [24], [39]
- Μέθοδος βασισμένη σε μύκητες: Η βιοσύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου μέσω μυκήτων μπορεί να γίνει επίσης είτε εξωκυτταρικά είτε εσωκυτταρικά. Γενικά, η χρήση μυκήτων προτιμάται καθώς η καλλιέργεια τους αποτελεί γρήγορη και οικονομική διαδικασία, οι μύκητες είναι απλοί στο χειρισμό και διαθέτουν ποικιλία ενζύμων και πρωτεϊνών τα οποία απεκκρίνονται και έτσι αυξάνεται η σύνθεση νανοσωματιδίων. Στην περίπτωση εξωκυτταρικής σύνθεσης, οι μύκητες που έχουν αναπτυχθεί σε άγαρ και ύστερα έχουν μεταφερθεί σε υγρή καλλιέργεια, φιλτράρονται ώστε να συλλεχθούν τα βιομόρια που είναι υπεύθυνα για την αναγωγή της πρόδρομης ένωσης αργύρου. Στην περίπτωση εσωκυτταρικής σύνθεσης, η πρόδρομη ένωση προστίθεται εξαρχής στις μυκηλιακές καλλιέργειες των μυκήτων και ροφάται από τη βιομάζα. Τα νανοσωματίδια ανακτώνται ύστερα από χημική κατεργασία, φυγοκέντρηση και φιλτράρισμα. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αναγωγή των ιόντων αργύρου είναι οι νιτρικές αναγωγάσες που εξαρτώνται από το μόριο NADH. Μύκητες που χρησιμοποιούνται για την εξωκυτταρική σύνθεση AgNPs είναι οι *Fusarium oxysporum, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Fusarium semitectum* κτλ. [24], [39], [40]
- Μέθοδος βασισμένη σε φύκη: Τα φύκη αποτελούν αυτότροφους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους για τη σύνθεση των AgNPs αφού έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν τα μέταλλα, διαθέτουν πληθώρα βιοδραστικών μορίων που μπορούν να ανάγουν τα ιόντα αργύρου, να σταθεροποιήσουν τα AgNPs και ακόμα καλλιεργούνται εύκολα και γρήγορα. Τέτοιες βιοδραστικές ενώσεις είναι οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια, δευτερογενείς μεταβολίτες, χρωστικές, υδατάνθρακες κ.α. Είναι λιγότερο τοξικά για το περιβάλλον και μπορούν να ανταπεξέλθουν σε πολλές ατμοσφαιρικές συνθήκες. Τα νανοσωματίδια παράγονται είτε εσωκυτταρικά είτε εξωκυτταρικά. [24], [41]
- Μέθοδος με χρήση φυτών: Η χρήση φυτικών εκχυλισμάτων για τη σύνθεση των AgNPs πλεονεκτεί καθώς τα φυτά βρίσκονται σε αφθονία, απαιτούν χαμηλότερο κόστος για τη καλλιέργεια και απομόνωση τους και δεν επιμολύνουν το περιβάλλον σε σχέση με άλλους

μικροοργανισμούς. Τα τμήματα των φυτών που χρησιμοποιούνται είναι τα φύλλα, ο κορμός, οι ρίζες, οι σπόροι, οι καρποί και ο χυμός τους και τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοσωματιδίων εξαρτώνται από τη ποιοτική και ποσοτική σύσταση των εκχυλισμάτων, την συγκέντρωση της πρόδρομης ένωσης $AgNO_3$, τον διαλύτη εκχύλισης, το χρόνο εκχύλισης και τη θερμοκρασία. Οι βιοδραστικές ενώσεις που βρίσκονται σε αυτά τα εκχυλίσματα είναι ενώσεις όπως οι πολυσακχαρίτες, οι τανίνες, τα αλκαλοειδή, τα αμινοξέα, οι πολυφαινόλες, τα τερπενοειδή όπου όλα είναι φιλικά προς το περιβάλλον και μπορούν να έχουν θεραπευτικές ιδιότητες. Ουσίες όπως οι τανίνες και τα φλαβονοειδή και κάποια σάκχαρα μπορεί να έχουν αναγωγικές ιδιότητες ενώ άλλες δρουν ως σταθεροποιητές ή επικαλύπτουν τα νανοσωματίδια. [24], [41]

Οι διάφορες φυσικές και χημικές μέθοδοι που αναφέρθηκαν για τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου έχουν πολύ υψηλό κόστος και δεν είναι φιλικές για το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, οι χημικές μέθοδοι χρησιμοποιούν συχνά επιβλαβή και τοξικά χημικά τα οποία ενέχουν σοβαρούς κινδύνους τόσο περιβαλλοντικά όσο και βιολογικά. Οι φυσικές μέθοδοι απαιτούν σημαντικά ποσά ενέργειας αφού χρησιμοποιούνται υψηλές θερμοκρασίες, συνθήκες κενού και γενικά περιλαμβάνουν κοστοβόρες διεργασίες. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις οι αντιδράσεις σύνθεσης των σωματιδίων έχουν αργούς ρυθμούς και οδηγούν σε μη σταθερά νανοσωματίδια που τείνουν να συσσωματωθούν. Η χρησιμότητα όμως των υλικών αυτών στις σύγχρονες εφαρμογές καθιστούν αναγκαία την σύνθεσή τους επομένως αυτή θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν με τη μεγαλύτερη ασφάλεια για το περιβάλλον και την υγεία αλλά και να συμφέρει οικονομικά. Έτσι, η σύνθεση των νανοσωματιδίων με χρήση πράσινων μεθόδων είναι ολοένα αυξανόμενη στοχεύοντας στην ελαχιστοποίηση της χρήσης χημικών ενώσεων. [41]

1.7 Μικροφύκη

1.7.1 Γενικά στοιχεία

Τα φύκη αποτελούν αυτότροφους, φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που είναι γνωστοί από την αρχαιότητα. Εμφανίζονται σε διάφορα περιβάλλοντα και σε διαφορετικές συνθήκες, όπως κυρίως σε υδάτινα περιβάλλοντα, στο έδαφος αλλά και ως επίφυτα και ενδόφυτα. Σε σχέση με τη δομή τους, μπορεί να είναι είτε μονοκύτταροι είτε πολυκύτταροι οργανισμοί και να έχουν μέγεθος είτε στην μακροκλίμακα είτε στην μικροκλίμακα. Για το λόγο αυτό κατηγοριοποιούνται ως εξής: [42], [43], [44]

Μακροφύκη: Τα μακροφύκη ή φύκη της θάλασσας (seaweed) είναι πολυκύτταροι οργανισμοί μεγάλου μεγέθους που μπορούν να παρατηρηθούν με γυμνό μάτι. Το μέγεθος τους μπορεί να ξεπεράσει τα 60m.

Μικροφύκη: Τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικοί μονοκύτταροι οργανισμοί οι οποίοι μπορεί να είναι προκαρυωτικοί όπως τα κυανοβακτήρια ή ευκαρυωτικοί όπως τα πράσινα φύκη.

Η ποικιλία των ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών των μικροφυκών οδηγεί σε δυσκολία ταξινόμησής τους. Ωστόσο, για παράδειγμα τα φύκη μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τις φωτοσυνθετικές χρωστικές τους στα μπλε-πράσινα φύκη (Cyanophyceae), στα κόκκινα φύκη (Rhodophyceae), στα καφέ φύκη (Phaeophyceae) και στα πράσινα φύκη (Chlorophyceae) (Εικόνα 11) [45].

Εικόνα 11: Είδη φυκών ανάλογα με το χρώμα τους [45]

Τα μικροφύκη ζουν σε θαλασσινό ή γλυκό νερό και είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Τα κυανοβακτήρια είναι οι μόνοι φωτοσυνθετικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί που παλιότερα ταξινομούνταν στην κατηγορία των μπλε-πράσινων φυκών, πλέον όμως κατατάσσονται στα βακτήρια.

Έρευνες έχουν δείξει ότι μπορούν να αναπτυχθούν ακόμα και στον αέρα. Αν και αυτότροφοι μπορούν να αναπτυχθούν ως ετερότροφοι, μιξότροφοι και φωτοετερότροφοι. Μπορούν να βρεθούν σε πιο ακραία περιβάλλοντα καθώς είναι ανθεκτικά στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, ως φωτοσυνθετικοί οργανισμοί συμβάλλουν στο περιβάλλον μετατρέποντας πάνω από το 50% του διοξειδίου του άνθρακα σε χρήσιμες οργανικές ενώσεις. Μάλιστα, τα μικροφύκη έχουν 10-15 φορές μεγαλύτερη φωτοσυνθετική ικανότητα σε σχέση με τα φυτά της στεριάς. Άλλα πλεονεκτήματα σε σχέση με τα κλασικά φυτά, είναι ο λιγοστός χώρος που απαιτείται για την ανάπτυξή τους ενώ σε πολλές περιπτώσεις δεν χρειάζεται η προσθήκη φρέσκου νερού ώστε αυτά να αναπτυχθούν. Επιπλέον, τα υδατικά μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν σε θαλασσινό νερό και σε γεωργικά και βιομηχανικά υδατικά απόβλητα καθώς αυτά περιέχουν τα απαιτούμενα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Ακόμα, συμβάλλουν στην αποκατάσταση εδαφών και υδάτων αφού έχουν την ικανότητα να μειώνουν την παρουσία βαρέων μετάλλων. [46]

Τα μικροφύκη είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και βιοδραστικές ενώσεις όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια, πολυακόρεστα λίπη, βιταμίνες, χρωστικές, φυκοχολοπρωτείνες, ένζυμα κ.α. Οι ενώσεις αυτές ενδιαφέρουν πολλούς τομείς εφαρμογών καθώς αυτές παρουσιάζουν χρήσιμες ιδιότητες όπως αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιιικές, αντικαρκινικές,

αντιυπερτασικές, νευροπροστατευτικές κλπ. Βιομηχανίες και επιστήμες που χρειάζονται τις βιοδραστικές ενώσεις που αναφέρθηκαν είναι η φαρμακολογία, η ιατρική, η κοσμετολογία, η βιομηχανία χημικών και ενέργειας και η γεωργία. Η περιεκτικότητα τους σε έλαια είναι μεγαλύτερη το 60% του ξηρού βάρους της βιομάζας τους γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα προς αξιοποίηση σε βιοκαύσιμα. Σε συνδυασμό με την εύκολη και γρήγορη ανάπτυξη των μικροφυκών και την προσαρμοστικότητά τους σε ποικίλες συνθήκες καλλιέργειας αποτελούν ιδανικό στόχο έρευνας για τις αναφερθείσες επιστήμες. [44], [46], [47]

Οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης είναι διαφορετικές για το κάθε είδος μικροφύκους και εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες. Στους αβιοτικούς παράγοντες ανήκουν η θερμοκρασία, τα θρεπτικά στοιχεία, το διοξείδιο του άνθρακα, το pH, η ποιότητα του νερού, η ένταση και η διάρκεια της έκθεσης σε φως. Στους βιοτικούς παράγοντες ανάπτυξης ανήκουν η ευθραυστότητα των κυττάρων και η πυκνότητά τους. Άλλοι παράγοντες είναι η συνεχής ανάδευση, το μέγεθος φυσαλίδων αερίου, η μεταφορά μάζας τα οποία ενδιαφέρουν στην περίπτωση ανάπτυξης σε φωτοβιοαντιδραστήρες. [47]

Στην παρούσα διπλωματική εργασία το στέλεχος μικροφύκους που χρησιμοποιείται είναι το *Stichococcus sp*. του οποίου η ταξινόμηση παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση στελέχους μικροφύκους *Stichococcus sp.* [48]

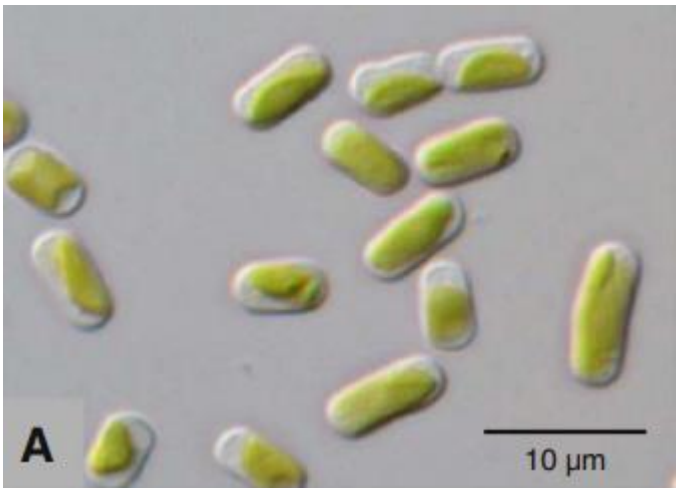
Αυτοκρατορία (Empire)	**Βασίλειο (Kingdom)**	**Φυλή (Phylum)**	**Κλάση (Class)**
Eykaryota	Plantae	Chlorophyta	Trebouxiophyceae
Τάξη (Order)	**Οικογένεια (Family)**	**Γένος (Genus)**	**Είδος (Species)**
Prasiolales	Prasiolaceae	Stichococcus	Stichococcus sp.

1.7.2 Μικροφύκος *Stichococcus sp.*

Το στέλεχος *Stichococcus sp.* αποτελεί πράσινο μικροφύκος το οποίο διαθέτει απλή μορφολογία, με μέγεθος διαστάσεων από 2 έως 6μm και διαμορφώνεται σε νηματοειδείς ή μονοκυτταρικές δομές

(Εικόνα 12)[49]. Το σχήμα του είναι σαν αυτό πολλαπλών ράβδων και μπορεί να βρεθεί σε υδατικά περιβάλλοντα αλλά και στο έδαφος. Η παρουσία του αποτελεί γεγονός για πολλά είδη εδαφών αφού έχει βρεθεί σε τροπικά εδάφη της Ινδίας, στη Κεντρική Αμερική και την Ωκεανία, σε πολικές ερήμους της Ανταρκτικής και στην Αρκτική[50]. Επίσης, αναπτύσσεται σε γλυκό ή θαλασσινό νερό. Γενικά, έχει βρεθεί πως μπορεί να αναπτυχθεί σε ακραίες τιμές pH, υψηλές θερμοκρασίες και αλατότητα ενώ μπορεί να αξιοποιήσει πολλά είδη θρεπτικών συστατικών και κυρίως άζωτο, φωσφόρο και κάλιο [46].

Ένα στέλεχος που έχει σημαντική αξία για εφαρμογές οικονομικού ενδιαφέροντος, ιδιαίτερα στην παραγωγή βιοκαυσίμων, είναι το *Stichococcus bacillaris*. [51].



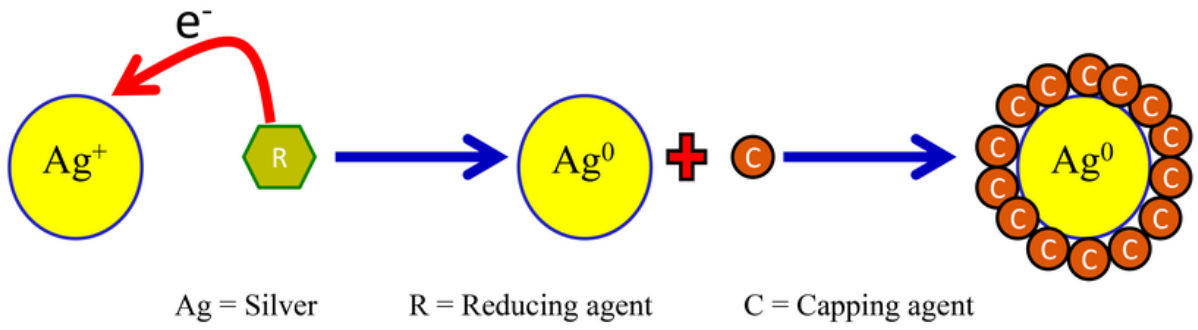
Εικόνα 12: Μορφολογία κυττάρων του στελέχους Stichococcus sp. με παρατήρηση στο μικροσκόπιο[52]

1.8 Σύνθεση AgNPs με χρήση μικροφυκών

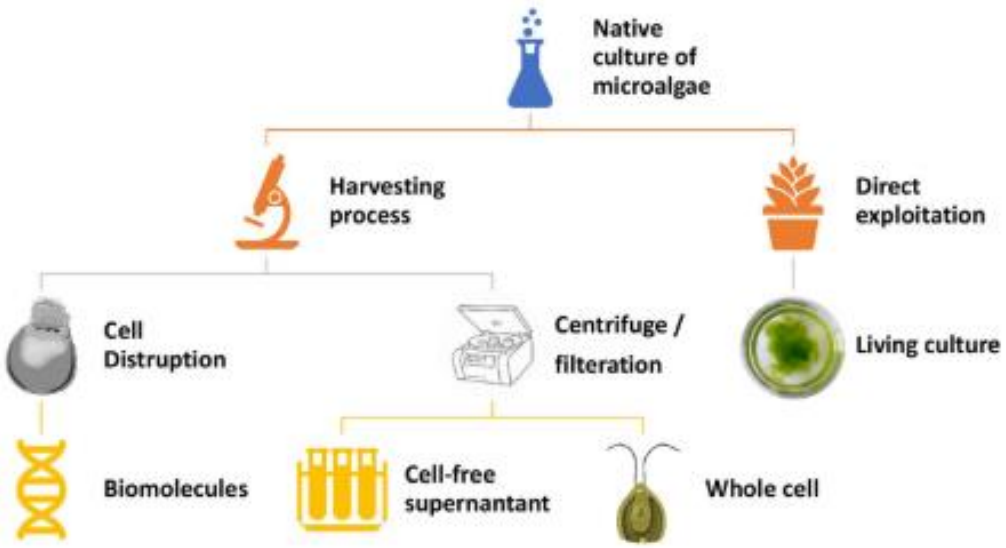
Η σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου με χρήση μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε εξωκυτταρικά είτε εσωκυτταρικά. Ο γενικός μηχανισμός που ακολουθείται για την μετατροπή των ιόντων αργύρου της πρόδρομης ένωσης προς μονοστοιχειακό άργυρο και έπειτα προς το σχηματισμό των νανοσωματιδίων αργύρου, παριστάνεται στην Εικόνα 13. Η αναγωγή των ιόντων στην περίπτωση της εξωκυτταρικής σύνθεσης λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του κυττάρου του φύκους ενώ στην περίπτωση της εσωκυτταρικής σύνθεσης η αναγωγή συμβαίνει στο εσωτερικό κυτταρικό τοίχωμα. Σε κάθε περίπτωση η αναγωγή των ιόντων αργύρου προς άργυρο μηδενικού φορτίου πραγματοποιείται με τη βοήθεια των βιομορίων που περιέχονται στα κύτταρα των φυκών. Αυτά αποτελούνται από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, αντιοξειδωτικά, χρωστικές όπως καροτενοειδή, χλωροφύλλες, φυκοχολίνες και άλλα. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα στάδια της

φάσης ενεργοποίησης όπου ανάγονται τα ιόντα αργύρου, τη φάση πυρήνωσης με τη βοήθεια ενζύμων που εκκρίνουν τα κύτταρα και τη φάση ανάπτυξης. Κατά τη φάση ανάπτυξης, τα άτομα αργύρου συσσωματώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας νανοσωματίδια αργύρου διαφόρων μεγεθών και σχημάτων τα οποία είναι θερμοδυναμικά σταθερά. [45], [53]

Η σύνθεση των AgNPs χρησιμοποιώντας φύκη μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους εξής τρόπους (Εικόνα 14):



Εικόνα 13: Μηχανισμός αναγωγής ιόντων αργύρου Ag^{+} προς Ag^{0} [37]



Εικόνα 14: Προσεγγίσεις σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου με χρήση μικροφυκών [41]

1.8.1 Σύνθεση με χρήση εξωκυτταρικού υγρού

Με τη μέθοδο αυτή αρχικά συλλέγεται η ποσότητα της καλλιέργειας που χρειάζεται και φυγοκεντρείται ώστε να αποχωριστεί το εξωκυτταρικό υγρό από τη βιομάζα. Το υπερκείμενο υγρό που λαμβάνεται είναι αυτό που περιέχει τις βιοδραστικές ουσίες που έχουν απεκκριθεί από το κύτταρο και χρησιμοποιούνται για την αναγωγή των ιόντων αργύρου. Έτσι, το εξωκυττάριο υγρό αναμιγνύεται με διάλυμα πρόδρομης ένωσης αργύρου και επωάζεται στις επιθυμητές συνθήκες προς σχηματισμό των νανοσωματιδίων αργύρου. [41]

1.8.2 Σύνθεση με χρήση ολόκληρου κυττάρου

Στην περίπτωση αυτή, το υγρό μέσο της καλλιέργειας διαχωρίζεται από τη βιομάζα μέσω φυγοκέντρησης και απορρίπτεται ενώ η καθαρή βιομάζα διαλύεται σε απεσταγμένο νερό και αναμιγνύεται με το διάλυμα της πρόδρομης ένωσης αργύρου. Ως μειονέκτημα αυτής της μεθόδου θεωρείται η απώλεια της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων μέσα σε μερικές ώρες μετά την απομόνωσή τους από το θρεπτικό μέσο. [41]

1.8.3 Σύνθεση με χρήση ζωντανής καλλιέργειας κυττάρων

Αποτελεί την πιο απλή μέθοδο καθώς δεν απαιτεί κανένα στάδιο προετοιμασίας αφού η καλλιέργεια χρησιμοποιείται αυτούσια για το σχηματισμό των AgNPs. Πραγματοποιείται ανάμιξη με το άλας αργύρου και η σύνθεση νανοσωματιδίων γίνεται είτε εξωκυτταρικά όταν το κύτταρο απεκκρίνει τις βιοδραστικές ενώσεις είτε εσωκυτταρικά όταν τα ιόντα μετάλλου εισέρχονται εντός του κυττάρου και ο σχηματισμός λαμβάνει χώρα εντός του. Ο εξωκυτταρικός τρόπος σύνθεσης είναι πιο συνηθισμένος. [41]

1.8.4 Σύνθεση με χρήση εκχυλίσματος βιομορίων

Τα βιομόρια αποτελούν τις οργανικές ενώσεις που περιέχονται εντός των κυττάρων όπως αμινοξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και άλλα μικρότερα οργανικά μόρια. Πολλά από αυτά τα μόρια σχετίζονται με το σχηματισμό των νανοσωματιδίων αργύρου. Για να συλλεχθούν τα βιομόρια θα πρέπει να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων η οποία είναι εφικτή με τρόπους όπως η χρήση θερμότητας, τα γυάλινα σφαιρίδια, οι υπέρηχοι, η λειοτρίβηση κτλ. Αφού γίνει το στάδιο της λύσης, τα βιομόρια απελευθερώνονται στον διαλύτη και τα σπασμένα κύτταρα μπορούν να απορριφθούν με τη βοήθεια φυγοκέντρησης. [41],[54]

1.9 Παράμετροι σύνθεσης AgNPs

Οι παράμετροι που επηρεάζουν τη σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου μέσω πράσινων μεθόδων και συγκεκριμένα φυκών είναι η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση της βιομάζας ή του εκχυλίσματος, η ένταση του φωτός η συγκέντρωση του πρόδρομου άλατος και ο χρόνος της αντίδρασης (Εικόνα 15). Η επίδραση τους αναλύεται στη συνέχεια: [41]

1.9.1 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία επιδρά στον ρυθμό της αντίδρασης αυξάνοντας τον αλλά οδηγεί και σε μεγαλύτερη παραγωγή νανοσωματιδίων αργύρου και ρυθμίζει το μέγεθός τους. Με αύξηση της θερμοκρασίας, το μέγεθος των νανοσωματιδίων αυξάνεται.[9], [41]

1.9.2 pH

Το pH επηρεάζει το μέγεθος και τη μορφολογία των νανοσωματιδίων επιδρώντας στο φορτίο των ενώσεων του εκχυλίσματος και των παραγόντων επικάλυψης. Ανάλογα με το pH, το φορτίο αλλάζει προκαλώντας διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με την ικανότητα πρόσδεσης και αναγωγής των ιόντων αργύρου. Επίσης, σε αρκετές αναφορές βρέθηκε ότι σε όξινα pH παράγονται μεγαλύτερα νανοσωματίδια ή και συσσωματώματα αυτών ενώ σε πιο αλκαλικά, μικρότερα νανοσωματίδια αργύρου. [41], [55]

Επιπλέον, το pH επηρεάζει το ρυθμό αναγωγής των ιόντων αργύρου με πιο αλκαλικά pH να εμφανίζουν καλύτερη αποτελεσματικότητα στην αναγωγή και να οδηγούν σε πιο μικρά και ομοιόμορφα σωματίδια. Η διαφορά αυτή ίσως οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση υδρογονοκατιόντων σε όξινα pH, που δυσχεραίνει την αντίδραση αναγωγής των ιόντων αργύρου [9],[56].

1.9.3 Συγκέντρωση βιομάζας-εκχυλίσματος

Η συγκέντρωση της βιομάζας ή του εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων αποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες της σύνθεσης και είναι άμεσα συνδεδεμένη με την απόδοση του πειράματος. Επίσης, η συγκέντρωση της βιομάζας επηρεάζει το μέγεθος και τη δομή των νανοσωματιδίων. Με αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας στο τελικό διάλυμα που περιέχει το άλας της πρόδρομης ένωσης, βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν δείξει πως υπήρξε μετακίνηση της κορυφής απορρόφησης στο UV-Vis προς χαμηλότερο μήκος κύματος. Η μετακίνηση οφείλεται στην μείωση του μεγέθους των AgNPs. Μεγάλη αύξηση στην συγκέντρωση οδηγεί σε φαινόμενα συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων λόγω μείωσης της έντασης του φαινομένου SPR. [41]

Επιπλέον, ο επαρκής αριθμός βιομορίων με ρόλο αναγωγικού μέσου οδηγεί σε πιο σταθερούς πυρήνες σωματιδίων αργύρου. Με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος, αντίδραση αναγωγής πραγματοποιείται με ταχύτερους ρυθμούς και ο πυρήνας γίνεται ασταθής. Ως αποτέλεσμα προκύπτουν μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια.[55]

1.9.4 Συγκέντρωση διαλύματος πρόδρομης ένωσης αργύρου

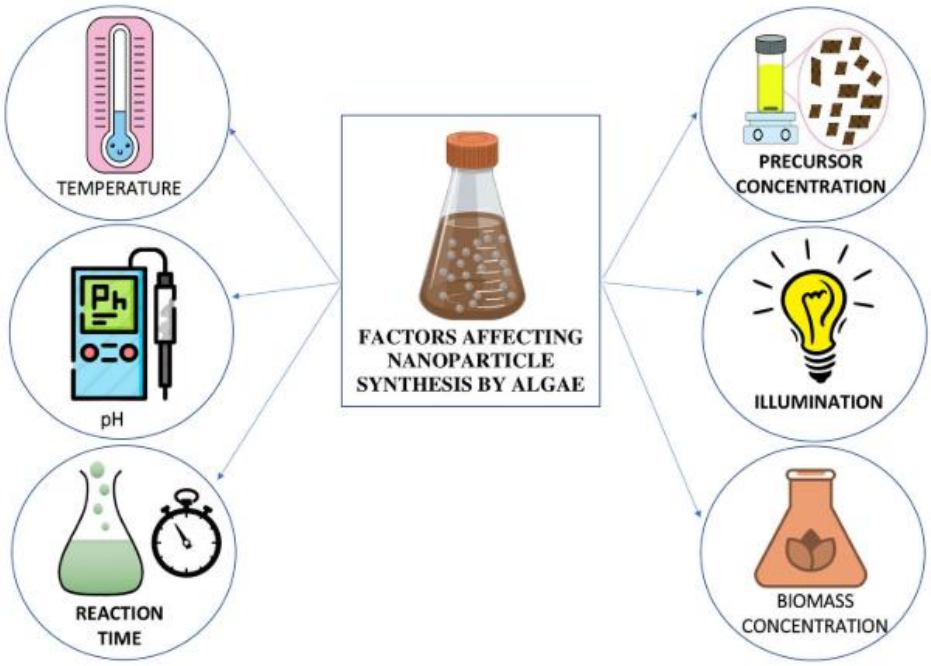
Η συγκέντρωση της πρόδρομης ένωσης αργύρου επηρεάζει την απόδοση του πειράματος αλλά και την μορφολογία των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων. Μεγαλύτερη συγκέντρωση άλατος αργύρου οδηγεί σε σχηματισμό περισσότερων νανοσωματιδίων άρα και σε υψηλότερη απόδοση. Παρόλα αυτά, συγκριτικά μικρότερη συγκέντρωση μπορεί να οδηγήσει σε ταχύτερο σχηματισμό νανοσωματιδίων. Επιπλέον, με αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος αργύρου το μέγεθος των νανοσωματιδίων επίσης αυξάνει. [41]

1.9.5 Ένταση φωτός

Το φως επηρεάζει τη σύνθεση των AgNPs, καταλύοντας την αντίδραση όπως συμβαίνει και σε άλλες αντιδράσεις. Στην περίπτωση της σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου με τη χρήση μικροοργανισμών, βιβλιογραφικές πηγές αποδεικνύουν τη σημασία της παρουσίας φωτός κατά τη διάρκεια του πειράματος, αναφέροντας ότι υπό συνθήκες σκότους η αντίδραση δεν παρουσίασε αποτελέσματα. Άλλα πειραματικά ευρήματα δείχνουν ότι ο σχηματισμός AgNPs υπό πορτοκαλί και κόκκινο φως ήταν ανεπιτυχής και συμπεραίνεται ότι η αντίδραση απαιτεί συγκεκριμένα μήκη κύματος ακτινοβολίας ώστε να καταλυθεί. Σε άλλη έρευνα σύνθεσης AgNPs βασισμένη στη χρωστική πρωτεΐνη φυκοκυανίνη, βρέθηκε ότι για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση ήταν απαραίτητη η χρωμοφόρα ομάδα, η οποία απορροφάει φως και διεγείρεται, ανάγοντας τα ιόντα αργύρου. [41]

1.9.6 Χρόνος επώασης

Γενικά, η αύξηση του χρόνου επώασης οδηγεί σε ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των παραγόμενων νανοσωματιδίων, καθώς επιτρέπεται η αναγωγή περισσότερων κατιόντων αργύρου (Ag+). Αυτό συμβαίνει για πεπερασμένο χρονικό διάστημα πέραν του οποίου τα νανοσωματίδια αυξάνονται τόσο που αποσταθεροποιούνται και αρχίζουν να συσσωματώνονται. Παρόλα αυτά, εάν τα νανοσωματίδια είναι σταθερά δεν παρατηρείται αυτό το φαινόμενο. Ανάλογα με τον μικροοργανισμό απαιτείται διαφορετικός χρόνος επώασης που μπορεί να είναι από λεπτά μέχρι και μέρες. [41], [55]



Εικόνα 15: Παράμετροι σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου με χρήση φυκών [41]

1.10 Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) με τη χρήση κυτταρικού εκχυλίσματος του μικροφύκους *Stichococcus sp.* Με αυτόν τον τρόπο σύνθεσης αξιοποιούνται οι βιοδραστικές ουσίες που περιέχονται στο εκχύλισμα του μικροφύκους και οι οποίες βοηθούν στην αναγωγή, την σταθεροποίηση και την επικάλυψη των AgNPs. Επιπλέον, εξετάζεται η λιγότερο διαδεδομένη μέθοδος σύνθεσης χρησιμοποιώντας κυτταρικό εκχύλισμα, προκειμένου να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που παράγονται μέσω αυτής της μεθόδου. Επιπλέον, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η ταυτόχρονη επίδραση των παραμέτρων που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των AgNPs με χρήση πειραματικού σχεδιασμού τύπου Plackett-Burman. Οι παράμετροι είναι η θερμοκρασία T, το pH, η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος σε $AgNO_3$, η αναλογία του τελικού διαλύματος σε $AgNO_3$ και εκχύλισμα και τέλος η επίδραση του φωτός. Τα παραγόμενα νανοσωματίδια αργύρου εξετάζονται με βάση τις τεχνικές χαρακτηρισμού UV-Vis, DLS, ICP-OES, TEM και FTIR και επιπλέον ελέγχονται ως προς τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες και την αλληλεπίδρασή τους με το DNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και μέθοδοι

2.1 Μικροοργανισμοί

Κατά την πραγματοποίηση της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος μικροφύκους και συγκεκριμένα το *Stichococcus sp*, το οποίο χορηγήθηκε από το τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιήθηκε ως πηγή κυττάρων για την εκχύλιση των βιομορίων με τη βοήθεια των οποίων έγινε η σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου.

2.2 Χημικά αντιδραστήρια-Αναλώσιμα υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), Merck (Γερμανία) και PanReac AppliChem (Γερμανία) και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα υάλινα εργαστηριακά σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αποτελούνται από κωνικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικούς κυλίνδρους και φιάλες και μπουκάλια αποστείρωσης. Τα πλαστικά σκεύη αποτελούνται από ρύγχη πιπετών (tips), πιπέτες Pasteur, σωληνάρια φυγοκέντρησης τύπου Falcon, σωληνάρια Eppendorf, σύριγγες και φίλτρα μιας χρήσης. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν σκεύη όπως μαγνήτες ανάδευσης, σπαθίδες και πορσελάνινο γουδί.

2.3 Όργανα και Συσκευές

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρουσιάζεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Όργανα και συσκευές

Όργανο/ Συσκευή	**Κατασκευαστής**	**Μοντέλο**
Ανακινούμενοι επωαστήρες	ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)	ZHWY-211C
Αναλυτής Μεγέθους Νανοσωματιδίων	Malvern Panalytical (Μ. Βρετανία)	Zetasizer Nano ZS
Αναλυτικός Ζυγός	KERN & SOHN GmbH (Γερμανία)	Abs 120-4N
Αυτόκαυστο	SANYO (Η.Π.Α.)	Labo Autoclave MLS-3020
Επωαστήρας (αντιμικροβιακά)	Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)	ORBITAL INCUBATOR SI50
Ζυγός Ακριβείας	BEL Engineering (Ιταλία)	Mark 2060
Ζυγός Ακριβείας	BEL Engineering (Ιταλία)	Mark 4065
Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης	JEOL (Η.Π.Α.)	JEM-2100 LaB_6
Φυγόκεντρος Eppendorf	ALC (Η.Π.Α.)	4239R
Οπτικό μικροσκόπιο	Zeiss (Γερμανία)	Axiolab
Συσκευή καθαρισμού υπερήχων	EMAG Technologies (Γερμανία)	Emmi-30HC
Συσκευή Λυοφιλίωσης (Freeze Drying)	B. Braun Biotech International (Γερμανία)	CHRIST ALPHA 1-4
Συσκευή μέτρησης pH	WTW (Γερμανία)	537
Σύστημα παροχής υπερκάθαρου νερού	Millipore (Η.Π.Α.)	Direct-Q
Φασματοφωτόμετρο ICP-OES	PerkinElmer (Η.Π.Α.)	Optima 7000 DV
Φασματοφωτόμετρο UV/Vis	Hitachi (Ιαπωνία)	U-5100
Φασματοφωτόμετρο FTIR	Jasco (Ιαπωνία)	FT/IR-4200
Φυγόκεντρος (Falcon)	Hettich (Γερμανία)	ROTANTA 460R
Φωτόμετρο	BOECO (Γερμανία)	S-20 Vis Spectrophotometer

2.4 Καλλιέργεια *Stichococcus sp.*

2.4.1 Θρεπτικό μέσο

Το μικροφύκος *Stichococcus sp.* αναπτύχθηκε σε τροποποιημένο θρεπτικό μέσο BG-11 [57] η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικού μέσου BG-11.

Stock	**Σύσταση**	**Συγκέντρωση**	**Προστιθέμενη ποσότητα στο θρεπτικό μέσο (mL/L)**
1	$NaNO_3$	150 g/L	10 mL
2	$K_2HPO_4•3H_2O$ ή *K_2HPO_4	40 g/L ή *30 g/L	1 mL
3	$MgSO_4•7H2O$	75 g/L	1 mL
4	$CaCl_2•2H_2O$	36 g/L	1 mL
5	Κιτρικό οξύ Κιτρικός σίδηρος	6 g/L 6 g/L	1 mL
6	$Na_2EDTA•2H_2O$	1 g/L	1 mL
7	Na_2CO_3	0,02g	1 mL
8	Διάλυμα ιχνοστοιχείων	*	1 mL
9	f/2 Διάλυμα βιταμινών	*	1 mL

Στον πίνακα 4 παρουσιάζεται η σύσταση του διαλύματος ιχνοστοιχείων σε g ανά L διαλύματος. Στον πίνακα 5 παρουσιάζεται η σύσταση του διαλύματος βιταμινών f/2 που παρασκευάστηκε ξεχωριστά. Για την παρασκευή του τελικού διαλύματος που προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο, χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες που παρουσιάζονται στον πίνακα 6 των stock διαλυμάτων (Πίνακας 5) σε 100 mL απιονισμένου νερού.

Πίνακας 4: Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων.

Trace Metal Solution (TMS)	
Σύσταση	g/L
H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_2•4H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4•7H_2O$	0.222 g
$Na_2MoO_4•2H_2O$	0.390 g
$CuSO_4•5H_2O$	0.079 g
$Co(NO_3)_2•6H_2O$	0.0494 g

Πίνακας 5: Σύσταση διαλύματος βιταμινών.

Σύσταση	Συγκέντρωση
Βιταμίνη B_{12} (Cyanocobalamin)	10 mg/10 mL
Βιοτίνη	5 mg/50 mL

Πίνακας 6: Ποσότητες των διαλυμάτων stock για την παρασκευή τελικού διαλύματος βιταμινών.

Σύσταση	Ποσότητα
Βιταμίνη B12	0,1 mL
Βιοτίνη	1 mL
Θειαμίνη HCl	20 mg

Επιπλέον, παρασκευάζεται διάλυμα Hepes Buffer για τη ρύθμιση του pH του θρεπτικού μέσου, συγκέντρωσης 1M από το οποίο προστίθεται ποσότητα 10mL ανά λίτρο θρεπτικού μέσου. Το pH του Buffer ρυθμίζεται στο 7,1 με διάλυμα NaOH.

Για το θρεπτικό μέσο προστίθενται η μισή ποσότητα σε όγκο διαλύματος, απιονισμένου νερού, και στη συνέχεια τα αντιδραστήρια $NaNO_3$, $MgSO_4 \bullet 7H2O$, $CaCl_2 \bullet 2H_2O$, $Na_2EDTA \bullet 2H_2O$ και Na_2CO_3 με τη σειρά, σε μπουκάλι αποστείρωσης. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7,1 με διάλυμα HCl με συσκευή πεχάμετρου και στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 λεπτά υπό πίεση 0,1 mPα. Μετά το πέρας του χρόνου αποστείρωσης, το διάλυμα αφήνεται ώστε να φτάσει τη θερμοκρασία δωματίου και να προστεθούν σε αυτό τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, που αποτελούν τα θερμοευαίσθητα υλικά καθώς και το buffer. Η προσθήκη τους γίνεται αφού τα διαλύματα των αντιδραστηρίων φιλτραριστούν με φίλτρο 0,22μm και οι απαιτούμενες ποσότητες προστίθενται στο θρεπτικό μέσο υπό στείρες συνθήκες.

2.4.2 Ανάπτυξη *Stichococcus sp.*

Το στέλεχος μικροφύκους *Stichococcus Sp*. καλλιεργήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer των 2 λίτρων με χρήση υδρόφοβων πωμάτων (Εικόνα 16). Το περιεχόμενο της φιάλης ήταν 500mL εκ των οποίων το 90% αποτελούνταν από το θρεπτικό μέσο και το 10% από εμβόλιο καλλιέργειας του στελέχους που βρίσκεται προς το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Οι φιάλες τοποθετούνται σε επωαστήρα υπό ανάδευση στα 100rpm, σε θερμοκρασία 25°C και υπό ακτινοβολία χρησιμοποιώντας λάμπες LED λευκού φωτός έντασης 80 $\mu mol \cdot m{-}2 \cdot s\ {-}1$ με φωτοπερίοδο 24 h συνεχή φωτισμό. Η ανάπτυξη διαρκεί για περίπου 8-10 ημέρες προτού πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια του μικροοργανισμού. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο, λαμβάνοντας εμβόλιο 10% από την καλλιέργεια.

Εικόνα 16: Καλλιέργεια *Stichococcus sp.*

2.4.3 Έλεγχος ανάπτυξης S*tichococcus sp.*

Για τον έλεγχο της ανάπτυξης του μικροφύκους πραγματοποιούνταν κάθε μία ή δύο ημέρες μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD-Optical Density) στα 680 nm σε δείγματα της καλλιέργειας που έχουν ληφθεί υπό στείρες συνθήκες [58]. Επιπλέον, ανά διαστήματα δείγμα της καλλιέργειας παρατηρούνταν σε οπτικό μικροσκόπιο ώστε να διαπιστωθεί η απουσία μολυσματικών παραγόντων (Εικόνα 17).

Εικόνα 17: Παρατήρηση *Stichococcus sp.* με οπτικό μικροσκόπιο

2.4.4 Μελέτη επίδρασης αναλογίας όγκου καλλιέργειας/φιάλης στην ανάπτυξη

Κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η επίδραση της αναλογίας όγκου καλλιέργειας προς όγκο φιάλης στην ανάπτυξη του μικροφύκους. Η αναλογία αυτή επηρεάζει τον αερισμό εντός της φιάλης, την ανάδευση και τον ομοιόμορφο και επαρκή φωτισμό της καλλιέργειας.

2.5 Προετοιμασία εκχυλίσματος βιομάζας

Για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η βιομάζα που συλλέγεται ύστερα από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας του μικροφύκους. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια ηλικίας περίπου 10 ημερών φυγοκεντρείται σε 4500 rpm, στους 4°C, για 45 min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμα δύο φορές με ενδιάμεσους καθαρισμούς με απιονισμένο νερό.

Η συλλεχθείσα υγρή βιομάζα απαλλάσσεται από την υγρασία μέσω λυοφιλίωσης (freeze drying). Μεταξύ των μεθόδων λύσης κυττάρων που δοκιμάστηκαν (γυάλινα σφαιρίδια, λειοτρίβηση σε γουδί, υπέρηχοι, θερμική λύση) σχηματισμός νανοσωματιδίων επιτεύχθηκε με το συνδυασμό της λειοτρίβησης και της θερμικής λύσης.

Η ξηρή βιομάζα που προκύπτει ζυγίζεται και λειοτριβείται (μηχανική λύση κυττάρων) σε πορσελάνινο γουδί και ακολούθως διαλύεται σε διπλά απεσταγμένο νερό. Η αναλογία ξηρής βιομάζας και νερού που χρησιμοποιείται είναι 1g/ 100mL [59]. Η διαλυμένη ποσότητα βιομάζας τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 60°C για 30 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων μέσω θέρμανσης. Στη συνέχεια, το διάλυμα υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση στις 4500 στροφές ανά λεπτό (rpm) στους 4°C για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό, που αποτελεί το εκχύλισμα των κυττάρων του μικροφύκους, συλλέγεται, ενώ τα λυμένα κύτταρα καταβυθίζονται και απορρίπτονται. Το εκχύλισμα φιλτράρεται με φίλτρο 0,45μm και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων ύστερα από ρύθμιση pH στην κατάλληλη τιμή ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. [60], [61]

2.5.1 Μέτρηση πρωτεΐνης εκχυλίσματος

Για τον προσδιορισμό του περιεχομένου του εκχυλίσματος σε πρωτεΐνες, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford [62]. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Bradford με καμπύλη αναφοράς εξίσωσης C(mg/mL)=1,5939x-0,0314 (Εξίσωση 1), όπου x η απορρόφηση και συντελεστή προσαρμογής R^2=0,9912 . Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάμιξη διαλυμάτων εκχυλίσματος και Bradford καθώς και τυφλού διαλύματος και την φωτομέτρησή τους στα 595nm. Σε μικροπλάκα αναμιγνύονται 240μl διαλύματος Bradford και 10μl εκχυλίσματος και τυφλό διάλυμα με χρήση 10μl υπερκάθαρου νερού, αφήνονται 5 λεπτά σε ηρεμία και φωτομετρούνται.

2.5.2 Μέτρηση χλωροφύλλης και καροτενοειδών

Οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή είναι δύο βασικές χρωστικές που περιέχονται στα κύτταρα των μικροφυκών. Οι χλωροφύλλες είναι πράσινες χρωστικές με καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Συγκεκριμένα, η χλωροφύλλη α μετατρέπει την φωτεινή ενέργεια της ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια. Η χλωροφύλλη β λειτουργεί έμμεσα, δεσμεύοντας την φωτεινή ενέργεια και μεταφέροντας την στην χλωροφύλλη α. Τα καροτενοειδή είναι κίτρινες ή κόκκινες χρωστικές και λειτουργούν βοηθητικά στη φωτοσύνθεση, ενώ διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση.[63]

Η μέτρηση της χλωροφύλλης και των συνολικών καροτενοειδών του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε μέσω φωτομέτρησης σε διαφορετικές τιμές μήκους κύματος με χρήση των εξισώσεων:

$$C_a = 12{,}21A_{663} - 2{,}81A_{646}\ ,\ (\text{Εξίσωση 2})$$

$$C_b = 20{,}13A_{646} - 5{,}03A_{663}\ ,(\text{Εξίσωση 3})$$

$$Ct = \frac{1000A_{470} - 3{,}27C_a - 104C_b}{198}\ (\text{Εξίσωση 4}),$$

όπου Ca και Cb η συγκέντρωση σε χλωροφύλλη a και b και Ct η συγκέντρωση σε συνολικά καροτενοειδή σε μg/mL. [64]

2.6 Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με χρήση εκχυλίσματος βιομάζας

Ως πρόδρομη ένωση για την παρασκευή νανοσωματιδίων αργύρου χρησιμοποιήθηκε νιτρικός άργυρος ($AgNO_3$). Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε στερεό άλας νιτρικού αργύρου και παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 2 και 18 mM. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος χρησιμοποιώντας θειικό οξύ (H_2SO_4) ή υδροξείδιο του νατρίου (NaOH). Οι τιμές pH που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3 και 9. Τα διαλύματα φυλάσσονται εντός ψυγείου σε σκοτεινό σημείο καθώς ο νιτρικός άργυρος αποτελεί φωτοευαίσθητο υλικό.

Για την παρασκευή των νανοσωματιδίων αργύρου, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη κατάλληλων αναλογιών εκχυλίσματος μικροφύκους και διαλύματος νιτρικού αργύρου σε αποστειρωμένες και σχολαστικά καθαρισμένες κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100mL με τελικό όγκο διαλύματος 50mL. Οι φιάλες τοποθετούνται εντός επωαστήρα υπό ανάδευση 100rpm και ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος μεταβάλλονται οι παράμετροι που επηρεάζουν το σχηματισμό των νανοσωματιδίων αργύρου και οι οποίες αναλύονται στην παράγραφο 2.7. Οι παράμετροι αυτές είναι η θερμοκρασία, το pH του τελικού διαλύματος, η συγκέντρωση σε νιτρικό άργυρο του τελικού αναμεμειγμένου διαλύματος, η αναλογία κατ’ όγκων εκχυλίσματος και νιτρικού αργύρου και η

επώαση υπό ακτινοβόληση λευκού φωτός ή σε σκοτάδι. Οι φιάλες αφήνονται να επωαστούν για χρονικό διάστημα 20 ωρών και για κάθε μία συνθήκη πραγματοποιείται επανάληψη. Η οπτική ένδειξη του σχηματισμού των νανοσωματιδίων αργύρου δίνεται μέσω της αλλαγής χρώματος του διαλύματος από διαυγές ή κιτρινωπό (ανάλογα την αναλογία εκχυλίσματος-διαλύματος νιτρικού αργύρου) σε κοκκινωπό και προοδευτικά καφέ (Εικόνα 18). Μετά το πέρας του χρόνου αυτού, τα προκύπτοντα διαλύματα συλλέγονται. [59]

Για τον καθαρισμό της ποσότητας του διαλύματος νανοσωματιδίων ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 4500rpm, 4°C για 30 λεπτά κατά την οποία τα νανοσωματίδια καταβυθίζονται και το υπερκείμενο υγρό που περιέχει τις ουσίες που δεν αντέδρασαν αποχύνεται. Τα νανοσωματίδια επαναδιαλύονται σε καινούρια ποσότητα υπερκάθαρου νερού και τοποθετούνται για μερικά λεπτά σε λουτρό υπερήχων ώστε τυχόν συσσωματώματα νανοσωματιδίων να διασπαστούν και να ξεκολλήσουν από τα τοιχώματα του falcon. Η διαδικασία του καθαρισμού πραγματοποιείται εις τριπλούν όπου στο τέλος η επαναδιάλυση γίνεται σε υποδεκαπλάσιο όγκο και ακολουθεί ξήρανση σε φούρνο κενού στους 40°C και σε πίεση 423mbar. Τα συμπυκνωμένα νανοσωματίδια αποθηκεύονται στους 4°C.

Για τον χαρακτηρισμό των παραγόμενων νανοσωματιδίων λαμβάνονται δείγματα 1mL τα οποία φυγοκεντρούνται στα 18000rpm, 4°C για 30 λεπτά και πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία καθαρισμού [59]. Η τελευταία επαναδιάλυση γίνεται σε τελικό όγκο 1mL. Τα πλέον καθαρισμένα δείγματα διαλύματος νανοσωματιδίων αργύρου χρησιμοποιούνται κατά τις μεθόδους χαρακτηρισμού.

Εικόνα 18: Διάλυμα $AgNO_3$ και εκχυλίσματος βιομάζας κατά την ανάμιξή τους

2.7 Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman

Τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοσωματιδίων αργύρου, όπως το μέγεθος, το σχήμα, η διασπορά και η ποσότητά τους μπορούν να ποικίλλουν. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τα τελικά χαρακτηριστικά συνδέονται άμεσα με τις συνθήκες υπό τις οποίες παρασκευάστηκαν τα εν λόγω νανοσωματίδια. Κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν κάποιες από τις βασικές παραμέτρους που διαμορφώνουν τις ιδιότητες των νανοσωματιδίων και μάλιστα επιλέχθηκε η εξέταση πέντε παραμέτρων ταυτόχρονα. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν συγκεκριμένα η θερμοκρασία επώασης Τ, το pH του διαλύματος, η συγκέντρωση του τελικού αναμειγνυόμενου διαλύματος σε νιτρικό άργυρο, η αναλογία εκχυλίσματος και διαλύματος νιτρικού αργύρου και τέλος η ακτινοβόληση ή μη από λευκό φως καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος [41]. Οι μεταβλητές αυτές εξετάζονται με βάση τα τελικά μετρήσιμα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων αργύρου τα οποία στην περίπτωση αυτή είναι η απορρόφηση των AgNPs στο φάσμα UV-Vis, το μέγεθος των AgNPs, ο δείκτης πολυδιασποράς μεγέθους PDI, το ζ-δυναμικό και η απόδοση σχηματισμού AgNPs (Yield).

Έναν από τους βασικούς στόχους της έρευνας αποτελεί η ανακάλυψη επιστημονικών ευρημάτων που βασίζονται σε υποκειμενικές και ελεγχόμενες μεθόδους και πειράματα. Για το σκοπό αυτό, συχνά χρησιμοποιούνται πειραματικοί σχεδιασμοί. Πρόκειται για συστηματικές μεθόδους κατά τις οποίες εξετάζεται η αλληλεπίδραση μίας ή παραπάνω ανεξάρτητων μεταβλητών, σε εξαρτημένες μεταβλητές αλλά και μεταξύ τους, με τη διεξαγωγή συγκεκριμένων πειραμάτων, τη συλλογή δεδομένων και την πραγματοποίηση κατάλληλων στατιστικών ελέγχων. Συχνά χρησιμοποιείται η ανάλυση διακύμανσης ANOVA. Τα αποτελέσματα των πειραματικών σχεδιασμών παρέχουν πιο ασφαλή συμπεράσματα και επομένως ακέραιη επιστημονική έρευνα. [65]

Κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιείται πειραματικός σχεδιασμός με μικρό αριθμό πειραμάτων, εξετάζοντας τις 5 παραμέτρους (ανεξάρτητες μεταβλητές) που επηρεάζουν τη σύνθεση των AgNPs σε δύο επίπεδα ακραίων τιμών (two levels). Ο πειραματικός σχεδιασμός που χρησιμοποιείται είναι ο Plackett-Burman ο οποίος δίνει ακριβώς την επιλογή της χρήσης δύο επιπέδων ως τιμές για τις μελετώμενες παραμέτρους. Ο αριθμός των πειραμάτων που προτείνει ο συγκεκριμένος πειραματικός σχεδιασμός είναι πολλαπλάσιος του 4 και δίνει τη δυνατότητα να εξετάζονται έως και N-1 ανεξάρτητες μεταβλητές ταυτόχρονα, όπου N ο αριθμός των πειραμάτων. Ο Plackett-Burman έχει ως βάση ότι δεν είναι όλες οι μεταβλητές εξίσου στατιστικά σημαντικές σε ό,τι αφορά την επίδραση τους στις εξαρτώμενες μεταβλητές.[66]

Μέσω υπολογιστικού εργαλείου (Design Expert 12) επιλέγεται ο πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman και εισάγονται οι μεταβλητές, οι τιμές και οι μονάδες μέτρησής τους (Πίνακας 7). Για το pH του διαλύματος επιλέγονται οι τιμές 3 και 9 [67], [68], για τη θερμοκρασία Τ οι 25°C και 55°C [60], για τη συγκέντρωση του τελικού διαλύματος C οι τιμές 1 και 9 mM [68], [69]και για την αναλογία κατ' όγκο (Ratio) διαλύματος νιτρικού αργύρου-εσωκυτταρικού εκχυλίσματος οι τιμές 50:50 και 95:5 [60]. Επιπλέον, εισάγονται οι αποκρίσεις (responses) που επιλέγονται να χαρακτηριστούν ώστε να αξιολογηθούν τα παραγόμενα νανοσωματίδια αργύρου (Πίνακας 8).

Πίνακας 7: Ανεξάρτητες μεταβλητές πειραματικού σχεδιασμού και τα αντίστοιχα επίπεδα

	Ανεξάρτητες μεταβλητές	**Επίπεδα**	
		-1	**+1**
X1	pH	3	9
X2	Θερμοκρασία T(°C)	25	55
X3	Συγκέντρωση $AgNO_3$ (mM)	1	9
X4	Αναλογία AgNO3/Εκχύλισμα	50	95
X5	Φως/Σκοτάδι	-1	1

Πίνακας 8:Εξαρτημένες μεταβλητές πειραματικού σχεδιασμού

Εξαρτημένες μεταβλητές (Responses)	
Y1	Απορρόφηση (Absorption)
Y2	Z-δυναμικό (zeta potential) (mV)
Y3	Μέγεθος (Z-average) (d.nm)
Y4	PDI
Y5	Απόδοση (Yield) %

Με βάση αυτά, το πρόγραμμα ορίζει τον αριθμό των πειραμάτων και τις συνθήκες υπό τις οποίες πρέπει να διεξαχθούν (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman

Συνθήκη (Run)	pH	Θερμοκρασία T	Συγκέντρωση $AgNO_3$ C(mM)	Αναλογία (Ratio) $AgNO_3$/Εκχύλισμα	Φως/Σκοτάδι (Light/Dark)
1	3	55	1	95	1
2	3	25	1	95	-1
3	3	25	9	50	1
4	9	55	1	95	1
5	3	55	9	50	1
6	3	25	1	50	-1
7	9	55	9	50	-1
8	9	25	1	50	1
9	3	55	9	95	-1
10	9	25	9	95	-1
11	9	55	1	50	-1
12	9	25	9	95	1

2.8 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων αργύρου

Για τον χαρακτηρισμό των παραγόμενων νανοσωματιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τεχνικές: Η φασματομετρία υπεριώδους- ορατού (UV-Vis), η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS), η φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-OES) και η υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR).

2.8.1 Φασματομετρία UV-Vis

Τα δείγματα 1mL καθαρισμένων νανοσωματιδίων που προέκυψαν κατά τις διάφορες συνθήκες σύνθεσης τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων ώστε να διασπαστούν τυχόν συσσωματώματα και μετρούνται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Συγκεκριμένα, το δείγμα τοποθετείται σε ειδική κυψελίδα και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης στα 300-700nm, με διαστήματα μέτρησης του 1nm και ταχύτητα σάρωσης 200nm/min. Προτού γίνει η μέτρηση των δειγμάτων, το όργανο βαθμονομείται με υπερκάθαρο νερό. Η ζώνη SPR των AgNPs αναμένεται στην περιοχή 400-500 nm.[70], [71]

2.8.2 Δυναμική σκέδαση φωτός- DLS

Τα δείγματα 1mL καθαρισμένων νανοσωματιδίων που προέκυψαν κατά τις διάφορες συνθήκες σύνθεσης τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων ώστε να διασπαστούν τυχόν συσσωματώματα. Τα δείγματα αραιώνονταν όταν αυτό θεωρούνταν απαραίτητο και εισάγονταν σε ειδική κυψελίδα (DTS1070) ύστερα από καλή ανάδευση. Πραγματοποιούνταν 2 μετρήσεις για κάθε δείγμα, μία του μεγέθους των σωματιδίων (size) και μία του ζ-δυναμικού (zeta potential). Κάθε μέτρηση περιελάμβανε δύο επαναλήψεις, πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία 25°C και λαμβανόταν ο μέσος όρος των μετρήσεων.

2.8.3 Φασματοσκοπία εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος Αργού (ICP-OES)

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης του αργύρου στα δείγματα νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε η τεχνική ICP-OES και συγκεκριμένα η μέθοδος Ag338 (μέτρηση στα 338nm). Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει την παρασκευή διαλύματος νιτρικού οξέος 1M που αποτελεί τον διαλύτη των νανοσωματιδίων για την μέτρηση στο ICP [72]. Από κάθε δείγμα λαμβάνεται 0,5mL και διαλύεται σε τελικό όγκο 25mL νιτρικού οξέος. Το τελικό διάλυμα αναδεύεται και είναι έτοιμο προς μέτρηση. Για την βαθμονόμηση του οργάνου ICP-OES παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα Ag τέτοιου εύρους έτσι ώστε να περιλαμβάνονται οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις των δειγμάτων νανοσωματιδίων εντός αυτού. Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση του οργάνου και τον προσδιορισμό των

συγκεντρώσεων αργύρου είναι η y = 0.000001423x - 0.040043968 (Εξίσωση 5) με R^2 = 0.998148694. Η μέθοδος ICP-OES δίνει αποτελέσματα εκπομπής ακτινοβολίας από το δείγμα και μέσω της καμπύλης αναφοράς των πρότυπων δειγμάτων αργύρου υπολογίζονται οι άγνωστες συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

2.8.4 Υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Για την πραγματοποίηση μέτρησης FTIR προηγείται η Παρασκευή παστίλιας άλατος KCl στο οποίο έχει αναμιχθεί ξηρή σκόνη στερεού δείγματος. Το άλας KCl λειτουργεί ως αραιωτικό του δείγματος και είναι διάφανο. Πρέπει να είναι ξηρό ώστε να μην επηρεαστεί το φάσμα από την περιεχόμενη υγρασία. Συγκεκριμένα, παρασκευάζονται δύο παστίλιες, η μία δείγματος νανοσωματιδίων αργύρου και μία δείγματος εκχυλίσματος βιομάζας. Λαμβάνεται σκόνη άλατος KCl και δείγματος και λειοτριβούνται σε γουδί ώστε να δημιουργηθεί ομοιογενές υλικό λεπτόκοκκης σκόνης. Στη συνέχεια το υλικό εισάγεται σε εσοχή της ειδικής διάταξης της υδραυλικής πρέσας. Η πρέσα ρυθμίζεται ώστε να ασκηθεί πίεση 10 τόνων για περίπου δύο λεπτά. [73]

Η παστίλια λαμβάνεται αφού απελευθερωθεί από τη διάταξη και εισάγεται στο όργανο FTIR. Το φάσμα απορρόφησης των δύο δειγμάτων που λαμβάνεται χρησιμοποιείται για συγκριτικούς σκοπούς ώστε να προσδιοριστούν τα βιομόρια που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των νανοσωματιδίων.

2.8.5 Χρόνος επώασης AgNPs

Για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των παραγόμενων AgNPs συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σύνθεσή τους όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.6 και λήψη δειγμάτων στα χρονικά διαστήματα των 12, 24, 48 και 72 ωρών [60] μετά την ανάμιξη των διαλυμάτων. Τα δείγματα που λήφθηκαν φυγοκεντρήθηκαν και ξεπλύθηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.6 και τα χαρακτηριστικά τους προσδιορίστηκαν με τη χρήση των τεχνικών: UV-Vis φασματομετρία, DLS και ICP-OES. Στόχος είναι ο προσδιορισμός της επίδρασης του χρόνου αντίδρασης στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, δηλαδή της απόδοσης του πειράματος, του μεγέθους των νανοσωματιδίων, της σταθερότητάς τους και της κατανομής του μεγέθους τους.

2.9 Βιολογική δράση νανοσωματιδίων

Οι εφαρμογές των συντιθέμενων νανοσωματιδίων αργύρου που πραγματοποιήθηκαν περιελάμβαναν τον έλεγχο των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων και την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το μακρομόριο DNA. Οι ιδιότητες αυτές είναι γνωστές για τα AgNPs και αποτελούν στόχο σε εφαρμογές της Ιατρικής και της Βιολογίας. Στην συγκεκριμένη περίπτωση εξετάζονται

νανοσωματίδια αργύρου συντεθειμένα υπό τις συνθήκες του πειράματος 8 (pH=9, T=25°C, C($AgNO_3$)=1mM, Αναλογία $AgNO_3$/εκχύλισμα=50:50, υπό φωτισμό). Το διάλυμα νανοσωματιδίων αφού ξεπλυθεί σύμφωνα με την παράγραφο 2.6 συμπυκνώνεται έτσι ώστε να δεκαπλασιαστεί η συγκέντρωσή του.

2.9.1 Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Για τον προσδιορισμό των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων αργύρου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μικροαραίωσης (broth microdilution) που βοηθά στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης MIC πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα. Ως MIC (Minimum Inhibitory Concentration) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση ενός αντιβακτηριακού παράγοντα σε mg/L που επιφέρει πλήρη αναστολή της ανάπτυξης του εν λόγω μικροοργανισμού. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia Coli*, το οποίο αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο LB του οποίου η σύσταση παρουσιάζεται στον πίνακα 10 [74]. Το pH του ρυθμίστηκε στο 7,0 με διάλυμα NaOH.

Η επώαση του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε στους 37°C , με ανάδευση 180rpm για 24h. [75], [76]

Πίνακας 10: Σύσταση θρεπτικού μέσου LB βακτηρίου *E. coli*

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	**ΣΥΣΤΑΣΗ (L^{-1} dH_2O)**
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	5 g
Τρυπτόνη	10 g
NaCl	10 g

Η διαδικασία περιλαμβάνει την επώαση για 24h, διαλυμάτων νανοσωματιδίων αυξανόμενης αραίωσης με θρεπτικό μέσο και προσθήκη σε αυτά συγκεκριμένης ποσότητας καλλιέργειας *E. Coli*. Συγκεκριμένα, σε πλάκα 96 κελιών, στις θέσεις από 1-12 των γραμμών A και B, τοποθετήθηκαν 50μL θρεπτικού μέσου LB και στη συνέχεια στην πρώτη στήλη 50μL δείγματος νανοσωματιδίων αργύρου. Ύστερα, υπό ανάμιξη με τη βοήθεια της πιπέτας 8-10 φορές, μεταφέρθηκαν 50μL στην επόμενη στήλη και η διαδικασία επαναλήφθηκε έως την τελευταία στήλη έτσι ώστε να επιτυγχάνονται διαδοχικές αραιώσεις 1:2. Σημειώνεται ότι από τη τελευταία στήλη τα 50μL που λαμβάνονται, απορρίπτονται ώστε όλα τα κελιά να έχουν όγκο διαλύματος 50μL. Στο τέλος, σε όλες τις χρησιμοποιούμενες θέσεις προστίθενται 50μL εναιωρήματος βακτηρίων (10^8 CFU/mL) σε κάθε κελί από τη στήλη 1-12. Με αυτό τον τρόπο, προέκυψε το τελικό επιθυμητό εμβόλιο 5*10^5 CFU/mL. Επιπλέον, σε 3 διαφορετικές θέσεις τοποθετούνται 50μL θρεπτικού μέσου LB και 50μL εναιωρήματος βακτηρίου για έλεγχο της ανάπτυξης (growth control). Σε ακόμα 3 θέσεις εισάγεται σκέτο θρεπτικό μέσο με σκοπό να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση της μικροπλάκας

(sterility control). Η διαδικασία πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες. Η μικροπλάκα επωάζεται για 24h στους 37°C και μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος φωτομετράται στα 600nm. Η αντιμικροβιακή δράση υπολογίστηκε μέσω της σχέσης: [77]

$$\%\text{Inhibition} = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100 \quad \text{(Εξίσωση 6)},$$

όπου $A_{control}$ η απορρόφηση του ελέγχου ανάπτυξης και A_{sample} η απορρόφηση του κάθε δείγματος.

2.9.2 Αλληλεπίδραση AgNPs-DNA

Για τη μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων αργύρου με DNA θύμου αδένα μόσχου (ctDNA) πραγματοποιείται φασματομετρική ανάλυση στο υπεριώδες φάσμα UV σε δείγματα διαλυμάτων ctDNA-AgNPs, καθαρού ctDNA και AgNPs. Εξαιτίας της ευρείας χρήσης των AgNPs σε πλήθος εφαρμογών, μελετάται η επίδραση που έχει στο ctDNA. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.5.3 τα AgNPs προσβάλλουν το κύτταρο και δημιουργούν φθορές στο DNA. Η παρούσα εφαρμογή έχει στόχο να αποδείξει την αλληλεπίδραση των AgNPs με το DNA και να βρεθεί το είδος της αλληλεπίδρασης αυτής. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την προετοιμασία κατάλληλου buffer Tris-HCl σε υπερκάθαρο νερό, με pH ίσο με 7,4 και συγκέντρωση 0,1M . Σε 10mL buffer διαλύεται 0,5mg ctDNA και αφήνεται για ανάδευση στους 4°C για 12 ώρες. [78]

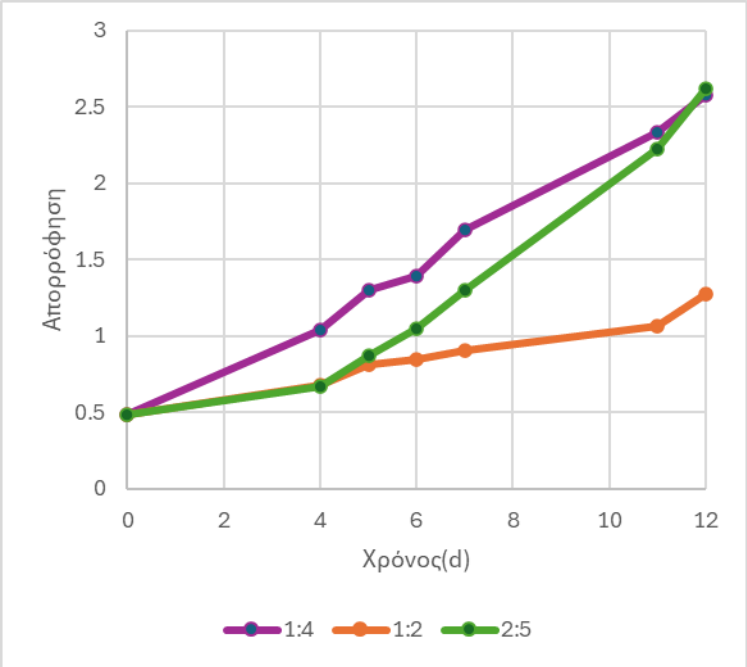
Τα διαλύματα νανοσωματιδίων αργύρου παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις χρησιμοποιώντας 0,5mL συμπυκνωμένου δείγματος νανοσωματιδίων συγκέντρωσης X . Σε αυτό προστίθενται 0,5 mL buffer (προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης X/2) και ύστερα από ανάδευση λαμβάνονται 0,5mL και μεταφέρονται σε επόμενο Eppendorf. Η διαδικασία πραγματοποιείται έως αραίωση X/16. Στα δείγματα προστίθενται άλλα 0,5mL buffer ώστε να προκύψουν διαλύματα του 1mL μέχρι αραίωσης X/32. Τα διαλύματα αργύρου αποτελούν τα τυφλά διαλύματα.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τα διαλύματα ctDNA-AgNPs όπου στην περίπτωση αυτή προστίθενται 0,5mL διαλύματος ctDNA αντί για σκέτο buffer. Να σημειωθεί ότι το διάλυμα ctDNA έχει αραιωθεί 5 φορές ώστε στα τελικά δείγματα να μπορεί να πραγματοποιηθεί η μέτρηση στο υπεριώδες. Το αραιωμένο διάλυμα ctDNA φωτομετράται μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα στην περιοχή 220-320nm εντός της οποίας απορροφάει το μόριο ctDNA. [78]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Μελέτη ανάπτυξης *Stichococcus sp.*

Πραγματοποιήθηκε χρονική μελέτη της ανάπτυξης του μικροφύκους *Stichococcus sp*. όπου λαμβάνονταν δείγματα της καλλιέργειας και μετρούνταν η οπτική πυκνότητα (OD) στα 680nm. Ο έλεγχος της ανάπτυξης του μικροφύκους πραγματοποιείται ώστε να είναι γνωστό το χρονικό διάστημα στο οποίο το συγκεκριμένο στέλεχος φτάνει στην εκθετική φάση ανάπτυξης και ανακαλλιεργείται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από γρήγορη ανάπτυξη και στο τέλος αυτού λαμβάνεται ο μέγιστος αριθμός ζωντανών κυττάρων. Αποτελεί την κατάλληλη στιγμή για να πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια του μικροφύκους ώστε να ελαχιστοποιηθεί η λανθάνουσα φάση, κατά την οποία το μικροφύκος προσαρμόζεται στο νέο θρεπτικό μέσο. [79]
Η επίδραση της αναλογίας όγκου καλλιέργειας/φιάλης στην ανάπτυξη του μικροφύκους μελετήθηκε μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας OD680 σε καλλιέργειες με την εν λόγω αναλογία να λαμβάνει τιμές 1:4 (Όγκος φιάλης 1L), 1:2 (Όγκος φιάλης 500mL) και 2:5 (Όγκος φιάλης 250mL). Η καμπύλη ανάπτυξης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 2.

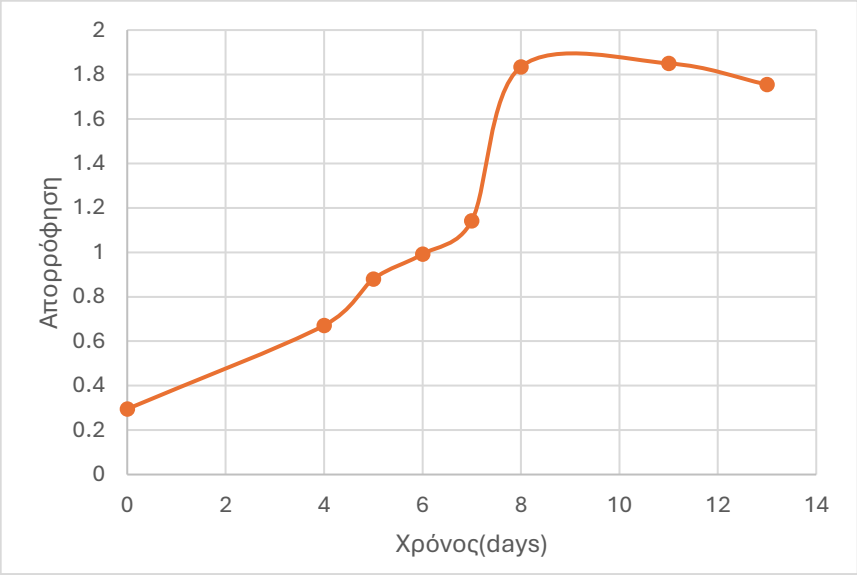


Διάγραμμα 2: Μελέτη επίδρασης αναλογίας όγκου καλλιέργειας/φιάλης στην ανάπτυξη του μικροφύκους

Οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροφύκους δείχνουν ότι σε χρονικό διάστημα 12 ημερών, μεγαλύτερη ανάπτυξη παρατηρείται για αναλογίες όγκου καλλιέργειας/φιάλης ίσες με 1:4 και 2:5. Επιπλέον, από τη μορφή των καμπυλών, διαπιστώνεται ότι η καλλιέργεια με αναλογία 2:5 εμφανίζει πιο απότομη αύξηση απορρόφησης στο χρονικό διάστημα των 12 ημερών. Αντίθετα, η

καλλιέργεια αναλογίας όγκου καλλιέργειας/φιάλης 1:2 εμφανίζει αργή ανάπτυξη στο ίδιο χρονικό διάστημα. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνεται ότι η ανάπτυξη του μικροφύκους μεγιστοποιείται σε αναλογία 2:5 και 1:4 στο διάστημα που μελετάται. Σε μεγαλύτερους χρόνους φαίνεται πως η καλλιέργεια με αναλογία 2:5 αυξάνει σε κυτταρικό πληθυσμό. Η ταχύτερη ανάπτυξη στην αναλογία αυτή οφείλεται στην πιο ομοιόμορφη ανάδευση της καλλιέργειας και τον επαρκή φωτισμό και αερισμό της.

Η ανάπτυξη του στελέχους *Stichococcus sp* πραγματοποιήθηκε σε αναλογία όγκου καλλιέργειας/φιάλης 1:4 σε δίλιτρες φιάλες για τη μεγιστοποίηση του λαμβανόμενου υγρού καλλιέργειας. Η αναλογία αυτή επιλέχθηκε έναντι της αναλογίας 2:5 καθώς μεγαλύτεροι όγκοι υγρού καλλιέργειας εμποδίζουν τον επαρκή αερισμό και φωτισμό των μικροφυκών. Επιπλέον, στο διάστημα κατά το οποίο πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια σε φρέσκο θρεπτικό μέσο, οι δύο αναλογίες οδηγούν σε ίδιο αριθμό κυττάρων (Διάγραμμα 2). Κατά την ανάπτυξη, παρατηρήθηκε ότι το μικροφύκος φτάνει προς το τέλος της εκθετικής ανάπτυξης περίπου μετά από 8 ημέρες και στην συνέχεια εισέρχεται στη φάση στασιμότητας (Διάγραμμα 3). Παρόλα αυτά, κάθε καλλιέργεια παρακολουθείται ως προς την οπτική πυκνότητα καθώς το χρονικό διάστημα μέχρι την φάση στασιμότητας μπορεί να μεταβάλλεται από καλλιέργεια σε καλλιέργεια. Παρατηρείται ότι το OD680 που μετράται στο ίδιο χρονικό διάστημα σε σχέση με αυτό του διαγράμματος 2 είναι χαμηλότερο. Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στη χρήση φιαλών μεγαλύτερου όγκου, εμποδίζοντας τον επαρκή αερισμό και φωτισμό.



Διάγραμμα 3: Καμπύλη ανάπτυξης *Stichococcus sp.*

3.2 Μέτρηση βιοδραστικών ενώσεων εκχυλίσματος

Το εκχύλισμα μικροφύκους που χρησιμοποιείται για την σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου περιέχει ενώσεις (Παράγραφος 1.8) που θεωρούνται υπεύθυνες για την αναγωγή των ιόντων αργύρου προς νανοσωματίδια καθώς και για την σταθεροποίηση ή και επικάλυψη τους (capping). Για το λόγο αυτό, εξετάζεται η παρουσία ορισμένων ενώσεων στο εκχύλισμα όπως είναι οι πρωτεΐνες και χρωστικές όπως οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή, με απλές τεχνικές μέτρησης.

3.2.1 Πρωτεΐνες εκχυλίσματος

Το περιεχόμενο του εκχυλίσματος σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου Bradford όπως παρουσιάστηκε στην παράγραφο 2.5.1 με εξίσωση της καμπύλης αναφοράς: C(mg/mL)=1,5939x-0,0314 .

Υπολογίζεται ότι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε πρωτεΐνη είναι ίση με 0.206 mg/mL ή 206 μg/mL.

3.2.2 Χλωροφύλλες και καροτενοειδή εκχυλίσματος

Ο προσδιορισμός της χλωροφύλλης α και β και των συνολικών καροτενοειδών που περιέχονται στο κυτταρικό εκχύλισμα πραγματοποιείται με χρήση των εξισώσεων (2), (3) και (4) και υπολογίζεται ότι:

Ca=4.900, Cb=5.894 και Ct=1.722 μg/mL, όπου Ca η συγκέντρωση σε χλωροφύλλη α, Cb η συγκέντρωση σε χλωροφύλλη β και Ct η συγκέντρωση σε συνολικά καροτενοειδή.

Οι μετρήσεις επιβεβαιώνουν την παρουσία πρωτεϊνών και χρωστικών στο εκχύλισμα όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις που συμβάλλουν στο σχηματισμό AgNPs, στην επικάλυψη και στην σταθεροποίηση τους [45], [53].

3.3 Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία επιτεύχθηκε η σύνθεση AgNPs με τη χρήση του κυτταρικού εκχυλίσματος του μικροφύκους *Stichococcus sp.* Τα βιομόρια (πρωτεΐνες, χλωροφύλλες κλπ.) που υπάρχουν στο κυτταρικό εκχύλισμα ανάγουν τα ιόντα αργύρου (Ag^{+}), που προέρχονται από τη διάσταση του νιτρικού αργύρου ($AgNO_3$) στο νερό, προς σχηματισμό ελεύθερων μεταλλικών ατόμων αργύρου (Ag^{0}). Ο ρόλος των βιομορίων είναι διττός, καθώς δρουν και ως σταθεροποιητικοί παράγοντες. Η σταθεροποίηση των διεσπαρμένων νανοσωματιδίων επιτυγχάνεται με τη δημιουργία ενός capping γύρω από αυτά κατά τη διάρκεια

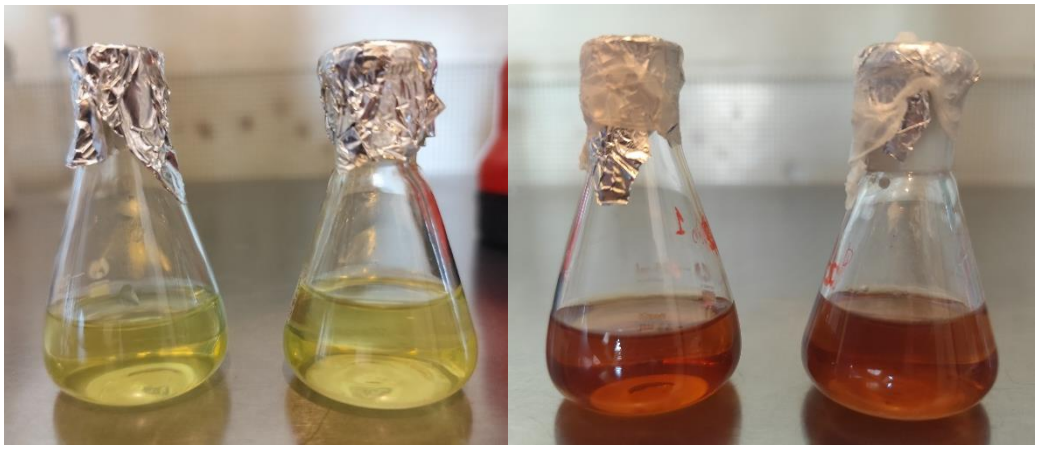
της σύνθεσης, όταν τα βιομόρια προσδένονται στην επιφάνεια του αργύρου, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη συσσωμάτωση [80]

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν τη σύνθεση των νανοσωματιδίων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πειραματικού σχεδιασμού τύπου Plackett-Burman. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman

Συνθήκη (Run)	**pH**	**Θερμοκρασία Τα**	**Συγκέντρωση AgNO3 C(mM)**	**Αναλογία (Ratio) AgNO3/Εκχύλισμα**	**Φως/Σκοτάδι (Light/Dark)**
1	3	55	1	95	1
2	3	25	1	95	-1
3	3	25	9	50	1
4	9	55	1	95	1
5	3	55	9	50	1
6	3	25	1	50	-1
7	9	55	9	50	-1
8	9	25	1	50	1
9	3	55	9	95	-1
10	9	25	9	95	-1
11	9	55	1	50	-1
12	9	25	9	95	1

Η σύνθεση των AgNPs πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 20 ωρών. Πρώτη ένδειξη για τον σχηματισμό νανοσωματιδίων αργύρου αποτελεί η αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από διαυγές υποκίτρινο σταδιακά σε καφέ-κόκκινο (χάλκινο) (Εικόνα 19).

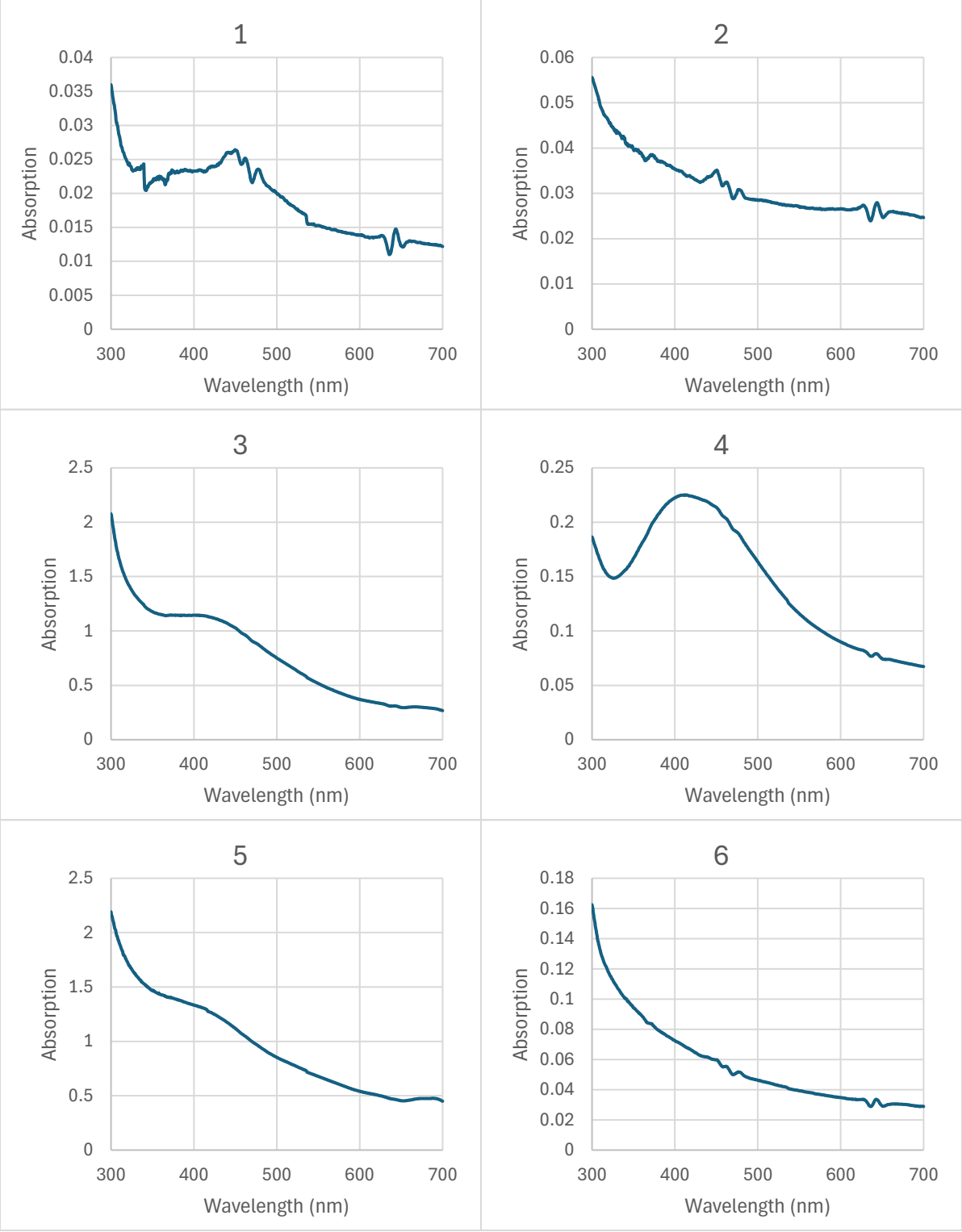


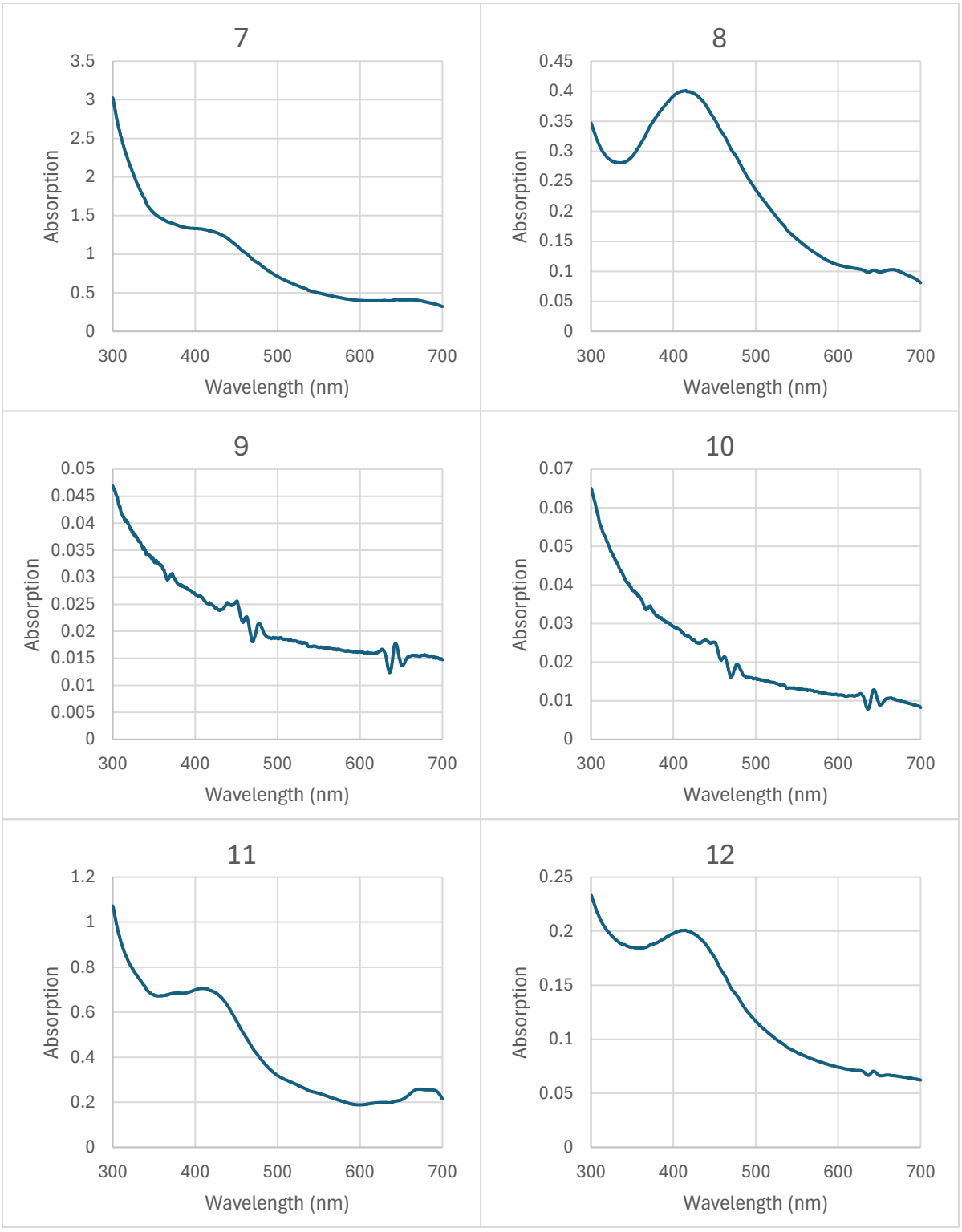
Εικόνα 19: Διάλυμα $AgNO_3$ και εκχυλίσματος βιομάζας κατά την ανάμιξη (υποκίτρινο χρώμα) και μετά τη σύνθεση νανοσωματιδίων (καφέ-κόκκινο χρώμα)

Η αλλαγή αυτή υποδεικνύει την αναγωγή των κατιόντων αργύρου σε ελεύθερα μεταλλικά άτομα αργύρου και πιστοποιεί τη σύνθεση των νανοσωματιδίων [81]. Η σύνθεσή τους επιβεβαιώνεται με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού αναμένοντας στα φάσματα να εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR με κορυφή συνήθως στα 400–450 nm. Από την τιμή της μέγιστης απορρόφησης, το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και το εύρος της ζώνης μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των σχηματισμένων AgNPs και κατ' επέκταση για την επίδραση κάθε εξεταζόμενου παράγοντα στη σύνθεση.

3.3.1 Φάσματα UV-Vis

Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis για κάθε μία από τις εξετασθείσες πειραματικές συνθήκες (Πίνακας 11). Στην περίπτωση των συνθηκών 2, 6, 9 και 10 δεν παρατηρείται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR καταδεικνύοντας την απουσία νανοσωματιδίων αργύρου. Οι συγκεκριμένες συνθήκες αφορούν σύνθεση απουσία φωτισμού. Επιπλέον, οι 3 από αυτές αφορούν σύνθεση σε πολύ όξινο pH (3.0) και σε χαμηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος βιομάζας (5% κατ' όγκο).


1
Absorption
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)
2
Absorption
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)
3
Absorption
2.5
2
1.5
1
0.5
0
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)
4
Absorption
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)
5
Absorption
2.5
2
1.5
1
0.5
0
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)
6
Absorption
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)



Διάγραμμα 4: Φάσμα Uv-Vis πειραμάτων σύνθεσης AgNPs από τη συνθήκη 1-12.

Οι υπόλοιπες συνθήκες απουσία φωτισμού είναι η 7 και 11 οι οποίες εμφανίζουν τη χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR , με πεπλατυσμένες κορυφές, μικρής κοιλάδας (valley). Η συνθήκη 7 και 11 αφορούν σε αλκαλικά pH και υψηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος βιομάζας, χαρακτηριστικά που ευνοούν το σχηματισμό νανοσωματιδίων [56]. Η συνθήκη 1 εμφανίζει πολύ χαμηλή απορρόφηση στην χαρακτηριστική περιοχή απορρόφησης των AgNPs. Το pH είναι 3 επομένως η υψηλή οξύτητα ίσως εμποδίζει το σχηματισμό νανοσωματιδίων [56] όπως και η ταυτόχρονη χαμηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος βιομάζας. Οι συνθήκες 3 και 5 εμφανίζουν απορρόφηση στην περιοχή που απορροφούν τα AgNPs λόγω του φαινομένου SPR, 400-450nm [68]. Το pH των δύο συνθηκών είναι πολύ όξινο, γεγονός που εμποδίζει τον σχηματισμό νανοσωματιδίων αργύρου. Το όξινο περιβάλλον προκαλεί αλλαγές στις λειτουργικές ομάδες των βιοδραστικών μορίων, οδηγεί σε μετουσίωση και υποβάθμισή τους και τελικά σε μειωμένους ρυθμούς αναγωγής των μεταλλικών ιόντων [56], [82]. Οι συνθήκες 4, 8 και 12 παρουσιάζουν καλύτερα χαρακτηριστικά φάσματος αφού η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR είναι εμφανής. Οι τρεις συνθήκες έχουν ως κοινό την έκθεση σε φως κατά την διάρκεια του πειράματος και τη χρήση αλκαλικού pH (9.0) που ευνοεί το σχηματισμό AgNPs [56], [82].

Παρουσιάζονται τα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης (λ_{max}) των νανοσωματιδίων αργύρου των συνθηκών 1 έως 12 (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης λ_{max} πειραμάτων 1-12

Συνθήκη	**λ_{max}(nm)**
1	450
2	Δ.Π.
3	407
4	411
5	Δ.Π.
6	Δ.Π.
7	420
8	415
9	Δ.Π.
10	Δ.Π.
11	408
12	415

Δ.Π. Δεν Προσδιορίστηκε

Τα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης βρίσκονται στο εύρος 400-450 που αποτελεί την περιοχή στην οποία εμφανίζεται τη χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR [68], επομένως επιβεβαιώνεται η σύνθεσή τους. Οι συνθήκες 4,8,12, εμφανίζουν λ_{max} στα 411 nm (συνθήκη 4) και 415 nm (συνθήκες 8, 12) αντίστοιχα. Η αύξηση του pH του διαλύματος οδηγεί σε μετακίνηση της κορυφής προς χαμηλότερα μήκη κύματος (blue shifting) [83]. Το φαινόμενο αυτό πράγματι παρατηρείται για

το πείραμα 1 (λ_{max}=450nm). Ο προσδιορισμός των μηκών κύματος μέγιστης απορρόφησης των πειραμάτων 3 και 7 είναι προσεγγιστικός καθώς οι κορυφές εμφανίζουν πλατό. Επιπλέον, με αύξηση του pH θεωρείται πως η κορυφή SPR γίνεται πιο στενή [83] που πράγματι παρατηρείται συγκρίνοντας τις συνθήκες 4,8,11 και 12 με τις συνθήκες 1 και 3. Επίσης, πλατιές κορυφές υποδηλώνουν την παρουσία συσσωματωμάτων [84] επομένως το όξινο pH γενικά οδηγεί σε μεγαλύτερα σωματίδια ή και συσσωματώματα. Οι συνθήκες 2,6,9,10 κατά τις οποίες δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός μέγιστης απορρόφησης αφορούν πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν απουσία φωτός. Η απουσία ακτινοβολίας μειώνει το ρυθμό σχηματισμού των νανοσωματιδίων επομένως συμπεραίνεται ότι η ακτινοβολία συνεισφέρει θετικά στην διαδικασία [85]. Η ακτινοβολία με χρήση λευκού φωτός LED ενισχύει την αναγωγή των κατιόντων αργύρου και την διέγερση των βιομορίων του εκχυλίσματος. Έτσι, προωθείται η πραγματοποίηση φωτοχημικών αντιδράσεων [86].

3.3.2 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Το μέγεθος, το σχήμα, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό των AgNPs είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις φυσικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες. Παρατίθενται οι μετρήσεις του δείκτη πολυδιασποράς , της υδροδυναμικής διαμέτρου και του ζ-δυναμικού.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα μετρήσεων δείκτη πολυδιασποράς, υδροδυναμικής διαμέτρου και ζ-δυναμικού για τα πειράματα 1-12

Πείραμα	Δείκτης πολυδιασποράς-PDI	Υδροδυναμική διάμετρος(nm)	Z-δυναμικό(mV)
1	0.285±0.033	239.98±25.93	-28.6±2.9
2	0.5325±0.076	678.05±173.86	-36.0±2.7
3	0.290±0.059	384.18±66.25	-40.7±5.9
4	0.324±0.028	148.48±8.50	-30.2±2.0
5	0.302±0.011	457.575±4.74	-44.5±3.1
6	0.271±0.080	358.05±84.45	-34.4±1.4
7	0.372±0.050	334.03±51.71	-48.6 ±2.9
8	0.419±0.051	181.65±20.66	-30.5±3.7
9	0.559±0.082	470.20±156.66	-35.2±2.3
10	0.570±0.051	644.63±44.32	-31.9±5.5
11	0.424±0.034	326.65±9.48	-32.5±4.5
12	0.484±0.037	195.90±16.67	-31.2±0.9

Σχετικά με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI, είναι επιθυμητό να λαμβάνει χαμηλές τιμές γεγονός που υποδηλώνει νανοσωματίδια με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους και οδηγεί σε βελτιωμένα χαρακτηριστικά και ιδιότητες. Τιμές κοντά στο 0,05 αντιστοιχούν σε μονοδιασπορά ενώ τιμές κοντά στο 0,7 σε πολυδιασπορά [87]. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, τιμές κάτω του 0,3 παρατηρούνται

στις συνθήκες 1,3 και 6. Από τις συνθήκες αυτές και με βάση τα φάσματα Uv-Vis σχηματισμός νανοσωματιδίων υπήρξε κατά το πείραμα 3, πολύ μικρή απορρόφηση παρατηρήθηκε για το πείραμα 1 ενώ για το πείραμα 6 δεν υπήρξε καμία ένδειξη σχηματισμού νανοσωματιδίων. Αμέσως μετά, τα πειράματα 5,4 και 7 κατά αύξουσα σειρά PDI βρέθηκαν μεταξύ τιμών 0,3-0,4. Μεταξύ τιμών PDI 0,4-0,5 ήταν τα πειράματα 8, 11 και 12 και τέλος τα πειράματα 9, 2 και 10 με PDI μεταξύ 0.5-0.6.

Τα πειράματα με τον χαμηλότερο δείκτη πολυδιασποράς 1, 3 και 6 έχουν ως κοινό το όξινο pH (3.0). Οι συνθήκες με την εμφανή αλλαγή χρώματος και την εμφάνιση της χαρακτηριστικής για τα AgNPs ζώνης SPR, 4,8 και 12, εμφανίζουν PDI στο εύρος 0,3- 0,48 με αυξανόμενη σειρά και απέχοντας περίπου μία μονάδα μεταξύ τους. Η συνθήκη 4 με το πιο ικανοποιητικό δείκτη PDI έχει χαμηλή συγκέντρωση νιτρικού αργύρου και χαμηλή συγκέντρωση βιομάζας συγκριτικά με τα 8 και 12. Οι συνθήκες με τις μεγαλύτερες τιμές PDI ήταν οι 2,9 για τις οποίες δεν υπήρξε ένδειξη σχηματισμού νανοσωματιδίων αργύρου με βάση τα διαγράμματα UV-Vis. Είναι πιθανό κατά τις συνθήκες αυτές να υπήρξε σχηματισμός συσσωματωμάτων που οδήγησε σε υψηλές τιμές PDI, γεγονός που αποδεικνύεται και από τις τιμές της υδροδυναμικής διαμέτρου.

Γενικά, ο δείκτης πολυδιασποράς προτιμάται να είναι χαμηλός. Ωστόσο, το αν είναι κατάλληλα προς χρήση τα AgNPs εξαρτάται και από την εφαρμογή για την οποία προορίζονται [87]. Τιμές μεγαλύτερες του 0.7, υποδηλώνουν μια υψηλή διασπορά στις διαστάσεις των σωματιδίων. Για τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs), ένας υψηλός PDI συχνά σημαίνει ότι το μέγεθος των σωματιδίων δεν είναι ομοιογενές, και υπάρχουν σωματίδια διαφορετικών μεγεθών στο δείγμα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα συσσωμάτωσης (aggregation), τα οποία μειώνουν την ειδική επιφάνεια των νανοσωματιδίων [84]. Η συσσωμάτωση μπορεί να προκαλέσει τη μείωση της ειδικής επιφάνειας που εκτίθεται σε αντιδράσεις, επηρεάζοντας αρνητικά την απόδοση τους σε εφαρμογές όπως καταλύσεις ή αλληλεπιδράσεις με βιολογικά συστήματα, όπου η υψηλή ειδική επιφάνεια είναι κρίσιμη. Τα παραγόμενα νανοσωματίδια έχουν τιμές PDI που αντιστοιχούν σε μία ενδιάμεση κατάσταση διασποράς, κατά μέσο όρο στο 0,4.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα οι συνθήκες των πειραμάτων 4,8,10 εμφανίζουν τις μικρότερες υδροδυναμικές διαμέτρους, δηλαδή 148,47 nm, 181,65 nm και 195,9 nm αντίστοιχα. Κοινό χαρακτηριστικό των συνθηκών αυτών είναι το αλκαλικό pH, στο οποίο φαίνεται να αποδίδεται το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων [83]. Η συνθήκη 4 ίσως έχει καλύτερα χαρακτηριστικά όσον αφορά στο μέγεθος και το PDI λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης νιτρικού αργύρου και της χαμηλής αναλογίας σε εκχύλισμα Στη συνέχεια, ακολουθεί η συνθήκη 1 με νανοσωματίδια διαμέτρου 239,97nm ενώ στις υπόλοιπες συνθήκες παρατηρούνται μεγαλύτερα μεγέθη άνω των 300nm (συνθήκες 11, 7, 6, 3) και ακόμα μεγαλύτερα κατά τα πειράματα 2,9,10. Ωστόσο, κατά τα πειράματα 2,9 και 10 δεν υπήρξε σχηματισμός νανοσωματιδίων επομένως το όργανο εντοπίζει συσσωματώματα. Οι τιμές αυτές δεν επαρκούν για τον πλήρη χαρακτηρισμό του μεγέθους των AgNPs καθώς η μέθοδος DLS μετράει το συνολικό μέγεθος των δομών, που περιλαμβάνει τα μόρια που επικαλύπτουν τα νανοσωματίδια ενώ επίσης σε αυτήν υπεισέρχεται το σφάλμα της παραδοχής σφαιρικών σωματιδίων. Στην πραγματικότητα, τα νανοσωματίδια έχουν

μικρότερο μέγεθος το οποίο προσδιορίζεται με ακρίβεια μέσω τεχνικών μικροσκοπίας όπως το TEM. Το TEM επιτρέπει επίσης τον προσδιορισμό του σχήματος των AgNPs. [87], [88]

Το ζ-δυναμικό προσδιορίζεται ώστε να ελεγχθούν τα νανοσωματίδια ως προς τη σταθερότητά τους. Για τιμές κατά απόλυτη τιμή μεγαλύτερες του 30mV θεωρείται ότι λαμβάνονται σταθερά νανοσωματίδια. Παρατηρείται ότι τα παραγόμενα νανοσωματίδια έχουν αρνητικό ζ-δυναμικό γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη βιομορίων με επικαλυπτικό ρόλο στα νανοσωματίδια (capping agents) [60]. Στην προκειμένη περίπτωση όλες οι συνθήκες πλην της συνθήκης 1 ξεπερνούν την τιμή αυτή. Τιμές ζ-δυναμικού κάτω του -40mv παρατηρούνται κατά τις συνθήκες 3, 5 και 7. Οι συνθήκες αυτές χαρακτηρίζονται από μεγάλη συγκέντρωση σε νιτρικό Άργυρο και υψηλή αναλογία σε εκχύλισμα βιομάζας. Η παρουσία περισσότερων βιοδραστικών ενώσεων στα διαλύματα αυτά ίσως οδηγεί σε πιο σταθερά νανοσωματίδια. Οι υπόλοιπες συνθήκες παρουσιάζουν ζ-δυναμικό στο εύρος -30 έως -40mV. Συμπεραίνεται πως με την πράσινη μέθοδο σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου παράγονται σταθερά AgNPs, γεγονός που επιβεβαιώνει την ικανότητα των βιομορίων να σταθεροποιούν τα νανοσωματίδια αργύρου.

3.3.3 Φασματοσκοπία εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος Αργού (ICP-OES)

Τα δείγματα νανοσωματιδίων αργύρου των πειραμάτων του πίνακα 9 και 11, μετριούνται μέσω της μεθόδου ICP-OES και υπολογίζεται η συγκέντρωση τους σε άργυρο μέσω της εξίσωσης καμπύλης αναφοράς y = 0.000001423x - 0.040043968 (Εξίσωση 5, παράγραφος 2.8.3) με R^2 = 0.998148694 (Πίνακας 14). Επομένως, προσδιορίζεται η απόδοση της αντίδρασης, δηλαδή η μετατροπή του αργύρου της πρόδρομης ένωσης σε AgNPs, για κάθε πείραμα, μέσω της σχέσης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ίδιο Πίνακα.

$$\text{Απόδοση}\% = \frac{\text{Συγκέντρωση Αργύρου δείγματος}}{\text{Συγκέντρωση Αργύρου για 100\% μετατροπή}} \times 100\% \text{ (Εξίσωση 7)}$$

Πίνακας 14: Συγκέντρωση αργύρου μετρούμενων διαλυμάτων ICP-OES

Πείραμα	Συγκέντρωση Ag (mg/L)	Απόδοση%
1	0.03± 0.01	1.22±0.36
2	0.13±0.13	6.39±6.20
3	0.82±0.08	8.49±0.78
4	0.01±0.00	0.49±0.19
5	1.09±0.28	11.22±2.85
6	0.25±0.04	22.75±3.78
7	5.67±0.05	58.39±0.53
8	0.41±0.04	38.18±3.37
9	0.00±0.01	0.02±0.03
10	0.03±0.05	0.18±0.28
11	0.41±0.03	38.09±3.18
12	0.02±0.00	0.11±0.00

Παρατηρούνται πολύ χαμηλές αποδόσεις, στο εύρος 0-6% κατά τα πειράματα 1, 2, 4, 9, 10 και 12. Όλα τα πειράματα αυτά έχουν ως κοινό την χαμηλή συγκέντρωση βιομάζας. Όταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος βιομάζας είναι χαμηλή, η διαθέσιμη ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων, όπως φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες, που λειτουργούν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες, δεν επαρκεί για την αποτελεσματική αναγωγή των ιόντων αργύρου (Ag^{+}) σε μεταλλικά άτομα αργύρου (Ag^{o}). Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για τη αναγωγή των κατιόντων Ag^{+} και την πυρήνωση, δηλαδή τον αρχικό σχηματισμό μικρών νανοσωματιδίων. Στη συνέχεια, οι ενώσεις αυτές οδηγούν στη σταθεροποίηση των πυρήνων που προκύπτουν, ώστε να αποφευχθεί η συσσωμάτωση και να επιτραπεί η ανάπτυξη των νανοσωματιδίων. Η ανεπαρκής συγκέντρωση των βιοδραστικών ενώσεων οδηγεί σε αναποτελεσματική πυρήνωση και περιορισμένη ανάπτυξη των νανοσωματιδίων, με αποτέλεσμα τις χαμηλές αποδόσεις AgNPs. Αυτό επιβεβαιώνει ότι η επαρκής ποσότητα βιοδραστικών συστατικών είναι κρίσιμη για την επιτυχή σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου.

Έρευνα με την ίδια μέθοδο σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου έδειξε ότι από τις χρησιμοποιούμενες μάζες βιομάζας για την παρασκευή του εκχυλίσματος, η μεγαλύτερη οδήγησε σε στενότερη και υψηλότερης έντασης κορυφή στο φάσμα UV-Vis ενώ το ίδιο συνέβη και στην περίπτωση των μελετώμενων αναλογιών εκχυλίσματος και νιτρικού αργύρου . Αυτό υποδεικνύει σχηματισμό περισσότερων νανοσωματιδίων στην περίπτωση χρήσης μεγαλύτερης ποσότητας βιομάζας από αυτήν που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα και ταυτόχρονη βελτίωση των τελικών AgNPs όταν χρησιμοποιείται υψηλή αναλογία σε εκχύλισμα. [60]

Στα υπόλοιπα πειράματα, με υψηλή αναλογία σε κυτταρικό εκχύλισμα παρατηρούνται υψηλότερες τιμές απόδοσης, (8-58%). Στην περίπτωση του πειράματος 6, όπου δεν υπήρξε ένδειξη σχηματισμού AgNPs σύμφωνα με το φάσμα UV-Vis, η απόδοση 22% οφείλεται στο σχηματισμό

συσσωματωμάτων αργύρου, όπως αποδείχθηκε και κατά την δυναμική σκέδαση φωτός. Η συνθήκη 8 εμφάνισε απόδοση 38%, όπως και η συνθήκη 11, με υψηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος. Οι συνθήκες 3 και 5 με αποδόσεις 8 και 11% χαρακτηρίζονται επίσης από υψηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος και νιτρικού αργύρου. Η υψηλότερη απόδοση βρέθηκε κατά το πείραμα 7 με 58% που χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση σε νιτρικό άργυρο και υψηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος. Επομένως, οι υψηλότερες αποδόσεις ελήφθησαν όταν υπήρχε ταυτόχρονα υψηλή συγκέντρωση νιτρικού αργύρου και υψηλή αναλογία σε κυτταρικό εκχύλισμα. Η υψηλή θερμοκρασία, όπως στο πείραμα 7 και 11 με την υψηλότερη απόδοση, επίσης μπορεί να οδήγησε σε ταχύτερο σχηματισμό σε σχέση με άλλα πειράματα. Παρόλα αυτά, η μέτρηση της απόδοσης του πειράματος δεν διαχωρίζει μεταξύ νανοσωματιδίων αργύρου επιθυμητών διαστάσεων και χαρακτηριστικών, το οποίο ανιχνεύεται πιο άμεσα μέσω της φασματομετρίας UV-Vis. Επομένως θα πρέπει να ερμηνεύονται συνδυαστικά όλες οι τεχνικές ώστε να προκύψουν συμπεράσματα για τις καταλληλότερες τιμές των παραμέτρων σύνθεσης. Στην συγκεκριμένη περίπτωση αν και η συνθήκη 7 έχει την μεγαλύτερη απόδοση, έχει επίσης διπλάσιο μέγεθος από τα σωματίδια της συνθήκης 8 καθώς και φάσμα UV-Vis πλατιάς κορυφής, υποδεικνύοντας την παρουσία συσσωματωμάτων.

3.4 Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman

Τα πειράματα που διεξήχθηκαν εισάγονται στο υπολογιστικό εργαλείο Design Expert 12 όπως και τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις UV-Vis, DLS και ICP-OES. Ο συγκεντρωτικός πίνακας που περιλαμβάνει τις τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών και των αποκρίσεων παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 15: Πειραματικός σχεδιασμός σύνθεσης AgNPs και αποτελέσματα μετρήσεων

Συνθήκη	pH	Θερμοκρασία T(°C)	Συγκέντρωση AgNO3 C(mM)	Αναλογία	Φως/ Σκοτάδι	Απορρόφηση	Z-δυναμικό (mV)	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	Απόδοση%
1	3	55	1	95	1	0.026	-28.6	239.975	0.285	1.22
2	3	25	1	95	-1	0	-36.0	678.05	0.559	6.39
3	3	25	9	50	1	1.145	-40.7	384.175	0.290	8.49
4	9	55	1	95	1	0.225	-30.2	148.475	0.324	0.49
5	3	55	9	50	1	0	-44.5	457.575	0.302	11.22
6	3	25	1	50	-1	0	-34.4	358.05	0.271	22.75
7	9	55	9	50	-1	0	-48.6	334.025	0.372	58.39
8	9	25	1	50	1	0.410	-30.5	181.65	0.419	38.18
9	3	55	9	95	-1	0	-31.6	470.2	0.504	0.02
10	9	25	9	95	-1	0	-31.9	644.625	0.570	0.18
11	9	55	1	50	-1	0.706	-32.5	326.65	0.424	38.09
12	9	25	9	95	1	0.201	-31.2	195.9	0.484	0.11

Ακολουθεί ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) με τη βοήθεια του λογισμικού. Συγκεκριμένα πραγματοποιείται ανάλυσης διακύμανσης, για κάθε μία εξαρτημένη μεταβλητή, δηλαδή την μέγιστη απορρόφηση των AgNPs στο φάσμα UV, το μέγεθος των AgNPs (μέση υδροδυναμική διάμετρος), τον δείκτη πολυδιασποράς μεγέθους PDI, το ζ-δυναμικό και την απόδοση σχηματισμού AgNPs. Με αυτόν τον τρόπο διαπιστώνεται ποιες μεταβλητές εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) έχουν την μεγαλύτερη επίδραση στις αποκρίσεις και σχηματίζεται το τροποποιημένο μοντέλο. Στη συνέχεια, μέσω του λογισμικού πραγματοποιείται η βελτιστοποίηση του μοντέλου που με βάση την στατιστική επεξεργασία που προηγήθηκε, παρέχει λύσεις του πειραματικού σχεδιασμού. Συγκεκριμένα, προσδιορίζονται συνδυασμοί πειραματικών συνθηκών που οδηγούν στα επιθυμητά αποτελέσματα.

Παρουσιάζονται για κάθε απόκριση τα αποτελέσματα της ANOVA, δηλαδή η τιμή σημαντικότητας (p-value), ο διορθωμένος συντελεστής προσαρμογής (Adjusted R^2), ο προβλεπόμενος συντελεστής προσαρμογής (Predicted R^2) και η εξίσωση πρόβλεψης της αντίστοιχης απόκρισης συναρτήσει των ανεξάρτητων μεταβλητών (Actual equation). Η τιμή p προσδιορίζει τη στατιστική σημαντικότητα της εκάστοτε ανεξάρτητης μεταβλητής και των αλληλεπιδράσεων αυτών. Για τιμές σημαντικότητας <0.05 θεωρείται ότι η εν λόγω μεταβλητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα. Ο διορθωμένος συντελεστής προσαρμογής εκφράζει το ποσοστό της μεταβλητότητας της αντίστοιχης εξαρτημένης μεταβλητής, μέσω του μοντέλου, από τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Η τιμή του αυξάνεται ή μειώνεται ανάλογα με τις μεταβλητές που εισάγονται στο μοντέλο και κατά πόσον συνεισφέρουν στην ερμηνεία της μεταβλητότητας. Ο προβλεπόμενος συντελεστής προσαρμογής δείχνει πόσο καλά προβλέπει το μοντέλο την αντίστοιχη εξαρτημένη μεταβλητή. Οι δύο συντελεστές πρέπει να έχουν μεταξύ τους διαφορά μικρότερη του 0,2 ώστε να βρίσκονται σε λογική συμφωνία ειδάλλως πρέπει να επανεξεταστεί το μοντέλο ή τα δεδομένα [87]. Η τιμή του συντελεστή προσαρμογής R^2 που παρουσιάζεται στους πίνακες 24,26,28,30 και 32 δεν αξιολογείται σε αντίθεση με τον διορθωμένο και τον προβλεπόμενο συντελεστή προσαρμογής καθώς η προσθήκη μεταβλητών στο κάθε μοντέλο οδηγεί σε αύξησή του είτε οι μεταβλητές συνεισφέρουν σημαντικά είτε όχι.

Τα δεδομένα της κάθε εξαρτημένης μεταβλητής προσαρμόζονται στο ακόλουθο μοντέλο. Στους πίνακες 16, 18, 20, 22 και 24 παρουσιάζονται οι τιμές p-value για τις επιλεγμένες ανεξάρτητες μεταβλητές και τις αλληλεπιδράσεις, όπου A:pH, B: T (Θερμοκρασία), C:C (Συγκέντρωση $AgNO_3$) , D: Ratio (Αναλογία $AgNO_3$/Εκχύλισμα), E: Dark/Light (Φως/Σκοτάδι) ενώ οι συνδυασμοί των γραμμάτων σημαίνουν την αλληλεπίδραση των αντίστοιχων παραμέτρων. Στους πίνακες 17, 19, 21, 23 και 25 παρουσιάζονται τα στατιστικά αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA. Οι εξισώσεις πρόβλεψης όπου αυτές ήταν δυνατόν να προσδιοριστούν επίσης παρατίθενται στη συνέχεια. Τέλος, παρουσιάζονται τα διαγράμματα του μοντέλου προσαρμογής για κάθε εξαρτημένη μεταβλητή που αναπαριστούν τα πραγματικά σημεία σε σχέση με το μοντέλο πρόβλεψης καθώς και τα τρισδιάστατα διαγράμματα της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών ανά δύο, στις εξαρτημένες μεταβλητές.

3.4.1 Απορρόφηση UV-Vis

Το αρχικό μοντέλο πρόβλεψης της μέγιστης απορρόφησης που προκύπτει από το λογισμικό περιγράφεται από την εξίσωση:

Απορρόφηση= -0,477219 + 0,0502262 * pH + 0,00987378 * T + 0,327717 * C + 0,00136675 * Ratio + 0,383253 * Dark/Light + -5,32222e-05 * pH * T + -0,014109 * pH * C + -0,0040525 * T * C + -1,82222e-06 * T * Ratio + -0,0113145 * T * Dark/Light + -0,00132119 * C * Ratio (Εξίσωση 8)

Κατά την στατιστική επεξεργασία απαλείφθηκαν οι μη σημαντικοί όροι ($p>0.05$) και προέκυψε το τροποποιημένο μαθηματικό μοντέλο με εξίσωση:

Απορρόφηση= -0,453692 + 0,0478712 * pH + 0,00940903 * T + 0,32574 * C + 0,00122372 * Ratio + 0,383305 * Dark/Light + (-0,0140588)* pH * C + (-0,00403919) * T * C + (-0,0112744) * T * Dark/Light + (-0,00130127)* C * Ratio (Εξίσωση 9)

Η ανάλυση της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή της μέγιστης απορρόφησης υπέδειξε ως στατιστικά σημαντικούς παράγοντες τους παράγοντες του A:pH, B: T (Θερμοκρασία), C:C (Συγκέντρωση $AgNO_3$) , D: Ratio (Αναλογία $AgNO_3$/Εκχύλισμα), E: Dark/Light (Φως/Σκοτάδι) και τις αλληλεπιδράσεις AC, BC, BE και CD σύμφωνα με τις τιμές p-value του τροποποιημένου μοντέλου (Πίνακας 16). Οι μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στη δημιουργία του μοντέλου (Πίνακας 16) έχουν p-value μικρότερο του 0.05 επομένως αποτελούν στατιστικά σημαντικούς όρους του μοντέλου πρόβλεψης.

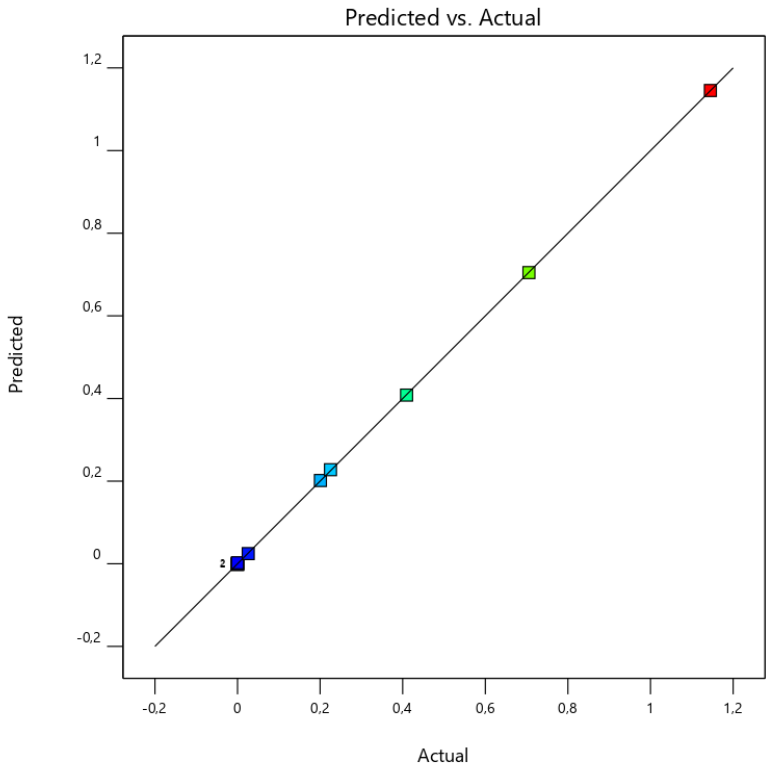
Ο προβλεπόμενος συντελεστής R^2 (Predicted R^2) είναι σε συμφωνία με τον διορθωμένο συντελεστή R^2 (Adjusted R^2) αφού η διαφορά τους είναι μικρότερη από 0.2. Και οι δύο συντελεστές έχουν πολύ υψηλή τιμή επομένως το μοντέλο προβλέπει αποτελεσματικά τις αποκρίσεις και οι επιλεχθείσες ανεξάρτητες μεταβλητές συμβάλλουν στην προσαρμογή του μοντέλου. Επιπλέον, η ακρίβεια Adequate Precision μετράει την αναλογία σήματος-θορύβου και όταν λαμβάνει τιμή μεγαλύτερη του 4 θεωρείται πως το σήμα είναι επαρκές[87], όπως και στην προκειμένη περίπτωση (Πίνακας 17).

Πίνακας 16: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης της μέγιστης απορρόφησης στο φάσμα UV-Vis

Πηγή (Source)	**P-value**
Μοντέλο (Model)	< 0.0001
A-pH	0,0003
B-T	< 0.0001
C-C	0,0003
D-Ratio	< 0.0001
E-Dark/Light	0,0003
AC	< 0.0001
BC	< 0.0001
BE	< 0.0001
CD	0.0001

Πίνακας 17: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης της μέγιστης απορρόφησης στο UV-Vis

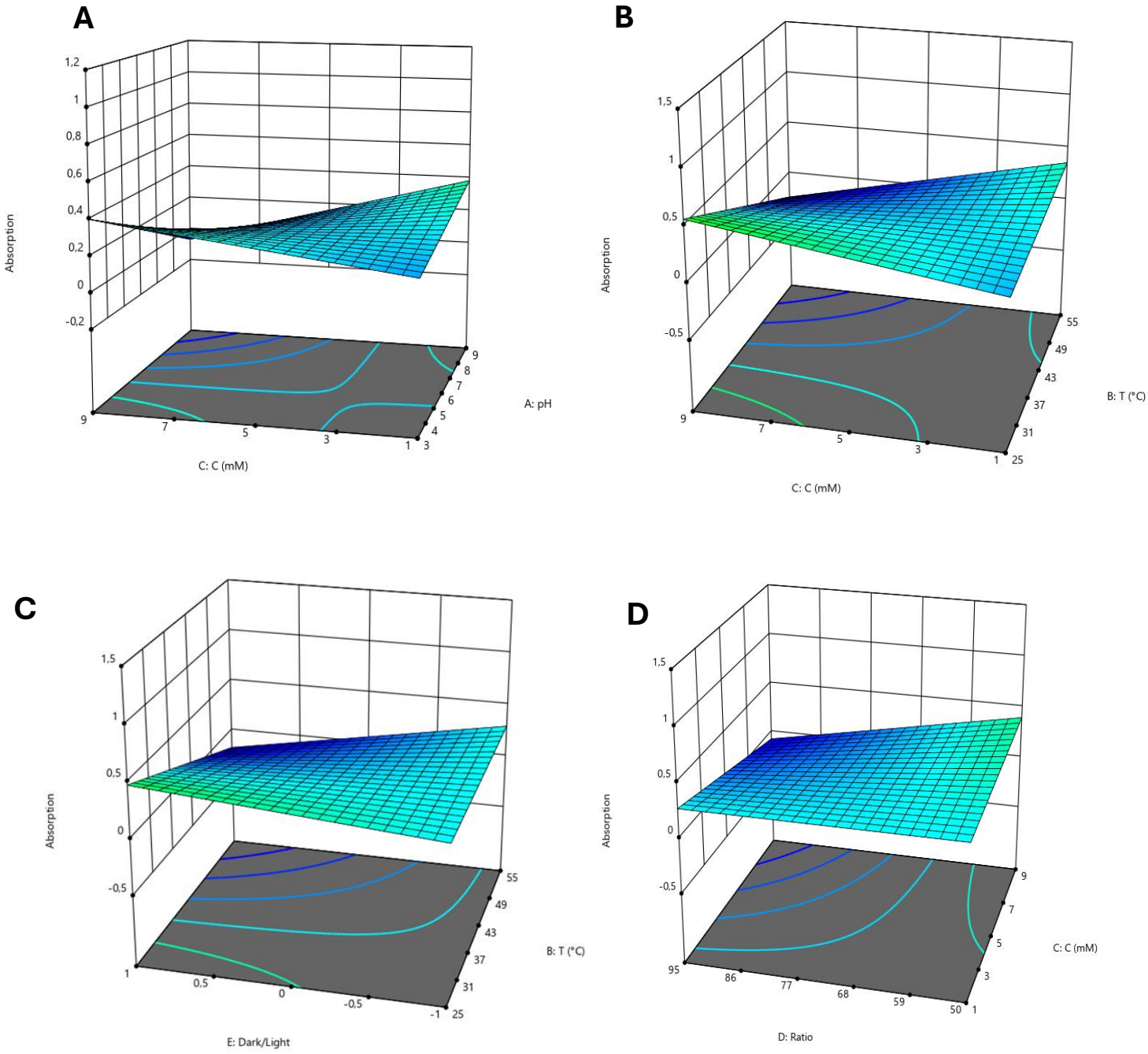
Std. Dev.	0,0033	**R^2**	0,9999
Mean	0,2260	**Adjusted R^2**	0,9999
C.V. %	1,46	**Predicted R^2**	0,9694
		Adeq Precision	379,8200



Διάγραμμα 5: Προσαρμογή πραγματικών σημείων μέγιστης απορρόφησης στο τροποποιημένο μοντέλο πρόβλεψης

Τα πραγματικά πειραματικά σημεία φαίνεται πως προσαρμόζονται πολύ καλά στο μοντέλο πρόβλεψης αφού βρίσκονται πάνω στην ευθεία του μοντέλου προσαρμογής (Διάγραμμα 5), γεγονός που γίνεται αντιληπτό και από τις τιμές των συντελεστών προσαρμογής (Πίνακας 16).

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα τρισδιάστατα διαγράμματα στα οποία παρουσιάζεται η ταυτόχρονη επίδραση δύο ανεξάρτητων μεταβλητών στην αντίστοιχη εξαρτημένη μεταβλητή, στην προκειμένη περίπτωση την μέγιστη απορρόφηση UV-Vis.



Διάγραμμα 6:3D διαγράμματα επίδρασης A)pH-C($AgNO_3$), B) T-C($AgNO_3$), C)T-Φως/Σκοτάδι, D)Ratio-C($AgNO_3$) στην μέγιστη απορρόφηση

Από το Διάγραμμα 6A παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης κατά την εφαρμογή υψηλών pH και χαμηλών συγκεντρώσεων νιτρικού αργύρου ενώ τείνει στο μηδέν για υψηλή συγκέντρωση και υψηλό pH. Το Διάγραμμα 6B δείχνει ότι υπάρχει τάση αύξησης της μέγιστης απορρόφησης σε υψηλές τιμές συγκέντρωσης και σε χαμηλές θερμοκρασίες ενώ τείνει στο μηδέν για υψηλές συγκεντρώσεις και υψηλές θερμοκρασίες. Για σταθερά χαμηλές συγκεντρώσεις φαίνεται πως η μέγιστη απορρόφηση διατηρείται σε μία ενδιάμεση τιμή σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών που μελετώνται. Στο Διάγραμμα 6C παρατηρείται αυξημένη απορρόφηση για χαμηλή θερμοκρασία και υπό συνθήκες φωτός. Η τιμή της μέγιστης απορρόφησης προσεγγίζει το μηδέν για συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και φωτός. Τέλος, το Διάγραμμα 6D δείχνει αύξηση απορρόφησης στις υψηλές αναλογίες σε εκχύλισμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου, και μείωση στο μηδέν για χαμηλές αναλογίες σε εκχύλισμα. Σε μικρές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου η μέγιστη απορρόφηση έχει σταθερή τιμή μεταξύ του 0-0.5 σε υψηλή και χαμηλή αναλογία εκχυλίσματος. Τα διαγράμματα αναφέρονται κάθε φορά σε σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους σε ενδιάμεση τιμή του εύρους που μελετάται.

3.4.2 Z-δυναμικό

Η προσαρμογή των μετρήσεων του ζ-δυναμικού οδήγησε στο παρακάτω γραμμικό μοντέλο:

Z-δυναμικό=-30,2336 + 0,0822531 * pH + 0,117049 * T + -2,40556 * C + -0,0684259 * Ratio + 2,60781 * Dark/Light + -0,000231481 * pH * T + -0,0534722 * pH * C + -0,0029321 * pH * Ratio + -0,0269097 * T * C + 0,0422222 * C * Ratio + -0,249479 * C * Dark/Light (Εξίσωση 10)

Κατά την στατιστική επεξεργασία απαλείφθηκαν οι μη σημαντικοί όροι (p>0.05) και προέκυψε το τροποποιημένο μαθηματικό μοντέλο με εξίσωση:

Z-δυναμικό= -30,1605 + 0,0732784 * pH + 0,115625 * T + -2,4135 * C + -0,068559 * Ratio + 2,61875 * Dark/Light + -0,0532552 * pH * C + -0,00296296 * pH * Ratio + -0,026875 * T * C + 0,042309 * C * Ratio + -0,25 * C * Dark/Light (Εξίσωση 11)

Η ανάλυση της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή του ζ-δυναμικού υπέδειξε ως στατιστικά σημαντικούς παράγοντες τους παράγοντες του A:pH, B: T (Θερμοκρασία), C:C (Συγκέντρωση $AgNO_3$) , D: Ratio (Αναλογία $AgNO_3$/Εκχύλισμα), E: Dark/Light (Φως/Σκοτάδι) και τις αλληλεπιδράσεις AC, AD και BC σύμφωνα με τις τιμές p-value του τροποποιημένου μοντέλου (Πίνακας 18). Οι μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στη δημιουργία του μοντέλου (Πίνακας 18) έχουν p-value μικρότερο του 0.05 επομένως αποτελούν στατιστικά σημαντικούς όρους του μοντέλου πρόβλεψης.

Ο προβλεπόμενος συντελεστής R^2 (Predicted R^2) είναι σε συμφωνία με τον διορθωμένο συντελεστή R^2 (Adjusted R^2) αφού η διαφορά τους είναι μικρότερη από 0.2. Και οι δύο συντελεστές έχουν πολύ υψηλή τιμή επομένως το μοντέλο προβλέπει αποτελεσματικά τις αποκρίσεις και οι επιλεχθείσες ανεξάρτητες μεταβλητές συμβάλλουν στην προσαρμογή του μοντέλου. Η ακρίβεια

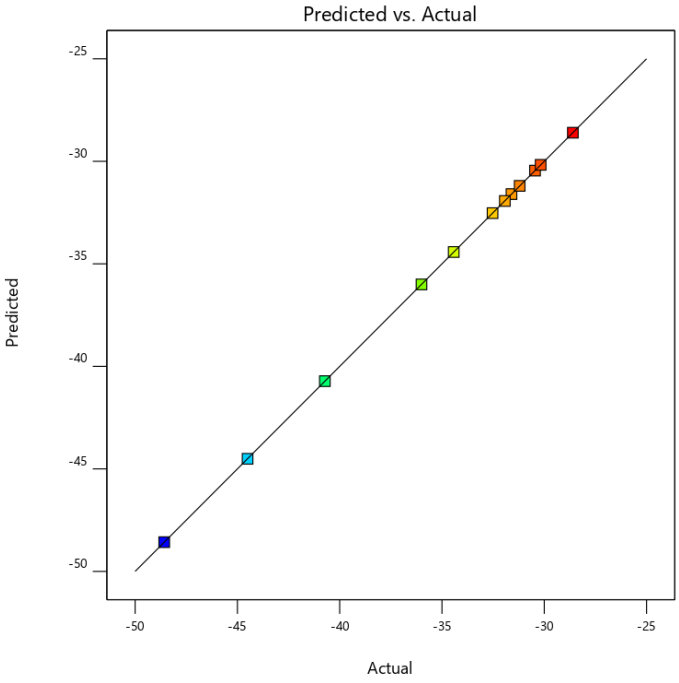
Adequate Precision είναι μεγαλύτερη του 4 άρα θεωρείται πως η πρόβλεψη του μοντέλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί (Πίνακας 19).

Πίνακας 18: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης του ζ-δυναμικού

Πηγή (Source)	**P-value**
Μοντέλο (Model)	0,0019
A-pH	0,0031
B-T	0,0141
C-C	0,0011
D-Ratio	0,0014
E-Dark/Light	0,0029
AC	0,0060
AD	0,0199
BC	0,0025

Πίνακας 19: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης του ζ-δυναμικού

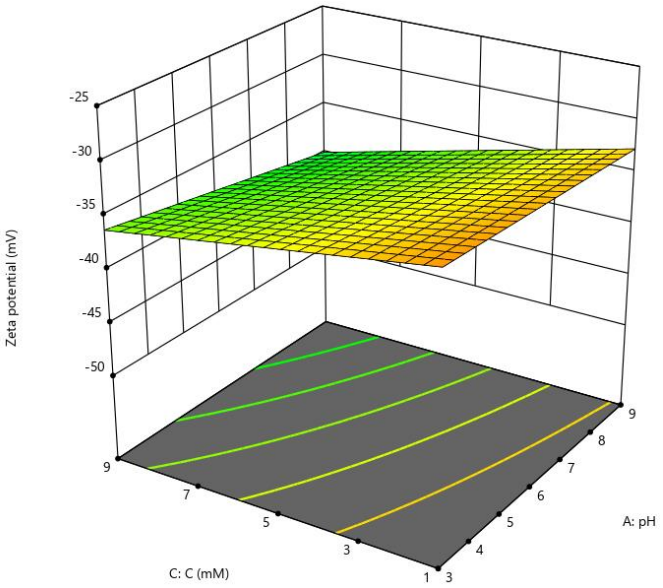
Std. Dev.	0,0161	**R^2**	0,9999
Mean	-35,06	**Adjusted R^2**	0,9999
C.V. %	0,0460	**Predicted R^2**	0,9698
		Adeq Precision	1292,4411



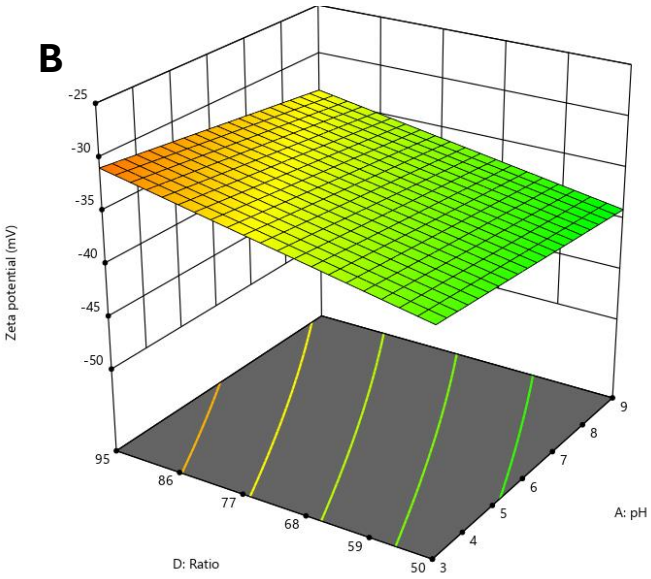
Διάγραμμα 7: Προσαρμογή πραγματικών σημείων ζ-δυναμικού στο τροποποιημένο μοντέλο πρόβλεψης

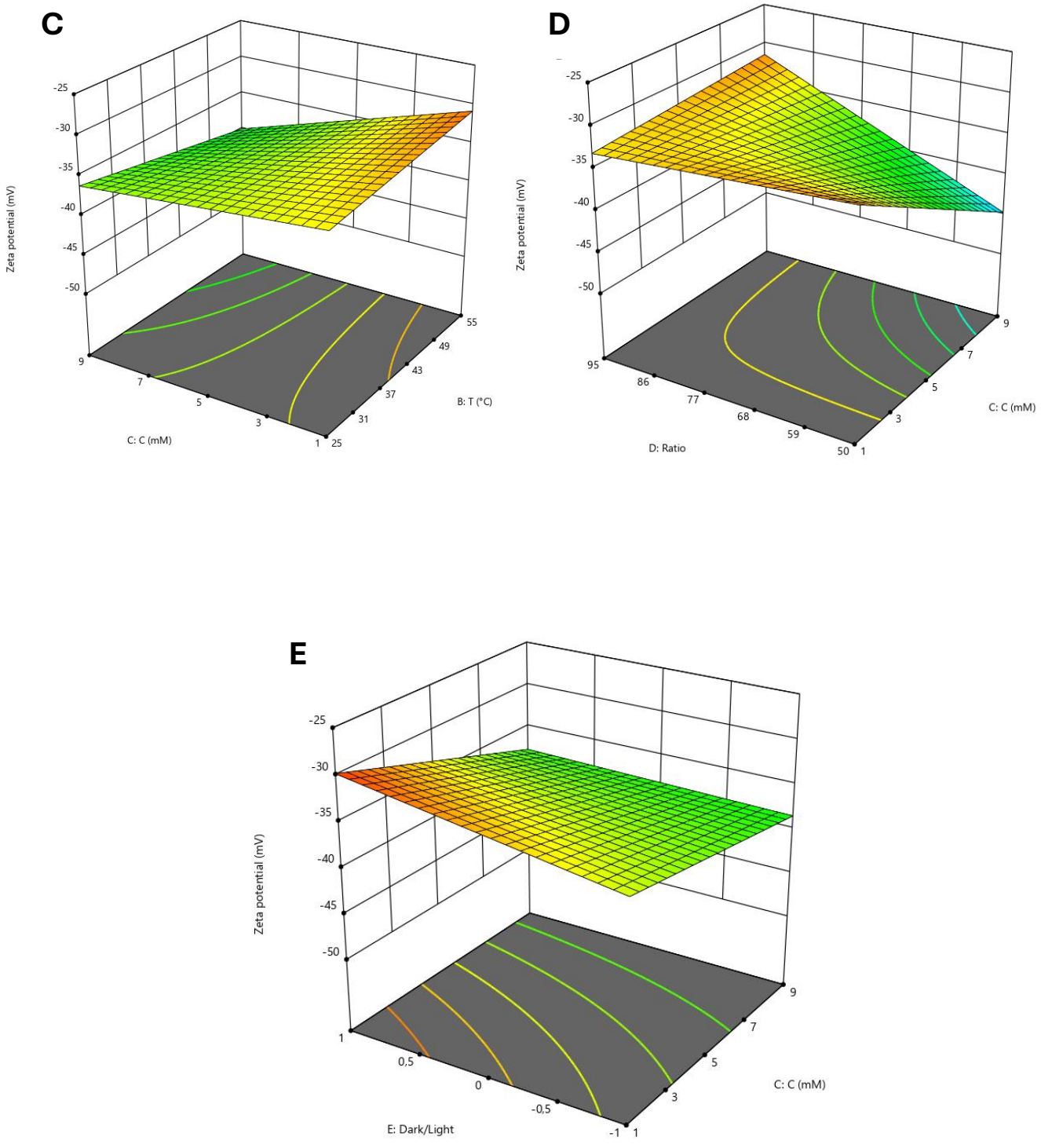
Η προσαρμογή των πειραματικών σημείων είναι πολύ καλή κρίνοντας από τη θέση τους στην καμπύλη του μοντέλου πρόβλεψης (Διάγραμμα 7) αλλά και από τις τιμές των συντελεστών προσαρμογής (Πίνακας 19). Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα τρισδιάστατα διαγράμματα της επίδρασης ανά δύο ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή του ζ-δυναμικού:

A



B





Διάγραμμα 8: 3D διαγράμματα επίδρασης A) pH-C, B) pH-Ratio, C) T-C, D) Ratio-C, E) Φως/Σκοτάδι-C στο ζ-δυναμικό

Στο Διάγραμμα 8A παρατηρείται μείωση του ζ-δυναμικού προς πιο αρνητικές τιμές με αύξηση της συγκέντρωσης και αύξηση του pH ενώ λιγότερο αρνητικές τιμές παρατηρούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και κυρίως προς τα όξινα pH. Στο Διάγραμμα 8B φαίνεται πως χαμηλότερο ζ-δυναμικό αποκτάται κυρίως σε υψηλά pH και σε υψηλές αναλογίες σε εκχύλισμα. Στο διάγραμμα 9C το ίδιο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με υψηλές συγκεντρώσεις και υψηλές θερμοκρασίες ενώ πιο υψηλό ζ-δυναμικό παρατηρείται για χαμηλή συγκέντρωση και υψηλή θερμοκρασία. Το διάγραμμα 9D δείχνει πως πολύ αρνητικές τιμές ζ-δυναμικού αποκτούνται με χρήση υψηλής συγκέντρωσης νιτρικού αργύρου και υψηλή αναλογία σε εκχύλισμα. Το Διάγραμμα 8E εμφανίζει χαμηλές τιμές ζ-δυναμικού εφαρμόζοντας υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου παρουσία/απουσία φωτός. Τα διαγράμματα αυτά επίσης εμφανίζουν σαγματικό σημείο και δεν μπορεί να βρεθεί μία βέλτιστη περιοχή για την ελαχιστοποίηση του ζ-δυναμικού. Παρόλα αυτά φαίνεται πως σε κάθε περίπτωση η υψηλή συγκέντρωση βελτιώνει την τιμή του ζ-δυναμικού.

3.4.3 Υδροδυναμική διάμετρος

Η προσαρμογή των μετρήσεων της υδροδυναμικής διαμέτρου οδήγησε στο παρακάτω γραμμικό μοντέλο:

Υδροδυναμική διάμετρος=-86,389 + -15,9434 * pH + 12,9583 * T + 22,8233 * C + 6,37141 * Ratio + 83,5361 * Dark/Light + -0,490182 * T * C + -0,153796 * T * Ratio + 2,63625 * T * Dark/Light + -3,88701 * Ratio * Dark/Light (Εξίσωση 12)

Κατά την στατιστική επεξεργασία απαλείφθηκαν οι μη σημαντικοί όροι ($p>0.05$) και προέκυψε το τροποποιημένο μαθηματικό μοντέλο με εξίσωση:

Υδροδυναμική διάμετρος=-86,389 + (-15,9434)* pH + 83,5361 * Dark/Light + (-0,490182) * T * C +(-0,153796) * T * Ratio + 2,63625 * T * Dark/Light + (-3,88701) * Ratio * Dark/Light (Εξίσωση 13)

Η ανάλυση της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή της υδροδυναμικής διαμέτρου υπέδειξε ως στατιστικά σημαντικούς παράγοντες τους παράγοντες του A:pH, E: Dark/Light (Φως/Σκοτάδι) και τις αλληλεπιδράσεις BC, BD, BE και DE σύμφωνα με τις τιμές p-value του τροποποιημένου μοντέλου (Πίνακας 20). Οι μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στη δημιουργία του μοντέλου (Πίνακας 20) έχουν p-value μικρότερο του 0.05 επομένως αποτελούν στατιστικά σημαντικούς όρους του μοντέλου πρόβλεψης.

Ο προβλεπόμενος συντελεστής R^2 (Predicted R^2) είναι σε συμφωνία με τον διορθωμένο συντελεστή R^2 (Adjusted R^2) αφού η διαφορά τους είναι μικρότερη από 0.2. Οι δύο συντελεστές έχουν υψηλή τιμή επομένως το μοντέλο προβλέπει αποτελεσματικά τις αποκρίσεις και οι επιλεχθείσες ανεξάρτητες μεταβλητές συμβάλλουν στην προσαρμογή του μοντέλου Η ακρίβεια Adequate Precision είναι μεγαλύτερη του 4 άρα θεωρείται πως η πρόβλεψη του μοντέλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί (Πίνακας 21).

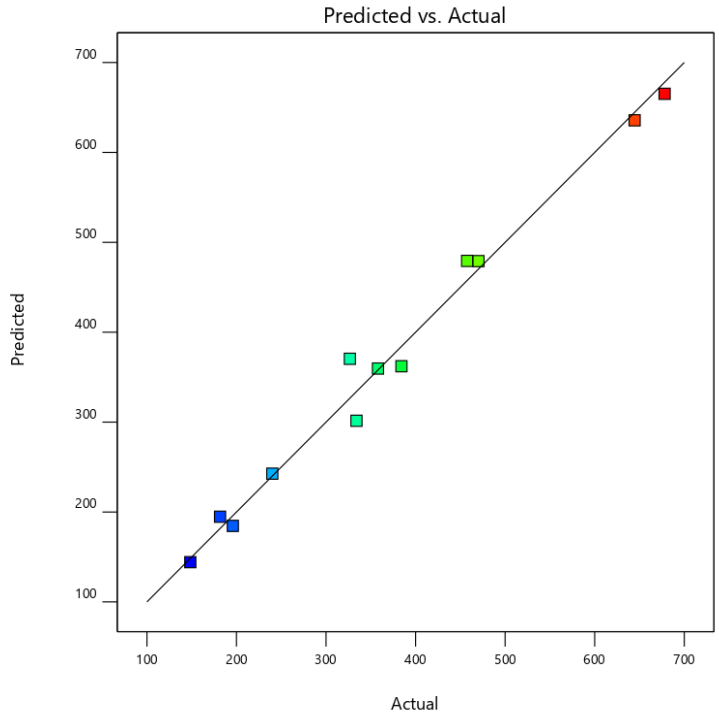
Πίνακας 20: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης της υδροδυναμικής διαμέτρου

Πηγή (Source)	**P-value**
Μοντέλο (Model)	0,0002
A-pH	0,0070
E-Dark/Light	0,0002
BC	0,0208
BD	0,0025
BE	0,0122
DE	0,0002

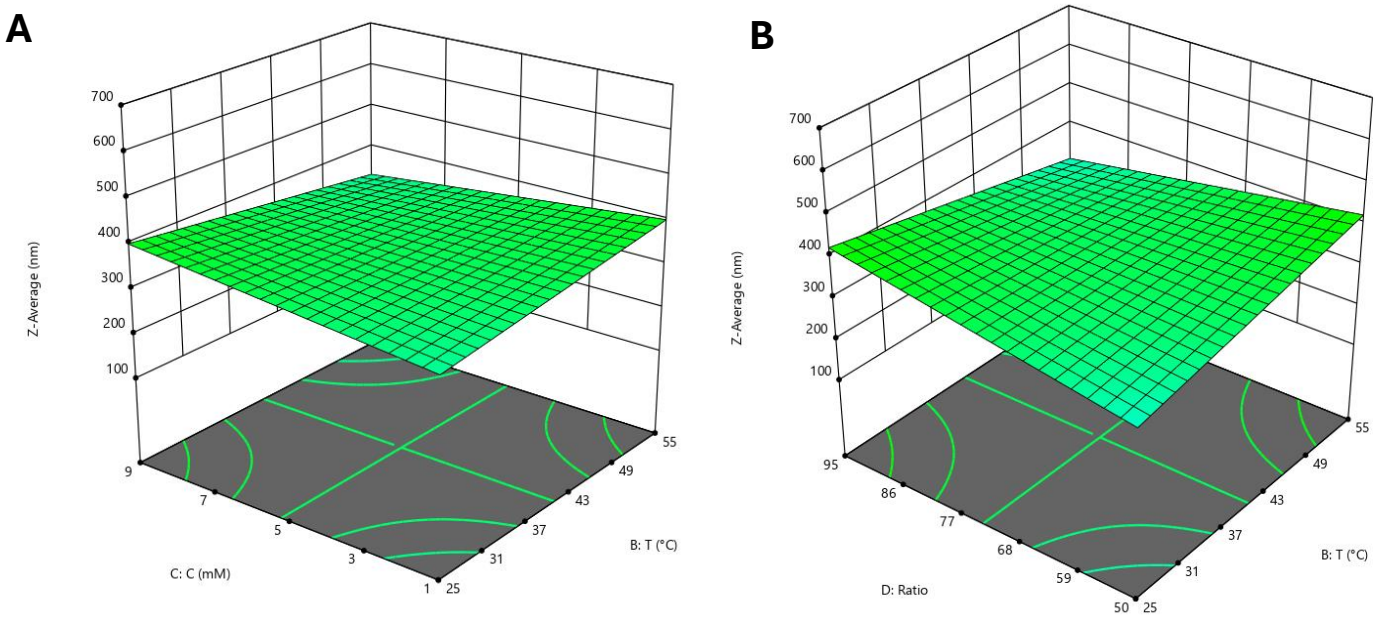
Πίνακας 21: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης της υδροδυναμικής διαμέτρου

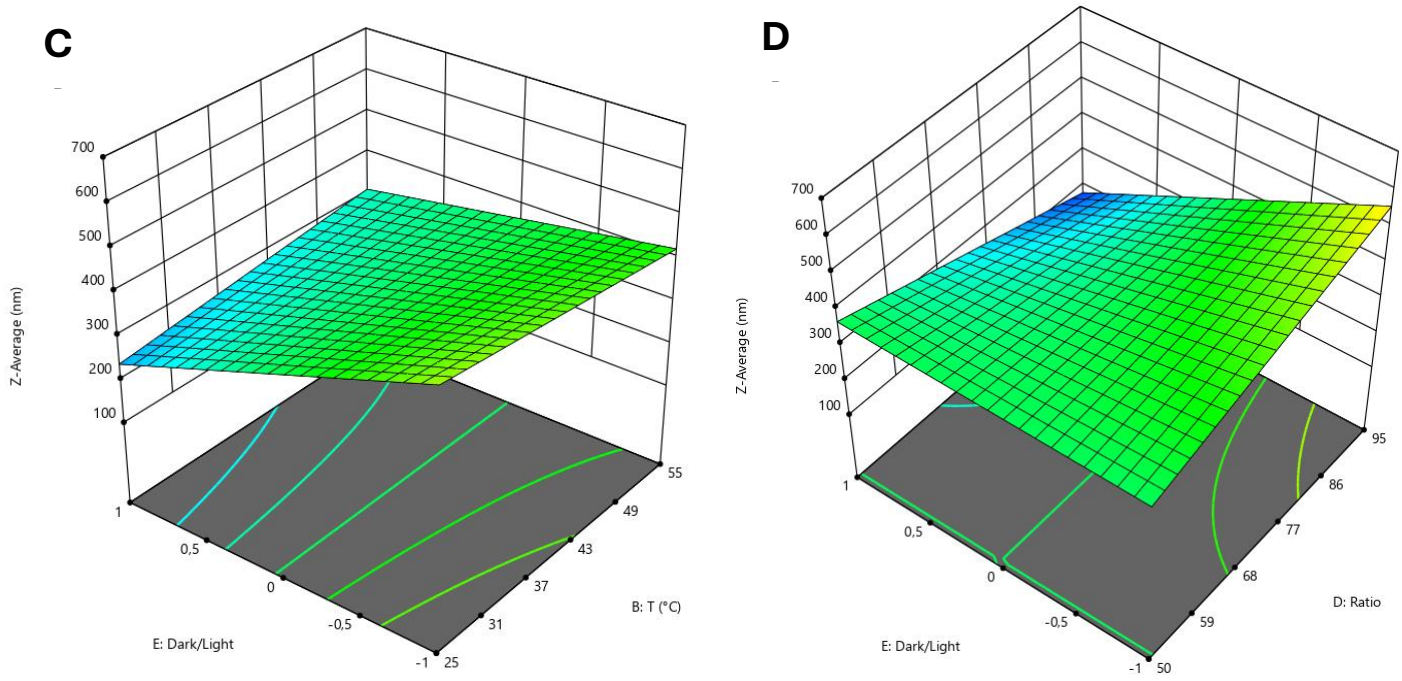
Std. Dev.	30,28	**R^2**	0,9858
Mean	368,28	**Adjusted R^2**	0,9688
C.V. %	8,22	**Predicted R^2**	0,9178
		Adeq Precision	22,5235

Το διάγραμμα προσαρμογής των πειραματικών σημείων για την υδροδυναμική διάμετρο στο αντίστοιχο μοντέλο πρόβλεψης δείχνει την ικανοποιητική προσαρμογή τους (Διάγραμμα 9). Στο Διάγραμμα 10 απεικονίζονται τα τρισδιάστατα γραφήματα επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στην υδροδυναμική διάμετρο.



Διάγραμμα 9: Προσαρμογή πραγματικών σημείων υδροδυναμικής διαμέτρου στο τροποποιημένο μοντέλο πρόβλεψης





Διάγραμμα 10: 3D διάγραμμα επίδρασης των A) C-T, B) T-Ratio, C) T-Φως/Σκοτάδι, D) Ratio-Φως/Σκοτάδι στην υδροδυναμική διάμετρο

Στο Διάγραμμα 10A φαίνεται ότι η ταυτόχρονη εφαρμογή των δύο παραγόντων στο εύρος των μελετηθέντων τιμών δεν επιδρά σημαντικά στο μέγεθος των νανοσωματιδίων. Παρόλα αυτά, γενικά το μοντέλο προβλέπει μεγέθη των 300-400nm στα εύρη της συγκέντρωσης και θερμοκρασίας που μελετώνται. Στο Διάγραμμα 10B παρατηρείται μείωση του μεγέθους, κοντά στα 300nm, για χαμηλή αναλογία σε εκχύλισμα και υψηλή θερμοκρασία και το αντίστροφο. Στο Διάγραμμα 10C παρατηρείται μείωση του μεγέθους για συνθήκες φωτός κυρίως σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τέλος, στο Διάγραμμα 10D η μέγιστη μείωση του μεγέθους στο μελετώμενο εύρος παρατηρείται για συνθήκες φωτός και για χαμηλές αναλογίες εκχυλίσματος με τιμή κοντά στα 100nm, ενώ το μέγεθος αυξάνεται για συνθήκες σκότους και χαμηλή αναλογία εκχυλίσματος (>500nm). Για υψηλή αναλογία σε εκχύλισμα, παρατηρείται ενδιάμεσο μέγεθος περίπου στα 350nm παρουσία/απουσία φωτός.

3.4.4 Δείκτης πολυδιασποράς

Η προσαρμογή των μετρήσεων του δείκτη πολυδιασποράς οδήγησε στο παρακάτω γραμμικό μοντέλο:

Δείκτης πολυδιασποράς=-0,172407 + 0,0563717 * pH + 0,00278585 * C + 0,0058933 * Ratio + 0,0951453 * Dark/Light + -0,000475327 * pH * Ratio + 0,0108539 * C * Dark/Light + -0,00260131 * Ratio * Dark/Light (Εξίσωση 14)

Κατά την στατιστική επεξεργασία απαλείφθηκαν οι μη σημαντικοί όροι ($p>0.05$) και προέκυψε το τροποποιημένο μαθηματικό μοντέλο με εξίσωση:

Δείκτης πολυδιασποράς=-0,172407 + 0,0563717 * pH + 0,0058933 * Ratio + 0,0951453 * Dark/Light + (-0,000475327) * pH * Ratio + 0,0108539 * C * Dark/Light + (-0,00260131) * Ratio * Dark/Light (Εξίσωση 15)

Η ανάλυση της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή του δείκτη πολυδιασποράς υπέδειξε ως στατιστικά σημαντικούς παράγοντες τους παράγοντες του A:pH, D: Ratio (Αναλογία $AgNO_3$/Εκχύλισμα), E: Dark/Light (Φως/Σκοτάδι) και τις αλληλεπιδράσεις AD, CE και DE σύμφωνα με τις τιμές p-value (Πίνακας 22). Οι μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στη δημιουργία του μοντέλου (Πίνακας 22) έχουν p-value μικρότερο του 0.05 επομένως αποτελούν στατιστικά σημαντικούς όρους του μοντέλου πρόβλεψης.

Ο προβλεπόμενος συντελεστής R^2 (Predicted R^2) είναι σε συμφωνία με τον διορθωμένο συντελεστή R^2 (Adjusted R^2) αφού η διαφορά τους είναι μικρότερη από 0.2. Ο διορθωμένος συντελεστής έχει υψηλή τιμή επομένως οι επιλεχθείσες ανεξάρτητες μεταβλητές συμβάλλουν στην προσαρμογή του μοντέλου. Ο προβλεπόμενος συντελεστής έχει πιο χαμηλή τιμή ωστόσο η διαφορά των δύο συντελεστών είναι εντός των επιτρεπόμενων ορίων και έτσι το μοντέλο είναι ικανό να προβλέψει τις αποκρίσεις. Η ακρίβεια Adequate Precision είναι μεγαλύτερη του 4 άρα θεωρείται πως η πρόβλεψη του μοντέλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί (Πίνακας 23).

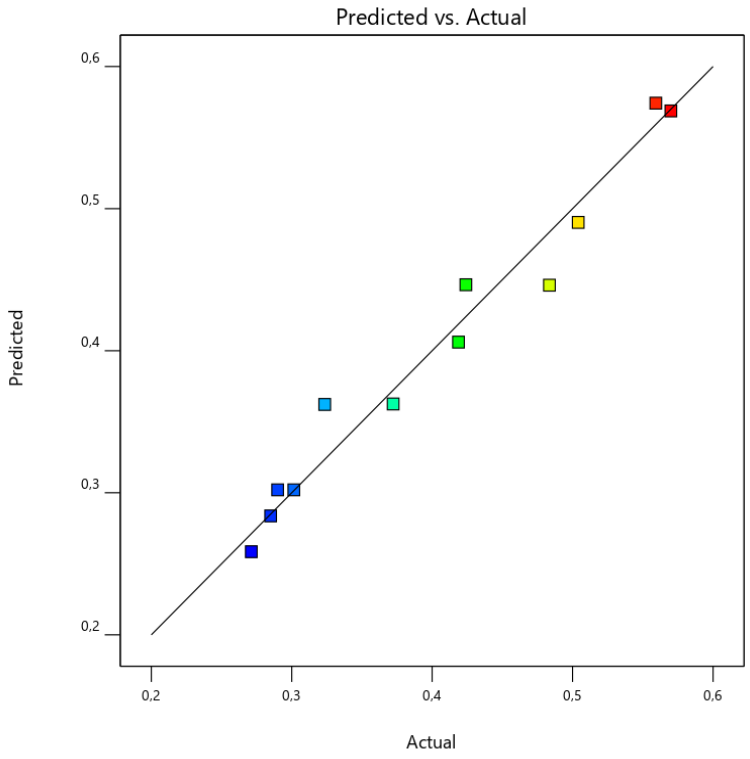
Πίνακας 22: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης του δείκτη πολυδιασποράς

Πηγή (Source)	**P-value**
Μοντέλο (Model)	0,0015
A-pH	0,0011
D-Ratio	0,0007
E-Dark/Light	0,0067
AD	0,0397
CE	0,0111
DE	0,0010

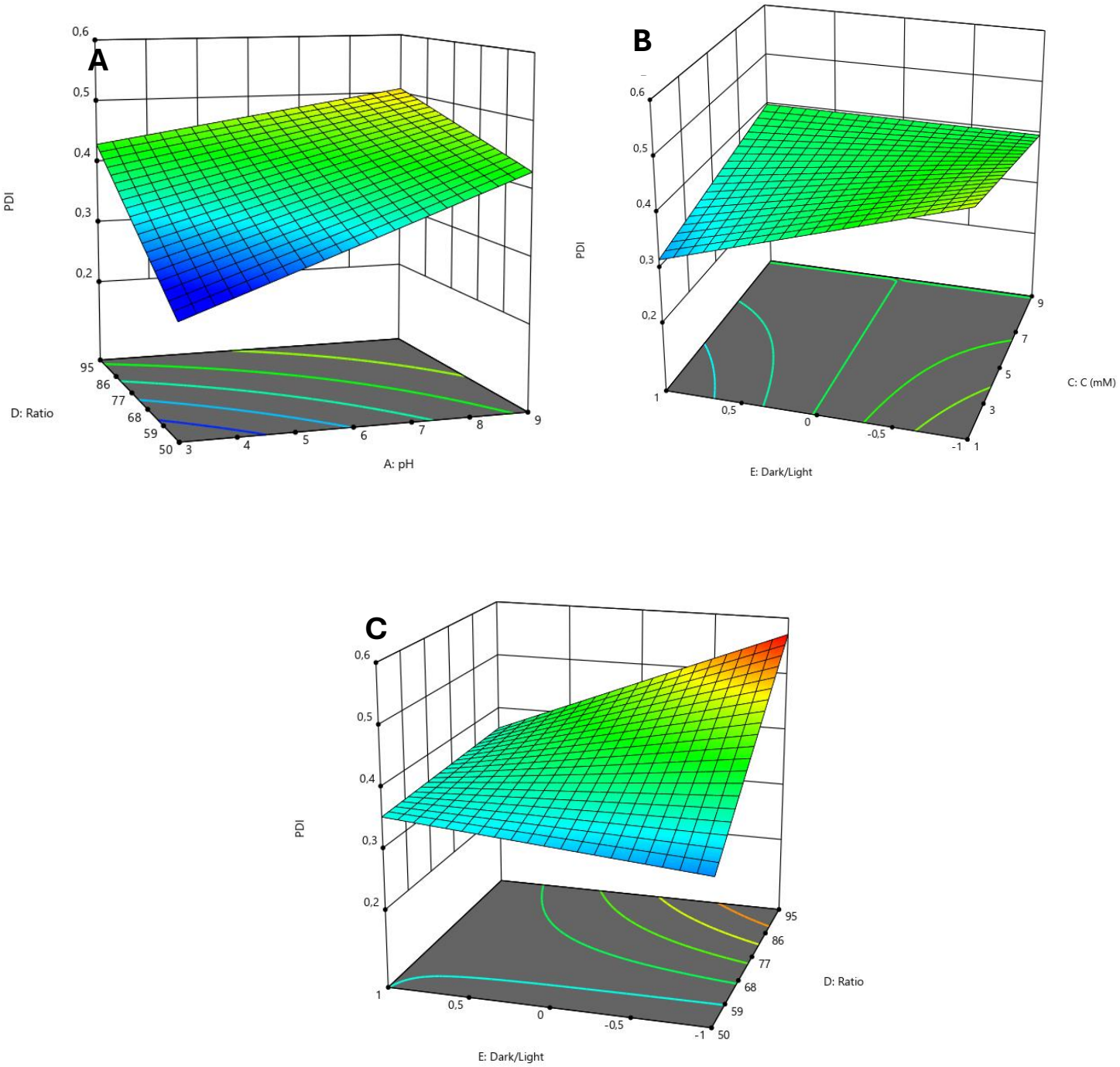
Πίνακας 23: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης του δείκτη πολυδιασποράς

Std. Dev.	0,0296	**R^2**	0,9666
Mean	0,4003	**Adjusted R^2**	0,9266
C.V. %	7,39	**Predicted R^2**	0,7993
		Adeq Precision	13,9691

Το Διάγραμμα 11 αποδεικνύει την ικανοποιητική προσαρμογή των πειραματικών σημείων του δείκτη πολυδιασποράς στην καμπύλη του μοντέλου πρόβλεψης, σε συνδυασμό με τις τιμές των συντελεστών προσαρμογής (Πίνακας 23). Ακολουθούν τα τρισδιάστατα διαγράμματα επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή του δείκτη πολυδιασποράς (Διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 11: Προσαρμογή πραγματικών σημείων δείκτη πολυδιασποράς στο μοντέλο πρόβλεψης



Διάγραμμα 12: 3D διαγράμματα επίδρασης των A) pH-Ratio, B) C-Φως/Σκοτάδι, C) Ratio-Φως/Σκοτάδι στην τιμή του δείκτη πολυδιασποράς

Στο Διάγραμμα 12A παρατηρείται μείωση του δείκτη πολυδιασποράς PDI(~0.2) για υψηλές τιμές αναλογίας εκχυλίσματος και χαμηλά pH και ενώ καταγράφεται αύξηση του δείκτη πολυδιασποράς κατά την εφαρμογή υψηλών pH και χαμηλής αναλογίας εκχυλίσματος. Στο Διάγραμμα 12B

παρατηρείται μείωση του PDI (~0,3) για συνθήκες φωτός και χαμηλή συγκέντρωση και αύξηση του (~0.5) για συνθήκες σκότους και επίσης χαμηλές συγκεντρώσεις. Τέλος, στο Διάγραμμα 12C φαίνεται αύξηση του PDI (~0.550) για συνθήκες σκότους και χαμηλή αναλογία εκχυλίσματος. Επομένως, φαίνεται πως η κατανομή του μεγέθους είναι πιο στενή για σωματίδια παραγόμενα υπό συνθήκες φωτός, χαμηλά pH και χαμηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, και σε αυτήν την περίπτωση τα διαγράμματα εμφανίζουν σαγματικό σημείο όπου εμφανίζονται ταυτόχρονα ελάχιστα και μέγιστα.

3.4.5 Απόδοση

Η προσαρμογή των μετρήσεων της απόδοσης οδήγησε στο παρακάτω γραμμικό μοντέλο:

Απόδοση=8,31487 + 9,47596 * pH + -2,18612 * C + 0,0531515 * Ratio + 0,381244 * pH * C + -0,124296 * pH * Ratio (Εξίσωση 16)

Κατά την στατιστική επεξεργασία απαλείφθηκαν οι μη σημαντικοί όροι ($p>0.05$) και προέκυψε το τροποποιημένο μαθηματικό μοντέλο με εξίσωση:

Απόδοση=8,31487 + 9,47596 * pH + 0,0531515 * Ratio + 0,381244 * pH * C + -0,124296 * pH * Ratio (Εξίσωση 17)

Η ανάλυση της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή της απόδοσης υπέδειξε ως στατιστικά σημαντικούς παράγοντες τους παράγοντες του A:pH, D: Ratio (Αναλογία $AgNO_3$/Εκχύλισμα) και τις αλληλεπιδράσεις AC και AD σύμφωνα με τις τιμές p-value (Πίνακας 24). Οι μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στη δημιουργία του μοντέλου (Πίνακας 24) έχουν p-value μικρότερο του 0.05 επομένως αποτελούν στατιστικά σημαντικούς όρους του μοντέλου πρόβλεψης.

Ο προβλεπόμενος συντελεστής R^2 (Predicted R^2) είναι σε συμφωνία με τον διορθωμένο συντελεστή R^2 (Adjusted R^2) αφού η διαφορά τους είναι μικρότερη από 0.2. Ο διορθωμένος συντελεστής έχει υψηλή τιμή επομένως οι επιλεχθείσες ανεξάρτητες μεταβλητές συμβάλλουν στην προσαρμογή του μοντέλου. Ο προβλεπόμενος συντελεστής έχει πιο χαμηλή τιμή ωστόσο η διαφορά των δύο συντελεστών είναι εντός των επιτρεπόμενων ορίων και έτσι το μοντέλο είναι ικανό να προβλέψει τις αποκρίσεις.. Η ακρίβεια Adequate Precision είναι μεγαλύτερη του 4 άρα θεωρείται πως η πρόβλεψη του μοντέλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί (Πίνακας 25).

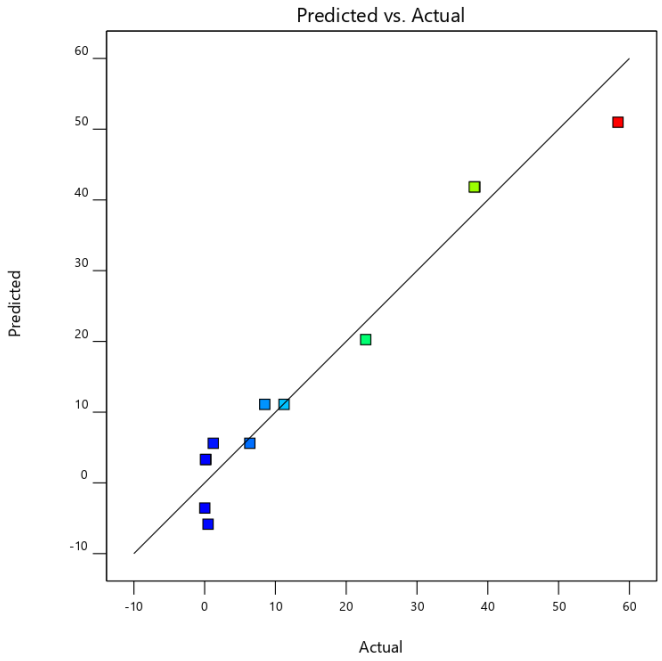
Πίνακας 24: Στατιστική σημαντικότητα ανεξάρτητων μεταβλητών και αλληλεπιδράσεων τους στο μοντέλο πρόβλεψης της απόδοσης

Πηγή (Source)	**P-value**
Μοντέλο (Model)	< 0.0001
A-pH	0,0021
D-Ratio	< 0.0001
AC	0,0235
AD	0,0009

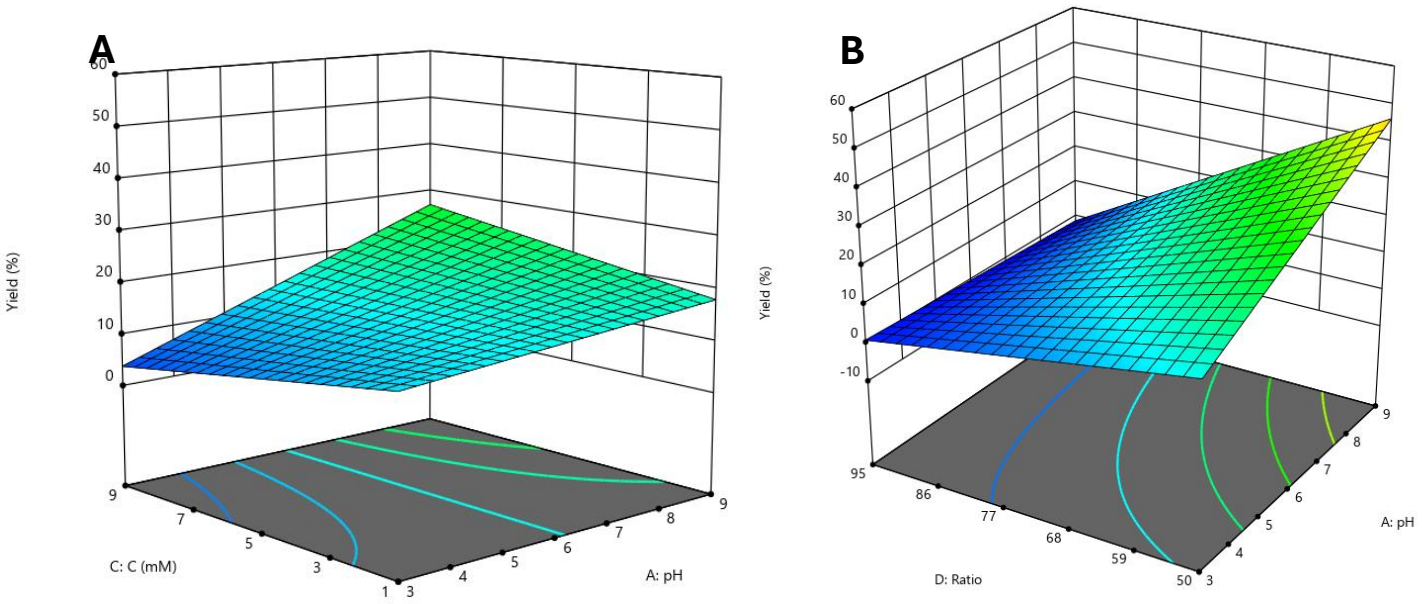
Πίνακας 25: Στατιστικά αποτελέσματα ANOVA στο μοντέλο πρόβλεψης της απόδοσης

Std. Dev.	5,18	**R^2**	0,9553
Mean	15,46	**Adjusted R^2**	0,9298
C.V. %	33,51	**Predicted R^2**	0,8467
		Adeq Precision	16,9915

Το Διάγραμμα 13 δείχνει ότι υπάρχει καλή προσαρμογή των σημείων της απόδοσης σε σχέση με την καμπύλη πρόβλεψης. Στο Διάγραμμα 14 παριστάνονται τα τρισδιάστατα γραφήματα της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή του δείκτη πολυδιασποράς.



Διάγραμμα 13: Προσαρμογή πραγματικών σημείων απόδοσης στο μοντέλο πρόβλεψης



Διάγραμμα 14: 3D διάγραμμα επίδρασης των A) pH-C, B) pH- Ratio στην απόδοση

Η ταυτόχρονη αύξηση του pH και της συγκέντρωσης του νιτρικού αργύρου οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης σύνθεσης , αντίθετα σημαντική μείωση καταγράφεται σε χαμηλά , όξινα pH και υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου (7-9mM) (Διάγραμμα 14A). Το Διάγραμμα 14B δείχνει ότι η απόδοση προσεγγίζει το μηδέν για χαμηλές αναλογίες σε εκχύλισμα και αυξάνεται σε υψηλή αναλογία εκχυλίσματος και υψηλό pH (~50%). Η συμπεριφορά αυτή όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.3.3 ίσως οφείλεται στην απουσία αρκετών βιομορίων για την αναγωγή των ιόντων αργύρου σε νανοσωματίδια με αποτέλεσμα τις πολύ χαμηλές αποδόσεις με χρήση χαμηλών αναλογίων σε εκχύλισμα.

3.4.6 Βελτιστοποίηση πειραματικού σχεδιασμού

Ύστερα από την ανάλυση των εξαρτημένων μεταβλητών ακολουθεί η βελτιστοποίηση (optimization) κατά την οποία θέτονται οι στόχοι για κάθε εξαρτώμενη μεταβλητή. Συγκεκριμένα, επιλέγεται η μεγιστοποίηση της απορρόφησης και της απόδοσης ώστε να λαμβάνονται περισσότερα νανοσωματίδια, η ελαχιστοποίηση του ζ-δυναμικού ώστε να λαμβάνονται σταθερά νανοσωματίδια, η ελαχιστοποίηση της υδροδυναμικής διαμέτρου ώστε να λαμβάνονται μικρότερα νανοσωματίδια και η ελαχιστοποίηση του δείκτη πολυδιασποράς ώστε να λαμβάνεται όσο το δυνατόν πιο ομοιογενές μείγμα νανοσωματιδίων. Οι λύσεις προκύπτουν εφαρμόζοντας τη συνάρτηση επιθυμίας Derringer [89], η οποία προσδιορίζει τα βέλτιστα επίπεδα των ανεξάρτητων μεταβλητών που οδηγούν σε ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των εξαρτημένων μεταβλητών.

Παρουσιάζονται οι βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών και οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές των εξαρτημένων μεταβλητών (Πίνακας 26).

Πίνακας 26: Βέλτιστες συνθήκες ανεξάρτητων μεταβλητών και ταυτόχρονη βελτιστοποίηση εξαρτημένων μεταβλητών (Desirability=0.749)

X1	pH	8,81
X2	Θερμοκρασία T(°C)	25
X3	Συγκέντρωση $AgNO_3$ (mM)	9
X4	Αναλογία AgNO3/Εκχύλισμα	50:50
X5	Φως/Σκοτάδι	+1
Y1	Απορρόφηση (Absorption)	0.69
Y2	Z-δυναμικό (zeta potential) (mV)	-43.9
Y3	Μέγεθος (Z-average) (d.nm)	266.7
Y4	PDI	0.484
Y5	Απόδοση (Yield) %	49.78

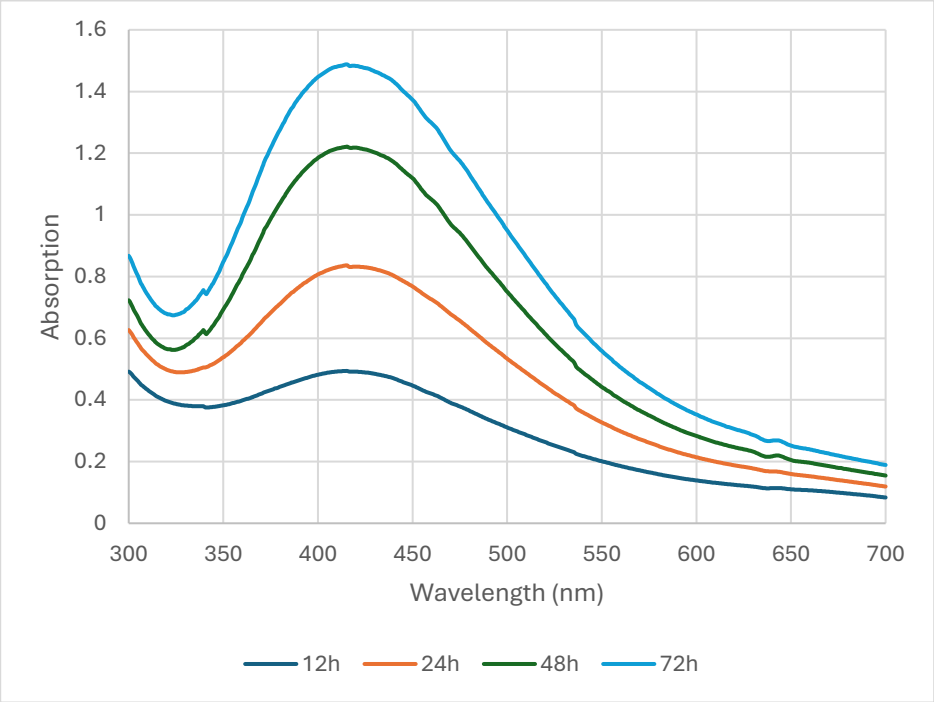
Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης του πειραματικού σχεδιασμού συμφωνούν με τη βιβλιογραφία σε ό,τι αφορά τη χρήση αλκαλικών τιμών pH [56], [82], τη θερμοκρασία δωματίου [60], την υψηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος βιομάζας [60] και την ακτινοβολία από λευκό φως [85]. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι σε αλκαλικό pH παρουσία φωτός υπήρξε έντονη χρωματική αλλαγή, εμφανής ζώνη SPR, ικανοποιητική τιμή ζ-δυναμικού και τα χαμηλότερα μεγέθη νανοσωματιδίων. Η συγκέντρωση νιτρικού αργύρου που βρέθηκε ως βέλτιστη μεταξύ των τιμών 1 και 9mM ήταν τα 9mM. Στην βιβλιογραφία προτείνονται χαμηλότερες τιμές συγκέντρωσης ώστε να προκύψουν καλύτερα χαρακτηριστικά AgNPs [60], [90].

3.5 Επίδραση χρόνου επώασης στη σύνθεση AgNPs

Τα νανοσωματίδια αργύρου που παρασκευάστηκαν με βάση το πείραμα αριθμού 8 (Πίνακας 9) εξετάζονται χρονικά λαμβάνοντας δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης. Η συνθήκη αυτή επιλέχθηκε μεταξύ των μελετηθέντων καθώς παράχθηκαν σχετικά μικρά νανοσωματίδια και η αντίδραση είχε συγκριτικά υψηλή απόδοση. Οι χρόνοι δειγματοληψίας είναι οι 12, 24, 48 και 72 ώρες μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων. Τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοσωματιδίων αργύρου εξετάζονται με τις τεχνικές UV-Vis, DLS και ICP-OES. Σκοπός είναι ο προσδιορισμός του βέλτιστου χρόνου αντίδρασης σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου.

3.5.1 Φάσμα UV-Vis

Τα φάσματα απορρόφησης των νανοσωματιδίων αργύρου των παραπάνω χρονικών διαστημάτων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 15:

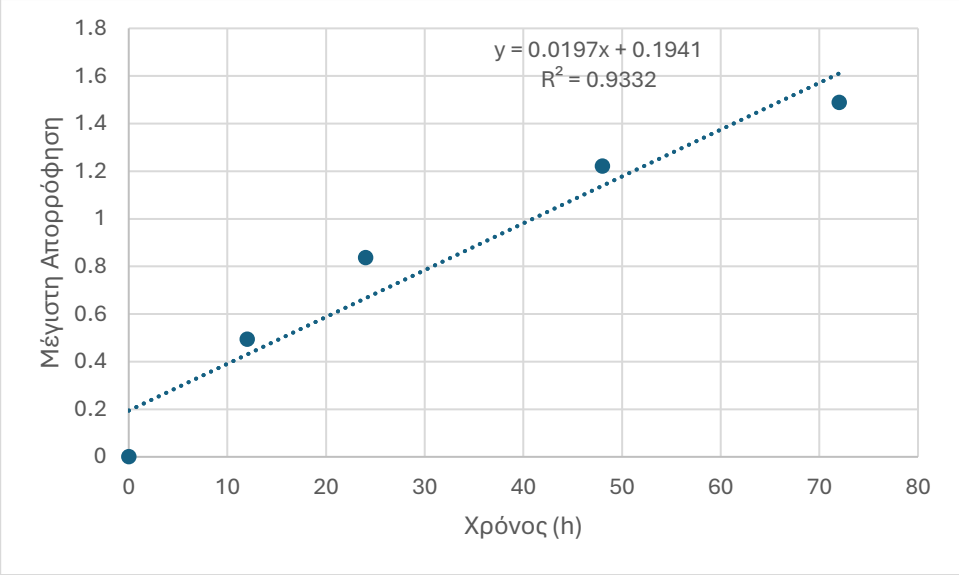


Διάγραμμα 15: Φάσματα απορρόφησης AgNPs με χρόνους αντίδρασης 12, 24, 48 και 72 ώρες

Το φάσμα απορρόφησης UV-Vis των δειγμάτων AgNPs σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επιβεβαιώνει την σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου αφού παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης των AgNPs λόγω του φαινομένου συντονισμού πλασμονίων SPR. Η χαρακτηριστική κορυφή εμφανίζεται και στις τέσσερις χρονικές στιγμές σε μήκος κύματος περίπου ίσο με λ_{max}=415 nm. Η τιμή αυτή συνάδει με τα αποτελέσματα μηκών κύματος μέγιστης απορρόφησης της φασματομετρίας UV-Vis (Πίνακας 12) στις ίδιες συνθήκες. Η κοινή τιμή μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης είναι αναμενόμενη αφού τα δείγματα προέρχονται από το ίδιο διάλυμα νανοσωματιδίων επομένως αναμένεται να έχουν κοινά χαρακτηριστικά μεγέθους και σχήματος. Η διαφορά των φασμάτων έγκειται στην ένταση της απορρόφησης των διαφορετικών δειγμάτων με αυξανόμενη απορρόφηση όσο μεγαλώνει ο χρόνος αντίδρασης. Η συμπεριφορά αυτή είναι επίσης λογική καθώς με αύξηση του χρόνου αντίδρασης δίνεται χρόνος στα αντιδραστήρια να έρθουν σε επαφή και να αντιδράσουν επομένως παράγονται περισσότερα νανοσωματίδια [41], [60]. Επίσης, υπολογίζεται ο λόγος της μέγιστης απορρόφησης προς την ελάχιστη απορρόφηση στην περιοχή της κοιλάδας (valley) των δειγμάτων AgNPs με χρόνους αντίδρασης 12, 24, 48 και 72 ώρες, και λαμβάνει τιμές 1.32, 1.71, 2.17 και 2.21 αντίστοιχα. Οι μετρήσεις υποδεικνύουν η αύξηση του χρόνου αντίδρασης οδηγεί σε φάσματα απορρόφησης με

πιο στενές κορυφές. Η διαφορά στους λόγους αυτούς μεταξύ των 48 και 72 ωρών είναι μικρή. Επιπλέον, πιο στενή κατανομή αντιστοιχεί σε νανοσωματίδια μικρότερου μεγέθους [82].

Από τα πειραματικά δεδομένα απορρόφησης των δειγμάτων AgNPs σε χρόνους 12, 24, 48 και 72 ώρες κατασκευάζεται το Διάγραμμα 16. Τα πειραματικά σημεία προσαρμόζονται σε γραμμή τάσης με εξίσωση y = 0.0197x + 0.1941 και συντελεστή προσαρμογής R^2 = 0.9332. Ο υψηλός συντελεστής προσαρμογής σημαίνει ικανοποιητική προσαρμογή των δεδομένων στο γραμμικό μοντέλο. Από την κλίση της ευθείας προσδιορίζεται η μέση ταχύτητα με την οποία μεταβάλλεται η μέγιστη απορρόφηση των δειγμάτων AgNPs σε συνάρτηση με το χρόνο που μελετάται. Η μέση ταχύτητα είναι ίση με 0.0197 ΔA/h.



Διάγραμμα 16: Μέγιστη απορρόφηση συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης

3.5.2 DLS

Τα αποτελέσματα της τεχνικής DLS παρουσιάζονται συγκεντρωτικά παρακάτω (Πίνακας 27).

Πίνακας 27: Αποτελέσματα επίδρασης χρόνου αντίδρασης στον δείκτη πολυδιασποράς, την υδροδυναμική διάμετρο και το ζ-δυναμικό των AgNPs

Χρόνος αντίδρασης(h)	Δείκτης πολυδιασποράς(PDI)	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Z-δυναμικό(mV)
12	0.398±0.013	206.9±10.5	-44.4±0.1
24	0.307±0.023	154.1±9.0	-42.425±1.8
48	0.404±0.028	152.8±1.8	-36.725±2.9
72	0.374±0.022	133.6±7.2	-36.15±1.5

Ο δείκτης πολυδιασποράς παρουσιάζει διακυμάνσεις αυξανομένου του χρόνου αντίδρασης και λαμβάνει τιμές στο εύρος 0.307-0.404. Δεν παρατηρείται κάποια τάση ανάλογα με τον χρόνο αντίδρασης αλλά ο χρόνος στον οποίο λαμβάνονται τα πιο ομοιόμορφα σωματίδια είναι οι 24 ώρες. Η υδροδυναμική διάμετρος παρουσιάζει μείωση με αύξηση του χρόνου αντίδρασης μέχρι τις 72 ώρες φτάνοντας μέχρι μέγεθος 133.6±7.2 nm. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα φάσματα UV-Vis όπου με αύξηση του χρόνου αντίδρασης λήφθηκαν κορυφές με πιο στενή κατανομή. Το ζ-δυναμικό παρουσιάζει μείωση κατά απόλυτη τιμή όμως παραμένει σε τιμές μεγαλύτερες του 30mV επομένως τα παραγόμενα νανοσωματίδια αργύρου χαρακτηρίζονται σταθερά. Η μέγιστη τιμή ζ-δυναμικού κατά απόλυτη τιμή παρατηρείται στις 12 ώρες και είναι ίση με -44.4±0.1 mV. Η τιμή αυτή δεν απέχει σημαντικά από αυτήν που λαμβάνεται για τις 24 ώρες αντίδρασης η οποία είναι -42.425±1.8 mV.

3.5.3 ICP-OES

Η συγκέντρωση των παραγόμενων νανοσωματιδίων προσδιορίζεται μέσω της τεχνικής ICP-OES όπως παρουσιάστηκε στην παράγραφο 2.8.3. Η εξίσωση καμπύλης αναφοράς είναι y = 2E-06x - 0.0015 (Εξίσωση 18) με συντελεστή προσαρμογής R^2=0.9999. Με χρήση της εξίσωσης 18 υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων AgNPs άγνωστης συγκέντρωσης βάση των απορροφήσεων τους. Τα δείγματα που μετρούνται έχουν συντεθεί με βάση τις συνθήκες του πειράματος αριθμού 8 (Πίνακας 9). Επομένως, υπολογίζεται η απόδοση των πειραμάτων με τη βοήθεια της εξίσωσης 7 της παραγράφου 3.3.3(Πίνακας 28).

Πίνακας 28: Απόδοση σχηματισμού AgNPs για χρόνους αντίδρασης 12, 24, 48 και 72 ώρες

Χρόνος(h)	**Συγκέντρωση Ag (mg/L)**	**Απόδοση%**
12	0.4±0.02	40.3±1.6
24	0.7±0.04	64.1±3.3
48	0.9±0.03	79.5±2.9
72	1.0±0.01	91.0±0.6

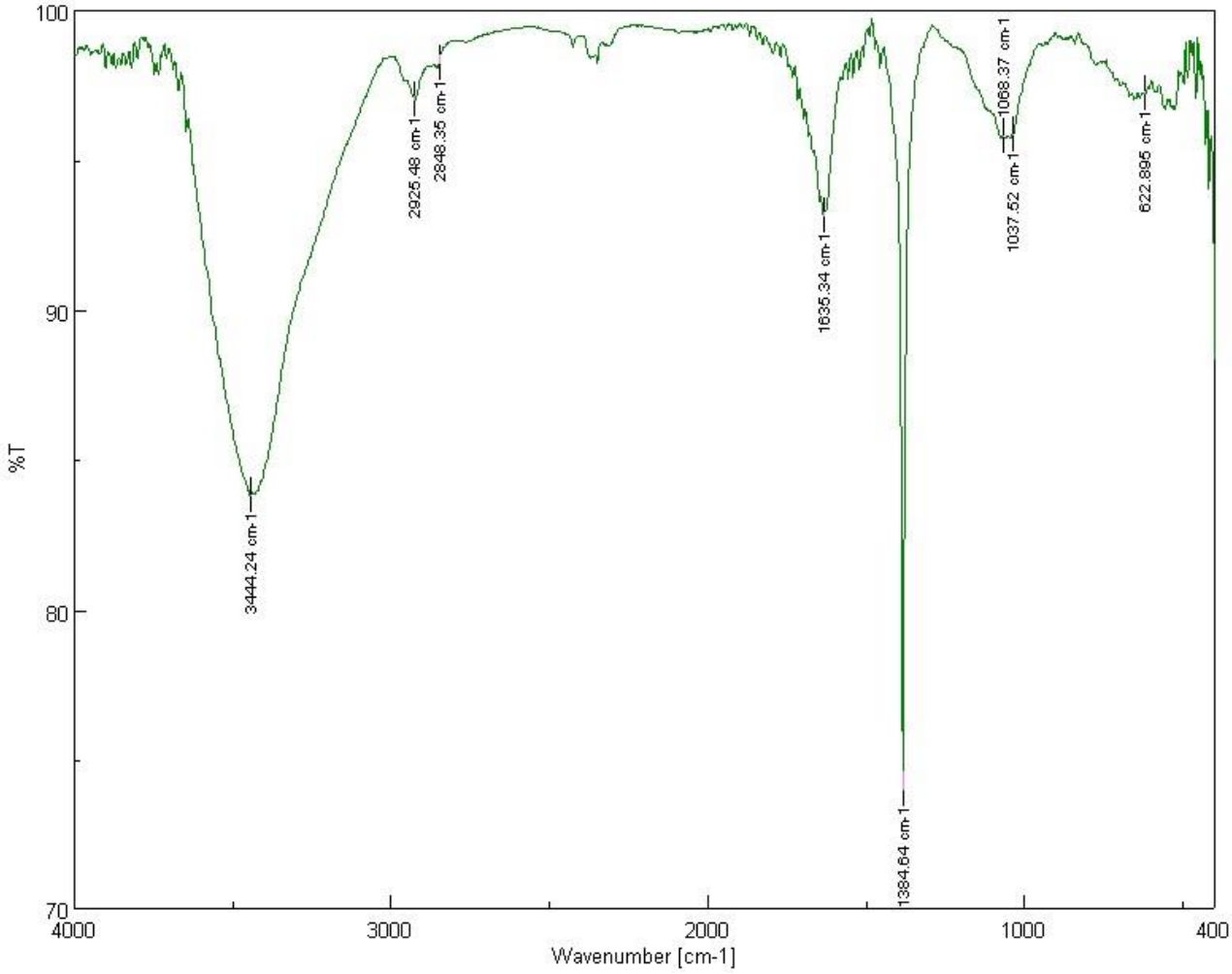
Παρατηρείται ότι με την πάροδο του χρόνου η απόδοση του πειράματος αυξάνεται δηλαδή παράγονται περισσότερα νανοσωματίδια. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο αφού δίνοντας περισσότερο χρόνο στο σύστημα, επιτρέπεται η συνέχιση της αντίδρασης μεταξύ των βιοδραστικών ενώσεων του εκχυλίσματος και των ιόντων αργύρου [41]. Τα αποτελέσματα συνάδουν με αυτά της φασματομετρίας UV-Vis επιβεβαιώνοντας την σύνθεση νανοσωματιδίων. Η απόδοση του πειράματος έχει αποκτήσει μία υψηλή τιμή άνω του 60% ήδη στις 24h και αυξάνεται σημαντικά κατά τις χρονικές στιγμές των 48 και 72 ωρών, όπου μάλιστα στις 72 ώρες λαμβάνει τιμή απόδοσης άνω του 90%. Έτσι, θεωρείται πως στο χρονικό σημείο των 72 ωρών έχει προσεγγιστεί σχεδόν μέγιστη μετατροπή της πρόδρομης ένωσης αργύρου σε νανοσωματίδια. Η επαναληψιμότητα των πειραμάτων επιβεβαιώνει την αξιοπιστία των μετρήσεων.

Με βάση τις παραπάνω μετρήσεις διαπιστώνεται ότι τα νανοσωματίδια αργύρου με τα καλύτερα χαρακτηριστικά λήφθηκαν σε χρόνο 72 ώρες, καθώς σε αυτόν το χρόνο εντοπίστηκαν τα μικρότερα και περισσότερα νανοσωματίδια σύμφωνα με το φάσμα απορρόφησης και την υπολογιζόμενη απόδοση. Επιπλέον, με βάση τις μετρήσεις για το ζ-δυναμικό θεωρείται ότι τα παραγόμενα AgNPs είναι σταθερά (-36.15±1.5mV). Ο δείκτης πολυδιασποράς του δείγματος των 72 ωρών ήταν ίσος με 0.374±0.022.

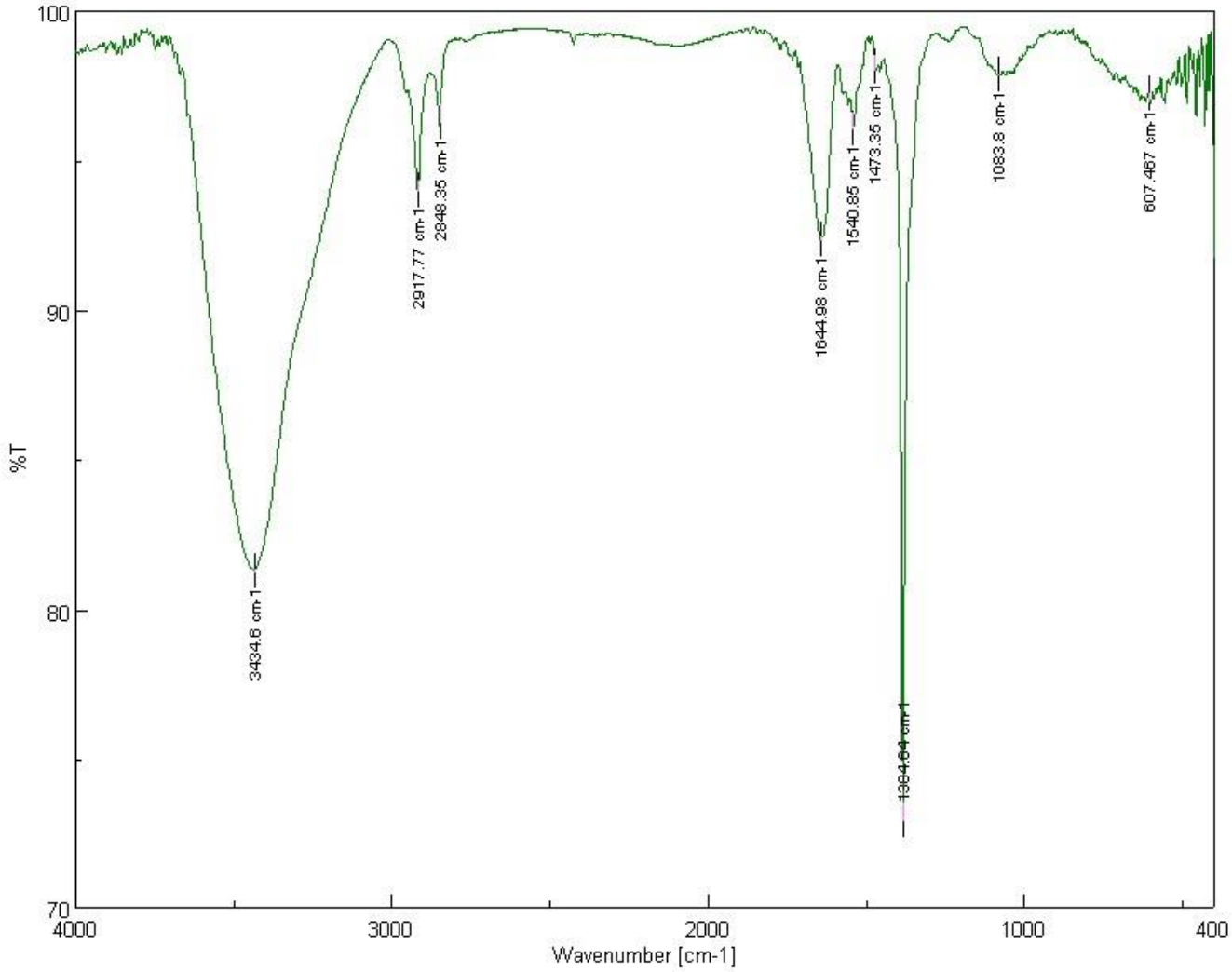
3.6 Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Τα φάσματα απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας δείγματος εκχυλίσματος και δείγματος συντεθειμένων νανοσωματιδίων αργύρου παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 20 και Εικόνα 21). Η τεχνική έχει στόχο να προσδιορίσει το είδος των βιομορίων του εκχυλίσματος που εμπλέκονται στο σχηματισμό των AgNPs σχηματίζοντας δεσμούς με αυτά και σταθεροποιώντας τα [67], [91].
Οι μεγαλύτερης έντασης κορυφές που εντοπίζονται στο φάσμα του εκχυλίσματος είναι μία πλατιά κορυφή στα 3444 cm^{-1}, μία στα 1635, μία οξεία στα 1384 και πιο μικρής έντασης στα 2925, 2848 και στο εύρος 1068-1037 cm^{-1}.
Το φάσμα των νανοσωματιδίων αργύρου εμφανίζει επίσης τις κορυφές σε κυματαριθμούς 3434, 1644, 1540, 1384, 2917, 2848, 1083 cm^{-1}.
Οι κορυφές στα 3444 και 3434 cm^{-1} είναι πολύ έντονες και πλατιές και φαίνεται πως πρόκειται για κάποια βασική λειτουργική ομάδα του εκχυλίσματος που επιδρά στη σύνθεση των AgNPs και την επικάλυψή τους. Ο κυματαριθμός αυτός οφείλεται στις δονήσεις τάσης της πρωτοταγούς αμίνης N-H που εντοπίζονται σε αμινοξέα [75] και του υδροξυλίου O-H που περιέχεται σε αλκοόλες και φαινόλες [24], [60] και στο νερό [92]. Οι κορυφές στα 2925 και 2917 cm^{-1} και 2848 cm^{-1} οφείλονται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-H που μπορεί να προέρχεται από πολυσακχαρίτες και υδατάνθρακες του εκχυλίσματος [93] καθώς και γενικά τα αλειφατικά τμήματα των βιομορίων [91], λιπιδίων και πρωτεϊνών [92]. Οι κορυφές στα 1635 και 1644 cm^{-1} υποδεικνύουν την ύπαρξη πρωτεϊνών αφού στους κυματαριθμούς αυτούς παρατηρούνται δονητικές τάσεις του καρβονυλίου -C=O και του αμιδίου II (-N-H) [24], [75], [92]. Η οξεία και υψηλής έντασης κορυφή στα 1384cm^{-1}

οφείλεται στις δονήσεις κάμψης του δεσμού αλκανίων C-H [70]. Η πλατιά και μικρή κορυφή στα 1083cm^{-1} στο δείγμα των AgNPs προέρχεται από τις δονήσεις τάσης της ομάδας C-O. Η ίδια κορυφή μεγαλύτερης έντασης αλλά επίσης πλατιά στο δείγμα του εκχυλίσματος εντοπίζεται περίπου στα 1068 cm^{-1} και μάλλον πρόκειται για την ίδια ομάδα C-O που περιέχεται σε αλκοόλες [70]. Το δείγμα νανοσωματιδίων αργύρου εμφανίζει μια επιπλέον κορυφή μικρής έντασης στα 1540 cm^{-1} η οποία οφείλεται στην ομάδα C-N δευτεροταγούς αμιδίου και άρα να προέρχεται από πρωτεΐνη [91]. Επιπλέον παρατηρείται ότι ορισμένες κορυφές αν και κοινές, εμφανίζουν μεγαλύτερη ένταση στο δείγμα των νανοσωματιδίων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην απόδοση ζεύγους ηλεκτρονίου από την υδροξυλομάδα στο άτομο του αργύρου οδηγώντας σε αυξημένη ηλεκτραρνητικότητα και πιο έντονα πολικό δεσμό [91]. Επιπλέον, η μετακίνηση των κορυφών μεταξύ των δύο δειγμάτων μπορεί να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις ηλεκτρονίων μεταξύ των ιόντων αργύρου και των ομάδων που περιέχουν άζωτο και οξυγόνο [94]. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση και το ρόλο βιομορίων στη σύνθεση AgNPs θεωρώντας ως βασικά βιομόρια τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες, τα λιπίδια, τις φαινόλες και τις αλκοόλες.



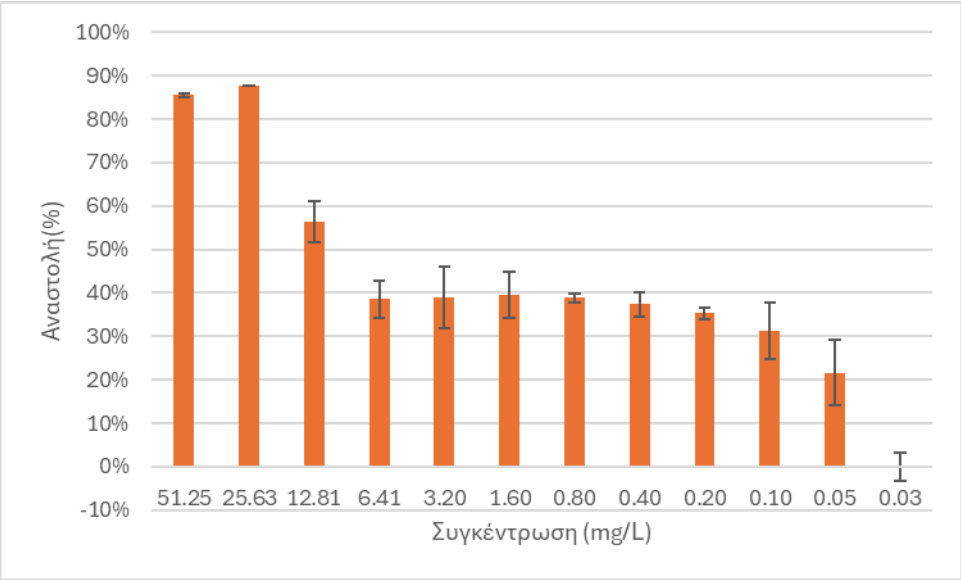
Εικόνα 20: Φάσμα FTIR κυτταρικού εκχυλίσματος



Εικόνα 21: Φάσμα FTIR νανοσωματιδίων αργύρου

3.7 Αντιβακτηριακές ιδιότητες Νανοσωματιδίων αργύρου

Τα αποτελέσματα της μεθόδου MIC για τον προσδιορισμό των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων των AgNPs, παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 17. Σε αυτό, παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου *E. Coli* συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς (growth control), χρησιμοποιώντας την εξίσωση 6 της παραγράφου 2.9.1.



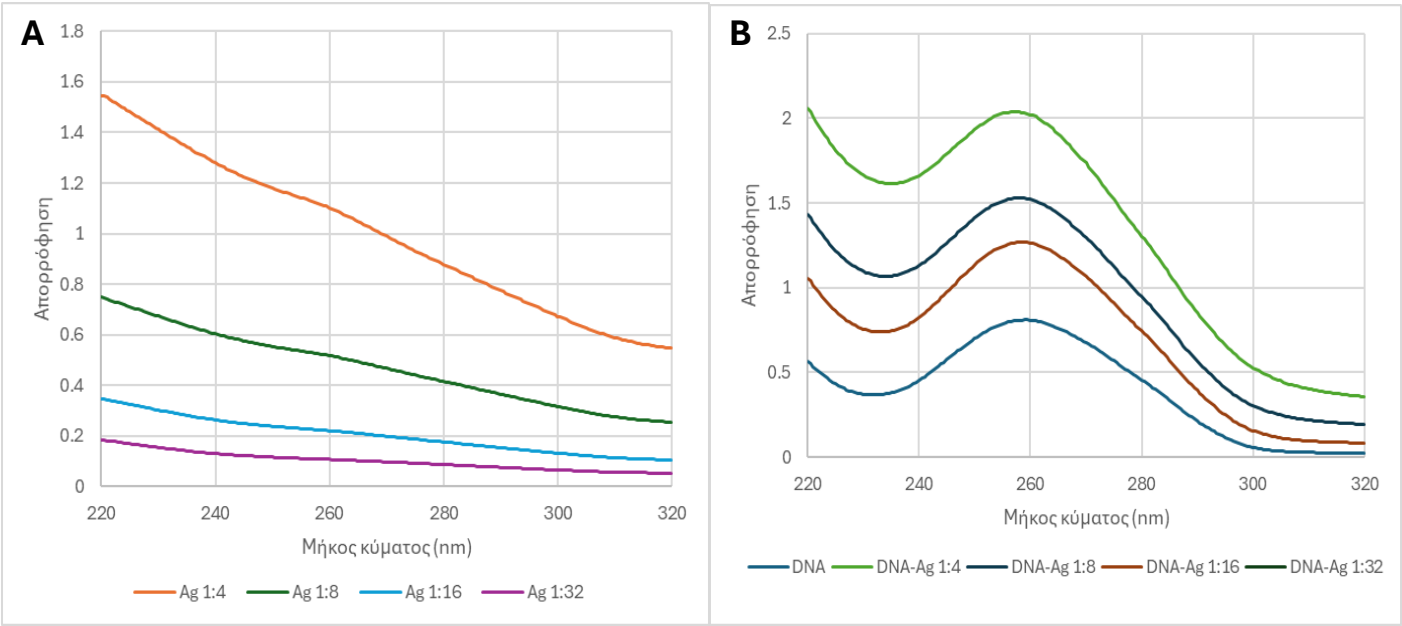
Διάγραμμα 17: Γραφική αναπαράσταση αναστολής ανάπτυξης του *E. Coli* για διαφορετικές συγκεντρώσεις AgNPs.

Με βάση τα αποτελέσματα για την αναστολή της ανάπτυξης του *E.Coli* με χρήση AgNPs ως αντιβακτηριακό παράγοντα, παρατηρείται ότι πράγματι τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Οι πρώτες 2 θέσεις με συγκεντρώσεις 51.25 και 25.63 mg/L προκαλούν υψηλή αναστολή του βακτηρίου με ποσοστό αναστολής 85 και 88%. Η μεγαλύτερη αναστολή που υπολογίζεται για την μικρότερη συγκέντρωση μεταξύ των δύο δεν θεωρείται σημαντική ως διαφορά και μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα κατά την πειραματική διαδικασία. Πρακτικά φαίνεται πως και οι δύο συγκεντρώσεις επιφέρουν στον ίδιο βαθμό αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου. Τα AgNPs με τιμή συγκέντρωσης 12.81mg/L επιφέρουν επίσης αξιοσημείωτη αναστολή της ανάπτυξης του *E. Coli* μειώνοντας την στο μισό. Στη συνέχεια οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις μέχρι την τιμή 0.20mg/L φαίνεται πως οδηγούν σε παρόμοια παρεμπόδιση με ποσοστά αναστολής στο εύρος 35-39%. Οι δύο επόμενες συγκεντρώσεις (0.10, 0.05mg/L) προκαλούν αναστολή με ποσοστά 22-31%. Η τελευταία τιμή συγκέντρωσης 0,03mg/L δεν προκαλεί καμία παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του *E. Coli*. Στην περίπτωση αυτή δεν μπορεί να γίνει προσδιορισμός του MIC αφού δεν προκλήθηκε πλήρης αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού επομένως θεωρείται πως MIC>51.25 mg/L. [77]

Συγκριτικά, έρευνα έδειξε ότι η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *E.Coli* με χρήση AgNPs είναι περιορισμένη στις συγκεντρώσεις αυτές, με MIC μεγαλύτερο του 100mg/L, το οποίο είναι μεγαλύτερο των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν [75]. Επίσης, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες επηρεάζονται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων, με τα μικρότερα να έχουν καλύτερες πιθανότητες να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων [95]. Επομένως, αναμένεται ενισχυμένη αναστολή της ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων για μικρού μεγέθους AgNPs.

3.8 Αλληλεπίδραση DNA-AgNPs

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των νανοσωματιδίων αργύρου και του DNA θύμου μόσχου (ctDNA), πραγματοποιήθηκε φασματομετρική μέθοδος στο φάσμα 220-320nm. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαλύματα νανοσωματιδίων αργύρου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 18Α), μίγμα διαλυμάτων ctDNA και AgNPs (Διάγραμμα 18Β) και τέλος δείγματος ctDNA (Διάγραμμα 18Β). Οι τελικές συγκεντρώσεις των AgNPs στα τυφλά και στα μίγματα με ctDNA διαλύματα ήταν (51.25, 25.63, 12.81, 6.41) mg/L. Το διάλυμα ctDNA χρησιμοποιήθηκε ώστε να βρεθεί η ένταση απορρόφησης του μορίου ctDNA στο εύρος αυτό, με χαρακτηριστική τιμή μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης του DNA, τα 260nm.



Διάγραμμα 18: Φάσμα απορρόφησης UV Α) διαλυμάτων AgNPs και Β) διαλυμάτων ctDNA-AgNPs διαδοχικών αραιώσεων ως προς AgNPs και διαλύματος καθαρού ctDNA.

Παρατηρείται ότι η ένταση απορρόφησης των διαλυμάτων ctDNA από μηδενικής συγκέντρωσης σε AgNPs (Διάλυμα ctDNA) έως το πιο πυκνό διάλυμα σε AgNPs (DNA-Ag 1:4) αυξάνεται, χωρίς κάποια μεταβολή στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (λ_{max}). Η μεταβολή στην ένταση της απορρόφησης ακτινοβολίας, είτε θετική είτε αρνητική σε σχέση με το καθαρό διάλυμα ctDNA, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα δύο μόρια, ctDNA και AgNPs αλληλεπιδρούν. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου ctDNA και αυτό γίνεται φανερό φασματομετρικά μέσω του υπερχρωμισμού (αύξηση στην απορρόφηση) είτε του υποχρωμισμού (μείωση στην απορρόφηση). Ο υπερχρωμισμός προκαλείται όταν η δευτεροταγής δομή του DNA υποστεί ρήξη ενώ ο υποχρωμισμός παρατηρείται όταν το μόριο που αλληλεπιδρά με το DNA δρα

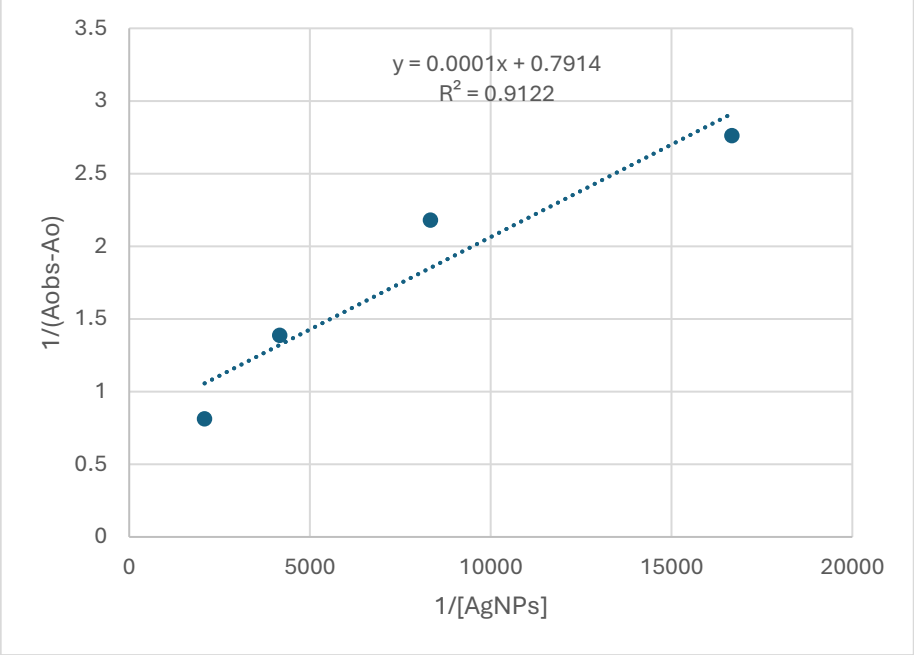
ως παράγοντας παρεμβολής σε αυτό. Στην προκειμένη περίπτωση, λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του υπερχρωμισμού. Η αύξηση στην απορρόφηση μπορεί να οφείλεται στο ξεδίπλωμα μέρους του ctDNA και την έκθεση μονάδων πουρινών και πυριμιδινών οδηγώντας σε ενίσχυση της απορρόφησης ακτινοβολίας. Επίσης, είναι πιθανή η δέσμευση των AgNPs σε αύλακα του μορίου ctDNA (groove binding), δηλαδή αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με την αλυσίδα του DNA κατά μήκος αυτής. Άλλη θεωρία αφορά στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των AgNPs με τις φωσφορικές ομάδες του ctDNA, όμως στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν λαμβάνει χώρα αυτό το φαινόμενο αφού τα παραγόμενα νανοσωματίδια έχουν αρνητικό φορτίο όπως και οι φωσφορικές ομάδες του DNA. [78]

Η αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης σε νανοσωματίδια αργύρου υποδεικνύει ότι μεγαλύτερη ποσότητα σε νανοσωματίδια οδηγεί σε όλο και μεγαλύτερη πρόσδεση μεταξύ ctDNA και AgNPs. Επομένως, λογική υπόθεση είναι ότι η έκθεση σε μεγαλύτερη συγκέντρωση AgNPs μπορεί να προκαλέσει μεγαλύτερη αλλοίωση του ctDNA. Τα αποτελέσματα δείχνουν την ικανότητα των παραγόμενων νανοσωματιδίων αργύρου μέσω εκχυλίσματος του *Stichococcus sp.* , να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές της κυτταρικής Βιολογίας.

Η εξίσωση των Benesi και Hilderbrand [78] επιτρέπει τον υπολογισμό της σταθεράς συγγένειας K_{app} που προσδιορίζει το είδος της αλληλεπίδρασης μεταξύ DNA και άλλων μορίων όπως είναι τα νανοσωματίδια αργύρου. Η μέθοδος βασίζεται στην επίλυση της εξίσωσης:

$$A_{obs} - A_o = A_c - A_o + K_{app}(A_c - A_o)[AgNPs]$$ (Εξίσωση 19),

όπου A_{obs} η μέγιστη απορρόφηση για κάθε διάλυμα ctDNA-AgNPs, A_o η μέγιστη απορρόφηση του διαλύματος ctDNA, A_c η απορρόφηση του διαλύματος μέγιστης συγκέντρωσης σε AgNPs και [AgNPs] η συγκέντρωση των διαλυμάτων σε AgNPs (mol/L). Ως y ορίζεται ο λόγος $1/(A_{obs}-A_o)$ και ως x ο λόγος 1/[AgNPs]. Κατασκευάζεται διάγραμμα των σημείων x και y και προσαρμόζεται γραμμή τάσης (Διάγραμμα 19).



Διάγραμμα 19: Προσαρμογή δεδομένων εξίσωσης Benesi-Hilderbrand για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_{app}

Η κλίση της ευθείας αναπαριστά το λόγο $1/(K_{app}(A_c-A_o))$ ενώ η αποτέμνουσα το λόγο $1/(A_c-A_o)$. Η γραμμή τάσης εξίσωσης y = 0.0001x + 0.7914 (Εξίσωση 20) με συντελεστή προσαρμογής R^2 = 0.9122 προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα δεδομένα. Η κλίση και αποτέμνουσα οδηγούν στον προσδιορισμό της σταθεράς K_{app} η οποία βρίσκεται ίση με 12635 L/mol. Η τιμή αυτή είναι συγκρίσιμη με αυτές της βιβλιογραφίας για τα AgNPs και υποδεικνύει αλληλεπίδραση τύπου groove binding, δηλαδή δέσμευση στην αύλακα του ctDNA. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα νανοσωματιδίων μπορεί να οφείλεται στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων καθώς είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση με τα βιομόρια εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και τη χημεία της επιφάνειας των νανοσωματιδίων [78].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συμπεράσματα

4.1 Γενικά συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ικανότητα πράσινης σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) με χρήση εκχυλίσματος βιομάζας από το μικροφύκος *Stichococcus sp*. Στόχος της μελέτης υπήρξε ο προσδιορισμός της επίδρασης των παραγόντων σύνθεσης των AgNPs και η προσπάθεια μοντελοποίησης τους μέσω πειραματικού σχεδιασμού τύπου Plackett-Burman με χρήση του λογισμικού Design-Expert 12. Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα των AgNPs ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση και την αλληλεπίδραση τους με το DNA. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση των AgNPs και μελετήθηκαν ήταν το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση νιτρικού αργύρου του τελικού διαλύματος, η αναλογία νιτρικού αργύρου προς εκχύλισμα και η ακτινοβόληση από λευκό φως (έντασης 80 $\mu mol \cdot m{-}2 \cdot s$ −1 με φωτοπερίοδο 24 h συνεχή φωτισμό) ή υπό συνθήκες σκότους. Η σύνθεση των AgNPs επιβεβαιώθηκε αρχικά από τη χρωματική αλλαγή των διαλυμάτων από υποκίτρινο σε χάλκινο χρώμα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε μέσω της φασματομετρίας UV-Vis, μέσω της οποίας εξάγονται συμπεράσματα σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοσωματιδίων όπως το μέγεθος, το σχήμα και την ύπαρξη συσσωματωμάτων. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους, της κατανομής του μεγέθους και της σταθερότητας των νανοσωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Η συγκέντρωση αργύρου στα τελικά διαλύματα AgNPs προσδιορίστηκε μέσω της φασματοσκοπίας εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος Αργού (ICP-OES). Τέλος, μελετήθηκε η σύνθεση των AgNPs χρονικά, λαμβάνοντας δείγματα σε χρόνους αντίδρασης 12, 24, 48 και 72 ώρες και προσδιορίζοντας τα χαρακτηριστικά των AgNPs με τις μεθόδους UV-Vis, DLS και ICP-OES. Το είδος των βιομορίων που συμμετέχουν στο σχηματισμό των AgNPs και τα επικαλύπτουν, προσδιορίστηκε μέσω φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Η αντιμικροβιακή δράση των AgNPs μελετήθηκε μέσω της μεθόδου μικροαραίωσης σε μικροπλάκα (Broth microdilution) ώστε να προσδιοριστεί το ποσοστό αναστολής ανάπτυξης του βακτηρίου *E. Coli*. Η αλληλεπίδραση των AgNPs με το ctDNA προσδιορίστηκε μέσω φασματομετρίας διαλυμάτων ctDNA και AgNPs διαφορετικών συγκεντρώσεων και σύγκριση με φάσμα καθαρού ctDNA.

Το pH του διαλύματος έχει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση AgNPs, επηρεάζοντας το μέγεθος και το σχήμα τους. Το pH επιδρά στο φορτίο των βιομορίων του εκχυλίσματος τα οποία λειτουργούν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες κατά τη σύνθεση AgNPs. Σε διαφορετικές τιμές pH η ικανότητα των βιομορίων να ανάγουν τα ιόντα αργύρου και να προσδένονται στα AgNPs μεταβάλλεται. Σε υψηλά pH επιταχύνεται η διαδικασία της αναγωγής γεγονός που πιθανόν οφείλεται στις ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων βιομορίων με τα θετικά ιόντα αργύρου. Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιβεβαιώθηκε ότι η χρήση αλκαλικών τιμών pH (9.0) ευνοεί το σχηματισμό νανοσωματιδίων αργύρου. Η χαρακτηριστική ζώνη για τα AgNPs SPR εμφανίστηκε σε συνθήκες σύνθεσης υψηλών pH, αντίθετα η εφαρμογή όξινων pH οδήγησε σε πεπλατυσμένες κορυφές στο UV-Vis ή και πλήρη απουσία τους, δηλαδή με

συσσωματώματα ή και μη σύνθεσή τους. Επιπλέον, εφαρμογή υψηλών pH οδήγησε σε μικρότερα μεγέθη με τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου 148,47nm, 181,65nm και 195,9nm (συνθήκες 4,8,12). Ο δείκτης πολυδιασποράς αντίθετα παρουσίασε τιμές στο εύρος 0.3-0.48.

Η ακτινοβολία κατά τη διάρκεια του πειράματος επίσης έχει καθοριστικό ρόλο για τη σύνθεση των AgNPs, προωθώντας την διέγερση των βιομορίων και την πραγματοποίηση φωτοχημικών αντιδράσεων. Ως αποτέλεσμα αυξάνεται ο ρυθμός των αντιδράσεων αναγωγής των ιόντων αργύρου. Επομένως, σε αυτή την περίπτωση, εκτός του αλκαλικού pH, θετική συνεισφορά στη σύνθεση νανοσωματιδίων έχει η παρουσία φωτός (συνθήκες 4,8,12). Αντίθετα, κατά τα πειράματα που διεξήχθηκαν απουσία φωτός αλλά και σε όξινο pH (2,6,9) δεν υπήρξε σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (απουσία ζώνης SPR). Σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρήθηκαν μεγάλα μεγέθη σωματιδίων αργύρου, στο εύρος 358-678 nm, επομένως επιβεβαιώνεται η παρουσία συσσωματωμάτων. Επίσης, η συσσωμάτωση επιβεβαιώνεται και από τις υψηλές τιμές δείκτη πολυδιασποράς που φτάνουν περίπου μέχρι 0.6.

Παρουσία μόνο του ενός παράγοντα που ευνοεί τη σύνθεση, δηλαδή χρήση αλκαλικού pH απουσία φωτισμού ή όξινο pH παρουσία φωτισμού, επιτυγχάνεται σχηματισμός AgNPs με χαρακτηριστικά που επιδέχονται βελτίωση. Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού παρουσιάζουν πεπλατυσμένες κορυφές και αυξημένα μεγέθη στο εύρος 239-457nm. Ωστόσο, σημειώνεται πως για τον προσδιορισμό των μεγεθών των AgNPs απαιτείται χρήση μικροσκοπίας καθώς το μέγεθος που μετράται από το DLS συμπεριλαμβάνει τα βιομόρια που επικαλύπτουν τα AgNPs, τα στρώματα ιόντων που κινούνται μαζί με το σωματίδιο καθώς αυτό είναι διαλυμένο σε ηλεκτρολύτη και υποθέτει σφαιρικό σχήμα. Για τους λόγους αυτούς προτιμάται ο προσδιορισμός με τεχνικές όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM).

Ο επαρκής αριθμός βιοδραστικών μορίων του εκχυλίσματος για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αναγωγής επίσης είναι σημαντικός. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από τα αποτελέσματα της απόδοσης σχηματισμού AgNPs. Πειράματα κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε μικρή αναλογία κατ’ όγκο σε κυτταρικό εκχύλισμα οδήγησε σε χαμηλές αποδόσεις στο εύρος 0-6%. Κατά τα υπόλοιπα πειράματα, με υψηλή αναλογία σε κυτταρικό εκχύλισμα παρατηρούνται υψηλότερες τιμές αποδόσεις, το εύρος 8-58%. Το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι οι βιοδραστικές ενώσεις του εκχυλίσματος στο τελικό διάλυμα, με αναλογία 95/5, δεν επαρκούν ώστε να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός νανοσωματιδίων. Οι υψηλότερες τιμές απόδοσης (Πείραμα 7 και 11, αποδόσεις 38, 58% αντίστοιχα) παρατηρούνται επίσης για υψηλή θερμοκρασία. Η θερμοκρασία επηρεάζει το ρυθμό των αντιδράσεων αναγωγής των κατιόντων αργύρου αυξάνοντάς τον. Αυτό οδηγεί σε σχηματισμό περισσότερων νανοσωματιδίων αργύρου σε λιγότερο χρόνο. Ωστόσο, υψηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε μεγαλύτερα μεγέθη AgNPs. Οι υψηλοί ρυθμοί αντίδρασης και η ακόλουθη αύξηση της απόδοσης στα πειράματα 7,11 δεν συνοδεύεται από επιθυμητά χαρακτηριστικά AgNPs εξαιτίας του φαινομένου της συσσωμάτωσης. Η μέτρηση της απόδοσης του πειράματος δεν διαχωρίζει μεταξύ νανοσωματιδίων αργύρου επιθυμητών διαστάσεων και χαρακτηριστικών και συσσωματωμάτων. Επομένως θα πρέπει να ερμηνεύονται

συνδυαστικά όλες οι τεχνικές ώστε να προκύψουν συμπεράσματα για τις καταλληλότερες τιμές των παραμέτρων σύνθεσης.

Το ζ-δυναμικό προσδιορίζεται ώστε να ελεγχθούν τα νανοσωματίδια ως προς τη σταθερότητά τους. Παρατηρείται ότι τα παραγόμενα νανοσωματίδια έχουν αρνητικό ζ-δυναμικό γεγονός (πιθανόν λόγω ομάδων -OH πολυσακχαριτών και αλκοολών) που αποδεικνύει την ύπαρξη βιομορίων με επικαλυπτικό ρόλο στα νανοσωματίδια (capping agents) [60]. Στην προκειμένη περίπτωση όλες οι συνθήκες πλην της συνθήκης 1 με τιμή -28.6mV ξεπερνούν την τιμή -30mV. Τιμές κατά απόλυτη τιμή άνω του 30mV αντιστοιχούν σε σταθερά σωματίδια [27]. Τιμές ζ-δυναμικού κάτω του -40mv παρατηρούνται κατά τις συνθήκες 3, 5 και 7. Οι συνθήκες αυτές χαρακτηρίζονται από μεγάλη συγκέντρωση σε νιτρικό Άργυρο και υψηλή αναλογία σε εκχύλισμα. Η παρουσία περισσότερων βιοδραστικών ενώσεων στα διαλύματα αυτά ίσως οδηγεί σε πιο σταθερά νανοσωματίδια. Συμπεραίνεται πως με την πράσινη μέθοδο σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου παράγονται σταθερά AgNPs, γεγονός που επιβεβαιώνει την ικανότητα των βιομορίων να σταθεροποιούν τα νανοσωματίδια αργύρου.

Ο προσδιορισμός του είδους των βιοδραστικών μορίων του κυτταρικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας FTIR. Η εύρεση των μορίων αυτών είναι σημαντική καθώς οδηγούν στην σύνθεση των AgNPs με αναγωγή των ιόντων αργύρου σε ελεύθερα μεταλλικά άτομα αργύρου. Στη συνέχεια προωθούν την πυρήνωση και την ανάπτυξη σε νανοσωματίδια αργύρου. Ο ρόλος τους είναι διττός, αφού συμβάλλουν επιπλέον στην επικάλυψή των AgNPs (capping) σταθεροποιώντας τα. Οι χαρακτηριστικές ομάδες που εντοπίζονται στα φάσματα υποδεικνύουν την ύπαρξη πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων, φαινολών κλπ. Επιπλέον, η ύπαρξη βιομορίων στο εκχύλισμα επιβεβαιώθηκε μετρώντας τις πρωτεΐνες και τις χρωστικές (χλωροφύλλη και καροτενοειδή) μέσω της μεθόδου Bradford και φασματομετρικά αντίστοιχα.

Ο πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman που αποσκοπεί στη μελέτη των παραγόντων σύνθεσης που επηρεάζουν τα τελικά χαρακτηριστικά των AgNPs, υπέδειξε ως βέλτιστες συνθήκες για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων τη χαμηλή θερμοκρασία (T=25°C), την υψηλή συγκέντρωση νιτρικού αργύρου (C=9mM), την υψηλή αναλογία σε εκχύλισμα (Ratio=50:50), την έκθεση σε φως και το αλκαλικό pH=9.0. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τις βιβλιογραφικές πηγές όπου θεωρούνται ως βέλτιστες οι αλκαλικές τιμές pH [82] αλλά και σε ό,τι αφορά τη θερμοκρασία [60] και την έκθεση σε φως [85], ενώ η αυξημένη αναλογία σε εκχύλισμα και συγκέντρωση επίσης επηρεάζουν θετικά σε αρκετές περιπτώσεις [60]. Σε άλλες βιβλιογραφικές έρευνες προσδιορίζονται καλύτερα χαρακτηριστικά AgNPs σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και αναλογίες [85]. Στην παρούσα εργασία η προτίμηση σε υψηλές αναλογίες εκχυλίσματος μπορεί να οφείλεται στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος βιομάζας η οποία ίσως ήταν αραιή. Επιπλέον, η συμπεριφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στην θερμική λύση των κυττάρων κατά την οποία είναι πιθανό να χάθηκε η δράση θερμοευαίσθητων βιομορίων [54]. Όταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος βιομάζας είναι χαμηλή, η διαθέσιμη ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων, όπως φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες, που λειτουργούν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες, δεν επαρκεί για την αποτελεσματική αναγωγή των ιόντων αργύρου (Ag^{+}) σε μεταλλικά νανοσωματίδια αργύρου (Ag^{o}).

Η χαμηλή θερμοκρασία ευνοεί το σχηματισμό νανοσωματιδίων βελτιωμένων χαρακτηριστικών ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες λαμβάνονται πιο πλατιές κορυφές στο UV-Vis, παρά τους υψηλότερους ρυθμούς αντίδρασης [60]. Το αλκαλικό pH προτιμάται καθώς επηρεάζει το φορτίο των αναγωγικών παραγόντων οδηγώντας σε πιο ταχεία πυρήνωση περισσότερων και μικρότερων νανοσωματιδίων σε αντίθεση με τα όξινα pH που οδηγούν σε πιο αργή αντίδραση, λιγότερων και μεγαλύτερων νανοσωματιδίων [56]. Με επιλογή των συνθηκών αυτών το μοντέλο υπολογίζει τιμή Desirability=0.749 και προβλέπει αποκρίσεις με τιμές: α) Απορρόφηση=0.69, β) Z-δυναμικό: -44mV, γ) Υδροδυναμική διάμετρος: 266nm, δ) Δείκτης πολυδιασποράς: 0.484 και ε) Απόδοση: ~50%.

Η χρονική μελέτη των AgNPs με χρήση των συνθηκών του πειράματος 8 (pH=9.0, T=25°C, C($AgNO_3$)=1mM, Ratio=50:50 v/v, Φως), έδειξε ότι παράγονται περισσότερα AgNPs με την πάροδο του χρόνου σύμφωνα με την ένταση της απορρόφησης στο UV-Vis αλλά και τον υπολογισμό της απόδοσης του πειράματος μέσω του ICP-OES. Η χαρακτηριστική κορυφή του φάσματος UV-Vis λαμβάνεται και στις τέσσερις χρονικές στιγμές σε μήκος κύματος λ_{max}=415 nm επιβεβαιώνοντας αρχικά την σύνθεση των AgNPs αλλά και τη σύνθεση ομοιόμορφων χαρακτηριστικών νανοσωματίδια αφού παράχθηκαν με τον ίδιο τρόπο. Ο λόγος μέγιστης απορρόφησης προς ελάχιστη απορρόφηση στην κοιλάδα (valley) ήταν αυξανόμενος με το χρόνο αντίδρασης συμπεραίνοντας πως με αύξηση του χρόνου στις 72 ώρες λαμβάνονται τα μικρότερα νανοσωματίδια. Το συμπέρασμα επιβεβαίωσε η μέθοδος DLS όπου έδειξε πως η υδροδυναμική διάμετρος μειώθηκε με αύξηση του χρόνου αντίδρασης. Με βάση τις παραπάνω μετρήσεις διαπιστώνεται ότι λήφθηκαν νανοσωματίδια αργύρου καλύτερων χαρακτηριστικών σε χρόνο 72 ωρών. Επιπλέον, σύμφωνα με το ζ-δυναμικό βρέθηκε ότι τα παραγόμενα νανοσωματίδια σε αυτόν το χρόνο είναι σταθερά (-36.15±1.5mV). Ο δείκτης πολυδιασποράς του δείγματος των 72 ωρών ήταν ίσος με 0.374±0.022.

Η αντιβακτηριακή δράση των AgNPs (συντεθειμένα στις συνθήκες του πειράματος 8) έναντι του βακτηρίου *E.Coli* επιβεβαιώθηκε μέσω της τεχνικής μικροαραίωσης σε μικροπλάκα και την επώαση καλλιέργειας του βακτηρίου και δειγμάτων νανοσωματιδίων διαφορετικών συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις 51.25 και 25.63 mg/L οδήγησαν σε υψηλό ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης του *E. Coli*, ίσο με 88%. Συνεπώς, χρειάζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις διαλυμάτων AgNPs για να επιτευχθεί πλήρης αναστολή του βακτηρίου. Ωστόσο, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες επηρεάζονται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων, με τα μικρότερα να έχουν καλύτερες πιθανότητες να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων [95]. Επομένως, πλήρης αναστολή θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με έλεγχο του μεγέθους των παραγόμενων AgNPs, μελετώντας σε μεγαλύτερο βάθος τους παράγοντες που επιδρούν στο τελικό μέγεθος.

Η αλληλεπίδραση του ctDNA και των AgNPs επιβεβαιώνεται (συντεθειμένα στις συνθήκες του πειράματος 8). Λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του υπερχρωμισμού το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα νανοσωματίδια αργύρου επιδρούν στην δευτεροταγή δομή του ctDNA αλλοιώνοντάς την. Επιπλέον, με χρήση της εξίσωσης Benesi-Hilderbrand προσδιορίζεται η σταθερά συγγένειας μεταξύ του DNA και των AgNPs και βρίσκεται ίση με K_{app}=12635 L/mol. Η τιμή αυτή

συγκρίνεται με τη βιβλιογραφία και είναι παρόμοια με άλλα AgNPs και θεωρείται πως αντιστοιχεί σε αλληλεπίδραση τύπου αύλακας (groove binding) με το ctDNA. [78]

Συμπερασματικά, η σύνθεση AgNPs επιθυμητών χαρακτηριστικών και με τη χρήση κυτταρικού εκχυλίσματος του μικροφύκους *Stichococcus sp*. είναι δυνατή. Επιπλέον, τα παραγόμενα νανοσωματίδια παρουσιάζουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι του *E. Coli* και αλληλεπιδρούν με το DNA καθιστώντας τα υποψήφια προς περαιτέρω έρευνα.

4.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η σύνθεση AgNPs μέσω της πράσινης μεθόδου με χρήση εκχυλίσματος βιομάζας του μικροφύκους *Stichococcus sp*. ήταν επιτυχής ανάλογα με τις χρησιμοποιούμενες συνθήκες. Προς περεταίρω διερεύνηση κρίνεται:

- Η διερεύνηση επιπλέον παραγόντων σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου και της επίδρασης στα χαρακτηριστικά τους, όπως είναι το είδος και η ένταση της ακτινοβολίας και η συγκέντρωση εκχυλίσματος βιομάζας.
- Η μελέτη των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των AgNPs χρησιμοποιώντας περισσότερα είδη βακτηρίων, θετικών και αρνητικών κατά Gram.
- Η μελέτη των ιδιοτήτων των AgNPs ως φορείς φαρμακευτικών μορίων.
- Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των AgNPs,
- Η διερεύνηση των αντιοξειδωτικών και αντιμυκητιασικών ιδιοτήτων των AgNPs.

Βιβλιογραφία

[1] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, and F. Rizzolio, “The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine,” 2020, *Molecules,* doi: 10.3390/molecules25010112.

[2] D. Sannino, “Types and Classification of Nanomaterials,” *Springer Singapore*, 2021, pp. 15–38. doi: 10.1007/978-981-15-9437-3_2.

[3] S. Mohan Bhagyaraj, O. S. Oluwafemi, and O. S. Oluwafemi, “Nanotechnology: The Science of the Invisible,” *Elsevier*, 2018, pp. 1–18. doi: 10.1016/B978-0-08-101975-7.00001-4.

[4] B. Karn, “Nanotechnology and the Environment: A Charge to EPA Nano Grantees,” 2004.

[5] B. Mekuye and B. Abera, “Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications,” *Nano Select*, vol. 4, no. 8, pp. 486–501, Aug. 2023, doi: 10.1002/nano.202300038.

[6] K. A. Altammar, “A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges,” 2023, *Frontiers Media S.A*. doi: 10.3389/fmicb.2023.1155622.

[7] A. M. Charpe, K. H. Waghode, and S. J. Gahukar, “NANO-PARTICLES: A PROMISING TOOL FOR FUTURE AGRICULTURE”, *Multilogic in Science,* vol. VIII, 2019, ISSN 2277-7601

[8] P. Christian, F. Von Der Kammer, M. Baalousha, and T. Hofmann, “Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media,”, *Ecotoxicology,* (2008) 17:326–343. doi: 10.1007/s10646-008-0213-1.

[9] C. K. Githala and R. Trivedi, “Review on synthesis method, biomolecules involved, size affecting factors and potential applications of silver nanoparticles,” Nov. 01, 2023, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.bcab.2023.102912.

[10] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz, “The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 3, pp. 668–677, Jan. 2003, doi: 10.1021/jp026731y.

[11] R. K. Ismail, T. H. Mubarak, and R. M. S. Al-Haddad, “Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications,” *J Biochem Tech*, vol. 10, no. 2, pp. 62–64, 2019.

[12] R. K. Saini, A. K. Sharma, A. Agarwal, and R. Prajesh, “Near field FEM simulations of plasmonic gold nanoparticle based SERS substrate with experimental validation,” *Mater Chem Phys*, vol. 287, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.matchemphys.2022.126288.

[13] A. Akbarzadeh, M. Samiei, and S. Davaran, “Magnetic nanoparticles: Preparation, physical properties, and applications in biomedicine,” *Nanoscale Res Lett*, vol. 7, 2012, doi: 10.1186/1556-276X-7-144.

[14] M. Montazer and T. Harifi, “Magnetic nanofinishes for textiles,” *Elsevier*, 2018, pp. 225–240. doi: 10.1016/b978-0-08-101214-7.00016-9.

[15] D. Guo, G. Xie, and J. Luo, “Mechanical properties of nanoparticles: Basics and applications,”, *Journal of Physics D: Applied Physics,* 47 (2014). doi: 10.1088/0022-3727/47/1/013001.

[16] Q. Wu, W. S. Miao, Y. Du Zhang, H. J. Gao, and D. Hui, “Mechanical properties of nanomaterials: A review,” *Nanotechnol Rev*, vol. 9, no. 1, pp. 259–273, Mar. 2020, doi: 10.1515/ntrev-2020-0021.

[17] S. Simpson, A. Schelfhout, C. Golden, and S. Vafaei, “Nanofluid thermal conductivity and effective parameters,” Jan. 01, 2019, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/app9010087.

[18] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, “Nanoparticles: Properties, applications and toxicities,” Nov. 01, 2019, *Elsevier,* doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011.

[19] E. Kianfar, “Catalytic properties of nanomaterials and factors affecting it.”, e Book: *Importance & Applications of Nanotechnology,* 2020

[20] 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,* Sep. 13, 2016. doi: 10.3390/ijms17091534.

[21] L. P. Silva, A. P. Silveira, C. C. Bonatto, I. G. Reis, and P. V. Milreu, “Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agents: Past, Present, and Future,” *Elsevier,* 2017, pp. 577–596. doi: 10.1016/B978-0-323-46152-8.00026-3.

[22] A. E. Vladár and V. D. Hodoroaba, “Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy,” *Elsevier*, 2019, pp. 7–27. doi: 10.1016/B978-0-12-814182-3.00002-X.

[23] M. Malatesta, “Transmission electron microscopy as a powerful tool to investigate the interaction of nanoparticles with subcellular structures,” *International Journal of Molecular Sciences* Dec. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms222312789.

[24] A. Naganthran *et al.*, “Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles,” *Materials*, vol. 15, no. 2, Jan. 2022, doi: 10.3390/ma15020427.

[25] V. Maniar, K. Kalsara, and U. Upadhyay, “A Review of Ftir-An Useful Instrument,” *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, vol. 8, p. 2486, doi: 10.35629/7781-080124862490.

[26] J. D. Clogston and A. K. Patri, “Zeta Potential Measurement,” in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, 2011, vol. 697. doi: 10.1007/978-1-60327-198-1_6.

[27] S. Davinder and H. S. L, “NANOPARTICLES: AN OVERVIEW,” *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 2013, 3(2), 169-175, ISSN: 2250-1177

[28] S. Sai Kiran, “A Review on Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Icp-Oes) with a Special Emphasis on its Applications”, *Scholars Research Library, Der Pharmacia Lettre*, 2017, 9 [10]:44-54, ISSN 0975-5071

[29] E. Elizondo *et al.*, “Liposomes and other vesicular systems: Structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine,” vol. 104, *Elsevier*, 2011, pp. 1–52. doi: 10.1016/B978-0-12-416020-0.00001-2.

[30] A. C. Quevedo *et al.*, “UV-vis spectroscopic characterization of nanomaterials in aqueous media,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 176, Oct. 2021, doi: 10.3791/61764.

[31] P. Sivaguru and X. Bi, “Introduction to Silver Chemistry,” in *Silver Catalysis in Organic Synthesis*, 2019, *Wiley*, pp. 1–32. doi: 10.1002/9783527342822.ch1.

[32] K. Mijnendonckx, N. Leys, J. Mahillon, S. Silver, and R. Van Houdt, “Antimicrobial silver: Uses, toxicity and potential for resistance,” *BioMetals*, vol. 26, no. 4, pp. 609–621, Aug. 2013, doi: 10.1007/s10534-013-9645-z.

[33] A. D. Politano, K. T. Campbell, L. H. Rosenberger, and R. G. Sawyer, “Use of silver in the prevention and treatment of infections: Silver review,” *Surgical infections* Jan. 01, 2013. doi: 10.1089/sur.2011.097.

[34] G. M. Misirli, K. Sridharan, and S. M. P. Abrantes, “A Review on Nanostructured Silver as A Basic Ingredient in Medicine: Physicochemical Parameters and Characterization,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 12, pp. 440–461, 2021, doi: 10.3762/BJNANO.12.36.

[35] M. Noga, J. Milan, A. Frydrych, and K. Jurowski, “Toxicological Aspects, Safety Assessment, and Green Toxicology of Silver Nanoparticles (AgNPs)—Critical Review: State of the Art,” Mar. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms24065133.

[36] P. Nie, Y. Zhao, and H. Xu, “Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review,” *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 253, p. 114636, Mar. 2023, doi: 10.1016/J.ECOENV.2023.114636.

[37] D. Das, S. Bhattacharyya, M. Bhattacharyya, and P. Mandal, “Green chemistry inspired formation of bioactive stable colloidal nanosilver and its wide-spectrum functionalised properties for sustainable industrial escalation,” *Results Chem*, vol. 4, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.rechem.2022.100533.

[38] J. Jabłońska *et al.*, “Preparation of silver nanoparticles in a high voltage AC arc in water,” *SN Appl Sci*, vol. 3, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.1007/s42452-021-04177-4.

[39] K. A. Altammar, “A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges,” 2023, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmicb.2023.1155622.

[40] M. Guilger-Casagrande and R. de Lima, “Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review,” Oct. 22, 2019, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fbioe.2019.00287.

[41] D. Chugh, V. S. Viswamalya, and B. Das, “Green synthesis of silver nanoparticles with algae and the importance of capping agents in the process,” Dec. 01, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1186/s43141-021-00228-w.

[42] D. Sahoo and P. Baweja, “General Characteristics of Algae,” *In The Algae World* (pp.3-29) 2015, pp. 3–29. doi: 10.1007/978-94-017-7321-8_1.

[43] N. Munir *et al.*, “Optimization of Growth Conditions of Different Algal Strains and Determination of Their Lipid Contents,” *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(2): 2015, Page: 546-553 ISSN: 1018-7081

[44] Y. Maltsev, K. Maltseva, M. Kulikovskiy, and S. Maltseva, “Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition,” *Biology,* 2021, *10*(10), 1060. doi: 10.3390/biology10101060.

[45] R. Chaudhary, K. Nawaz, A. K. Khan, C. Hano, B. H. Abbasi, and S. Anjum, “An overview of the algae-mediated biosynthesis of nanoparticles and their biomedical applications,” *Biomolecules*, 2020, Nov; 10(11): 1498. doi: 10.3390/biom10111498.

[46] G. Makaroglou, E. Syranidou, K. Pantelidaki, N. Kalogerakis, and P. Gikas, “Chemical mutation of Stichococcus sp. for the selection of strains with reduced chlorophyll content.” Available at SSRN: https://ssrn.com/abstract=4596895

[47] V. Dolganyuk *et al.*, “Microalgae: A promising source of valuable bioproducts,” Biomolecules. 2020 Aug; 10(8): 1153. doi: 10.3390/biom10081153.

[48] EPPO Global Database, Stichococcus sp., Accessed: 1 Sept 2024 (https://gd.eppo.int/taxon/SKKSS)

[49] P. Psachoulia and C. Chatzidoukas, “Illumination policies for stichococcus sp. Cultures in an optimally operating lab-scale pbr toward the directed photosynthetic production of desired products,” *Sustainability (Switzerland)*, vol. 13, no. 5, pp. 1–17, Mar. 2021, doi: 10.3390/su13052489.

[50] L. Hodač *et al.*, “Widespread green algae Chlorella and Stichococcus exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography,” *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 92, no. 8, Aug. 2016, doi: 10.1093/femsec/fiw122.

[51] A. T. Van, U. Karsten, and K. Glaser, “A chemosystematic investigation of selected stichococcus-like organisms (Trebouxiophyta),” *Algae*, vol. 36, no. 2, pp. 123–135, 2021, doi: 10.4490/algae.2021.36.6.5.

[52] C. Hallmann, J. Rüdrich, M. Enseleit, T. Friedl, and M. Hoppert, “Microbial diversity on a marble monument: A case study,” *Environ Earth Sci*, vol. 63, no. 7, pp. 1701–1711, Aug. 2011, doi: 10.1007/s12665-010-0772-3.

[53] A. Mukherjee, D. Sarkar, and S. Sasmal, “A Review of Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Algae,” Aug. 26, 2021, *Frontiers Media S.A*. doi: 10.3389/fmicb.2021.693899.

[54] P. S. Corrêa, W. G. Morais Júnior, A. A. Martins, N. S. Caetano, and T. M. Mata, “Microalgae biomolecules: Extraction, separation and purification methods,” Processes 2021, 9(1), 10. doi: 10.3390/pr9010010.

[55] A. Dhaka, S. Chand Mali, S. Sharma, and R. Trivedi, “A review on biological synthesis of silver nanoparticles and their potential applications,” *Results Chem*, vol. 6, p. 101108, Dec. 2023, doi: 10.1016/J.RECHEM.2023.101108.

[56] F. Chutrakulwong, K. Thamaphat, and M. Intarasawang, “Investigating UV-Irradiation Parameters in the Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Water Hyacinth Leaf Extract: Optimization for Future Sensor Applications,” *Nanomaterials*, vol. 14, no. 12, Jun. 2024, doi: 10.3390/nano14121018.

[57] R. Rippka, J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman and R. Y. Stanier, “Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria,” 1979 *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61.

[58] V. A. Thiviyanathan, P. J. Ker, E. P. P. Amin, S. G. H. Tang, W. Yee, and M. Z. Jamaludin, “Quantifying Microalgae Growth by the Optical Detection of Glucose in the NIR Waveband,” *Molecules*, vol. 28, no. 3, Feb. 2023, doi: 10.3390/molecules28031318.

[59] K. Chokshi *et al.*, “Green synthesis, characterization and antioxidant potential of silver nanoparticles biosynthesized from de-oiled biomass of thermotolerant oleaginous microalgae: Acutodesmus dimorphus,” *RSC Adv*, vol. 6, no. 76, pp. 72269–72274, 2016, doi: 10.1039/c6ra15322d.

[60] S. Choudhary *et al.*, “Phyco-synthesis of silver nanoparticles by environmentally safe approach and their applications,” *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-60195-3.

[61] R. S. Hamida, M. A. Ali, Z. N. Almohawes, H. Alahdal, M. A. Momenah, and M. M. Bin-Meferij, “Green Synthesis of Hexagonal Silver Nanoparticles Using a Novel Microalgae Coelastrella aeroterrestrica Strain BA_Chlo4 and Resulting Anticancer, Antibacterial, and Antioxidant Activities,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 10, Oct. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14102002.

[62] C. L. Kielkopf, W. Bauer, and I. L. Urbatsch, “Bradford assay for determining protein concentration,” *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2020, no. 4, pp. 136–138, Apr. 2020, doi: 10.1101/pdb.prot102269.

[63] D. Pharma, A. Dharma, W. Sekatresna, R. Zein, Z. Chaidir, and N. Nasir, “Chlorophyll and Total Carotenoid Contents in Microalgae Isolated from Local Industry Effluent in West Sumatera, Indonesia,” Der Pharma Chemica, 2017, 9(18):9-11. ISSN 0975-413X

[64] Y. Chen and S. Vaidyanathan, “Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae,” *Anal Chim Acta*, vol. 776, pp. 31–40, May 2013, doi: 10.1016/J.ACA.2013.03.005.

[65] S. Bell, “Experimental Design.”, 2009 *International Encyclopedia of Human Geography*

2009, Pages 672-675, https://doi.org/10.1016/B978-008044910-4.00431-4

[66] J. Wang and W. Wan, “Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review,” *International Journal of Hydrogen Energy,* Volume 34, Issue 1, January 2009, Pages 235-244, doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.10.008.

[67] G. Muthusamy, S. Thangasamy, M. Raja, S. Chinnappan, and S. Kandasamy, “Biosynthesis of silver nanoparticles from Spirulina microalgae and its antibacterial activity,” *Environmental*

Science and Pollution Research, vol. 24, no. 23, pp. 19459–19464, Aug. 2017, doi: 10.1007/s11356-017-9772-0.

[68] S. Mora-Godínez, F. F. Contreras-Torres, and A. Pacheco, "Characterization of Silver Nanoparticle Systems from Microalgae Acclimated to Different CO2 Atmospheres," *ACS Omega*, vol. 8, no. 24, pp. 21969–21982, Jun. 2023, doi: 10.1021/acsomega.3c01914.

[69] S. N. Sinha, D. Paul, N. Halder, D. Sengupta, and S. K. Patra, "Green synthesis of silver nanoparticles using fresh water green alga Pithophora oedogonia (Mont.) Wittrock and evaluation of their antibacterial activity," *Applied Nanoscience (Switzerland)*, vol. 5, no. 6, pp. 703–709, Aug. 2015, doi: 10.1007/s13204-014-0366-6.

[70] J. M. Ashraf, M. A. Ansari, H. M. Khan, M. A. Alzohairy, and I. Choi, "Green synthesis of silver nanoparticles and characterization of their inhibitory effects on AGEs formation using biophysical techniques," *Sci Rep*, vol. 6, Feb. 2016, doi: 10.1038/srep20414.

[71] T. E. Agustina, W. Handayani, and C. Imawan, "The UV-VIS Spectrum Analysis From Silver Nanoparticles Synthesized Using Diospyros maritima Blume. Leaves Extract," Advances in Biological Sciences Research, volume 14 , 2021.

[72] R. S. Pappas, "Sample Preparation Problem Solving for Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry with Liquid Introduction Systems I. Solubility, Chelation, and Memory Effects." Spectroscopy (Springf). 2012 May 1; 27(5): 20–31

[73] A. Olori, D. Pietro, and A. Campopiano, "PREPARATION OF ULTRAPURE KBr PELLET: NEW METHOD FOR FTIR QUANTITATIVE ANALYSIS," *International Journal of Science Academic Research*, vol. 02, pp. 1015–1020, 2021, ISSN: 2582-6425

[74] G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, and R. D'Ari, "Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth," *J Bacteriol*, vol. 189, no. 23, pp. 8746–8749, Dec. 2007, doi: 10.1128/JB.01368-07.

[75] R. S. Sathishkumar *et al.*, "Green synthesis of silver nanoparticles by bloom forming marine microalgae Trichodesmium erythraeum and its applications in antioxidant, drug-resistant bacteria, and cytotoxicity activity," *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 23, no. 8, pp. 1180–1191, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.jscs.2019.07.008.

[76] F. Ö. Küp, S. Çoşkunçay, and F. Duman, "Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of Aesculus hippocastanum (horse chestnut): Evaluation of their antibacterial, antioxidant and drug release system activities," *Materials Science and Engineering C*, vol. 107, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.msec.2019.110207.

[77] I. Wiegand, K. Hilpert, and R. E. W. Hancock, "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances," *Nat Protoc*, vol. 3, no. 2, pp. 163–175, Feb. 2008, doi: 10.1038/nprot.2007.521.

[78] Z. Talebpour *et al.*, "Binding interaction of spherical silver nanoparticles and calf thymus DNA: Comprehensive multispectroscopic, molecular docking, and RAPD PCR studies," *J Mol Liq*, vol. 289, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.111185.

[79] I. Farag, “Resources Conservation in Microalgae Biodiesel Production,” *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)* ISSN: 2321-0869, Volume-1, Issue-8, October 2013

[80] K. M. M. Abou El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan, and R. A. A. Ammar, “Synthesis and applications of silver nanoparticles,” Arabian Journal of Chemistry Volume 3, Issue 3, July 2010, Pages 135-140. doi: 10.1016/j.arabjc.2010.04.008.

[81] S. Chowdhury, A. Basu, and S. Kundu, “Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria,” *Nanoscale Res Lett*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1186/1556-276X-9-365.

[82] K. Sharma, S. Guleria, and V. K. Razdan, “Green synthesis of silver nanoparticles using Ocimum gratissimum leaf extract: characterization, antimicrobial activity and toxicity analysis,” *J Plant Biochem Biotechnol*, vol. 29, no. 2, pp. 213–224, Jun. 2020, doi: 10.1007/s13562-019-00522-2.

[83] M. K. Alqadi, O. A. Abo Noqtah, F. Y. Alzoubi, J. Alzouby, and K. Aljarrah, “PH effect on the aggregation of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction,” *Materials Science-Poland*, vol. 32, no. 1, pp. 107–111, 2014, doi: 10.2478/s13536-013-0166-9.

[84] I. De Leersnyder, L. De Gelder, I. Van Driessche, and P. Vermeir, “Revealing the importance of aging, environment, size and stabilization mechanisms on the stability of metal nanoparticles: A case study for silver nanoparticles in a minimally defined and complex undefined bacterial growth medium,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 12, Dec. 2019, doi: 10.3390/nano9121684.

[85] M. G. Savvidou, E. Kontari, S. Kalantzi, and D. Mamma, “Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Cell-Free Supernatant of Haematococcus pluvialis Culture,” *Materials*, vol. 17, no. 1, Jan. 2024, doi: 10.3390/ma17010187.

[86] S. Anjum *et al.*, “Light-emitting diode (LED)-directed green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their multifaceted clinical and biological activities,” *RSC Adv*, vol. 12, no. 34, pp. 22266–22284, Aug. 2022, doi: 10.1039/d2ra03503k.

[87] S. Ghasemi *et al.*, “Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles using Rubus discolor leaves extract and its biological activities against multi-drug resistant bacteria and cancer cells,” *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-54702-9.

[88] A. Corciovă *et al.*, “Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using a Lythrum salicaria Extract and In Vitro Exploration of Their Biological Activities,” *Life*, vol. 12, no. 10, Oct. 2022, doi: 10.3390/life12101643.

[89] M. Jimidar, B. Bourguignon, and D. L. Massart, “Application of Derringer’s desirability function for the selection of optimum separation conditions in capillary zone electrophoresis,” Journal of Chromatography A, 740 (1996) 109-117, https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00110-0

[90] S. Chouhan and S. Guleria, “Green synthesis of AgNPs using Cannabis sativa leaf extract: Characterization, antibacterial, anti-yeast and α-amylase inhibitory activity,” *Mater Sci Energy Technol*, vol. 3, pp. 536–544, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.mset.2020.05.004.

[91] L. C. Moraes *et al.*, “High diversity of microalgae as a tool for the synthesis of different silver nanoparticles: A species-specific green synthesis,” *Colloids and Interface Science Communications*, vol. 42, May 2021, doi: 10.1016/j.colcom.2021.100420.

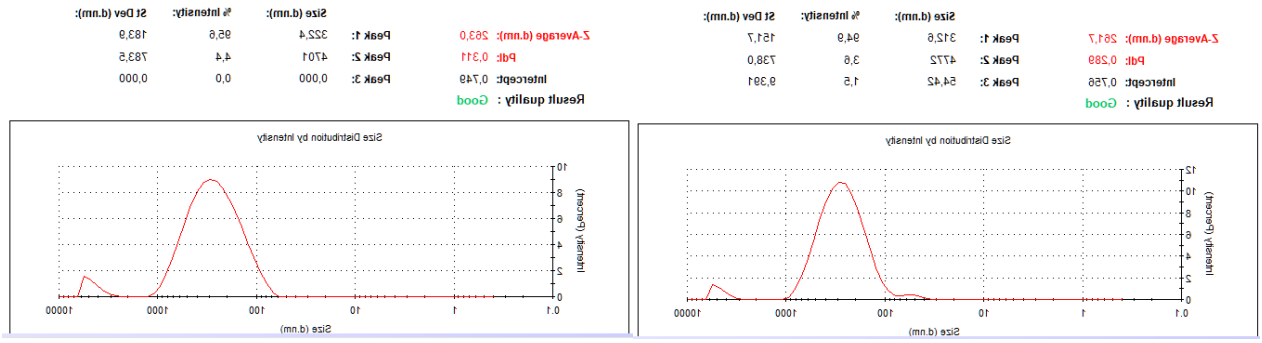
[92] M. Saber, F. Takahashi, and K. Yoshikawa, “Characterization and application of microalgae hydrochar as a low-cost adsorbent for Cu(II) ion removal from aqueous solutions,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no. 32, pp. 32721–32734, Nov. 2018, doi: 10.1007/s11356-018-3106-8.

[93] P. Wongsa, P. Phatikulrungsun, and S. Prathumthong, “FT-IR characteristics, phenolic profiles and inhibitory potential against digestive enzymes of 25 herbal infusions,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-10669-z.

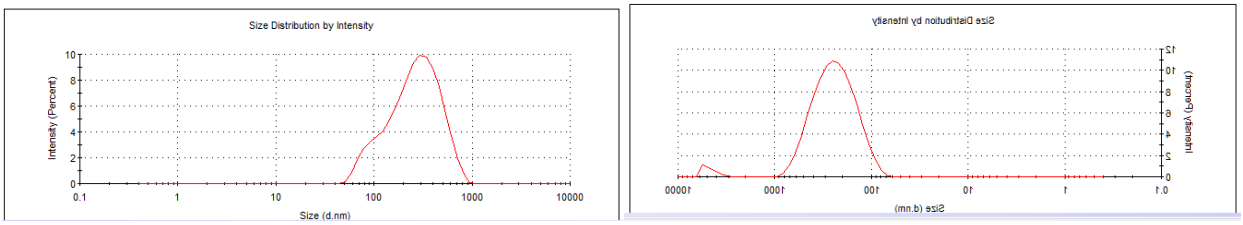
[94] N. H. Rezazadeh, F. Buazar, and S. Matroodi, “Synergistic effects of combinatorial chitosan and polyphenol biomolecules on enhanced antibacterial activity of biofunctionalaized silver nanoparticles,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-76726-7.

[95] S. Anees Ahmad *et al.*, “Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review,” Jan. 01, 2020, *KeAi Communications Co.* doi: 10.1016/j.mset.2020.09.002.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: Αποτελέσματα DLS

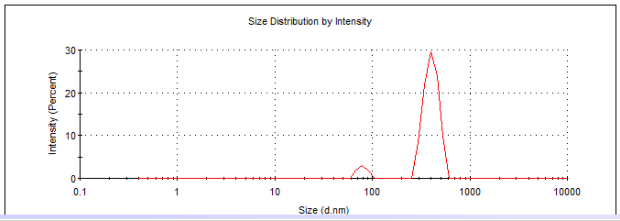


	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 215,5	Peak 1: 293,5	100,0	161,5
PdI: 0,238	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,774	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			

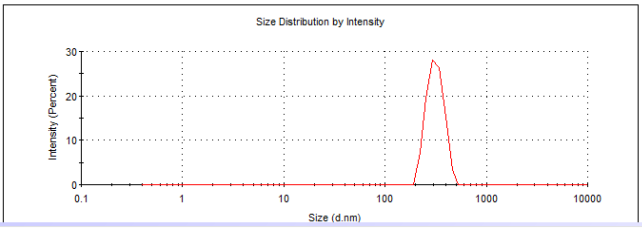


Διάγραμμα Π. 1:Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 1

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 909,3	Peak 1: 404,8	93,6	66,60
PdI: 0,700	Peak 2: 78,92	6,4	8,535
Intercept: 0,765	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Refer to quality report			

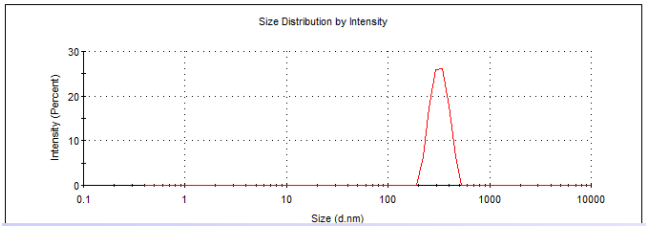


	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 701,1	Peak 1: 315,0	100,0	57,96
PdI: 0,592	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,698	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Refer to quality report			



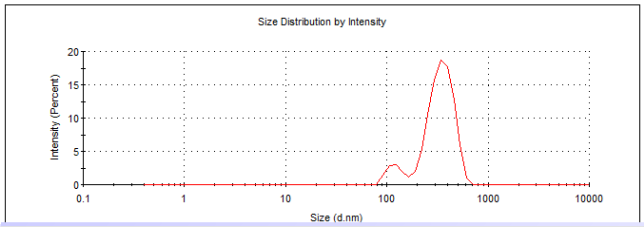
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 597,5	Peak 1:	323,8	100,0	62,44
PdI: 0,505	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,761	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 504,3	Peak 1:	353,7	89,6	92,35
PdI: 0,440	Peak 2:	121,5	10,4	21,55
Intercept: 0,804	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

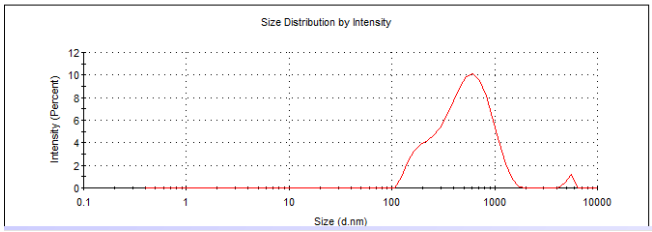
Result quality : Refer to quality report

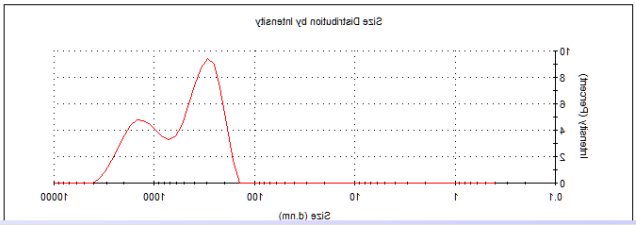


Διάγραμμα Π. 2: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 2

		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 450,5	Peak 1:	549,7	98,4	290,8
PdI: 0,344	Peak 2:	5364	1,6	334,4
Intercept: 0,915	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

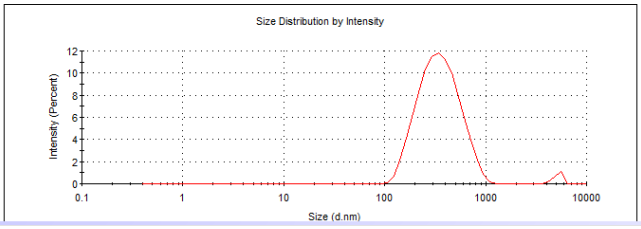
Result quality : Good





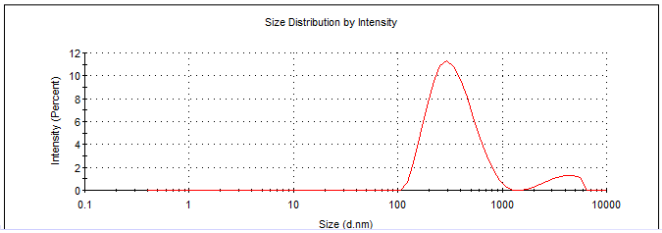
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 331,1	Peak 1:	376,1	98,1	171,7
PdI: 0,231	Peak 2:	5170	1,9	490,7
Intercept: 0,932	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Result quality : Good



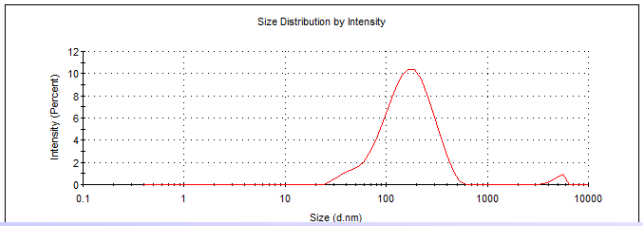
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 323,4	Peak 1:	356,5	92,5	170,4
PdI: 0,247	Peak 2:	3839	7,5	1100
Intercept: 0,932	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

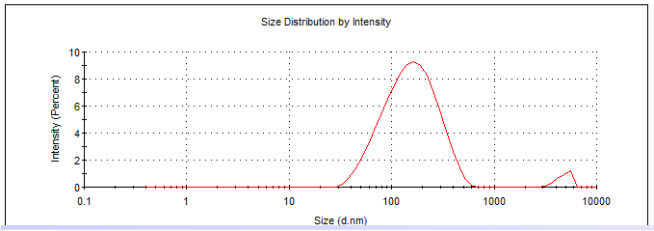


Διάγραμμα Π. 3: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 3

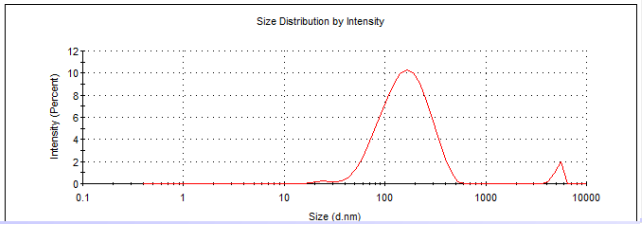
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 143,5	Peak 1:	179,2	98,2	93,16
PdI: 0,293	Peak 2:	5055	1,8	578,1
Intercept: 0,773	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



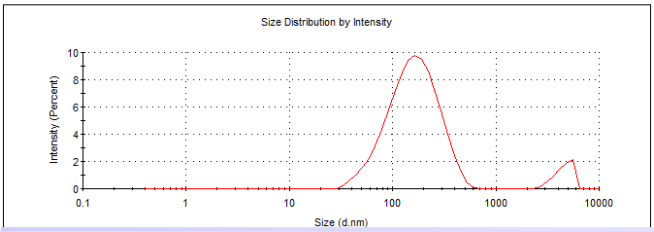
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 139,1	Peak 1:	174,0	96,8	97,54
PdI: 0,306	Peak 2:	4814	3,2	718,9
Intercept: 0,782	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 156,4	Peak 1:	175,0	96,1	87,97
PdI: 0,345	Peak 2:	5248	3,1	444,3
Intercept: 0,885	Peak 3:	25,59	0,8	4,565
Result quality : Good				

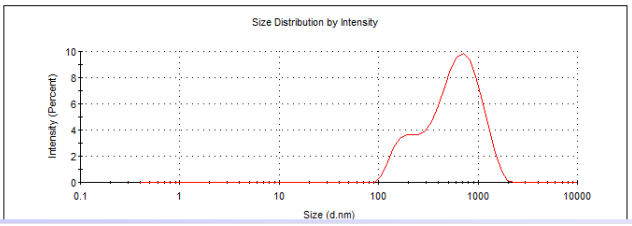


		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 154,9	Peak 1:	177,1	93,1	93,10
PdI: 0,350	Peak 2:	4556	6,9	860,6
Intercept: 0,880	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

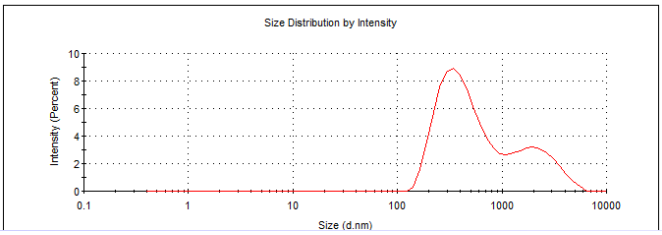


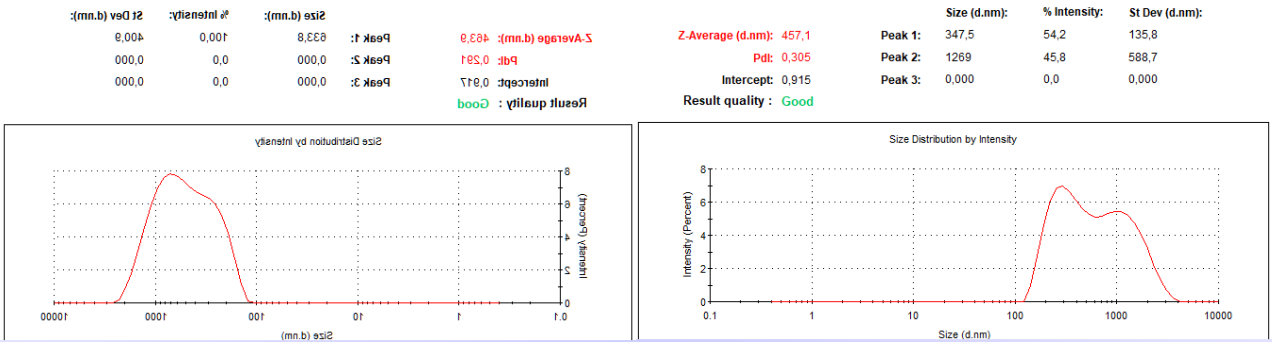
Διάγραμμα Π. 4: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 4

		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 452,4	Peak 1:	706,3	81,6	324,1
PdI: 0,294	Peak 2:	189,2	18,4	44,60
Intercept: 0,914	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

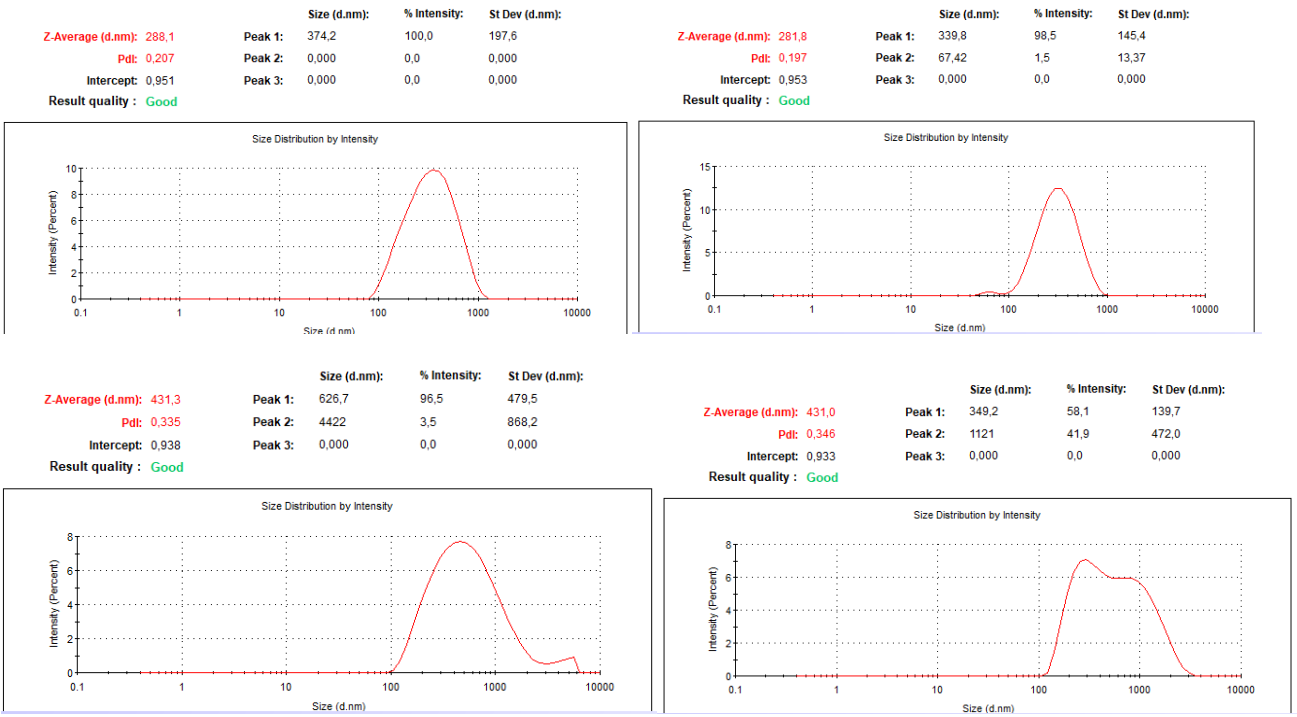


		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 456,9	Peak 1:	445,5	73,7	231,0
PdI: 0,316	Peak 2:	2274	26,3	1001
Intercept: 0,910	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



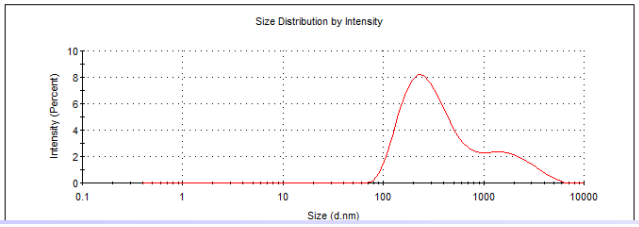


Διάγραμμα Π. 5: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 5

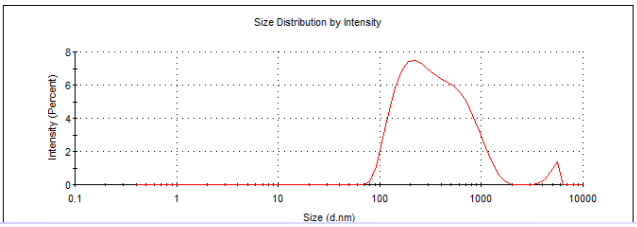


Διάγραμμα Π. 6: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 6

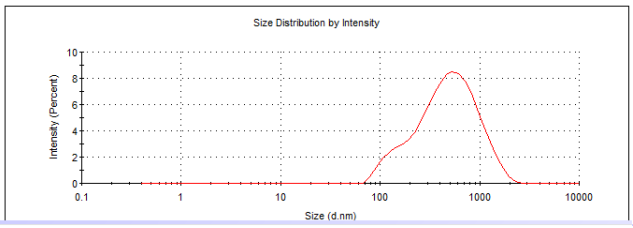
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 288,3	Peak 1:	329,5	79,4	203,1
Pdl: 0,384	Peak 2:	2021	20,6	1004
Intercept: 0,899	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



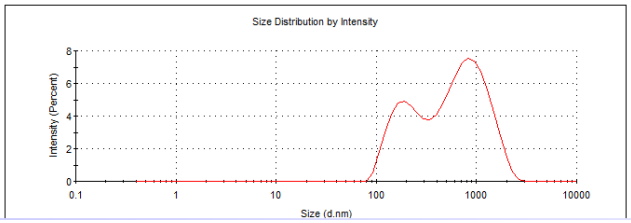
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 290,2	Peak 1:	404,9	97,4	285,6
Pdl: 0,381	Peak 2:	5113	2,6	541,6
Intercept: 0,901	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 379,8	Peak 1:	562,4	100,0	368,8
Pdl: 0,302	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,902	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

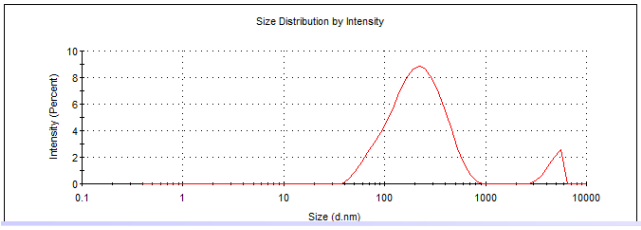


		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 377,8	Peak 1:	888,5	65,9	425,0
Pdl: 0,422	Peak 2:	208,8	34,1	71,70
Intercept: 0,899	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

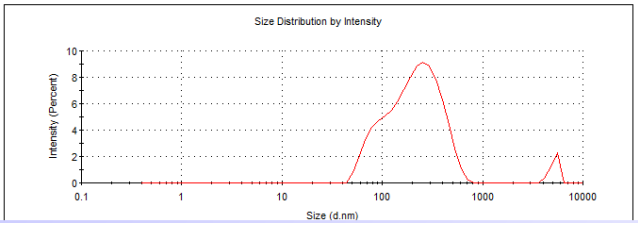


Διάγραμμα Π. 7: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 7

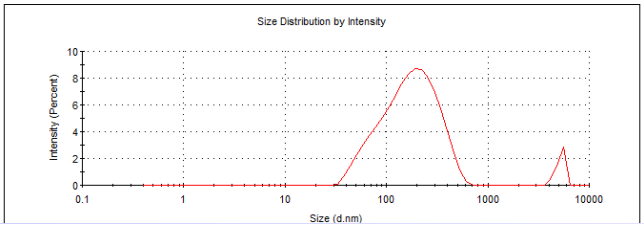
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 200,7	Peak 1:	234,8	93,2	134,9
Pdl: 0,385	Peak 2:	4790	6,8	734,6
Intercept: 0,817	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



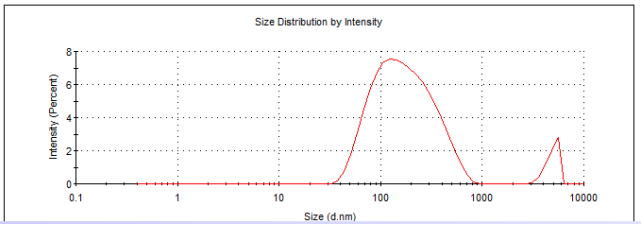
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 198,0	Peak 1:	230,9	96,2	128,4
Pdl: 0,365	Peak 2:	5181	3,8	485,3
Intercept: 0,816	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 167,4	Peak 1:	194,1	95,3	111,4
PdI: 0,467	Peak 2:	5201	4,7	474,4
Intercept: 0,912	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

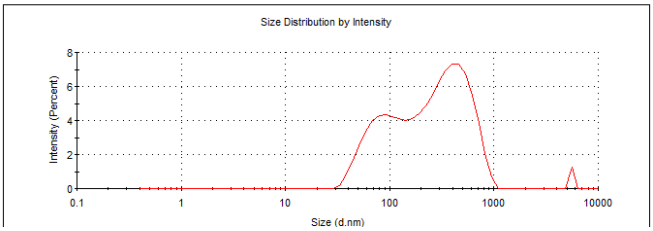


		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 160,5	Peak 1:	198,8	93,6	133,0
PdI: 0,458	Peak 2:	4921	6,4	663,9
Intercept: 0,906	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

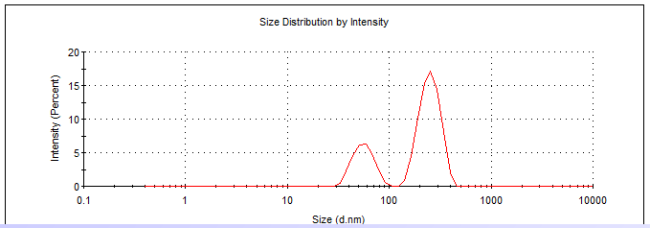


Διάγραμμα Π. 8: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 8

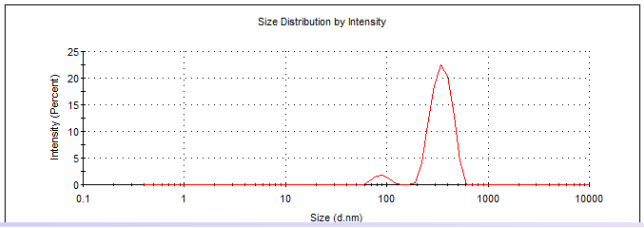
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 306,3	Peak 1:	389,2	66,7	185,7
PdI: 0,407	Peak 2:	88,57	32,1	30,79
Intercept: 0,782	Peak 3:	5560	1,2	6,104e-5
Result quality : Refer to quality report				



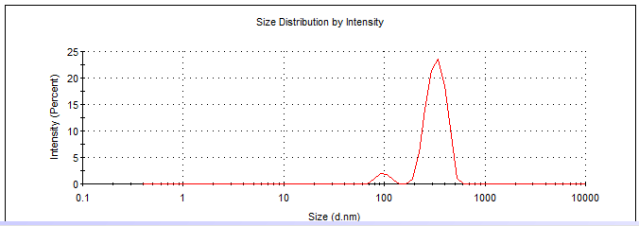
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 366,2	Peak 1:	253,6	72,4	56,80
PdI: 0,484	Peak 2:	56,49	27,6	12,94
Intercept: 0,782	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Refer to quality report				



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 609,6	Peak 1:	353,0	94,7	78,13
PdI: 0,605	Peak 2:	88,54	5,3	13,33
Intercept: 0,866	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Refer to quality report				



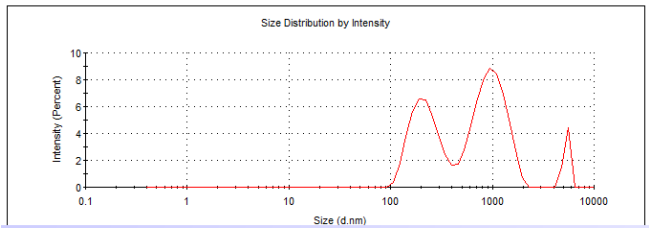
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 598,7	Peak 1:	333,3	94,7	70,72
PdI: 0,520	Peak 2:	98,17	5,3	13,24
Intercept: 0,844	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Refer to quality report				



Διάγραμμα Π. 9: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 9

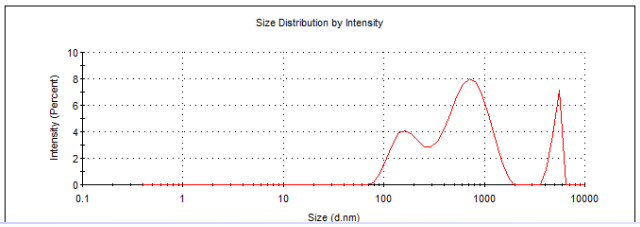
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 610,3	Peak 1:	980,4	56,6	346,5
PdI: 0,563	Peak 2:	221,2	37,5	69,60
Intercept: 0,812	Peak 3:	5364	5,9	336,3

Result quality : Refer to quality report



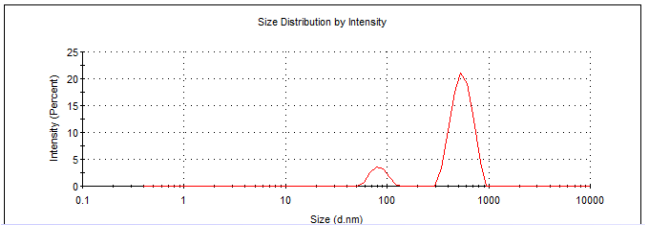
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 602,4	Peak 1:	736,1	62,0	309,2
PdI: 0,642	Peak 2:	182,9	26,3	59,66
Intercept: 0,793	Peak 3:	5186	11,7	483,6

Result quality : Refer to quality report



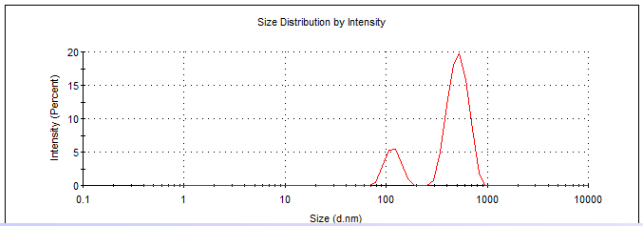
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 683,5	Peak 1:	552,3	88,2	121,1
PdI: 0,521	Peak 2:	83,09	11,8	14,27
Intercept: 0,731	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 682,3	Peak 1:	523,7	81,7	114,8
PdI: 0,554	Peak 2:	117,7	18,3	20,48
Intercept: 0,763	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

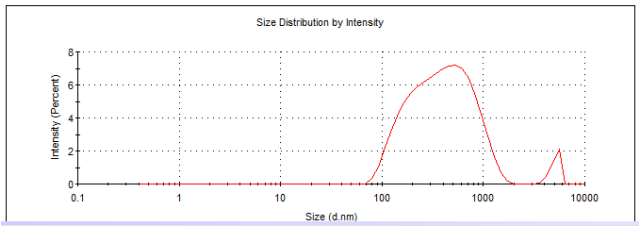
Result quality : Refer to quality report



Διάγραμμα Π. 10: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 10

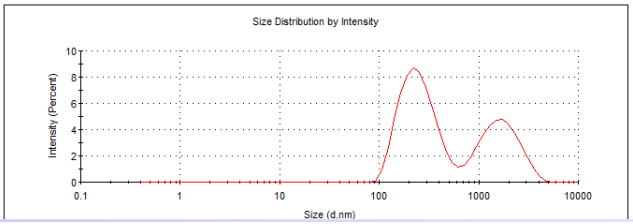
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 340,1	Peak 1:	459,6	96,1	299,9
PdI: 0,431	Peak 2:	5117	3,9	538,3
Intercept: 0,935	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

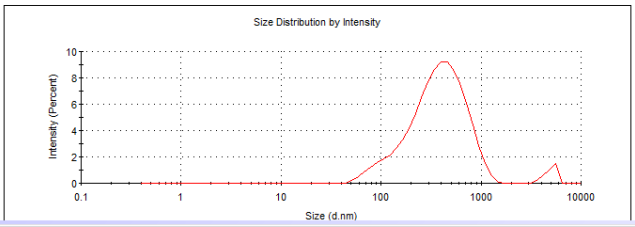


		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 325,4	Peak 1:	258,3	61,8	108,5
PdI: 0,457	Peak 2:	1728	38,2	761,9
Intercept: 0,923	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

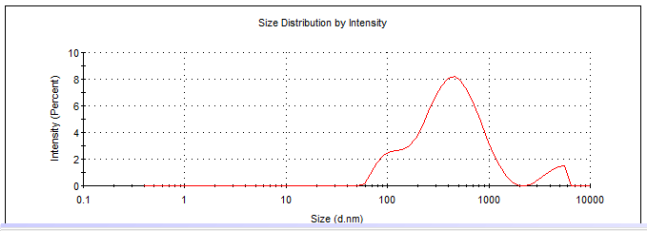
Result quality : Good



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 318,0	Peak 1:	422,7	96,8	245,2
Pdi: 0,377	Peak 2:	4957	3,2	634,7
Intercept: 0,826	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

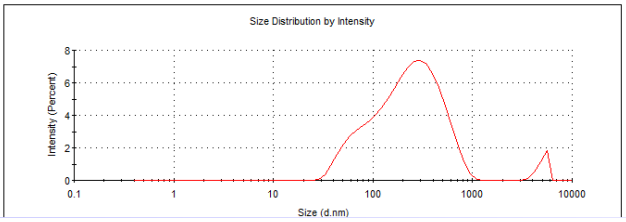


		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 323,1	Peak 1:	454,3	94,4	294,6
Pdi: 0,431	Peak 2:	4476	5,6	869,1
Intercept: 0,833	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

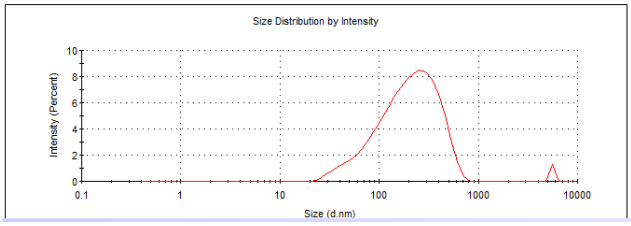


Διάγραμμα Π. 11: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 11

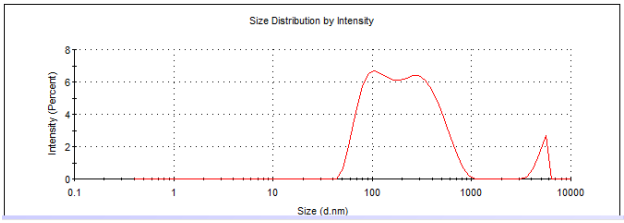
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 187,8	Peak 1:	266,9	96,3	183,4
Pdi: 0,429	Peak 2:	5046	3,7	586,2
Intercept: 0,832	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



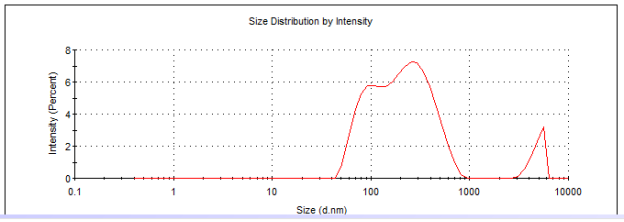
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 220,6	Peak 1:	231,7	98,7	138,7
Pdi: 0,491	Peak 2:	5560	1,3	0,000
Intercept: 0,887	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Refer to quality report				



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 184,4	Peak 1:	334,5	52,9	152,6
Pdi: 0,511	Peak 2:	109,0	42,3	32,95
Intercept: 0,873	Peak 3:	5100	4,7	552,7
Result quality : Good				



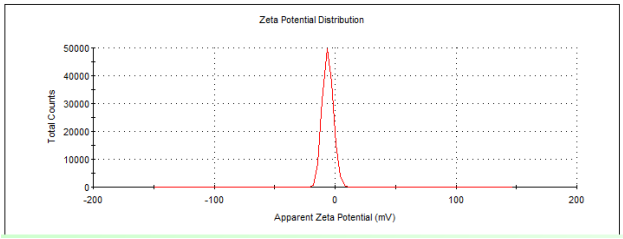
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 190,8	Peak 1:	285,1	64,6	138,2
Pdi: 0,503	Peak 2:	90,76	28,3	21,45
Intercept: 0,877	Peak 3:	4896	7,0	684,8
Result quality : Good				



Διάγραμμα Π. 12: Μέση υδροδυναμική διάμετρος πειράματος 12

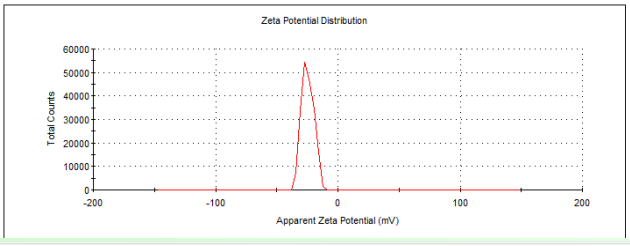
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -25,7	Peak 1: -5,91	100,0	4,42
Zeta Deviation (mV): 60,5	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00347	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



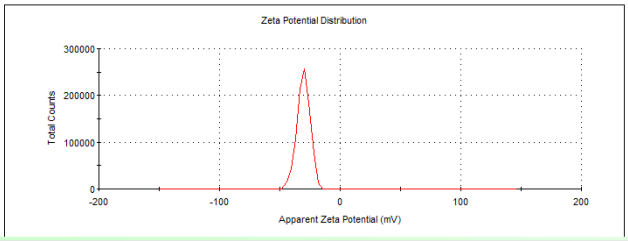
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -26,5	Peak 1: -24,7	100,0	4,95
Zeta Deviation (mV): 20,2	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0268	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



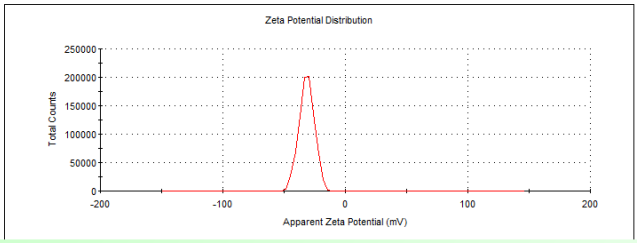
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -30,6	Peak 1: -30,6	100,0	5,29
Zeta Deviation (mV): 5,29	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00413	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -31,6	Peak 1: -31,6	100,0	6,04
Zeta Deviation (mV): 6,04	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00378	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

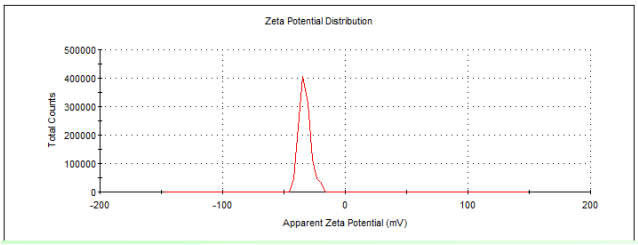
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 13: Z-δυναμικό πειράματος 1

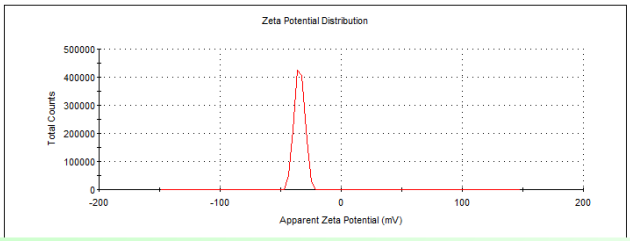
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -33,0	Peak 1: -33,0	100,0	4,73
Zeta Deviation (mV): 4,73	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00796	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



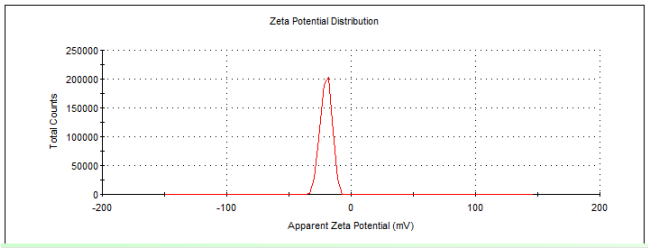
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -34,5	Peak 1: -34,5	100,0	4,11
Zeta Deviation (mV): 4,11	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00514	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



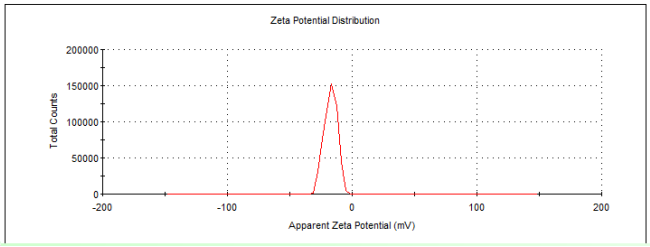
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -38,9	Peak 1:	-20,0	100,0	4,43
Zeta Deviation (mV): 57,2	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00518	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -37,6	Peak 1:	-17,3	100,0	5,12
Zeta Deviation (mV): 59,5	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0152	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

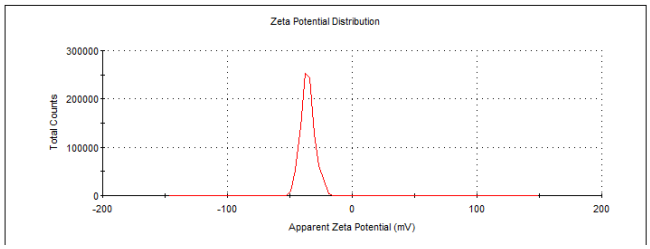
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 14: Z-δυναμικό πειράματος 2

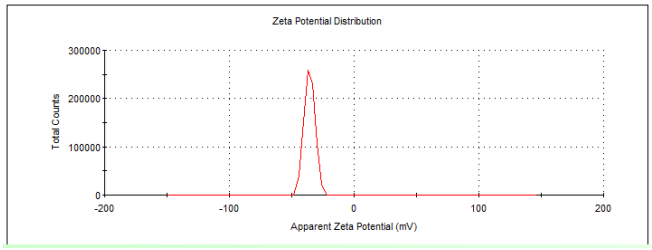
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -35,6	Peak 1:	-35,6	100,0	5,60
Zeta Deviation (mV): 5,60	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00496	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



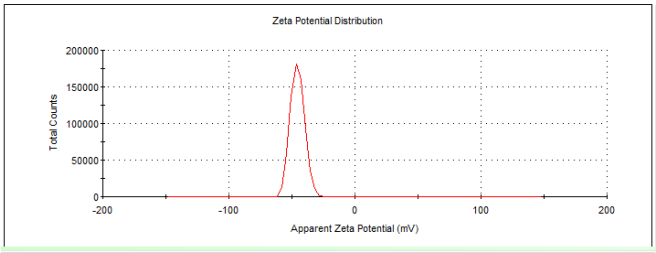
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -35,7	Peak 1:	-35,7	100,0	4,30
Zeta Deviation (mV): 4,30	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00465	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



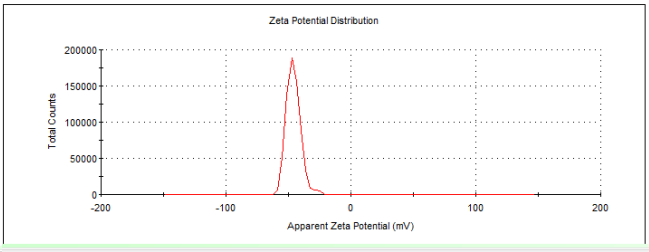
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -45,6	Peak 1:	-45,6	100,0	5,49
Zeta Deviation (mV): 5,49	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00746	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -46,0	Peak 1:	-46,0	100,0	5,69
Zeta Deviation (mV): 5,69	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0106	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

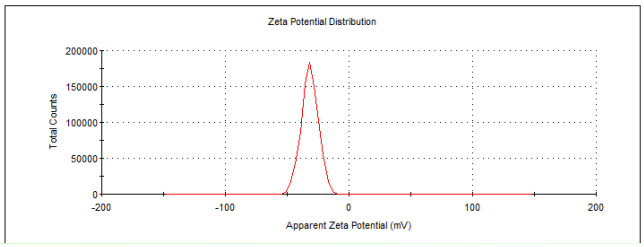
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 15: Z-δυναμικό πειράματος 3

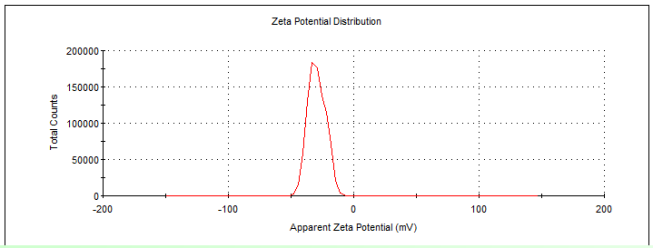
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -31,7	Peak 1: -31,7	100,0	6,77
Zeta Deviation (mV): 6,77	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00774	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



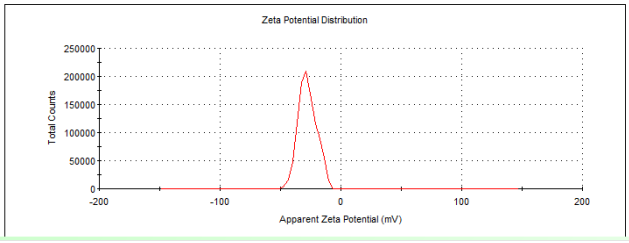
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -29,3	Peak 1: -29,3	100,0	7,01
Zeta Deviation (mV): 7,01	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00556	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



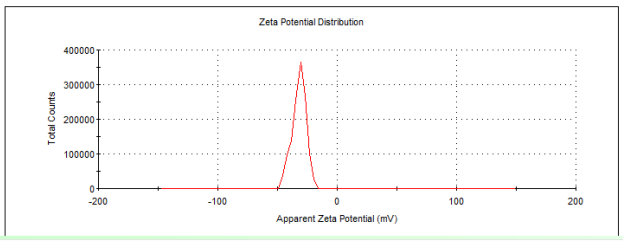
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -27,7	Peak 1: -27,7	100,0	7,42
Zeta Deviation (mV): 7,42	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0144	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -32,0	Peak 1: -32,0	100,0	5,78
Zeta Deviation (mV): 5,78	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0126	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

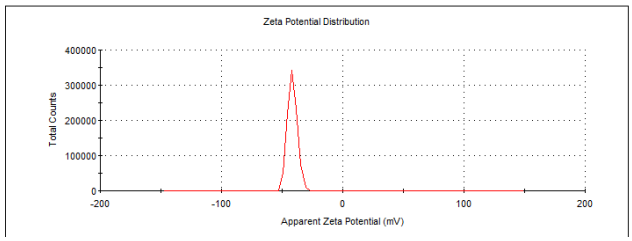
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 16: Z-δυναμικό πειράματος 4

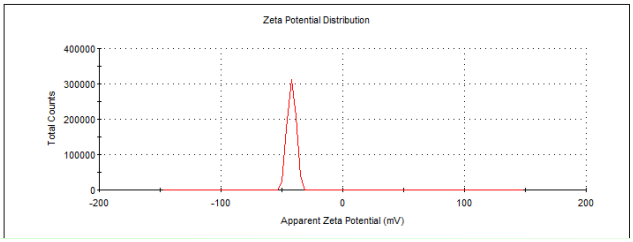
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -41,6	Peak 1: -41,6	100,0	3,94
Zeta Deviation (mV): 3,94	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0137	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



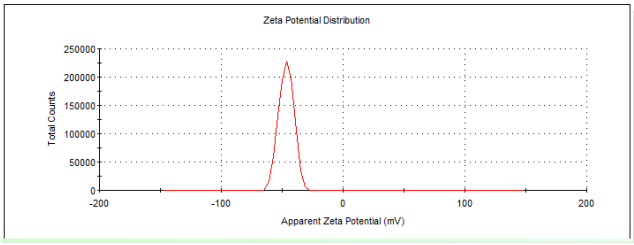
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -42,0	Peak 1: -42,0	100,0	3,42
Zeta Deviation (mV): 3,42	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0307	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



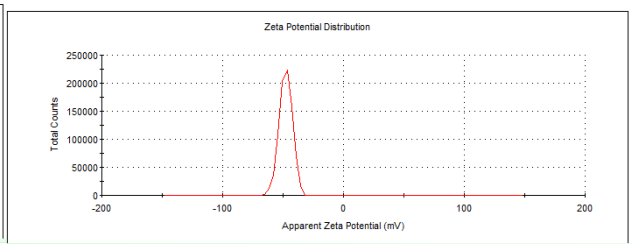
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -46,8	Peak 1: -46,8	100,0	6,01
Zeta Deviation (mV): 6,01	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0271	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -47,6	Peak 1: -47,6	100,0	5,42
Zeta Deviation (mV): 5,42	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00426	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

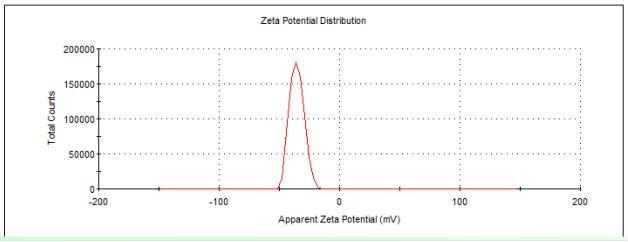
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 17: Z-δυναμικό πειράματος 5

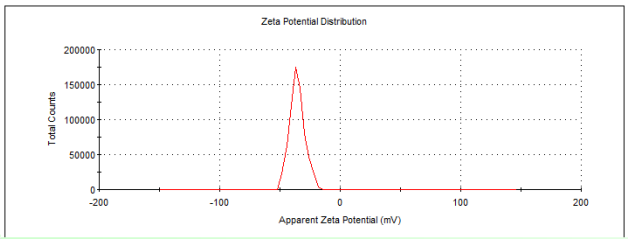
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -35,4	Peak 1: -35,4	100,0	5,82
Zeta Deviation (mV): 5,82	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0141	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



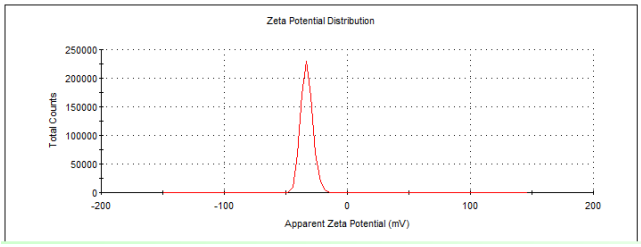
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -35,8	Peak 1: -35,8	100,0	6,14
Zeta Deviation (mV): 6,14	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00808	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



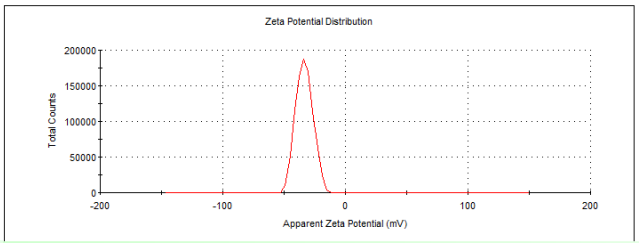
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -33,0	Peak 1: -33,0	100,0	4,81
Zeta Deviation (mV): 4,81	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00715	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -33,5	Peak 1: -33,5	100,0	6,74
Zeta Deviation (mV): 6,74	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0110	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

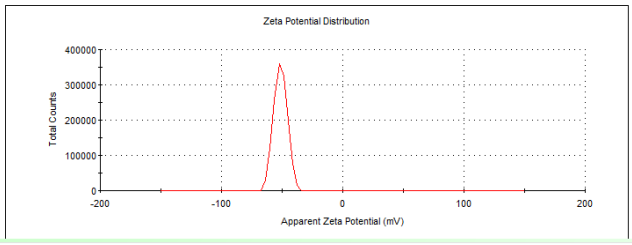
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 18: Z-δυναμικό πειράματος 6

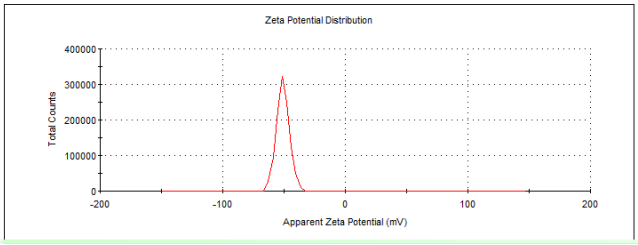
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -51,3	Peak 1: -51,3	100,0	5,47
Zeta Deviation (mV): 5,47	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0192	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



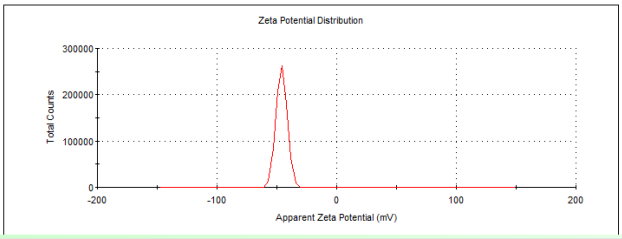
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -50,9	Peak 1: -50,9	100,0	5,24
Zeta Deviation (mV): 5,24	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0192	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



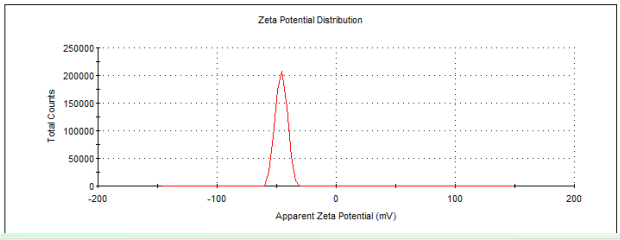
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -46,0	Peak 1: -46,0	100,0	4,48
Zeta Deviation (mV): 4,48	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0192	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -46,1	Peak 1: -46,1	100,0	4,84
Zeta Deviation (mV): 4,84	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0309	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

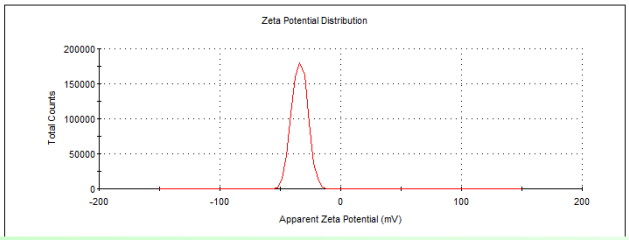
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 19: Z-δυναμικό πειράματος 7

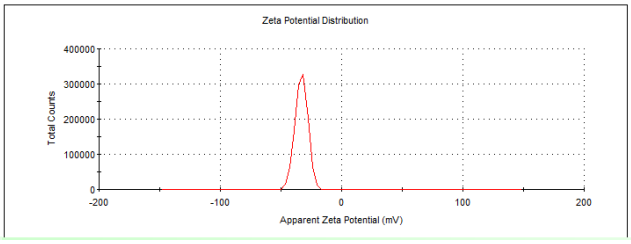
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -34,0	Peak 1: -34,0	100,0	6,45
Zeta Deviation (mV): 6,45	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0277	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



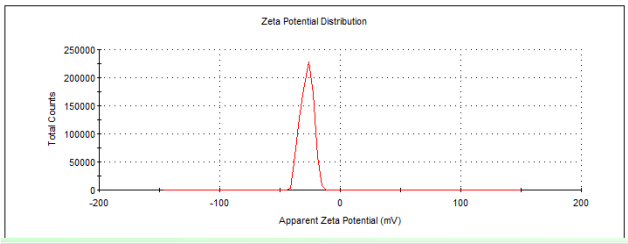
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -33,2	Peak 1: -33,2	100,0	5,07
Zeta Deviation (mV): 5,07	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00397	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



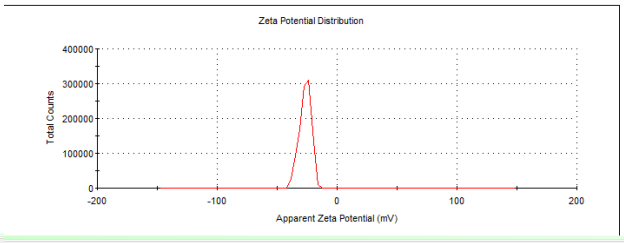
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -27,8	Peak 1: -27,8	100,0	5,26
Zeta Deviation (mV): 5,26	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00405	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -26,8	Peak 1: -26,8	100,0	4,80
Zeta Deviation (mV): 4,80	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0154	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

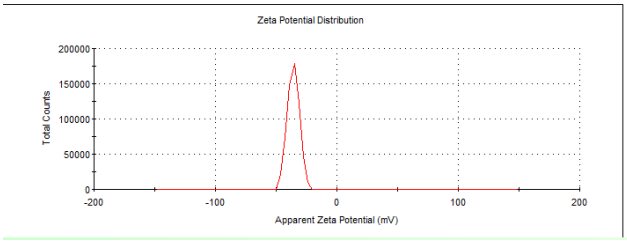
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 20: Z-δυναμικό πειράματος 8

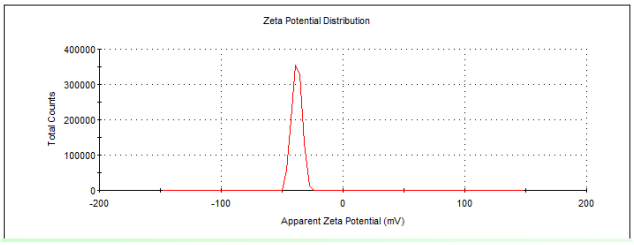
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -35,8	Peak 1: -35,8	100,0	4,88
Zeta Deviation (mV): 4,88	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0169	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



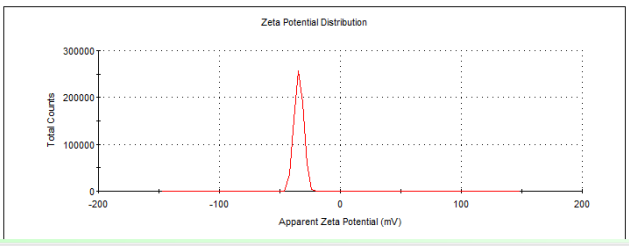
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -38,0	Peak 1: -38,0	100,0	4,13
Zeta Deviation (mV): 4,13	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00689	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



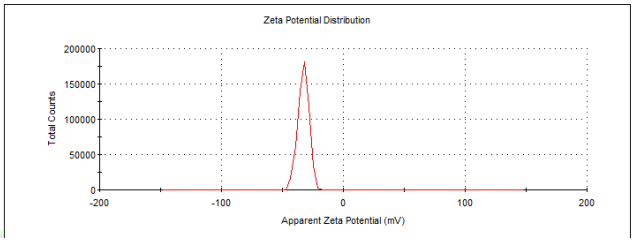
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -34,3	Peak 1: -34,3	100,0	3,87
Zeta Deviation (mV): 3,87	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00475	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -32,7	Peak 1: -32,7	100,0	4,45
Zeta Deviation (mV): 4,45	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00356	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

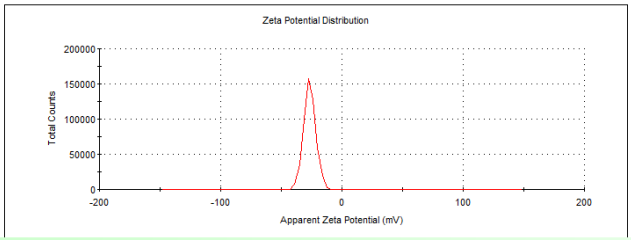
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 21: Z-δυναμικό πειράματος 9

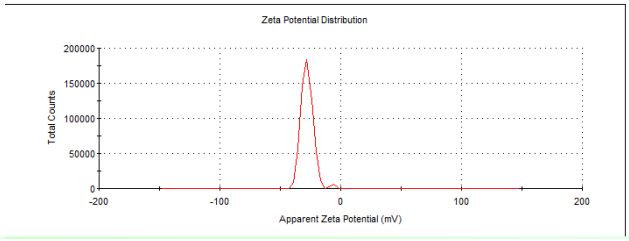
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -26,6	Peak 1:	-26,6	100,0	4,88
Zeta Deviation (mV): 4,88	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00637	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



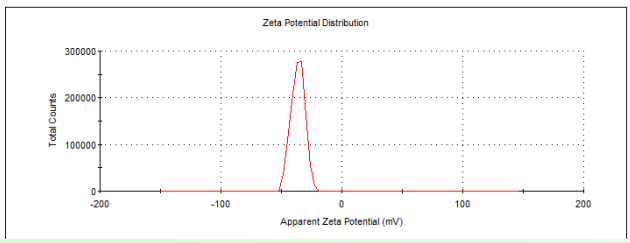
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -27,8	Peak 1:	-28,1	98,5	4,62
Zeta Deviation (mV): 5,30	Peak 2:	-6,39	1,5	1,60
Conductivity (mS/cm): 0,00898	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



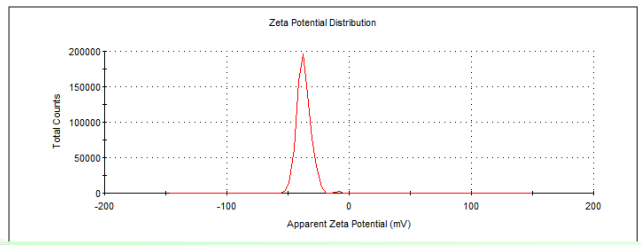
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -36,3	Peak 1:	-36,3	100,0	5,59
Zeta Deviation (mV): 5,59	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00495	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -37,0	Peak 1:	-37,1	99,6	5,46
Zeta Deviation (mV): 5,76	Peak 2:	-8,95	0,4	1,76
Conductivity (mS/cm): 0,0282	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

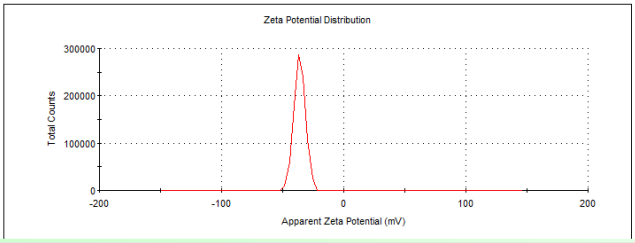
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 22: Z-δυναμικό πειράματος 10

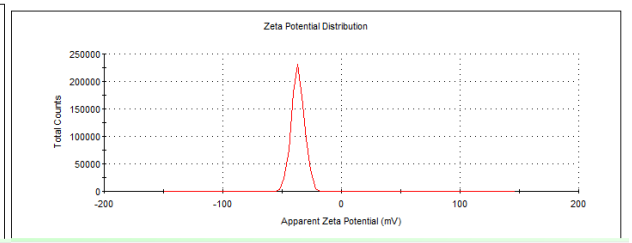
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -36,1	Peak 1:	-36,1	100,0	4,58
Zeta Deviation (mV): 4,58	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0110	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



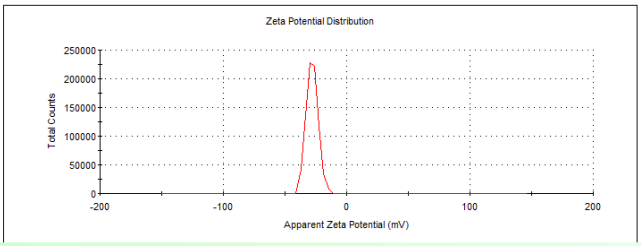
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -36,6	Peak 1:	-36,6	100,0	5,41
Zeta Deviation (mV): 5,41	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00445	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



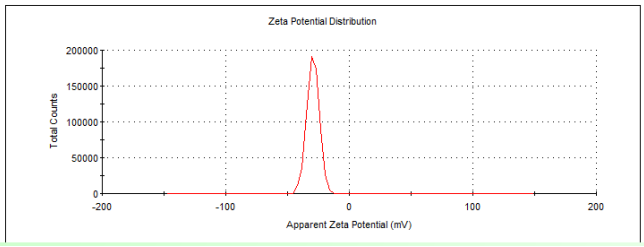
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -28,0	Peak 1: -28,0	100,0	4,73
Zeta Deviation (mV): 4,73	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00648	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -29,4	Peak 1: -29,4	100,0	4,94
Zeta Deviation (mV): 4,94	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00369	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

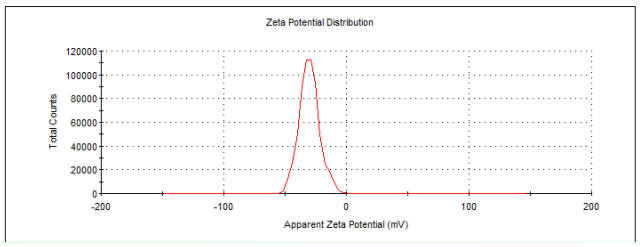
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 23: Z-δυναμικό πειράματος 11

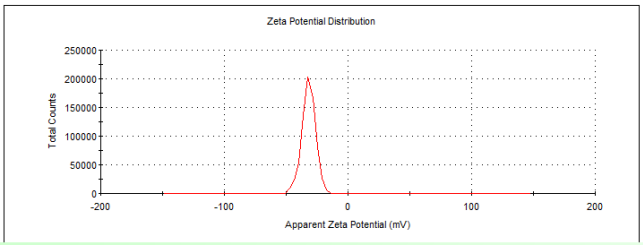
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -30,2	Peak 1: -30,2	100,0	8,12
Zeta Deviation (mV): 8,12	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0113	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



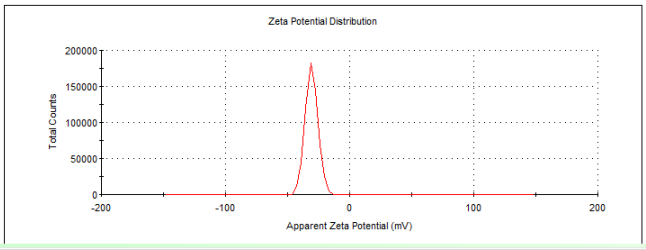
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -31,9	Peak 1: -31,9	100,0	5,51
Zeta Deviation (mV): 5,51	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00468	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



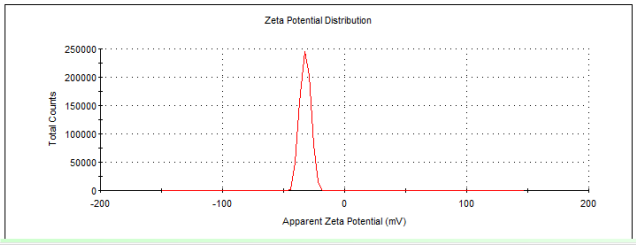
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -30,6	Peak 1: -30,6	100,0	5,04
Zeta Deviation (mV): 5,04	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0143	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



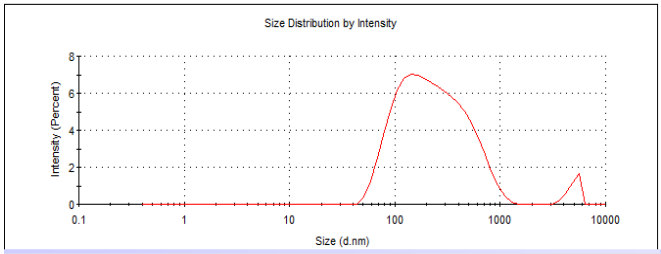
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -32,1	Peak 1: -32,1	100,0	4,32
Zeta Deviation (mV): 4,32	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0121	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

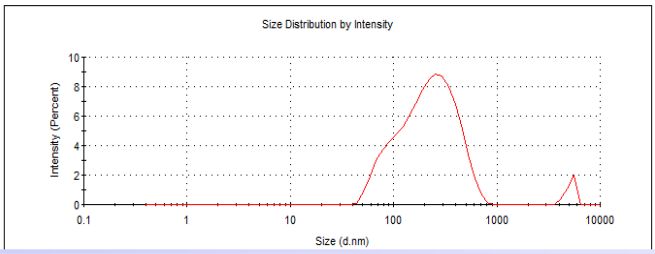


Διάγραμμα Π. 24: Z-δυναμικό πειράματος 12

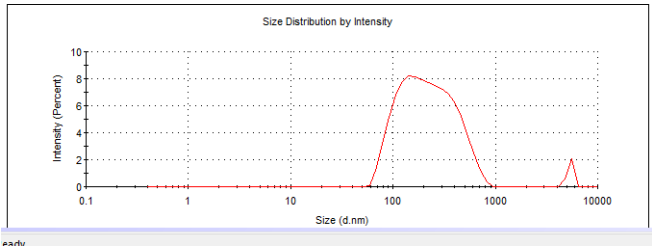
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 195,8	Peak 1:	278,0	96,4	204,5
PdI: 0,409	Peak 2:	4977	3,6	623,6
Intercept: 0,907	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



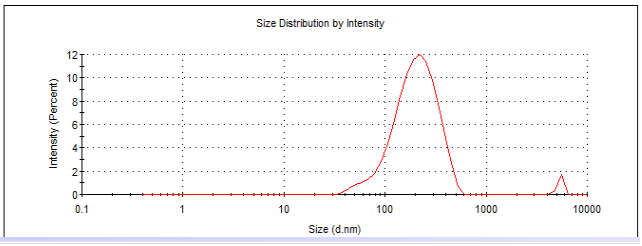
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 200,1	Peak 1:	244,3	96,7	139,9
PdI: 0,383	Peak 2:	5185	3,3	482,9
Intercept: 0,921	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 216,9	Peak 1:	249,2	97,4	149,3
PdI: 0,459	Peak 2:	5387	2,6	318,3
Intercept: 0,952	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

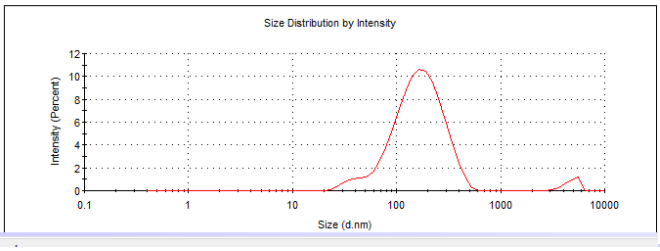


		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 214,9	Peak 1:	217,4	97,9	97,58
PdI: 0,400	Peak 2:	5448	2,1	269,1
Intercept: 0,932	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

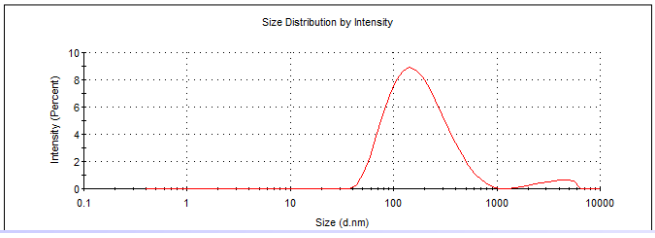


Διάγραμμα Π. 25: Μέση υδροδυναμική διάμετρος για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 12 ώρες

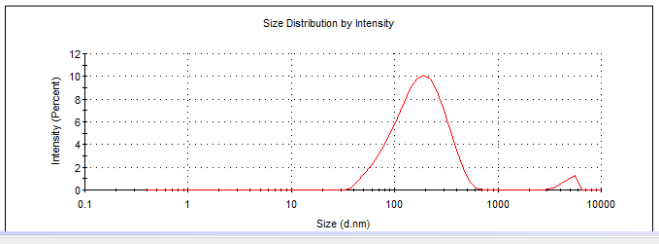
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 144,7	Peak 1:	178,0	97,0	90,95
PdI: 0,321	Peak 2:	4852	3,0	699,3
Intercept: 0,952	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



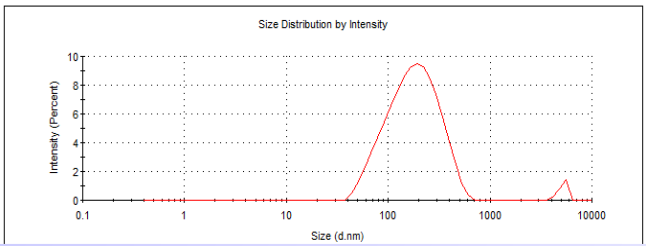
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 148,4	Peak 1:	197,8	96,0	131,7
PdI: 0,278	Peak 2:	3719	4,0	1153
Intercept: 0,947	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 159,2	Peak 1:	193,9	96,9	100,9
PdI: 0,300	Peak 2:	4854	3,1	697,8
Intercept: 0,951	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

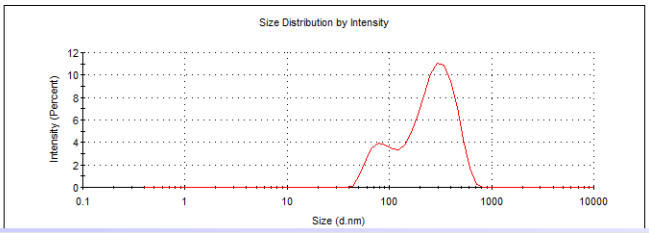


		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 164,0	Peak 1:	198,6	97,5	107,9
PdI: 0,329	Peak 2:	5178	2,5	486,7
Intercept: 0,961	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				

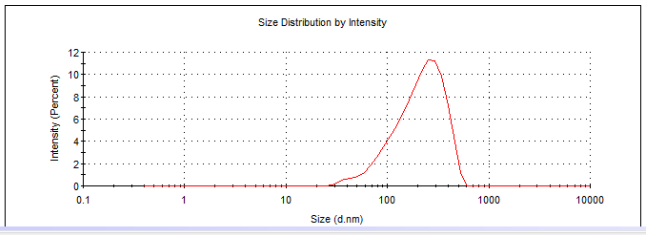


Διάγραμμα Π. 26: Μέση υδροδυναμική διάμετρος για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 24 ώρες

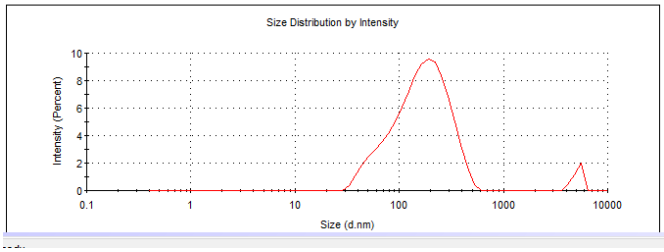
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 268,2	Peak 1:	304,7	79,0	119,5
PdI: 0,423	Peak 2:	86,34	21,0	22,04
Intercept: 0,890	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Refer to quality report				



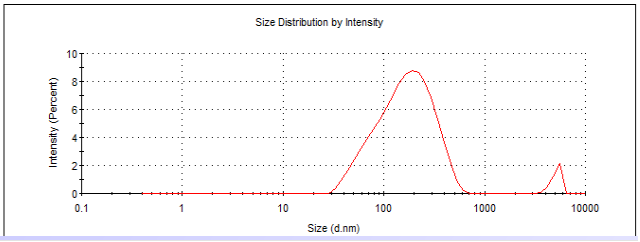
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 295,4	Peak 1:	230,6	100,0	110,6
PdI: 0,432	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,854	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Refer to quality report				



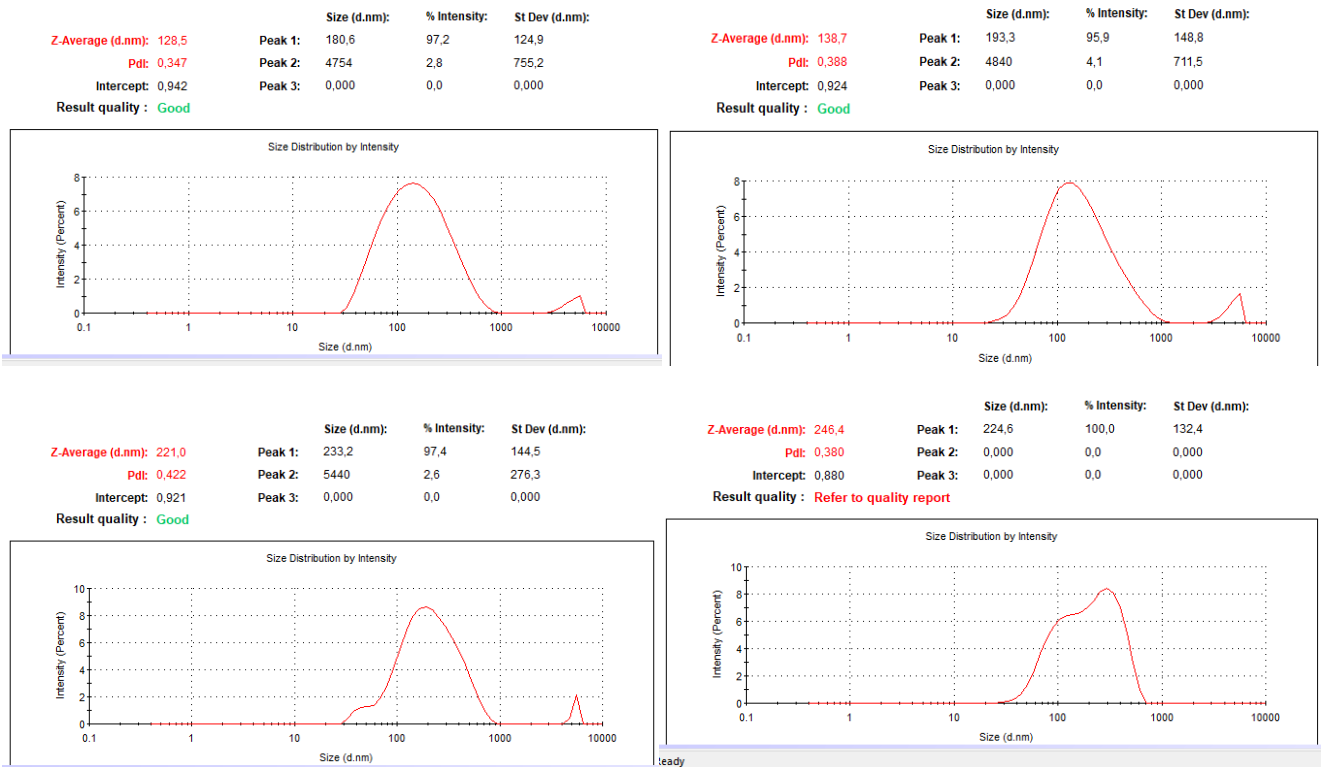
		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 151,5	Peak 1:	182,1	96,4	98,84
PdI: 0,373	Peak 2:	5134	3,6	520,5
Intercept: 0,949	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 154,0	Peak 1:	187,5	96,1	108,3
PdI: 0,389	Peak 2:	5125	3,9	529,4
Intercept: 0,938	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



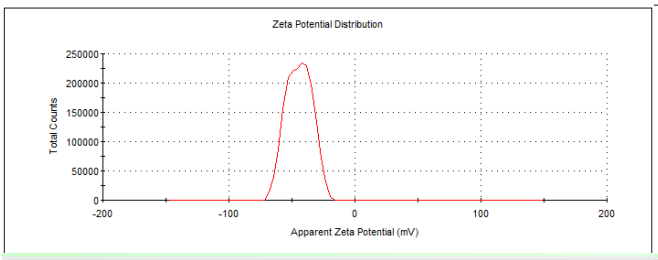
Διάγραμμα Π. 27: Μέση υδροδυναμική διάμετρος για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 48 ώρες



Διάγραμμα Π. 28: Μέση υδροδυναμική διάμετρος για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 72 ώρες

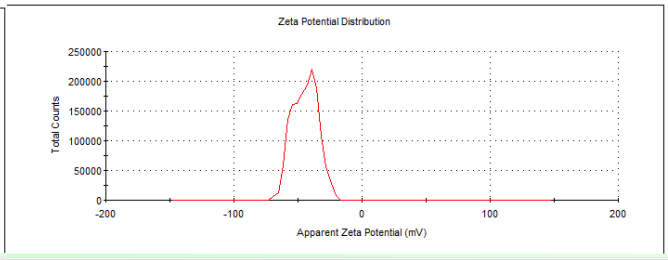
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -44,3	Peak 1:	-44,3	100,0	10,1
Zeta Deviation (mV): 10,1	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0266	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



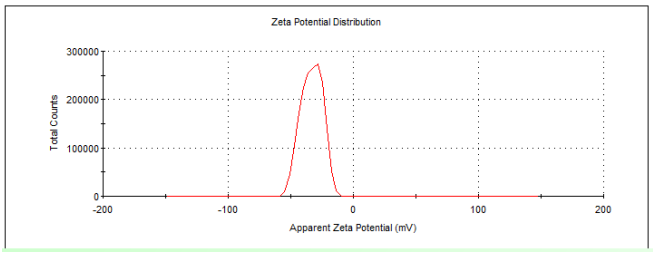
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -44,5	Peak 1:	-44,5	100,0	9,74
Zeta Deviation (mV): 9,74	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0172	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : See result quality report



		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -33,3	Peak 1:	-33,3	100,0	8,54
Zeta Deviation (mV): 8,54	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0222	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

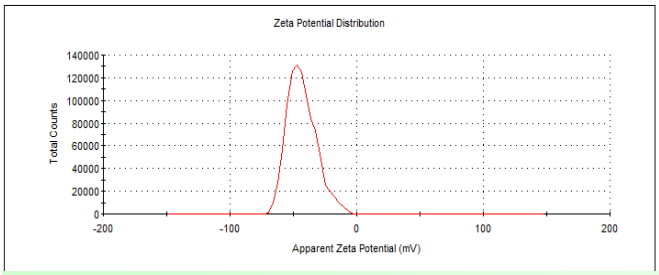
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 29: Z-δυναμικό για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 12 ώρες

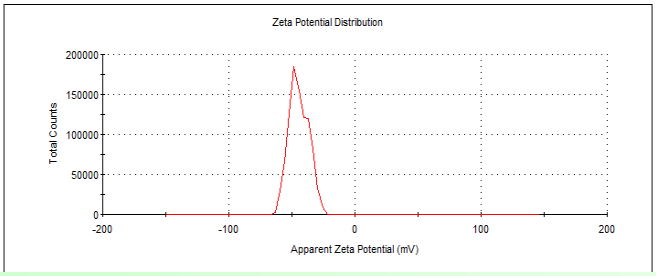
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -43,3	Peak 1:	-43,3	100,0	11,3
Zeta Deviation (mV): 11,3	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0217	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : See result quality report



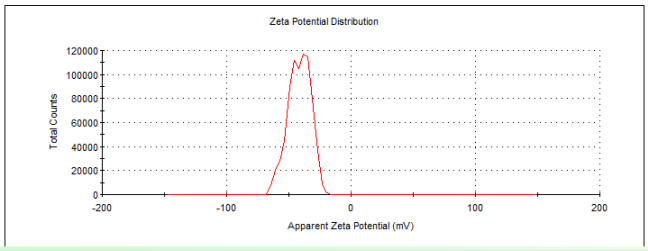
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -44,4	Peak 1:	-44,4	100,0	7,68
Zeta Deviation (mV): 7,68	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0162	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



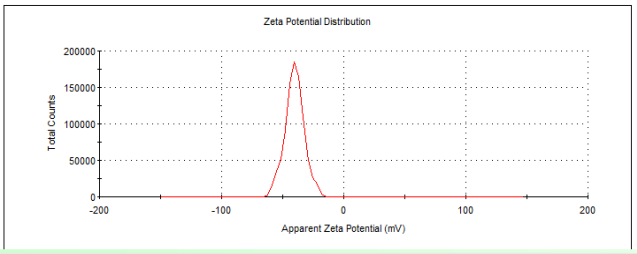
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -41,7	Peak 1:	-35,8	53,2	4,99
Zeta Deviation (mV): 8,84	Peak 2:	-48,5	46,8	5,76
Conductivity (mS/cm): 0,0223	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -40,3	Peak 1:	-40,3	100,0	7,82
Zeta Deviation (mV): 7,82	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00841	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

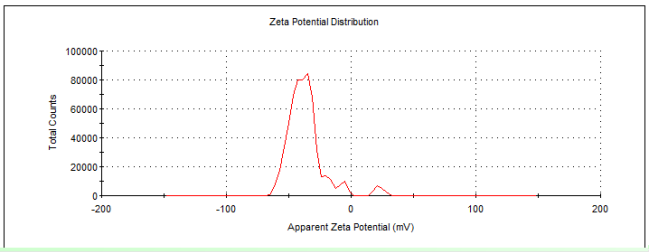
Result quality : Good



Διάγραμμα Π. 30: Z-δυναμικό για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 24 ώρες

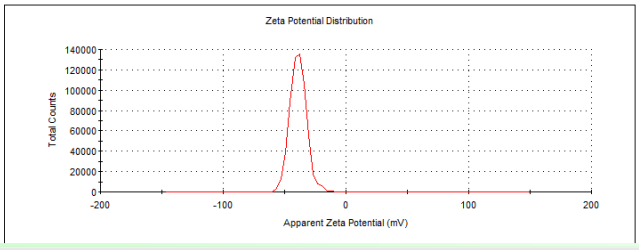
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -36,5	Peak 1:	-45,9	48,0	5,94
Zeta Deviation (mV): 15,3	Peak 2:	-33,9	39,6	4,30
Conductivity (mS/cm): 0,00716	Peak 3:	-19,4	6,2	3,73

Result quality : See result quality report



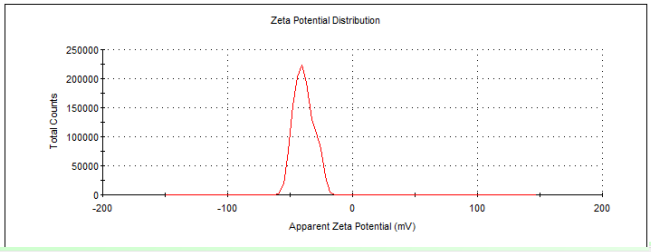
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -38,7	Peak 1:	-38,7	100,0	6,66
Zeta Deviation (mV): 6,66	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00779	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



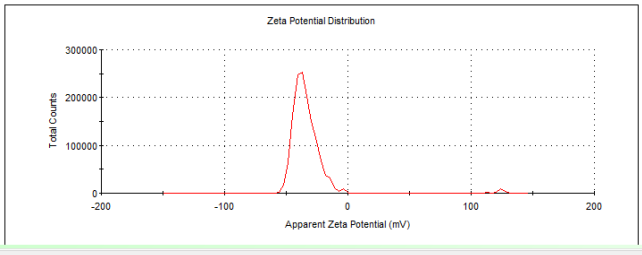
		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -39,0	Peak 1:	-39,0	100,0	8,01
Zeta Deviation (mV): 8,01	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00673	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

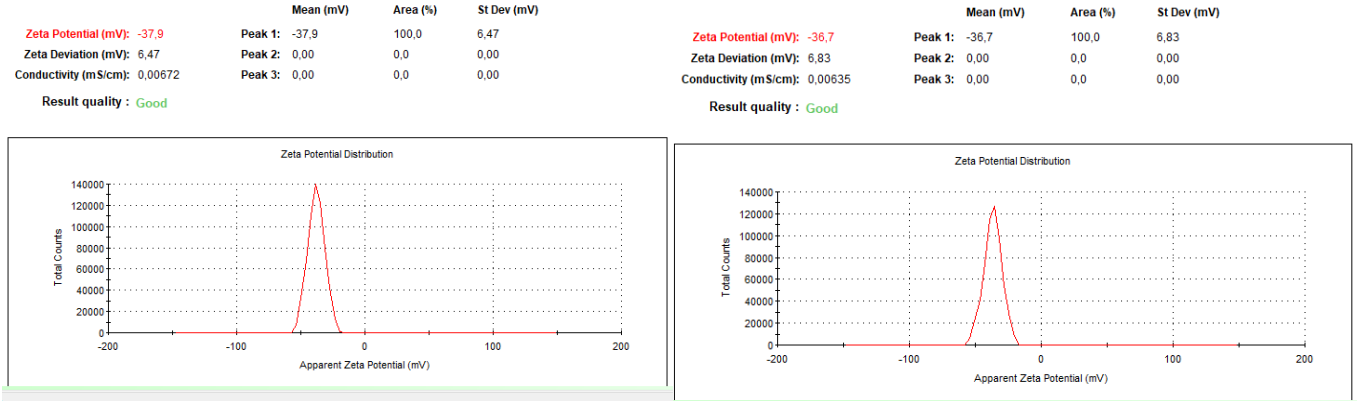


		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -32,7	Peak 1:	-34,9	97,7	8,58
Zeta Deviation (mV): 19,7	Peak 2:	125	1,1	2,59
Conductivity (mS/cm): 0,00967	Peak 3:	-4,49	1,0	1,73

Result quality : See result quality report



Διάγραμμα Π. 31: Z-δυναμικό για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 48 ώρες



Διάγραμμα Π. 32: Z-δυναμικό για χρόνο αντίδρασης σύνθεσης AgNPs 72 ώρες