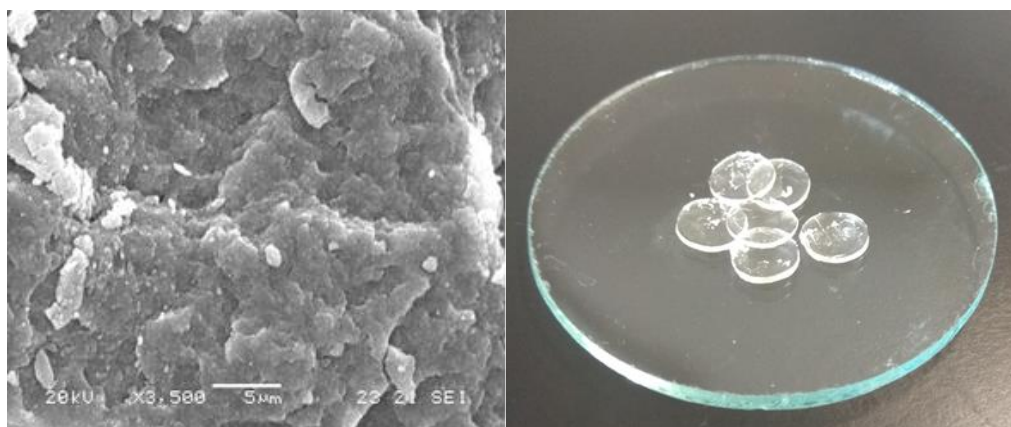




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)  
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ  
ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ**



**ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΡΑΠΤΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**

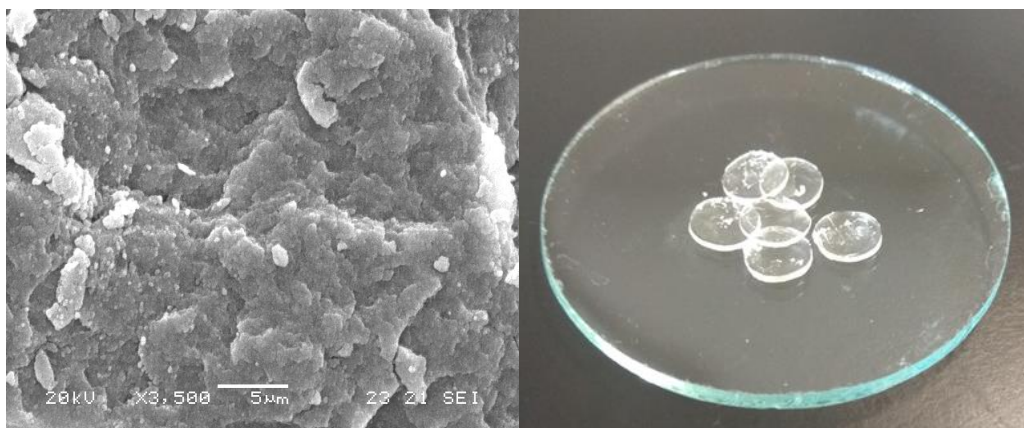




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)  
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ  
ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ**



**ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΡΑΠΤΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**



«Υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνεΚ) (κωδικός έργου: Τ1ΕΔΚ-02990)»





**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)  
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»  
του κ. Παναγιώτη Ράπτη**

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: κ. Σωτήριος Χατζηκακού

Θέμα: «Ανάπτυξη νέων αντιμικροβικών νανοσωματιδίων αργύρου από φυσικά προϊόντα και εφαρμογές τους»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.: ...<sup>Α</sup>/...-...-.....

- 1 Καθηγητής Σωτήριος Χατζηκακού
- 2 Καθηγητής Αθανάσιος Κουτσολέλος
- 3 Αναπλ. Καθηγητής Νικόλαος Κουρκουμέλης

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις \_\_\_\_\_

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.  
Καθηγητής \_\_\_\_\_

Ο/Η Γραμματέας  
\_\_\_\_\_

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ανόργανης χημείας του Τμήματος Χημείας στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ» .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας κύριο Χατζηκακού Σωτήριο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας και υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ», για την σωστή καθοδήγηση, την πολύτιμη βοήθεια και την συνεχή στήριξη που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της εργασίας, τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και κατά τη διάρκεια της συγγραφής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Χριστίνα Μπαντή μεταδιδάκτορα Βιολογίας του μεταπτυχιακού προγράμματος για την καθοδήγηση και την βοήθεια που μου παρείχε τόσο στα βιολογικά πειράματα καθώς και σε ότι άλλο χρειάστηκα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια, την πολύ καλή συνεργασία καθώς και το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την συνεχή υποστήριξή τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτελεί η σύνθεση αντιμικροβιακών νανοσωματιδίων αργύρου από φυσικά προϊόντα, οι εφαρμογές τους και η βιολογική μελέτη τους. Η σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) πραγματοποιήθηκε μέσω μιας εναλλακτικής, φιλικής προς το περιβάλλον και ασφαλούς διαδικασίας αφού σε σχέση με τις συμβατικές συνθέσεις των χημικών μεθόδων αποφεύγεται η χρήση και η παραγωγή τοξικών ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, εκχύλισμα χαμομηλιού χρησιμοποιήθηκε για την βιοσύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου δρώντας ως αναγωγικό και σταθεροποιητικό μέσο, αποφεύγοντας τα μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν. Στη συνέχεια τα νανοσωματίδια αργύρου ενσωματώθηκαν σε μήτρα υδρογέλης HEMA / PEGDA για την παρασκευή στείων φακών επαφής.

Ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) επιβεβαιώθηκε από το φάσμα απορρόφησης ορατού υπεριώδους UV-VIS. Η δομή των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) αναλύθηκε με την τεχνική περίθλαση ακτίνων X (XRD) ενώ η στοιχειακή και ποσοτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική φθορισμού ακτίνων X (XRF). Η παρουσία των βιομορίων του φυτικού εκχυλίσματος, που είναι υπεύθυνα για την αναγωγή και σταθεροποίηση των AgNPs, στην επιφάνειά τους επιβεβαιώθηκε με την φασματοσκοπία υπέρυθρου FTIR. Επίσης πραγματοποιήθηκε θερμική ανάλυση των νανοσωματιδίων και μέτρηση του μεγέθους τους με την τεχνική δυναμικής σκέδασης του φωτός (DLS) και SEM. Στη συνέχεια έγινε ο χαρακτηρισμός του νανοςύνθετου υλικού pHEMA@AgNPs και του φακού υδρογέλης HEMA / EGDMA και η σύγκριση μεταξύ τους. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι FTIR, UV-VIS στερεάς κατάστασης, θερμική ανάλυση TGA, XRD, και XRF από όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία των νανοσωματιδίων στο νανοςύνθετο υλικό και επομένως η σύνθεσή του.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν βιολογικά πειράματα των νανοσωματιδίων αργύρου και του νανοςύνθετου υλικού pHEMA@AgNPs. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των AgNPs και του pHEMA@AgNPs μελετήθηκαν στα βακτήρια *PAOI*, *E.COLI*, *S.AUREUS* και *S.EPIDERMIDI*, ενώ εξετάστηκε η τοξικότητα των υλικών σε ανθρώπινα κύτταρα του κερατοειδούς χιτώνα HCEC.





## ABSTRACT

The subject of this postgraduate thesis is the synthesis of silver nanoparticles by natural products with antimicrobials properties, their applications and their biological study. The synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) was carried out through an alternative, environmentally friendly and safe process compared to conventional chemical compositions, the use and production of toxic substances is avoided. Chamomile extract was used for the biosynthesis of silver nanoparticles acting as a reducing and stabilizing agent. Subsequently, silver nanoparticles were incorporated into a HEMA / PEGDA hydrogel matrix to make sterile contact lenses.

The formation of silver nanoparticles (AgNPs) was confirmed by the UV-VIS absorption spectrum. The structure of silver nanoparticles (AgNPs) was analyzed by X-ray diffraction (XRD) while elemental and quantitative analysis was performed by X-ray fluorescence (XRF). The presence of plant extract biomolecules, which are responsible for the reduction and stabilization of AgNPs on their surface, was confirmed by FTIR infrared spectroscopy. Thermal stability in relative to weight of the biosynthesized silver nanoparticles was assessed using Thermogravimetry (TGA) and the effective diameter of AgNPs was determined with the dynamic light scattering (DLS) and SEM. The pMEMA@AgNPs nanocomposite and the HEMA / PEGDA hydrogel were characterized by FTIR, TGA, XRD, XRF, solid state UV-VIS methods.

Biological experiments of silver nanoparticles and pHEMA@AgNPs nanocomposite material were performed. The antimicrobial properties of AgNPs and pHEMA@AgNPs were studied in the bacteria *PAO1*, *E.COLI*, *S.AUREUS* and *S.EPIDERMIDIS*, while the toxicity of the materials in human cells of the cornea HCEC was examined.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	-14-
1. NANOTEΧΝΟΛΟΓΙΑ.....	-14-
1.1 Εισαγωγή.....	-14-
1.2 Νανοσωματίδια.....	-17-
1.2.1 Ιδιότητες νανοσωματιδίων.....	-18-
2. Άργυρος.....	-21-
2.1 Αντιμικροβιακές ιδιότητες.....	-21-
2.2 Νανοσωματίδια Αργύρου (AgNPs).....	-22-
2.2.1 Αντιμικροβιακές ιδιότητες νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs).....	-24-
3. Σύνθεση Νανοσωματιδίων.....	-27-
3.1 Βιοσύνθεση νανοσωματιδίων από εκχυλίσματα φυτών.....	-29-
3.2 Χαμομήλι.....	-32-
3.2.1 Βιοδραστικά συστατικά χαμομηλιού.....	-33-
4. Σύνθετα υλικά- Εισαγωγή.....	-35-
4.1 Νανοσύνθετα υλικά πολυμερικής μήτρας.....	-36-
4.1.1 pHEMA.....	-36-
4.1.2 Μέθοδοι πολυμερισμού pHEMA.....	-37-
4.1.3 Εφαρμογές pHEMA.....	-39-
<b>B. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b> .....	-42-
<b>Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	-43-
<b>1. Χημικό μέρος</b> .....	-43-

1.1 Εκχύλιση χαμομηλιού.....	-44-
1.2 Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) με εκχύλιμα χαμομηλιού.....	-44-
1.3 Σύνθεση φακού επαφής υδρογέλης pHEMA και νανοσύνθετου φακού pHEMA@AgNPs.....	-45-
<b>2. Βιολογικό μέρος.....</b>	<b>-50-</b>
2.1 Αντιμικροβιακή δράση.....	-50-
2.1.1 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) .....	-51-
2.1.2 Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) .....	-51-
2.1.3 Ζώνη Αναστολής - IZ.....	-52-
2.1.4 Ποσοστό βακτηριακής βιωσιμότητας.....	-52-
2.2 Τοξικότητα Human Corneal Eukaryotic Cells (HCEC).....	-52-
<b>Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>-55-</b>
<b>1. Χημικό μέρος.....</b>	<b>-55-</b>
1.1 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs.....	-55-
1.2 Χαρακτηρισμός pHEMA και pHEMA@AgNPs - 1&2.....	-64-
<b>2. Βιολογικό μέρος.....</b>	<b>-74-</b>
2.1 Αντιμικροβιακή μελέτη.....	-74-
2.1.1 MIC AgNPs.....	-74-
2.1.2 Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) AgNPs.....	-79-
2.1.3 Ζώνη αναστολής (IZ) AgNPs.....	-80-
2.2 Αντιμικροβιακή μελέτη υδρογελών pHEMA@AgNPs 1&2.....	-82-
2.3 Μελέτη τοξικότητας για AgNPs και pHEMA@AgNPs-1&2.....	-86-

<b>Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>-87-</b>
<b>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>-88-</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....</b>	<b>-96-</b>

.

## Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

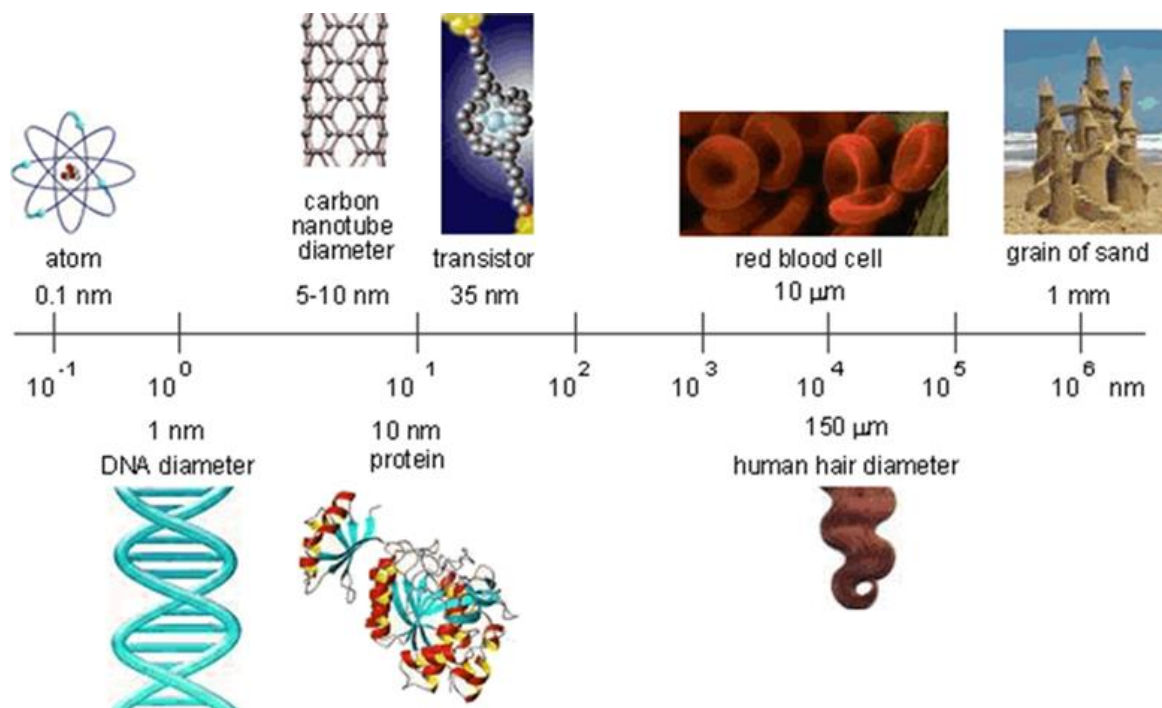
### 1. NANOTEΧΝΟΛΟΓΙΑ

#### 1.1 Εισαγωγή

Ως νανοτεχνολογία ορίζεται η επιστήμη που περιγράφει τη δημιουργία και χρήση λειτουργικών δομών με έλεγχο της ύλης σε ατομικό και μοριακό επίπεδο, στη κλίμακα των νανομέτρων, που κυμαίνεται μεταξύ 1 και 100 νανομέτρων. Έτσι, ο όρος είναι πολύ γενικός, παρουσιάζει μεγάλη ευρύτητα και μπορεί να χωριστεί σε πιο ειδικά θέματα όπως αυτό των νανοϋλικών, της νανοηλεκτρονικής καθώς και άλλων. Επομένως, η νανοτεχνολογία είναι η μελέτη και η χρήση δομών πολύ μικρών διαστάσεων με εφαρμογές σε πολλά επιστημονικά πεδία, όπως η φυσική, η χημεία, η επιστήμη των υλικών, η ιατρική και οι μηχανικές επιστήμες [1].

Μονάδα μέτρησης του μήκους είναι το νανόμετρο (nm), περιέχει το πρόθεμα "νάνος" που δίνει τη σημασία του πολύ μικρού και αντιστοιχεί στο ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου ( $10^{-9}$  m). Για να αντιληφθεί κανείς το μέγεθος των διαστάσεων, αναφέρεται πώς ένα νανόμετρο ισούται με την ακτίνα της διπλής έλικας του DNA ή με το 1/80000 της ανθρώπινης τρίχας [2]. Στις διαστάσεις αυτές ασυνήθιστα φυσικο / χημικά και βιολογικά φαινόμενα αναδεικνύονται και οι ιδιότητες διαφέρουν σε σχέση με τα υλικά όγκου. Στην εικόνα 1 φαίνεται η σύγκριση μεγέθους του νανόμετρου σε σχέση με άλλες τάξεις μεγεθών.

Η νανοτεχνολογία τα τελευταία χρόνια βρίσκει μεγάλη ανάπτυξη και αποτελεί μια από τις πιο υποσχόμενες τεχνολογίες, παρόλα αυτά δεν αποτελεί ένα εντελώς νέο επιστημονικό πεδίο. Η μελέτη του ανθρώπινου πολιτισμού αποκαλύπτει ότι σε διάφορες εποχές λαοί έχουν χρησιμοποιήσει νανοτεχνολογία χωρίς να γνωρίζουν το θεωρητικό υπόβαθρο και τα φυσικά φαινόμενα για να το ερμηνεύσουν.



Εικόνα 1. Σύγκριση τάξεων μεγεθών

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα παραδείγματα είναι ένα ποτήρι του 4<sup>ου</sup> αιώνα μ.Χ από τους Ρωμαίους. Το κύπελλο του Λυκούργου (εικόνα 2) αποτελεί διχρωματικό γυαλί, καθώς ανάλογα με την γωνία που πέφτει το φως πάνω του αλλάζει το χρώμα του και αναγνωρίζεται ως ένα από τα παλαιότερα συνθετικά νανοϋλικά. Η αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες οφείλεται στην παρουσία νανοσωματιδίων χρυσού [3]. Ένα άλλο παράδειγμα είναι τα βιτρώ παράθυρα μεσαιωνικής εκκλησίας που λάμπουν φωτεινά κόκκινα και κίτρινα χρώματα εξαιτίας παρουσίας νανοσωματιδίων αργύρου και χρυσού στο γυαλί. Σήμερα είναι γνωστό ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων επηρεάζει τις οπτικές ιδιότητές τους.

Στην σύγχρονη εποχή, υπήρξε μια πρόοδος στη νανοτεχνολογία από τις πρώτες ιδέες του Richard Feynman, όμως ταχεία πρόοδος συνέβη με την ανάπτυξη του κατάλληλου εξοπλισμού για το χαρακτηρισμό και τον χειρισμό των δομών σε αυτές τις διαστάσεις, συγκεκριμένα με την εφεύρεση του AFM (Μικροσκόπια Σάρωσης Ατομικής Δύναμης) και στη συνέχεια τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRTEM) και άλλες σημαντικές τεχνικές (σκέδαση νετρονίων και ακτίνων-x σε μικρές γωνίες, NMR κλπ) [5].



Εικόνα 2. Το κύπελλο του Λυκούργου [4]

Η νανοτεχνολογία παράγεται διάφορους τύπους υλικών σε επίπεδο νανοκλίμακας, τα νανοϋλικά.. Σύμφωνα με τις διαστάσεις που καταλαμβάνουν στο χώρο μπορούν να διαχωριστούν σε υλικά 0-D, 1-D, 2-D και 3-D. Με κατάλληλη επεξεργασία ένα υλικό με τις τρεις διαστάσεις του στη μακροκλίμακα, μπορεί να μειωθεί κατά πολύ το μέγεθος σε μια συγκεκριμένη διάσταση και έτσι το πάχος του να φτάσει κάτω από τα 100 nm. Σε αυτή τη περίπτωση, το υλικό θεωρείται δύο διαστάσεων 2-D όπως για παράδειγμα τα λεπτά υμένια με πάχος μέχρι 100 nm. Αντίστοιχα, με σμίκρυνση σε ακόμα μία διάσταση πάμε σε υλικά μονοδιάστατα 1-D, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα, ενώ όταν και η τρίτη διάσταση φτάνει στην νανοκλίμακα το υλικό καλείται αδιάστατο 0-D όπως οι κβαντικές τελείες. Τα νανοσωματίδια αποτελούν μια ευρεία κατηγορία υλικών που περιλαμβάνουν ουσίες σωματιδίων με διάμετρο μεταξύ 1 και 100 νανομέτρων [6]. Η σπουδαιότητα των νανοσωματιδίων έγινε αντιληπτή όταν ερευνητές ανακάλυψαν πως το μέγεθος τους μπορεί να επηρεάσει τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με τα νανοσωματίδια.



## 1.2 Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια είναι μια εξαιρετικά λεπτή δομή όπου οι διαστάσεις τους μετρούνται σε νανόμετρα (nm). Ο διεθνής οργανισμός τυποποίησης (ISO) το 2008 όρισε ως νανοσωματίδιο κάθε σωματίδιο με όλες τις διαστάσεις του να βρίσκονται κάτω των 100 nm [6], ωστόσο το IUPAC το 2012 έδωσε ένα πιο ευρύ ορισμό όπου ένα νανοσωματίδιο χρειάζεται μία από τις χαρακτηριστικές του διαστάσεις μεταξύ 1 και 100 nm, έστω και εάν οι υπόλοιπες διαστάσεις είναι εκτός αυτής της περιοχής [7]. Τα νανοσωματίδια που είναι άμορφα χωρίς καμία ομοιογένεια ως προς το σχήμα και το μέγεθός τους αναφέρονται και ως νανοσκόνη, ενώ αυτά που έχουν κρυσταλλική ατομική δομή νανοκρύσταλλοι.

Παρουσιάζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς αποτελούν γέφυρα μεταξύ των υλικών όγκου (bulk materials) και των ατομικών ή μοριακών δομών. Οι φυσικές ιδιότητες ενός υλικού όγκου πρέπει είναι σταθερές και ανεξάρτητες του μεγέθους του. Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων δε συμβαίνει το ίδιο. Εντός αυτού του εύρους τιμών μεγέθους, όλες οι ιδιότητες των μεμονωμένων / ατόμων / μορίων αλλάζουν κατά θεμελιώδη τρόπο παρουσιάζοντας εντελώς νέες και βελτιωμένες ιδιότητες που οφείλονται κυρίως στο μέγεθός τους, τη διανομή τους και στην μορφολογία τους. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων στην επιφάνειά τους, προσδίδοντάς τους υψηλή ενεργή επιφάνεια για κάθε είδους αλληλεπίδραση, φυσική, χημική ή βιολογική [8]. Σε γενικές γραμμές, οι ενδιαφέρουσες ιδιότητες και τα πλεονεκτικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων είναι :

- Υψηλές αναλογίες επιφάνειας προς όγκο, που παρέχουν μεγάλο αριθμό περιοχών ανά μονάδα θέσεων συγκριτικά με τα αντίστοιχα μακροσκοπικά υλικά "όγκου" (bulk) [9]
- Υψηλότερο ζ-δυναμικό, αποτρέποντας την συσσωμάτωση νανοσυστημάτων σε διάλυμα [10]
- Πιθανός διαχωρισμός και δυνατότητα ανακύκλωσης, μειώνοντας την πιθανότητα μόλυνσης του καταλύτη με το προϊόν, καθιστώντας τα οικονομικά αποδοτικά [11]

Επίσης, έχει διαπιστωθεί πως το μικροσκοπικό μέγεθός τους, τους προσδίδει μη αναμενόμενες οπτικές ιδιότητες και υπό συνθήκες παράγουν κβαντικά φαινόμενα. Μεταβολή του μεγέθους, του σχήματος και της συγκέντρωσης του μετάλλου, επηρεάζει τις ιδιότητες απορρόφησης των νανοσωματιδίων και παρατηρούνται διαφορετικά χρώματα απορρόφησης. Για παράδειγμα, νανοσωματίδια χρυσού 20 nm παρουσιάζουν σκούρο κόκκινο χρώμα, λευκόχρυσου κίτρινο γκρι και του αργύρου μαύρο και σκούρο μαύρο χρώμα [8].

### 1.2.1 Ιδιότητες νανοσωματιδίων

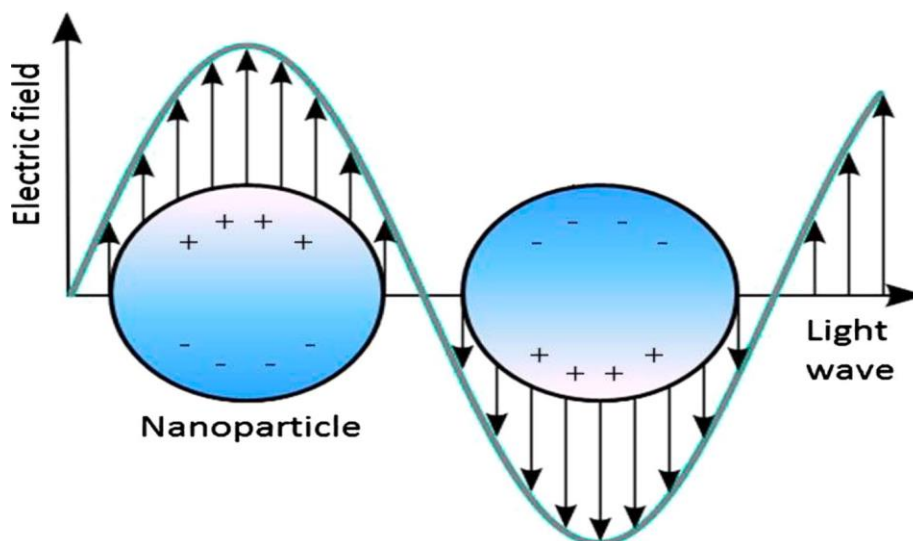
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες όπως μεγάλη επιφάνεια, οπτικώς ενεργά και χημική δραστηριότητα καθιστούν τα νανοσωματίδια μοναδικά και ιδανικά για διάφορες εφαρμογές. Μερικές σημαντικές ιδιότητες αναφέρονται.

- ο Ηλεκτρονικές και οπτικές ιδιότητες

Οι ηλεκτρονικές και οπτικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων είναι αλληλένδετες σε μεγάλο βαθμό. Τα ευγενή μέταλλα έχουν οπτικές ιδιότητες εξαρτώμενες από το μέγεθος εμφανίζοντας ισχυρή ζώνη απορρόφησης στο φάσμα ορατού που δεν υπάρχει στο αντίστοιχο φάσμα του χύδην μετάλλου. Αυτή η ζώνη διέγερσης προκύπτει επειδή τα ηλεκτρόνια αγωγιμότητας στην επιφάνεια του μετάλλου υφίστανται συλλογική ταλάντωση όταν διεγείρονται από το φως σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, γνωστή ως συντονισμός επιφανειακού πλασμονίου (Surface Plasmon Resonance, SPR), όπου αυτή η ταλάντωση έχει ως αποτέλεσμα ασυνήθιστα ισχυρές ιδιότητες σκέδασης και απορρόφησης. Έχει αποδειχθεί ότι το μέγιστο μήκος κύματος του SPR εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και τις διηλεκτρικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων.

Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια στην επιφάνεια των μεταλλικών νανοσωματιδίων (d ηλεκτρόνια σε άργυρο και χρυσό) μεταφέρονται ελεύθερα μέσω του νανοϋλικού. Το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μπορεί να είναι μεγαλύτερο από το μέγεθος των νανοσωματιδίων κάτι που δεν συμβαίνει με τα χύδην υλικά μακροσκοπικών διαστάσεων, όπου δεν αναμένεται σκέδαση.

Έτσι, τα νανοσωματίδια τίθενται σε συνθήκες μόνιμου συντονισμού το οποίο είναι υπεύθυνο για το SPR [12].



Εικόνα 3. Συντονισμός επιφανειακού πλασμονίου όπου τα ελεύθερα ηλεκτρόνια στο μεταλλικό νανοσωματίδιο ταλαντώνονται λόγω ισχυρής σύζευξης με συγκεκριμένο μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός[12]

- Μαγνητικές ιδιότητες

Οι μαγνητικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων αποτελούν αντικείμενο μελέτης για τους επιστήμονες πολλών κλάδων που περιλαμβάνουν ετερογενή και ομογενή κατάλυση, βιοϊατρική, μαγνητικά υγρά, MRI. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται πως τα νανοσωματίδια αποδίδουν καλύτερα όταν το μέγεθος έχει την κρίσιμη τιμή 10-20 nm [13]. Η άνιση κατανομή των ηλεκτρονίων οδηγεί σε μαγνητικές ιδιότητες, οι οποίες εξαρτώνται επίσης από το πρωτόκολλο σύνθεσης και τις διάφορες συνθετικές μεθόδους [14].

- Δραστικότητα

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως είναι η μεγάλη περιεκτικότητα ατόμων επιφάνειας σε σχέση με άτομα όγκου, που έχει σαν αποτέλεσμα να ενισχύονται σε αυτά οι επιφανειακές αντιδράσεις. Επιπλέον, αφού και η ηλεκτρονική δομή τους

εξαρτάται από το μέγεθός τους έτσι και η δραστικότητά τους. Όσο μικρότερο μέγεθος έχουν τα νανοσωματίδια τόσο πιο δραστικά είναι.

## 2. Άργυρος

Ο άργυρος είναι ένα βαρύ, μαλακό μέταλλο με έντονη μεταλλική λάμψη και αποτελεί ένα από τα 8 ευγενή μέταλλα. Το ασήμι είναι ένα από τα πρώτα μέταλλα που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος και είναι γνωστό ήδη από τη προϊστορική εποχή στις περιοχές της μέσης ανατολής, του ελλαδικού χώρου, της Μεσοποταμίας και της Αιγύπτου. Έχει τη μεγαλύτερη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα καθώς και τη μεγαλύτερη ανακλαστικότητα στο ορατό φάσμα, από όλα τα χημικά στοιχεία. Σπάνια βρίσκεται ως αυτοφύες και πολλές φορές συνυπάρχει με χρυσό. Οι ενώσεις του αργύρου, κυρίως ο νιτρικός άργυρος χρησιμοποιούνται ως χημικά αντιδραστήρια, μικροβιοκτόνα και ως απολυμαντικά.

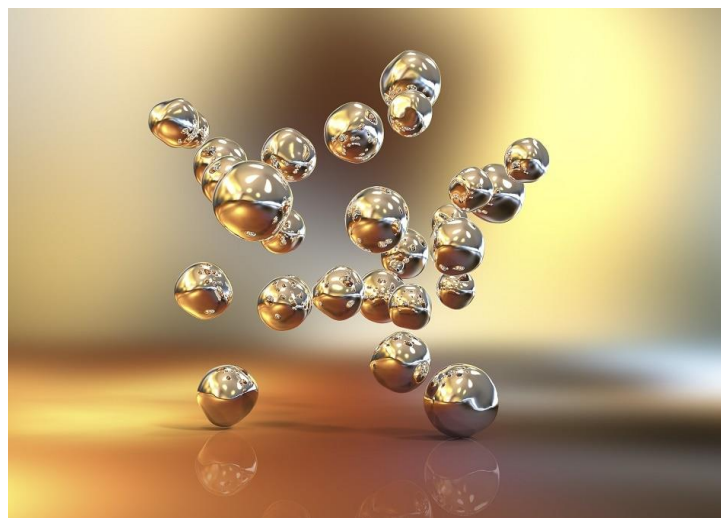
### 2.1 Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του αργυρού ήταν γνωστή από τα αρχαία χρόνια, με πολλές κοινωνίες να αποθηκεύουν το νερό και το κρασί σε αργυρά σκεύη. Ο Ηρόδοτος περιγράφει πως ο βασιλιάς της Περσίας όταν πήγε σε πόλεμο, πήρε νερό αποθηκευμένο σε ασημένια φλασκιά. Η πρώτη σύγχρονη περιγραφή αυτού του αποτελέσματος έγινε από τον Raulin το 1869, που παρατήρησε ότι ο μύκητας *Aspergillus niger* δεν αναπτυσσόταν σε ασημένια σκεύη [15]. Αργότερα διαπιστώθηκε πως ο άργυρος έχει την πιο αποτελεσματική αντιβακτηριδιακή δράση και τη μικρότερη τοξικότητα στα ζωικά κύτταρα, σε σχέση με τα άλλα μέταλλα με αντιμικροβιακή δράση. Σήμερα γνωρίζουμε ότι, τα ιόντα αργύρου χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο βακτηριακής ανάπτυξης σε μια ποικιλία ιατρικών εφαρμογών συμπεριλαμβανομένης της οδοντιατρικής, καθώς επίσης, κατέχουν και σημαντικές επουλωτικές ιδιότητες και για το λόγο αυτό η χρήση των ιόντων αργύρου συνιστάται στην τοπική θεραπεία των άτονων ελκών, των κατακλίσεων, των διαβητικών ελκών, των εγκαυμάτων, αλλά και των τραυμάτων. Η ένταση της αντιμικροβιακής δράσης των ιόντων αργύρου, εξαρτάται από τη συγκέντρωση και το ρυθμό απελευθέρωσής τους αλλά και από την παρουσία ελεύθερων ριζών αργύρου. Ο άργυρος έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Σε σύγκριση με τα μοριακά αντιβιοτικά, τα οποία γενικά απευθύνονται σε συγκεκριμένες τάξεις οργανισμών, ο άργυρος είναι ευρέως φάσματος και τοξικός σε πολλά στελέχη βακτηρίων, μυκήτων

φυκιών και ενδεχομένως ορισμένων ιών. Ωστόσο ίσως το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του αντιμικροβιακού παράγοντα του αργύρου είναι ότι μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί σε πολλά υλικά, όπως τα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα και τα πλαστικά, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμο για εφαρμογές όπου η ευρέως φάσματος, διαρκή αντιμικροβιακή δράση είναι επιθυμητή αλλά και όπου τα παραδοσιακά αντιμικροβιακά δεν θα ήταν πρακτικά. Μέχρι σήμερα το FDA έχει εγκρίνει πάνω από μία δωδεκάδα ζεόλιθους που περιέχουν άργυρο για χρήση ως υλικά επαφής σε τρόφιμα για τους σκοπούς της απολύμανσης.

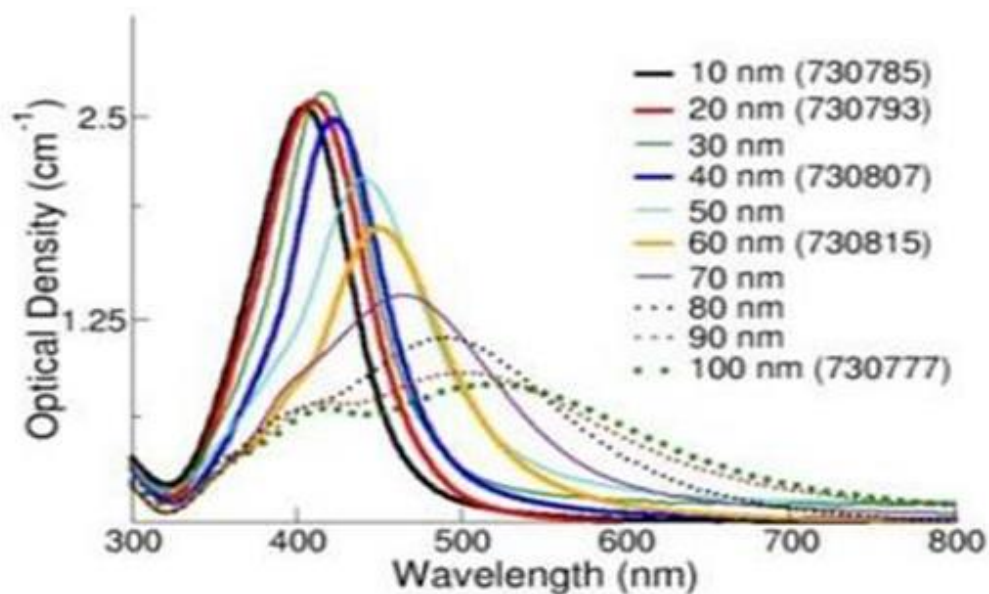
## 2.2 Νανοδοματίδια Αργύρου (AgNPs)

Οι νέες και βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των μεταλλικών νανοδοματιδίων, που είναι σχετιζόμενες με το μέγεθός τους, τα καθιστούν ιδανικά για εφαρμογές στην ιατρική, την κατάλυση, την οπτική, τα καλλυντικά, τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, τα μελάνια, τη μικροηλεκτρονική, την ιατρική απεικόνιση, την περιβαλλοντική αποκατάσταση και τις βιοϊατρικές συσκευές [16,17]. Μεταξύ των μεταλλικών νανοδοματιδίων, τα νανοδοματίδια αργύρου (AgNPs) είναι τα πιο δημοφιλή τραβώντας το ενδιαφέρον των ερευνητών και έχουν μελετηθεί εκτενώς, καθώς παρουσιάζουν μοναδικές ηλεκτρικές, οπτικές και βιολογικές ιδιότητες [18]. Αν και συχνά περιγράφονται ως νανοδοματίδια αργύρου, μερικά αποτελούνται από ένα μεγάλο ποσοστό οξειδίου του αργύρου λόγω της μεγάλης αναλογίας επιφάνειας.



Εικόνα 4. Νανοδοματίδια αργύρου (AgNPs)

Έναντι άλλων ευγενών μετάλλων τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) έχουν κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τις φυσικοχημικές ιδιότητες. Παρουσιάζουν μικρή απώλεια οπτικής συχνότητας κατά τη διάρκεια διάδοσης επιφανειακού πλασμονίου, είναι μη τοξικά, έχουν υψηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, ενώ παραμένουν σταθερά σε συνθήκες περιβάλλοντος. Επίσης το κόστος τους είναι χαμηλό σε σχέση με άλλα ευγενή μέταλλα όπως χρυσός, παρουσιάζουν ευρεία απορρόφηση στο ορατό και υπεριώδες και είναι χημικώς σταθερά. Επιπλέον, παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα μεγάλης αντιμικροβιακής δραστηριότητας με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για ανάπτυξη απολυμαντικών με βάση τα νανοσωματίδια αργύρου [19].



Εικόνα 5. Φάσμα UV-VIS νανοσωματιδίων αργύρου με διάμετρο από 10 έως 100 nm [21]

Τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) σφαιρικού σχήματος εμφανίζουν SPR μεταξύ 400 nm και 530 nm (εικόνα 5) αλλάζοντας το μέγεθος των σωματιδίων και τον τοπικό δείκτη διάθλασης κοντά στην επιφάνεια των σωματιδίων. Ακόμη μεγαλύτερες μετατοπίσεις του μήκους κύματος της κορυφής SPR προς την υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μπορούν να επιτευχθούν με την παραγωγή νανοσωματιδίων αργύρου με σχήματα ράβδων ή πλακών ανάλογα με το μέγεθός τους. Σε κάποιες περιπτώσεις, στην περιοχή του ορατού, παρατηρείται όμως στην κορυφή απορρόφησης του

SPR, ο οποίος οφείλεται στην ύπαρξη νανοσωματιδίων αργύρου πεπλατυσμένου σφαιρικού σχήματος [20].

### **2.2.1 Αντιμικροβιακές ιδιότητες νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs)**

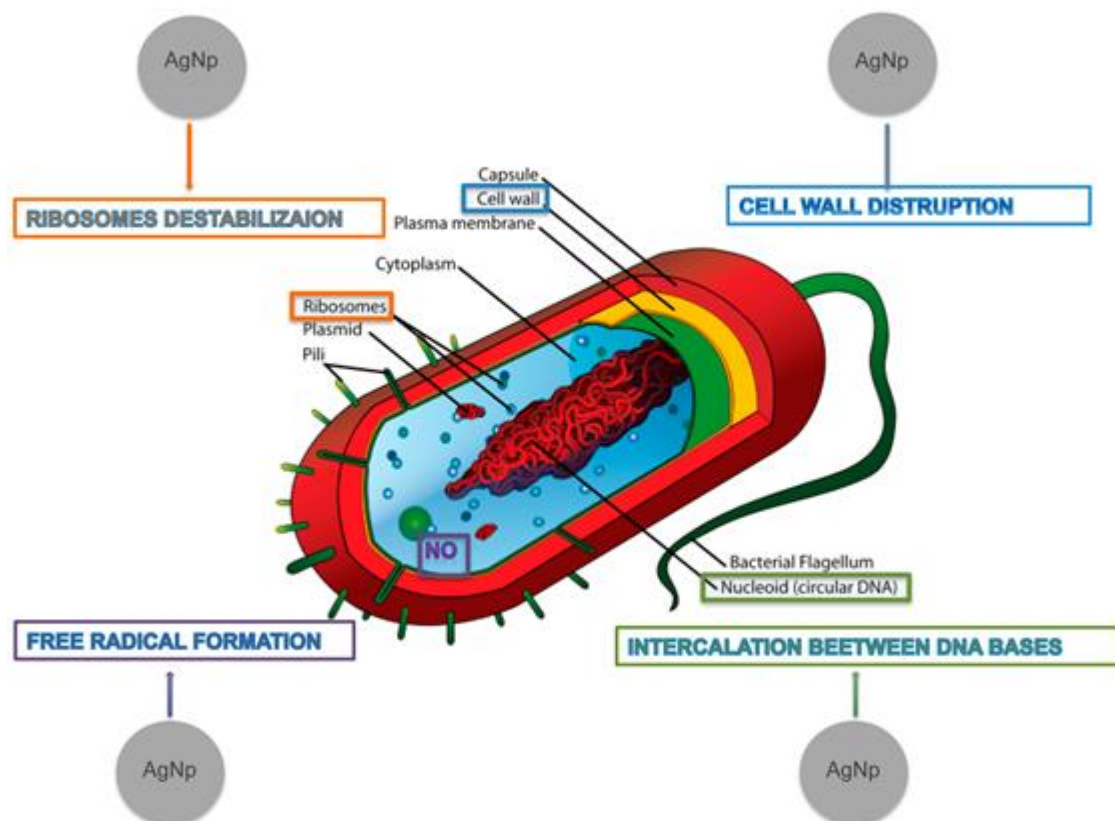
Τα υλικά νανοκλίμακας, πρόσφατα έχουν αναδειχθεί ως νέα αντιμικροβιακά και θεωρούνται μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για τα αντιβιοτικά με μεγάλες δυνατότητες, δίνοντας λύση στο πρόβλημα που σχετίζεται με την αντοχή των βακτηρίων σε πολλά φάρμακα. Τα νανοσωματίδια αργύρου συγκεκριμένα, εξαιτίας και της ιστορίας του αργύρου όπου στο παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί ως αντισηπτικό και αντιμικροβιακό έναντι gram-αρνητικών και gram-θετικών βακτηρίων, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για την παραγωγή μιας νέας κατηγορίας αντιμικροβιακών υλικών.

Από έρευνες έχει βρεθεί ότι είναι ισχυροί παράγοντες κατά πολυάριθμων ειδών βακτηρίων. Ο ακριβής μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως. Η ισχυρή αντιμικροβιακή και ευρέως φάσματος δράση κατά των διαφορετικών μορφολογικά και μεταβολικά μικροοργανισμών, φαίνεται ότι συσχετίζεται με ένα πολύπλευρο μηχανισμό που αλληλεπιδρούν τα νανοσωματίδια με τα μικρόβια. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους των νανοσωματιδίων σε σχέση με την μακροσκοπική τους μορφή (bulk), αυξάνεται κατά πολύ η επιφάνεια στην οποία τα μικρόβια θα εκτεθούν. Συνεπώς, οι φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητές τους διαφέρουν σημαντικά από αυτές του bulk υλικού προέλευσης.

Τα νανοσωματίδια αργύρου αλληλεπιδρούν φυσικά με την κυτταρική επιφάνεια διαφόρων βακτηρίων. Στην περίπτωση των αρνητικών gram βακτηρίων είναι ιδιαίτερα σημαντικό, όπου σε πολλές μελέτες έχει παρατηρηθεί προσκόλληση και συσσώρευση των νανοσωματιδίων στην επιφάνειά τους. Πολλές μελέτες, έχουν αναφέρει ότι τα AgNPs μπορούν να βλάψουν τις κυτταρικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα να προκαλούνται δομικές μεταβολές οδηγώντας σε αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης και κατά συνέπεια το βακτηριακό θάνατο. Πέρα από τις διαφορές στην ευαισθησία μεταξύ των βακτηριακών ειδών (κυρίως μεταξύ Gram-αρνητικών και Gram-θετικών δειγμάτων), η ποσοτική τοξικότητα των AgNPs σε βακτήρια ποικίλλει από μελέτη σε μελέτη και φαίνεται να εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων. Η τοξικότητα των AgNPs αυξάνεται



σημαντικά καθώς η διάμετρος των νανοσωματιδίων μειώνεται, το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι μικρότερα νανοσωματίδια έχουν μεγαλύτερες σχετικές περιοχές επιφάνειας αλληλεπίδρασης και ανώτερη ικανότητα διείσδυσης στα βακτήρια. Πράγματι, βρέθηκε ότι η βακτηριοκτόνος δράση μικρότερων διαστάσεων AgNPs (<30 nm) είναι η βέλτιστη κατά *Staphylococcus aureus* και *Klebsiella pneumoniae*.



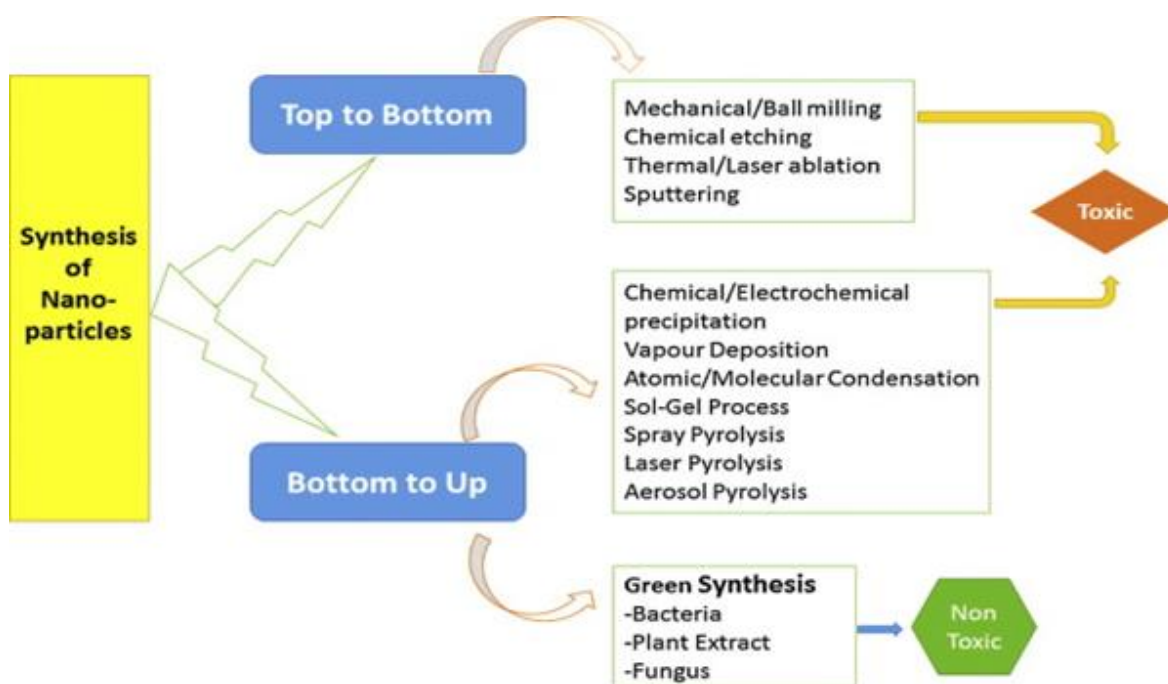
Εικόνα 6. Πιθανοί μηχανισμοί τοξικής δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) [22]

Όπως προαναφέρθηκε, τα νανοσωματίδια έχουν λόγο επιφάνεια/όγκο μεγαλύτερο από τον αντίστοιχο του ακεραίου ογκώδους υλικού (bulk material) με αποτέλεσμα να έχουν υψηλότερη αντιβακτηριακή δραστηριότητα. Θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη ότι μια ορισμένη ποσότητα κατιόντων αργύρου απελευθερώνεται από τα νανοσωματίδια, καθώς αυτά διαλύονται σε νερό ή όταν διεισδύουν στα κύτταρα. Έτσι, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων αργύρου οφείλονται τόσο στις φυσικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων όσο και στην έκλυση ιόντων αργύρου και τις καθιστούν ανώτερες από αυτές των ελεύθερων ιόντων αργύρου. Είναι πιθανό ότι ένας συνδυασμός της

δράσης των νανοσωματιδίων και των ελεύθερων ιόντων συμπράττουν με διάφορους τρόπους στην παραγωγή μιας ευρέος φάσματος αντιβακτηριακής δραστηριότητας. Επιπλέον, το γεγονός ότι σπάνια παρατηρείται βακτηριακή αντοχή σε στοιχείο αργύρου, υπογραμμίζει τη παρουσία πολλαπλών μηχανισμών βακτηριακής δράσης σε συνεργία. Τα νανοσωματίδια βλάπτουν τις μεμβράνες προκαλώντας την απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species) (ROS) που σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες με ισχυρή αντιβακτηριακή δράση. Οι πιθανοί μηχανισμοί τοξικότητας των AgNPs φαίνονται παρακάτω στην εικόνα 6 [22,23,24,25].

### 3. Σύνθεση Νανοδομημάτων

Η παραγωγή νανοδομημάτων μπορεί να επιτευχθεί γενικά μέσω χημικών, φυσικών και βιολογικών μεθόδων, αν και παραδοσιακά βασίζεται σε δύο προσεγγίσεις, χημικές και φυσικές όπως αναγωγή των χημικών [26], ηλεκτροχημικών διαδικασιών [27] και αναγωγή φωτοχημικών [28]. Οι μέθοδοι σύνθεσης των νανοδομημάτων επίσης ταξινομούνται σε δύο κύριους τύπους "επαγωγικούς (Bottom Up)" και "απαγωγικούς ή παραγωγικούς (Top Down)", όπως φαίνεται και στις εικόνες 7 και 8.



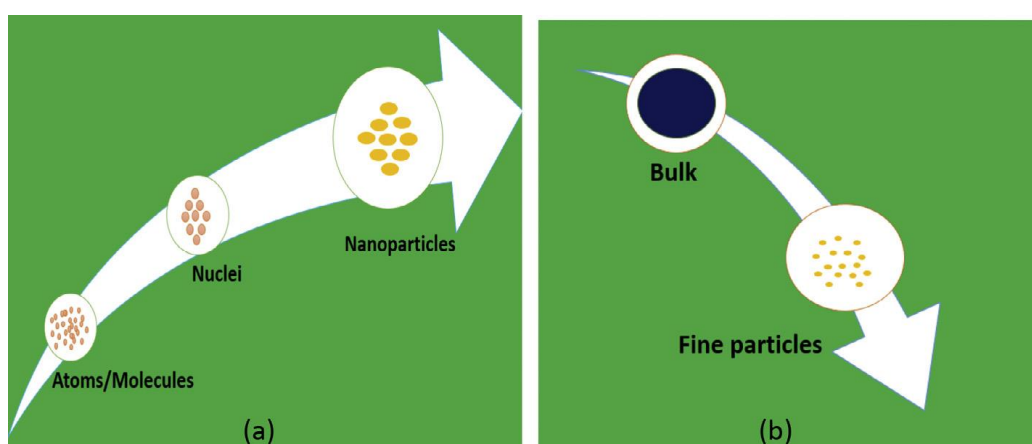
Εικόνα 7. Διάφοροι τρόποι σύνθεσης νανοδομημάτων αργύρου [29]

- Επαγωγικές μέθοδοι (Bottom up methods)

Σε αυτή τη κατηγορία παρασκευάζονται νανοδομηματα όπου οι πρώτες ύλες είναι μακροσκοπικού μεγέθους και το μέγεθος τους μειώνεται μέχρι τη νανοκλίμακα με φυσικές/χημικές διεργασίες. Οι μέθοδοι που περιλαμβάνονται είναι μηχανική κραματοποίηση (mechanical alloying), ηλεκτρική έκρηξη σύρματος, sputtering και απομάκρυνσης ατόμων με χρήση ακτινοβολίας laser (laser ablation) και η πυρόλυση αεροδιαλύματος (spray pyrolysis).

- Απαγωγικές μέθοδοι (Top down methods)

Αντίθετα, σε αυτή τη κατηγορία ακολουθείται αντίστροφη πορεία αφού τα αρχικά υλικά είναι ατομικού ή μοριακού μεγέθους και συγχωνεύονται σε μεγαλύτερα συστήματα. Η σύνθεση των νανοσωματιδίων σε αυτή τη περίπτωση βασίζεται σε χημικές και βιολογικές μεθόδους. Στη bottom-up κατηγορία περιλαμβάνονται οι μέθοδοι διαλύματος-πηκτώματος (Sol-Gel), χημικής εναπόθεσης ατμών (CVD), φυσικής εναπόθεσης ατμών (PVD), ατομικής ή μοριακής συμπύκνωσης αδρανούς αερίου (atomic or molecular condensation).



Εικόνα 8. Πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση νανοσωματιδίων (α) bottom to top και (β) top to bottom [30]

Παρόλο που οι φυσικές και χημικές μέθοδοι εφαρμόζονται ευρέως για την σύνθεση νανοσωματιδίων, υπάρχουν κάποιιοι περιορισμοί καθώς αποτελούν δαπανηρές μεθόδους, τοξικές, επικίνδυνες και απαιτούν υψηλή ενέργεια και πίεση. Η χρήση τοξικών αναγωγικών μέσων (για παράδειγμα βοροϋδρίδιο του νατρίου και N,N διμεθυλοφορμαμιδιο) ή οργανικοί διαλύτες (παραδείγματος χάριν εξάνιο για σύνθεση νανοδιάσπαρτου αργύρου σε γαλακτώματα με τη χρήση του αντιδραστηρίου Tollens) περιορίζει σημαντικά τις βιοϊατρικές τους εφαρμογές [31]. Επομένως, εξαιτίας της αυξανόμενης ανάγκης της εποχής για μείωση ή εξάλειψη ουσιών επικίνδυνων προς το περιβάλλον, η ανάπτυξη πράσινων μεθοδολογιών χρησιμοποιώντας βιολογικές οντότητες έχει τραβήξει το ενδιαφέρον τη τελευταία δεκαετία. Οι βιολογικές συνθετικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν είτε ζωντανούς οργανισμούς όπως βακτήρια, μύκητες και φυτά ή βιομάζα όπως εκχυλίσματα φυτών. Η

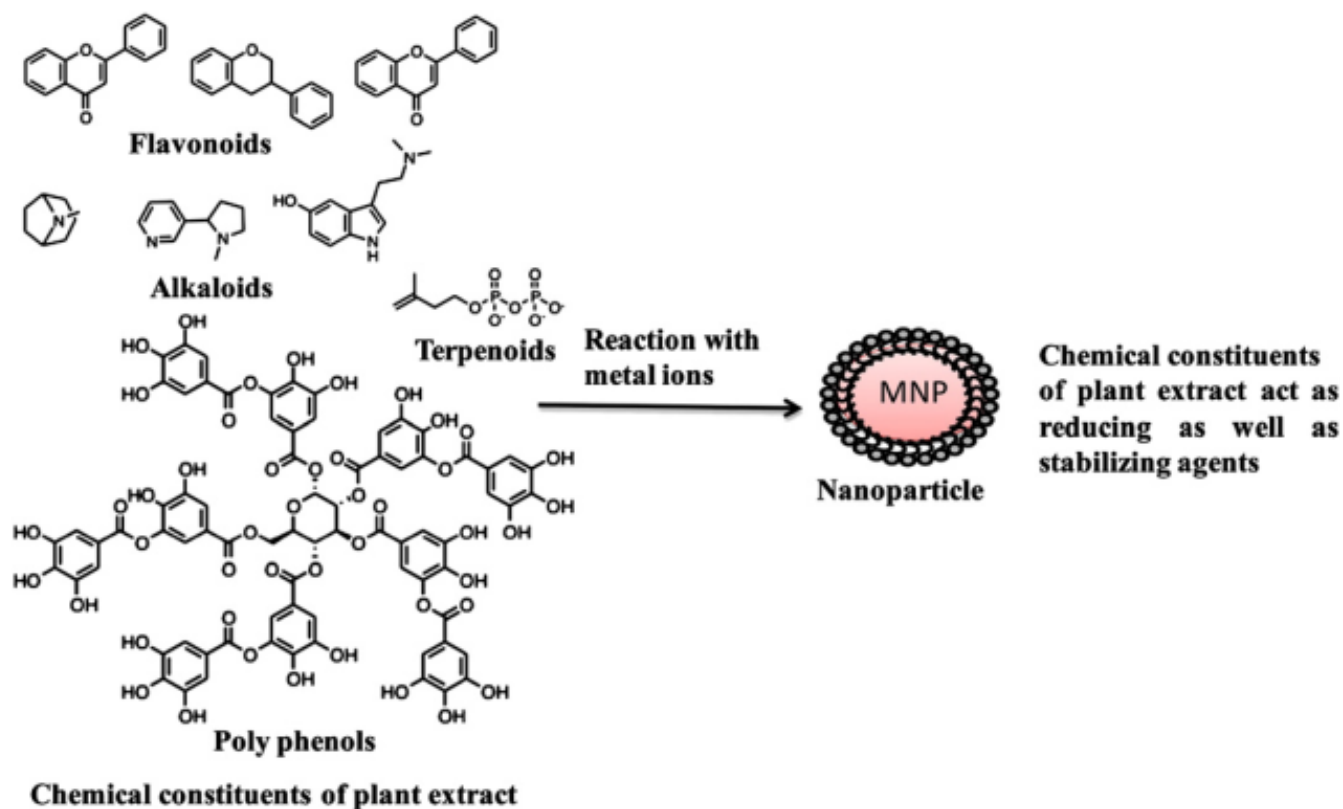
βιολογική σύνθεση έχει εμφανιστεί ως απλή και εναλλακτική μέθοδος σε σχέση με τις φυσικοχημικές μεθόδους και επιπλέον είναι φιλική προς το περιβάλλον, οικονομικά αποδοτική και κατάλληλη για μεγάλης κλίμακας παραγωγής νανοσωματιδίων [31,32].

### **3.1 Βιοσύνθεση νανοσωματιδίων από εκχυλίσματα φυτών**

Η χρήση φυτών για την παραγωγή νανοσωματιδίων αποτελεί σημαντικό κλάδο της πράσινης σύνθεσης. Για την παραγωγή νανοσωματιδίων χρησιμοποιώντας φυτικά εκχυλίσματα, το εκχύλισμα αναμιγνύεται με διάλυμα μεταλλικού άλατος σε διάφορες θερμοκρασίες (από θερμοκρασία δωματίου έως και τους 100 °C) και η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα σε λίγα λεπτά ανάλογα με το πρωτόκολλο που ακολουθείται. Τα ενεργά συστατικά των εκχυλισμάτων, όπως οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, φαινολικό οξύ, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή και τερπενοειδή προκαλούν το σχηματισμό των νανοσωματιδίων, αφού ανάγουν και σταθεροποιούν τα μεταλλικά ιόντα (εικόνα 10). Με τον τρόπο αυτό έχουν παραχθεί νανοσωματίδια αργύρου, χρυσού και άλλων μετάλλων.

Η φύση και συγκέντρωση του φυτικού εκχυλίσματος, η συγκέντρωση του μεταλλικού άλατος, το pH, η θερμοκρασία και ο χρόνος επαφής επηρεάζουν τον ρυθμό παραγωγής των νανοσωματιδίων, τη ποσότητά τους και άλλα χαρακτηριστικά. Μια αλλαγή στο pH έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγή φορτίου στα φυτοχημικά που περιέχονται σε ένα εκχύλισμα, επηρεάζοντας την ικανότητά τους να δεσμεύουν και να ανάγουν μεταλλικά ιόντα και τελικά επηρεάζοντας το σχήμα, το μέγεθος και την απόδοση των νανοσωματιδίων. Όσο μεγαλύτερη η οξύτητα τόσο μεγαλύτερα νανοσωματίδια σχηματίζονται.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας για το σχηματισμό νανοσωματιδίων από φυτικά εκχυλίσματα είναι η θερμοκρασία. Η αύξηση της θερμοκρασίας, γενικά αυξάνει την ταχύτητα της αντίδρασης και την αποτελεσματικότητά της. Αντίστοιχα επηρεάζει και τη μορφή των νανοσωματιδίων. Για παράδειγμα, νανοσωματίδια αργύρου που συντέθηκαν από εκχύλισμα φλούδας πορτοκαλιού (*Citrus sinensis*) στους 60°C είχαν μέσο μέγεθος περίπου 10 nm, ενώ όταν η θερμοκρασία αντίδρασης μειώθηκε στους 25°C το μέσο μέγεθός τους αυξήθηκε έως 35 nm [35].



Εικόνα 9. Χημικά συστατικά φυτικού εκχυλίσματος που είναι υπεύθυνα για την αναγωγή μεταλλικών ιόντων [33,34]

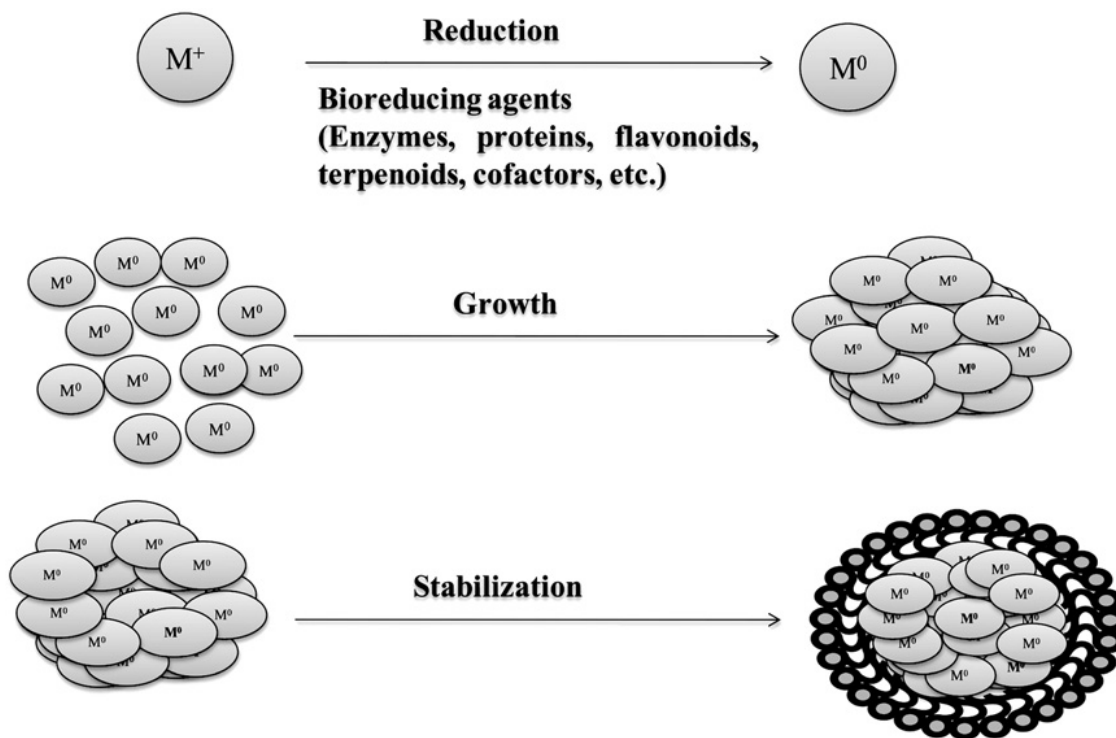
Μια εναλλακτική τεχνική, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην συγκεκριμένη εργασία, είναι η σύνθεση νανοσωματιδίων με τη βοήθεια μικροκυμάτων. Η θέρμανση με μικροκύματα έχει αρκετά ελκυστικά χαρακτηριστικά, όπως σύντομος χρόνος αντίδρασης, χαμηλότερη ενέργεια κατανάλωσης και καλύτερη απόδοση προϊόντος σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης. Η ακτινοβολία των μικροκυμάτων εξασφαλίζει γρήγορη και ομοιόμορφη θέρμανση στο μέσο αντίδρασης παρέχοντας έτσι ομογενείς πυρήνες και συνθήκες ανάπτυξης για τα νανοσωματίδια.

Ο μηχανισμός για τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων αποτελείται από τρεις φάσεις :

- Φάση ενεργοποίησης : πραγματοποιείται η αναγωγή των μεταλλικών ιόντων και η δημιουργία ανηγμένων μεταλλικών ιόντων.
- Φάση ανάπτυξης : παρακείμενα μικρά σωματίδια συνενώνονται σε σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους ενώ αυξάνεται και η θερμοδυναμική τους σταθερότητα.

- Φάση τερματισμού : τα νανοσωματίδια αποκτούν την πιο ευνοϊκή διαμόρφωση ενεργειακά.  
 Η διαδικασία επηρεάζεται από τη ικανότητα του φυτικού εκχυλίσματος να σταθεροποιεί μεταλλικά νανοσωματίδια.

Η διαδικασία φαίνεται στην εικόνα 11.

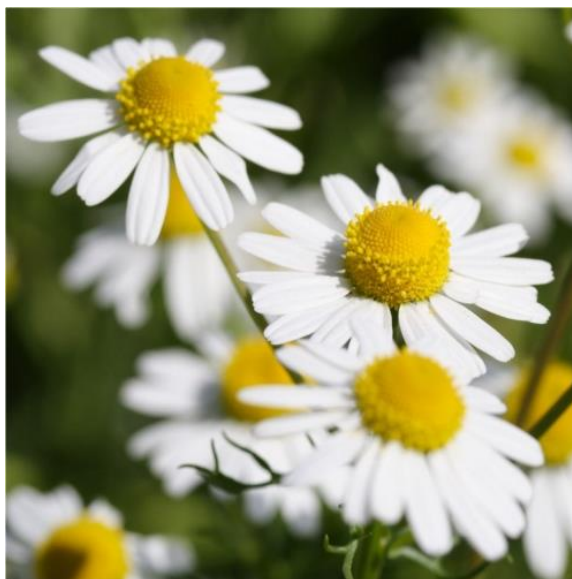


Εικόνα 11. Μηχανισμός σύνθεσης νανοσωματιδίων ( $M^+$  - ιον μετάλλου) [35]

Τέλος, η βιοσύνθεση νανοσωματιδίων από φυτικά εκχυλίσματα μας παρέχει ένα ευρύ φάσμα πλεονεκτημάτων συγκριτικά με άλλες βιολογικές μεθόδους. Αποτελεί μια πολύ απλή και οικονομική μέθοδο αφού η φυτική ύλη είναι αρκετά φθηνή, με το κόστος να περιορίζεται κυρίως στη λήψη του μεταλλικού άλατος, είναι κατάλληλη για παραγωγή μεγάλης κλίμακας, δεν απαιτούνται ιδιαίτερες συνθήκες αποθήκευσης, δεν υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης και τέλος τα φυτικά εκχυλίσματα είναι πολύ σταθερά έναντι σκληρών συνθηκών (μεγάλες θερμοκρασίες, μεγάλο φάσμα συγκεντρώσεων pH και αλάτων) [36,37,38].

### 3.2 Χαμομήλι

Για τον σχηματισμό νανοσωματιδίων αργύρου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα χαμομηλιού. Το χαμομήλι ανήκει στη κατηγορία των αρωματικών φυτών και έχει χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα ως φαρμακευτικό βότανο. Το όνομα του προέρχεται από την αρχαία Ελλάδα όπου το ονόμασαν «μήλο χαμαί» (μήλο του εδάφους) λόγω του αρώματός του. Οι φαρμακευτικές του ιδιότητες έχουν αναφερθεί από τον Ιπποκράτη (460-370 π.Χ.) πατέρα της ιατρικής, καθώς το θεωρούσε ως εμμηναγωγό και φάρμακο κατά της υστερίας.



*Εικόνα 12. Χαμομήλι*

Είναι φυτό μονοετές, που φθάνει σε ύψος μέχρι 60 εκατοστά περίπου. Έχει όρθιο, λείο και πολύκλαδο βλαστό. Τα φύλλα του είναι λεπτά, εναλλασσόμενα δίπτερα ή τρίπτερα, ενώ τα άνθη του σχηματίζονται γύρω από το κεντρικό κίτρινο στέλεχος του άνθους. Το χαμομήλι συνήθως βρίσκεται σε ανοιχτές περιοχές που είναι ηλιόλουστες με υγρές έως ελαφρά ξηρές ατμόσφαιρες και η άνθησή του ξεκινά τον Απρίλιο και διαρκεί μέχρι τον Ιούνιο [39].

Αρκετές βιολογικές επιδράσεις έχουν αποδοθεί στο χαμομήλι και για αυτό παραδοσιακά χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς και αντιμετώπιση αρκετών παθήσεων. Δρα ως αντιφλεγμονώδες, αντιοξειδωτικό, αντιβακτηριακό, σπασμολυτικό, ηρεμιστικό, αντιελονοσιακό και αντικαρκινικό. Η χρήση του είναι εσωτερική και εξωτερική [40].

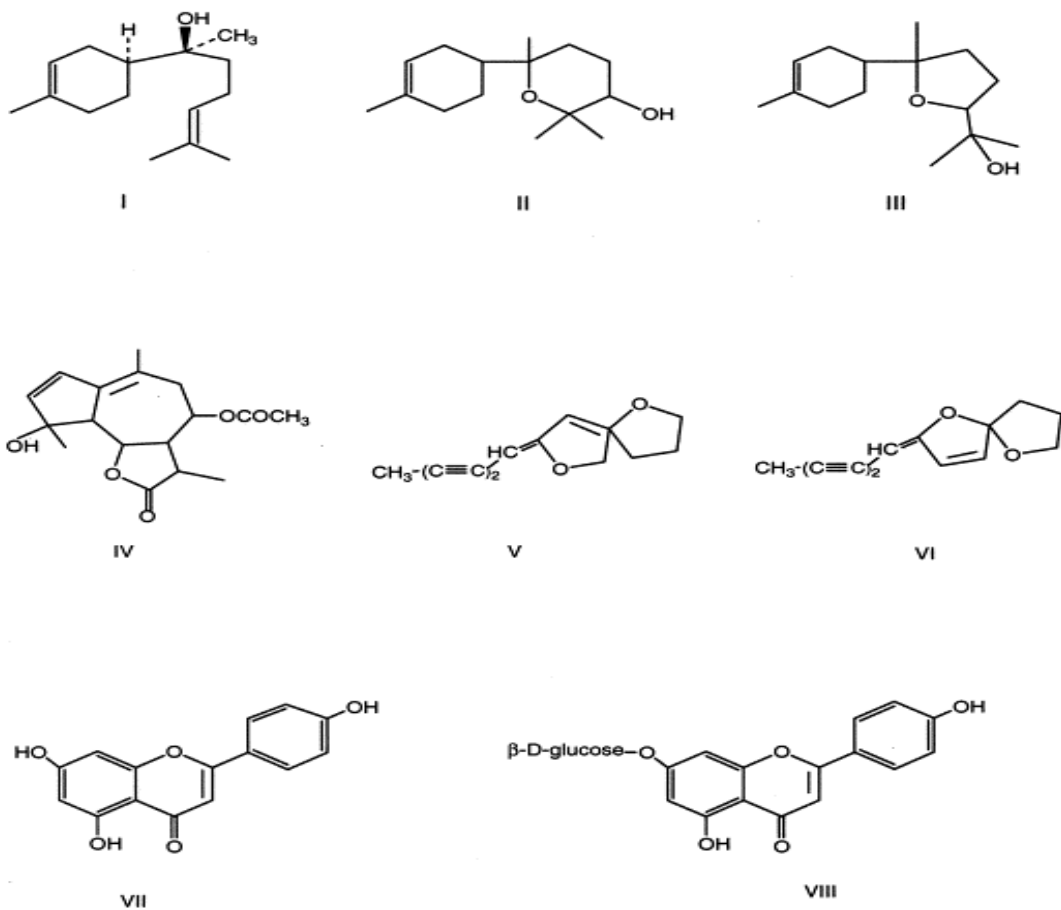


Εξωτερικά χρησιμοποιείται για θεραπεία φλεγμονών και ερεθισμούς του δέρματος και του βλεννογόνου, όπως πληγές, εγκαύματα, μώλωπες, δερματίτιδα, τσιμπήματα εντόμων, ερεθισμό και λοιμώξεις του στόματος, των ούλων και αιμορροΐδων. Το ρόφημα εκχυλίσματος χαμομηλιού είναι ένα αποτελεσματικό ηρεμιστικό και έχει μυοχαλαρωτική δράση. Χρησιμοποιείται για ανακούφιση της γαστρεντερικής δυσφορίας και δυσπεψίας, είναι άριστο για τη σπαστική κολίτιδα και την επούλωση των έλκων του στομάχου και της στομαχικής κοιλότητας. Δρα σαν κατασταλτικό του άγχους και της ήπιας αϋπνίας λόγω νευρικών διαταραχών. Το αιθέριο έλαιο του είναι ηρεμιστικό για τα μάτια και χρησιμοποιείται σε πλύσεις για κουρασμένα μάτια και σε επιπεφυκίτιδα [41].

Τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από το χαμομήλι έχουν παρουσιάσει κάποια αντιμικροβιακή δραστηριότητα ενάντια σε ορισμένα είδη βακτηρίων, μυκήτων και ιών [42]. Επίσης είναι ένας πολύ ισχυρός αντιφλεγμονώδης παράγοντας. Μια νέα κλινική μελέτη έδειξε ότι η κατανάλωση χαμομηλιού και άλλων φυτών της οικογένειας Asteraceae, που έχουν εκχυλίσματα απιγενίνης και флаβονοειδών μπορεί να είναι αποτελεσματικά στη πρόληψη καρκινογένεσης και φλεγμονών [43].

### **3.2.1 Βιοδραστικά συστατικά χαμομηλιού**

Οι θεραπευτικές, αντιοξειδωτικές ιδιότητες και σημαντικό μέρος των φαρμακολογικών αποτελεσμάτων προσδιορίζεται από τα βιολογικώς δραστικά χημικά συστατικά που έχουν εντοπισθεί στο χαμομήλι (εικόνα 3). Από τη βιβλιογραφία βλέπουμε ότι το φυτό περιέχει 0.24-1.9 πτητικό έλαιο που αποτελείται από μια ποικιλία ξεχωριστών ελαίων. Περίπου 120 δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν αναγνωρισθεί στο χαμομήλι, συμπεριλαμβανομένων 28 τερπενοειδών και 36 флаβονοειδών. Τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου είναι σεσκιτερπενικές ενώσεις όπως η βισαβολόλη, τα οξειδία βισαβολόλης Α και Β, αζουλένιο, και οι φαινολικές ενώσεις, με διάφορα флаβονοειδή μεταξύ των οποίων η απιγενίνη να είναι η πιο υποσχόμενη ένωση, καθώς και οι κουμαρίνες [39,44,45].



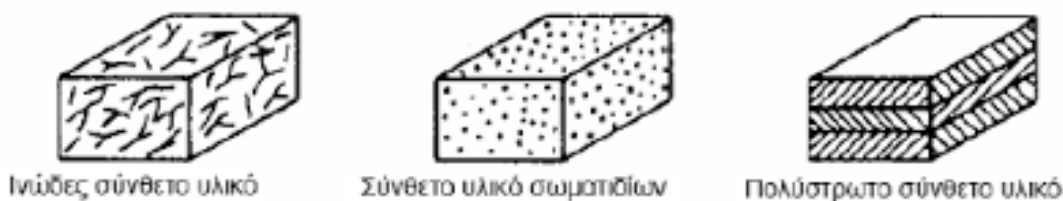
Εικόνα 13. Χημικές δομές συστατικών χαμομηλιού. I, α-βισαβολόλη, II, οξείδιο α-βισαβολόλης A, III, οξείδιο α βισαβολόλης B, IV, matricine, V, cis-en-in-dicycloether, VI, trans-en-in-dicycloether (σπιροαιθέρες), VII, απιγενίνη, VIII, απιγενίνη-7-γλυκοσίδη [44].

#### 4. Σύνθετα υλικά- Εισαγωγή

Ως σύνθετο καλείται κάθε υλικό που αποτελείται από δύο ή περισσότερα φυσικώς ευδιάκριτα και μηχανικώς διαχωριζόμενα υλικά. Παρασκευάζονται με φυσική ανάμειξη ώστε ο διαχωρισμός του ενός εντός του άλλου να είναι ελεγχόμενος για την επίτευξη των βέλτιστων ιδιοτήτων. Ο συνδυασμός τους οδηγεί σε υλικά με διαφορετικές και σε μερικές περιπτώσεις μοναδικές σε σχέση με τις ιδιότητες των επιμέρους συστατικών. Τα κύρια συστατικά του σύνθετου υλικού είναι η μήτρα, όπου αποτελεί και τη συνεχή φάση στο υλικό, ενώ η δεύτερη φάση καλείται ενίσχυση, αποτελεί την ασυνεχή ή διασκορπισμένη φάση στο σύνθετο και του προσδίδει βελτιωμένες ιδιότητες. Τα σύνθετα υλικά κατηγοριοποιούνται με βάση τη μητρική φάση, με βάση την ενισχυτική φάση ή και των δύο.

Ανάλογα με την μορφή του συστατικού ενίσχυσης κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες [46,47] :

- Ινώδη σύνθετα, με ενίσχυση ινών εμποτισμένες σε υλικό μήτρας
- Πολύστρωτα σύνθετα, με επάλληλες στρώσεις υλικών
- Κοκκώδη σύνθετα, με ενίσχυση σωματιδίων διασκορπισμένων στο υλικό μήτρας



Εικόνα 14. Ταξινόμηση σύνθετων υλικών ανάλογα με τη μορφή της ενίσχυσης.

Επίσης, γίνεται διαχωρισμός με βάση το μέγεθος της ενισχυτικής φάσης. όταν τα εγκλείσματα είναι μεγέθους  $>10^{-6}$  m καλούνται μακροσύνθετα, με εγκλείσματα μεγέθους περίπου  $10^{-6}$  m μικροσύνθετα και όταν τα εγκλείσματα είναι μεγέθους της τάξης  $10^{-9}$  m νανοσύνθετα. Με βάση το υλικό της μήτρας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε :

A) σύνθετα υλικά πολυμερικής μήτρας

B) σύνθετα υλικά μεταλλικής μήτρας

Γ) σύνθετα υλικά κεραμικής μήτρας

#### **4.1 Νανοσύνθετα υλικά πολυμερικής μήτρας**

Νανοσύνθετα πολυμερικά υλικά ονομάζονται εκείνα στα οποία ως μήτρα χρησιμοποιείται ένα πολυμερές και ως έγκλεισμα κάποιο σωματίδιο το οποίο έχει τουλάχιστον μία διάσταση στην περιοχή των νανομέτρων (1-100nm). Αποτελούνται από δύο φάσεις: (πχ μία νανοκρυσταλλική φάση και μία φάση μήτρας), η φάση μπορεί να είναι ανόργανη-ανόργανη, ανόργανη-οργανική ή οργανική-οργανική. Σε σχέση με τις ιδιότητες των νανοσύνθετων, διαφέρουν από τα κλασικά σύνθετα στο μικρότερο μέγεθος των σωματιδίων μέσα στο υλικό της μήτρας [48].

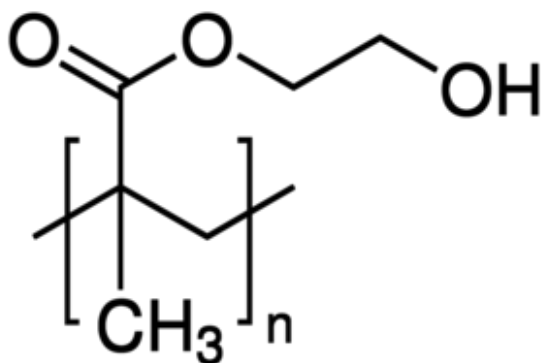
Για την παρασκευή των νανοσύνθετων πολυμερικών υλικών υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι. Το κύριο μέλημα των τεχνικών αυτών αποτελεί η βέλτιστη διασπορά των νανοεγκλεισμάτων στην πολυμερική μήτρα όπως επίσης και το όσο δυνατόν εξάλειψη της συσσωμάτωσης αυτών. Τρεις από τις κυριότερες τεχνικές [49] για την σχηματισμό των νανοσύνθετων είναι

- Τεχνική παρασκευής από διάλυμα
- Ανάπτυξη από τήγμα
- Πολυμερισμός in situ

##### **4.1.1 pHEMA**

Το pHEMA είναι ένα βιοσυμβατό υδρόφιλο μεθακρυλικό πολυμερές. Προκύπτει από τον πολυμερισμό του μεθακρυλικού 2-υδροξυαιθυλεστέρα (HEMA) και σχηματίζει υδρογέλη στο νερό. Αποτελεί αδρανής υδροπηκτική, σταθερή στο νερό μη αποικοδομήσιμη με υψηλή διαφάνεια. Σε ξηρή κατάσταση το υλικό είναι σκληρό και υαλώδες, αλλά σε πολικά μέσα γίνεται μαλακό και εύκαμπτο, εξαιτίας της υδροξυαιθυλο ομάδας. Είναι διαλυτό σε κοινούς οργανικούς πολικούς διαλύτες, ωστόσο το πολυμερές δεν διαλύεται σε νερό αλλά απορροφά το νερό και διογκώνεται. Οι φυσικές τους ιδιότητες (όπως για παράδειγμα η διόγκωση, δυσκαμψία, ρεολογία κλπ), έχουν σχέση με την πυκνότητα του

δικτύου των πολυμερικών αλυσίδων, των διαφόρων χημικών κατά τον συμπολυμερισμό και την εισαγωγή μεσοσκοπικών πόρων. Συγκεκριμένα, η μείωση πυκνότητας των σταυροδεσμών οδηγεί σε πιο μαλακή και εύπλαστη υδρογέλη, που είναι καταλληλότερη για αναγέννηση μαλακού ιστού. [50]



Εικόνα 15. Δομική μονάδα pHEMA

#### 4.1.2 Μέθοδοι πολυμερισμού pHEMA

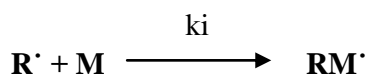
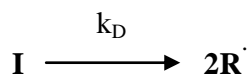
Οι υδρογέλες pHEMA γενικά παρασκευάζονται με πολυμερισμό ελεύθερων ριζών των μονομερών μεθακρυλικού 2-υδροξυαιθυλεστέρα (HEMA) και μικρή ποσότητα συνήθως διμεθακρυλικού εστέρα της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA), όπου το τελευταίο χρησιμοποιείται για την επίτευξη της σταυρωτής σύνδεσης των πολυμερικών αλυσίδων. Η διαδικασία του πολυμερισμού ξεκινά με τη βοήθεια ενός εκκινητή, ο οποίος διασπάται θερμικά, φωτοχημικά ή με οξειδοαναγωγική αντίδραση και παράγει τις ελεύθερες ρίζες.

Ο πολυμερισμός ελεύθερων ριζών είναι από τους σημαντικότερους, αφού τα περισσότερα βιομηχανικά πολυμερή παρασκευάζονται με αυτή τη μέθοδο. Περιλαμβάνει τρία στάδια, την έναρξη (initiation), τη διάδοση (propagation) και τον τερματισμό (termination). Κατά το στάδιο έναρξης του πολυμερισμού είναι απαραίτητο η χρήση ενός εκκινητή, όπου διεγείρεται μέσω θερμότητας ή φωτός σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες ( $R^*$ ) που αντιδρούν με το μονομερές και δίνουν τις πρωτογενείς ρίζες. Αυτές σταθεροποιούνται από τους υποκαταστάτες. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της διάδοσης ή πρόοδος του πολυμερισμού όπου τα μόρια του μονομερούς προστίθενται με μεγάλη ταχύτητα στις πρωτογενείς ρίζες που έχουν σχηματιστεί κατά την έναρξη του πολυμερισμού. Τέλος, επέρχεται το

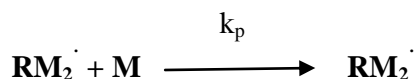
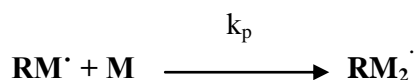
στάδιο του τερματισμού του πολυμερισμού. Σε αυτό το στάδιο οι μακρόριζες που σχηματίστηκαν κατά την διάδοση του πολυμερισμού τερματίζουν είτε με συνένωση δύο μακρόριζων είτε με ανακατανομή, όπου μεταφέρεται υδρογόνο από μακρόριζα σε μακρόριζα [51].

Τα στάδια και οι κινητικές εξισώσεις του ριζικού πολυμερισμού που αναφέρθηκαν φαίνονται παρακάτω.

- Έναρξη



- Πρόοδος

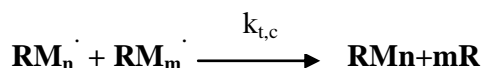


.....

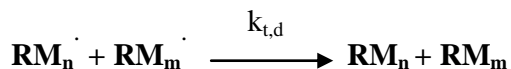


- Τερματισμός

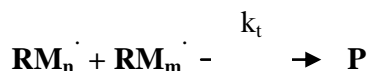
A) Με συνένωση ριζών



B) Με ανακατανομή ριζών



Γενικά



Όπου :

I : εκκινητής

R<sup>·</sup> : αρχικές σχηματιζόμενες ρίζες

M : μονομερές

$M'$  : ενεργές μακρόριζες

$P$  : σχηματιζόμενο πολυμερές

$k$  : κινητική σταθερά για κάθε στάδιο

$i$ , έναρξη

$p$ , πρόοδος

$t_c$ , τερματισμός με συνένωση

$t_d$ , τερματισμός με ανακατανομή

### 4.1.3 Εφαρμογές pHEMA

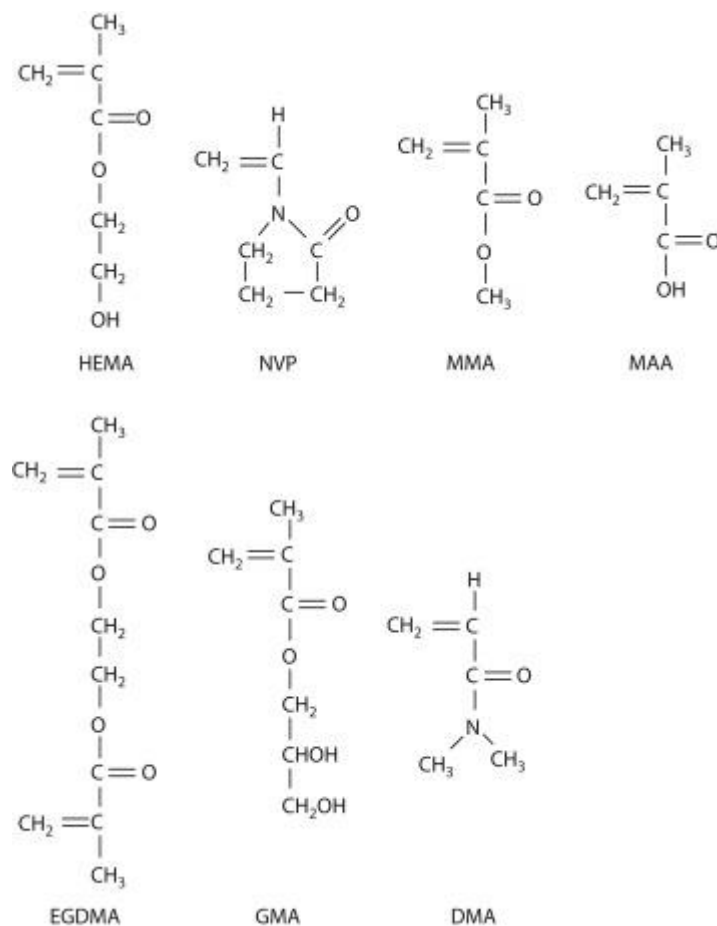
Το pHEMA είναι ένα σταθερό, οπτικά διαφανές, υδρόφιλο πολυμερές, που είναι από τα πιο ευρέως εφαρμοσμένα βιοϋλικά υδρογέλης. Οι υδρογέλες που έχουν βάση το pHEMA μπορούν να κατασκευαστούν ώστε να περιέχουν παρόμοια ποσότητα σε νερό και παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες με τον ιστό ενώ να παρουσιάζουν και εξαιρετική κυτταροσυμβατότητα. Έχει εξεταστεί για ελεγχόμενη απελευθέρωση πρωτεϊνών και φαρμάκων, ενώ κάποιες άλλες εφαρμογές είναι αντικατάσταση μεσοσπονδύλιων δίσκων και μηχανική καρδιακού ιστού. Λόγω των εξαιρετικών οπτικών ιδιοτήτων του έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως σε οφθαλμικές εφαρμογές και αποτελεί τη βάση των περισσότερων φακών επαφής. [52,53]



Εικόνα 16. Μαλακοί φακοί επαφής pHEMA

Η υδρόφιλη συμπεριφορά του pHEMA οφείλεται κυρίως στην υδροξύλο ομάδα στο μονομερές του HEMA, όπου σε αυτή τη θέση σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου με τα μόρια νερού, αναγκάζοντάς τα

να έλκονται εντός της πολυμερικής μήτρας. Έτσι, οι φακοί επαφής από pHEMA στην πλήρη ενυδατωμένη μορφή τους περιέχουν νερό ως και 40%, ενώ μπορεί να φτάσει σε περιεκτικότητα σε νερό μέχρι και 70% αν συμπολυμεριστεί με άλλα υλικά. Τα διάφορα υδρόφιλα υλικά μαλακών φακών επαφής αποτελούν κυρίως συμπολυμερή των μονομερών που φαίνονται στην εικόνα 17.



Εικόνα 17. Μονομερή που χρησιμοποιούνται σε συμβατικά υλικά φακών υδρογέλης. [52]

### Επιπλοκές φακών επαφής

Ωστόσο η χρήση των φακών επαφής συνδέεται και με κάποιες μη επιθυμητές επιδράσεις και κινδύνους. Η μη σωστή χρήση μπορεί να επηρεάσει το βλέφαρο, τον επιπεφυκότα και, πάνω απ' όλα, ολόκληρη τη δομή του κερατοειδούς χιτώνα. Η φροντίδα τους επιβάλλεται να είναι σχολαστική ειδάλλως εύκολα μπορεί να οδηγήσει σε μολύνσεις από διάφορους μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των βακτηριδίων, μυκήτων, και της ακανθαμοιμάδας, οι οποίοι μπορούν να



οδηγήσουν και σε τύφλωση. Οι επιπλοκές από τη φθορά του φακού επαφής επηρεάζουν περίπου το 5% των χρηστών κάθε χρόνο. Μια από τις πιο σοβαρές επιπλοκές από τη φθορά των φακών επαφής είναι η μικροβιακή κερατίτιδα. Η φθορά του φακού επαφής είναι ο πρωταρχικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη μικροβιακής κερατίτιδας και ο κίνδυνος ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του φακού και το πρόγραμμα φθοράς, αλλά έρευνες έχουν δείξει ότι συνδέεται και με τις θήκες των φακών επαφής. Το πιο κυρίαρχο μικροβιακό παθογόνο θεωρείται πως είναι η *Pseudomonas aeruginosa*, επίσης οι *Staphylococcus*, *Streptococcus* και *Serratia* είναι συνηθισμένοι μικροοργανισμοί. Το *P. Aeruginosa* μπορεί να πολλαπλασιαστεί με τον φακό επαφής και να σχηματίσει ένα βιοφιλμ που το προστατεύει από τη δράση του αντιμικροβιακού. Επίσης ένα άλλο παθογόνο που σχετίζεται με τους φακούς επαφής είναι το *Acanthamoeba*. Η μόλυνση του κερατοειδούς με *Acanthamoeba* είναι ιδιαίτερα επώδυνη και είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί με χημειοθεραπεία [54,55]. Μέχρι τώρα η απολύμανση και η αποθήκευση των φακών επαφής γίνεται σε υγρά που πρέπει να είναι στείρα, όμως αυτά μπορεί να συνδέονται με κινδύνους σχετικά με την χρήση τους. Επομένως υπάρχει η ανάγκη για σύνθεση ενός υλικού το οποίο θα είναι στείρο και δεν θα χρειάζεται υγρό για απολύμανση και ιδιαίτερες συνθήκες αποθήκευσης, πάνω στο οποίο δεν αναπτύσσονται τα μικρόβια που σχετίζονται με την μικροβιακή κερατίτιδα.

## **B. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής αποτελεί η σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) από φυσικά προϊόντα με αντιμικροβιακές ιδιότητες και η ενσωμάτωσή τους σε πολυμερική μήτρα υδρογέλης pHEMA. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζονται στείροι φακοί επαφής, όπου δεν θα αναπτύσσονται βακτήρια στην επιφάνειά τους, αποφεύγοντας τους κινδύνους που συνδέονται με τη χρήση τους, με κυριότερο την μικροβιακή κερατίτιδα.

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου πραγματοποιήθηκε μέσω μια εναλλακτικής και φιλικής προς το περιβάλλον μεθοδολογίας αφού για την αναγωγή και σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα χαμομηλιού.

Τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) και το νανοςύνθετο υλικό φακών επαφής pHEMA@AgNPs μελετήθηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση. Για τα νανοσωματίδια αργύρου προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) και η ζώνη αναστολής (IZ) στα βακτήρια *PAOI*, *E.COLI*, *S.AYREUS* *S.EPIDERMIDIS*. Για το νανοςύνθετο υλικό pHEMA@AgNPs προσδιορίστηκε το ποσοστό βιωσιμότητας των παραπάνω βακτηρίων μετά από επώαση με τους φακούς σε διάλυμα. Τέλος, μελετήθηκε η τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου και του νανοςύνθετου υλικού σε ανθρώπινα κύτταρα του κερατοειδούς χιτώνα HCEC.

## Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Χημικό μέρος

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι :

- Νιτρικός Άργυρος (AgNO<sub>3</sub>)
- Εκχύλισμα Χαμομηλιού
- Μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας (HEMA)
- Διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA)
- Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide (TPO)
- Αέριο Άζωτο (N<sub>2</sub>)

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε :

- Ζυγός ακριβείας
- Ζυγός
- Συσκευή Soxhlet
- LAMINAR FLOW CABINET
- Μαγνητικός αναδευτήρας / Θερμαντήρας
- Φούρνος Μικροκυμάτων
- FTIR : Agilent
- UV-Vis: φασματοφωτόμετρο U.V. 1600PC Spectrophotometer VWR
- Λουτρό υπερήχων TRANSSONIC420 Elma
- Θάλαμος λυχνίας UV

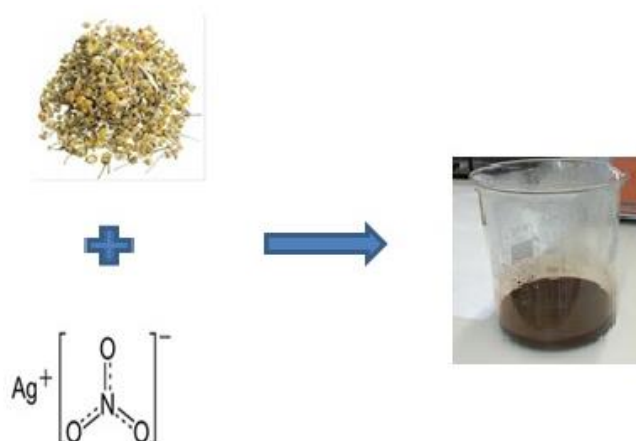
Τα σκεύη και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι γυάλινα σκεύη 25ml, 50 ml και 100 ml, γυάλινοι σωλήνες 15ml, σπάτουλες, μαγνήτες, ddH<sub>2</sub>O. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες (1000, 100, 10μl), tips, eppendorf 1,5ml.

## 1.1 Εκχύλιση χαμομηλιού

Για την εκχύλιση χαμομηλιού αρχικά ζυγίστηκε 4g σκόνης από χαμομήλι και τοποθετείται με φίλτρο στη συσκευή Soxhlet. Με ογκομετρικό κύλινδρο μετρήθηκαν 50 ml δις απεσταγμένου νερού ddH<sub>2</sub>O και τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 100 ml. Η διαδικασία της εκχύλισης κράτησε περίπου 4 ώρες από τη στιγμή που ξεκίνησε να αποστάζει το χαμομήλι.

## 1.2 Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) με εκχύλισμα χαμομηλιού

Για τον σχηματισμό νανοσωματιδίων αργύρου χρησιμοποιήθηκε μια πράσινη μεθοδολογία, αποφεύγοντας η χρήση τοξικών ουσιών για την αναγωγή των ιόντων αργύρου σε νανοσωματίδια. Στο παρακάτω γράφημα απεικονίζεται συνοπτικά η πράσινη σύνθεση των νανοσωματιδίων.



Εικόνα 18. Συνοπτικό γράφημα σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs

Για την σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου, αρχικά σε ζυγό, ζυγίστηκαν 0.17 g AgNO<sub>3</sub> (1mmol). Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε εκχύλισμα χαμομηλιού ποσότητας 10 ml, έπειτα προστέθηκε η ποσότητα του νιτρικού αργύρου και αναμίχθηκαν υπό ανάδευση για μερικά λεπτά. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 2-3 λεπτά όπου πραγματοποιήθηκε η αντίδραση και παρατηρήθηκε αλλαγή του χρώματος σε σκούρο καφέ, ενδεικτικό του σχηματισμού νανοσωματιδίων αργύρου. Στη συνέχεια, το μίγμα των νανοσωματιδίων τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων 10 λεπτά για να σπάσει τη δομή των νανοσωματιδίων και να αποφευχθεί η συσσωμάτωσή

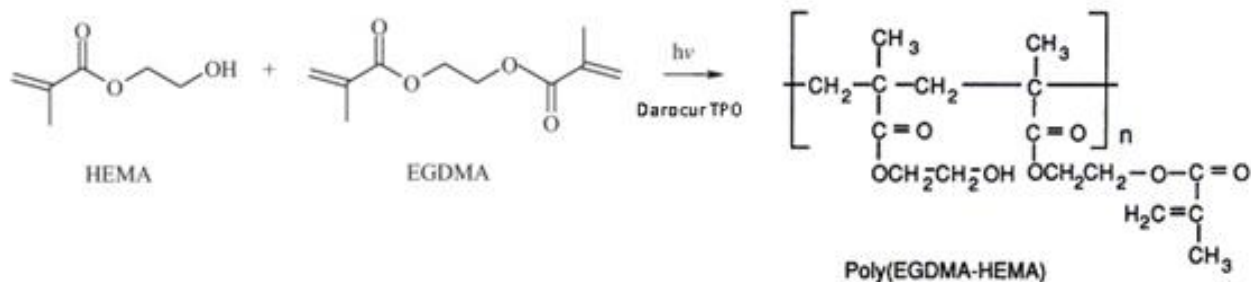
τους. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 20 λεπτά απ όπου συλλέχθηκε το ίζημα των νανοσωματιδίων, αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε πλύση των νανοσωματιδίων όπου απομακρύνονται από την επιφάνεια τους διασκορπίστηκαν σε νερό και πραγματοποιήθηκε πάλι φυγοκέντρηση, έτσι απομακρύνεται η περίσσεια του φυτικού εκχυλίσματος. Τελικά τα νανοσωματίδια αφού ξηράθηκαν, συλλέχθηκαν σε μορφή σκόνης (εικόνα 19) και αποθηκεύτηκαν.



*Εικόνα 19. Σκόνη νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs*

### **1.3 Σύνθεση φακού επαφής υδρογέλης pHEMA και νανοσύνθετου φακού pHEMA@AgNPs**

Το pHEMA αποτελεί υδατοδιαλυτό πολυμερές που προέρχεται από τον συμπολυμερισμό του μεθακρυλικού υδροξυαιθυλεστέρα (HEMA) με μικρή ποσότητα διμεθακρυλικού εστέρα της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA) ως συμμονομερούς για να επιτευχθεί η δικτύωση. Το πολυμερές παράγεται με ελεύθερες ρίζες σε υδατικό διάλυμα. Η διαδικασία πολυμερισμού αρχίζει με υπεριώδες φως. Στο πείραμα θα χρησιμοποιηθεί ως εκινηητής το Trimethylbenzoyldiphenyl-phosphineoxide\* (Darocur TPO). Στην εικόνα 20 φαίνεται η αντίδραση για τον σχηματισμό του pHEMA.



Εικόνα 20. Σύνθεση πολυ(μεθακρυλικού υδροξαιθυλεστέρα)

### Παρασκευή υδρογέλης pHEMA

Για την παρασκευή της υδρογέλης για τελικό όγκο 4,71 ml, αναμείχθηκε 2.7 ml HEMA συγκέντρωσης 4.71 M , 10 μl EGDMA συγκέντρωσης 0,0112 M και 2 ml δις-αποσταγμένου νερού ddH<sub>2</sub>O σε καθαρό γυάλινο φιαλίδιο. Αφού παρασκευάστηκε το διάλυμα, έγινε παροχή αέριου αζώτου N<sub>2</sub> για 15 λεπτά, με σκοπό να αφαιρεθεί το οξυγόνο το οποίο δρα ως παρεμποδιστής κατά τον πολυμερισμό και να υπάρχει αδρανής ατμόσφαιρα. (εικόνα 21)

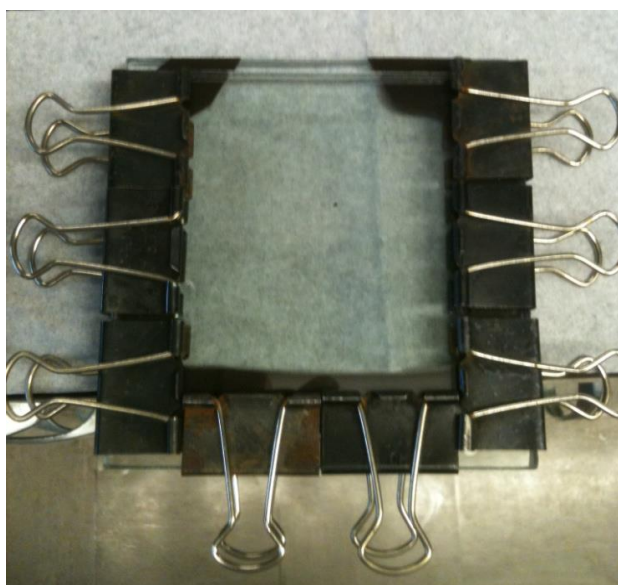


Εικόνα 21. Παροχή αέριου αζώτου N<sub>2</sub> για απομάκρυνση οξυγόνου από το διάλυμα

Καθώς η ανάδευση συνεχίζεται, δημιουργήθηκε ένα καλούπι για την υδρογέλη χρησιμοποιώντας δύο γυάλινες πλάκες με υδρόφοβη επικάλυψη (Rain-X) \*. Οι υδρόφοβες επιφάνειες τοποθετήθηκαν η μία έναντι της άλλης. Στη συνέχεια, κόπηκε μία διαχωριστική μεμβράνη (πάχος ~240 μm) σε ένα κοίλο σχήμα (εικόνα 20) και τοποθετήθηκε μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η στερέωση των γυάλινων πλακών μαζί (εικόνα 23).



*Εικόνα 22. Διαχωριστική μεμβράνη που τοποθετείται μεταξύ των πλακών*

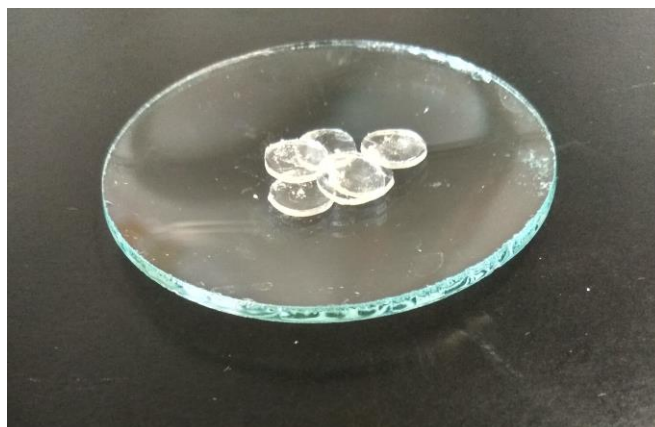


*Εικόνα 23. Στερέωση γυάλινων πλακών για το καλούπι της υδρογέλης*

Ζυγίστηκαν 6 mg εκκινητή TPO (Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide) ενώ το διάλυμα βρισκόταν σε διαδικασία ανάδευσης και αφού τελείωσε η διαδικασία ανάδευσης προστέθηκε το TPO στο διάλυμα όπου και αναδεύτηκε για 5 λεπτά στις 800 rpm. Αφού το διάλυμα αναμίχθηκε, με πλαστική πιπέτα Παστέρ μεταφέρθηκε προσεκτικά στο καλούπι και τοποθετείται σε θάλαμο με λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας για 40 λεπτά ώστε να επιτευχθεί ο φωτοπολυμερισμός. Μόλις τελείωσε ο πολυμερισμός, αφαιρέθηκαν τα κλιπ από το καλούπι και η υδρογέλη κόπηκε σε κυκλικούς δίσκους με κόφτη και αφαιρέθηκαν με λαβίδα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια διαδικασία πλύσεων των κυκλικών δίσκων υδρογέλης για την απομάκρυνση των μονομερών που δεν αντέδρασαν από την υδρογέλη. Το στάδιο των πλύσεων περιλαμβάνει εμβάπτιση των δίσκων υδρογέλης διαδοχικά σε :

- Αρχικά σε δις απεσταγμένο νερό ddH<sub>2</sub>O
- NaCl 0.9%
- HCl 0.1%
- Δις απεσταγμένο νερό ddH<sub>2</sub>O

Τελικά οι δίσκοι υδρογέλης αποθηκεύονται σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%).



Εικόνα 24. Φακοί επαφής υδρογέλης pHEMA

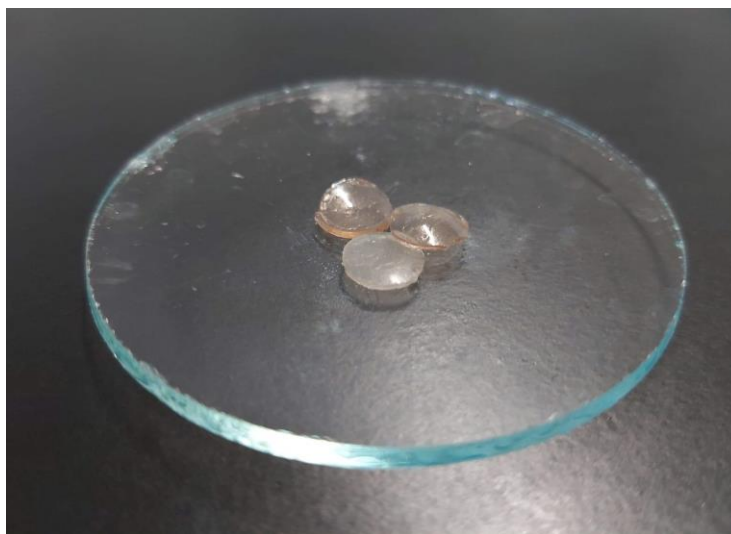
#### Παρασκευή νανოსύνθετου φακού υδρογέλης pHEMA@AgNPs

Η διαδικασία παρασκευής του νανოსύνθετου φακού υδρογέλης είναι σχεδόν όμοια με αυτήν της υδρογέλης pHEMA, με την διαφορά ότι στο διάλυμα προστέθηκε και διάλυμα των νανοσωματιδίων



αργύρου (AgNPs). Για την σύνθεση του νανοσύνθετου υλικού μελετήθηκαν δύο συγκεντρώσεις , 1 mg/ml και 2 mg/ml των νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs.

Για τελικό όγκο 2,2 ml και για συγκεντρώσεις 1 mg/ml και 2 mg/ml νανοσωματιδίων αργύρου στην υδρογέλη pHEMA ζυγίστηκε αντίστοιχα ποσότητα AgNPs και υπολογίσθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των μονομερών HEMA και EGDMA καθώς και αυτή του δις απεσταγμένου νερού. Οι συγκεντρώσεις του HEMA (4,71 M) και του EGDMA (0,0112 M) είναι ίδιες με αυτές της σύνθεσης της απλής υδρογέλης pHEMA. Τα νανοσωματιδια διαλύθηκαν στην ποσότητα νερού που εισάγεται για την σύνθεση της υδρογέλης. Αφού διαλύθηκαν τα νανοσωματίδια στο ddH<sub>2</sub>O, αναμείχθηκαν με το HEMA και EGDMA σε καθαρό γυάλινο σωλήνα υπό ανάδευση. Παροχή αέριου αζώτου N<sub>2</sub> για 15 λεπτά εξασφάλισε αδρανή ατμόσφαιρα στο διάλυμα. Στη συνέχεια ζυγίστηκε ποσότητα του εκκινητή TPO, προστέθηκε στο διάλυμα και αναδεύτηκε για 5 λεπτά στις 800 rpm. Παράλληλα ετοιμάσθηκε το καλούπι από τις γυάλινες επιφάνειες. Μόλις ολοκληρώθηκε η ανάδευση το διάλυμα εισάγεται στο καλούπι και αυτό σε ειδικό θάλαμο με λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας για περίπου 45 λεπτά, όπου πραγματοποιήθηκε ο πολυμερισμός. Εν συνεχεία, ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα για την κοπή της υδρογέλης σε κυκλικούς δίσκους καθώς και για τις πλύσεις τους ώστε να απομακρυνθούν τα μονομερή που δεν αντέδρασαν.



Εικόνα 25. Φακοί επαφής νανοσύνθετης υδρογέλης pHEMA@AgNPs

## 2. Βιολογικό μέρος

Η βιολογική μελέτη περιλαμβάνει τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης αρχικά των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs). Ο έλεγχος και η διεύρυνση της αντιμικροβιακής δράσης των AgNPs είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς στοχεύει στην παραγωγή νέων αντιμικροβιακών παραγόντων με υποσχόμενες εφαρμογές, καθώς και στην αντιμετώπιση του προβλήματος που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Εν συνεχεία, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των νανوسύνθετων υλικών pHEMA@AgNPs. Το δεύτερο μέρος της βιολογικής μελέτης περιλαμβάνει το προσδιορισμό της τοξικότητας τόσο των AgNPs όσο και των νανوسύνθετων pHEMA@AgNPs σε κύτταρα του κερατοειδούς χιτώνα αφού στόχος είναι η σύνθεση στείρων φακών επαφής.

### 2.1 Αντιμικροβιακή δράση

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης των AgNPs και των pHEMA@AgNPs πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) καθώς και των ζωνών αναστολής (IZ). Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι δύο θετικά κατά Gram βακτήρια (*S. aureus* και *S. epidermidis*) και δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*E. coli* και *P. aeruginosa*).

Τα θρεπτικά υλικά μέσα ήταν διαφορετικά και τα βέλτιστα για το κάθε βακτήριο σύμφωνα με την American Type Culture Collection (ATCC). Για την *P. Aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε tryptone (1%, 10g/L), yeast extract (0,5%, 5g/L) και NaCl (1%, 10g/L). Για τον *S. epidermidis* χρησιμοποιήθηκε beef extract (1%, 3g/L) και peptone (0,5%, 5g/L). Για τον *S. aureus* χρησιμοποιήθηκαν tryptone (1,7%, 17g/L), soytone (0,3%, 3g/L), dextrose (0,25%, 2,5g/L), NaCl (0,5%, 5g/L), και K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,25%, 2,5g/L). Για το υγρό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O). Για το στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε και άγαρ (1,5%, 15g/L). Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα θρεπτικά αποστειρώθηκαν σε εργαστηριακό κλίβανο. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν είτε μέσα σε hood με laminar air flow είτε κάτω από στείρα φλόγα ώστε να εξασφαλισθούν στείρες συνθήκες.

### **2.1.1 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)**

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) ορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *in vitro*. Για τον υπολογισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης επιλέχθηκε ένα εύρος λογαριθμικών συγκεντρώσεων. Για τελικό όγκο 2 ml υπολογίσθηκαν οι κατάλληλοι όγκοι για το θρεπτικό, την ουσία προς εξέταση ουσία καθώς και του μικροβίου. Έτσι σε 2 ml 0,9M NaCl διαλύθηκε κατάλληλη ποσότητα. Σχηματίστηκε στοκ διάλυμα νανοσωματιδίων αργύρου σε δις απεσταγμένο νερό 1 mg/ml. Για την ίδια συγκέντρωση της ουσίας χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις στο ίδιο πείραμα. Στη συνέχεια, ο αριθμός των μικροβίων που θα εμβολιαστούν οι σωλήνες πρέπει να είναι σταθερός. Θεωρητικά κάθε κύτταρο μπορεί να σχηματίσει μια αποικία. Το μικρόβιο βρίσκεται σε τρυβλίο το οποίο έχει επωαστεί για 24 ώρες. Με μικροβιολογικό κρίκο πήραμε 3 με 5 ομοιόμορφες αποικίες και τις διαλύσαμε στο φυσιολογικό ορό. Ακολούθησε ανάδευση σε συσκευή βόρτεξ για να σχηματιστεί ομοιόμορφο διάλυμα. Ο φυσιολογικός ορός μας εξασφαλίζει ότι τα μικρόβια θα παραμείνουν ζωντανά. Ακολούθως, έγινε μέτρηση σε φωτόμετρο όπου στα 625 nm αναμένεται απορρόφηση 0.08-0.013, το οποίο μας εξασφαλίζει ότι υπάρχει η απαραίτητη ποσότητα μικροβίου. Τέλος, το στατό με τους σωλήνες τοποθετήθηκε στο επωαστή για 16-20 ώρες σε θερμοκρασία 35<sup>0</sup>C. Την επόμενη μέρα έγιναν μετρήσεις των απορροφήσεων στα 620 nm για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις.

### **2.1.2 Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC)**

Η χαμηλότερη συγκέντρωση που θανατώνεται ο μικροοργανισμός κατά 99.9%. Για την MBC χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικά στερεά συστατικά των 10 ml. Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με 4 μL από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της MIC. Τα αποτελέσματα είναι ορατά μετά το πέρας των 24h, όπου σκανάρεται το τρυβλίο και αποθηκεύεται το αποτέλεσμα.

### 2.1.3 Ζώνη Αναστολής - IZ

Η ζώνη αναστολής εμφανίζει την διάμετρο, κατά την οποία σταματά η ανάπτυξη των βακτηρίων. Για τα πειράματα των IZ απαιτούνται τρυβλία με θρεπτικά στερεά συστατικά κατάλληλα για την ανάπτυξη του κάθε βακτηρίου των 20 ml, αποστειρωμένος βαμβakoφόρος στείλεός και αποστειρωμένα κυλινδρικά χαρτιά διαμέτρου 9 mm. Αρχικά ο βαμβakoφόρος στείλεός εμβαπτίζεται για 20 sec σε διάλυμα βακτηρίου με  $A = 0,1$  (500000 βακτήρια) και εμβολιάζεται το θρεπτικό υλικό. Εν συνεχεία τα απορροφητικά χαρτιά εμβαπτίζονται σε διάλυμα των AgNPs συγκέντρωσης 1 mg/ml και τοποθετούνται πάνω στο θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα καθίστανται ορατά σε 24h όπου σκανάρεται το τρυβλίο και αποθηκεύεται το αποτέλεσμα.

### 2.1.4 Ποσοστό βακτηριακής βιωσιμότητας

Η αντιμικροβιακή ικανότητα των ναοσύνθετων pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2 αξιολογήθηκε έναντι του αρνητικά κατά Gram βακτηριακού στελέχους *P. Aeruginosa* και των θετικά κατά Gram βακτηρίων *S. Aureus* και *S. Epidermidis*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την μικροβιακή κερατίτιδα. Για την προσδιορισμό αυτών των ιδιοτήτων δίσκοι των pHEMA, pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2 τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν  $5 \cdot 10^5$  cfu/mL από τα μικρόβια *P.aeruginosa*, *S.aureus* και *S.epidermidis*. Το ποσοστό της βακτηριακής βιωσιμότητας των παραπάνω βακτηρίων εξετάσθηκε ύστερα από επώασή τους με δίσκους των pHEMA@AgNPs για περίπου 20 ώρες. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των απορροφήσεων στα 620 nm.

## 2.2 Τοξικότητα Human Corneal Eukaryotic Cells (HCEC)

Τα κύτταρα HCEC είναι υγιή ανθρώπινα κύτταρα του κερατοειδούς χιτώνα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της τοξικότητας των AgNPs και των pHEMA@AgNPs. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρέμεινε κατεψυγμένη σε δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο ( $-196^\circ\text{C}$ ). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ψύξη τους είναι η εξής: 1) Τα κύτταρα στην εκθετική φάση

ανάπτυξής τους συλλέγονται από το τρυβλίο ανάπτυξής τους και φυγοκεντρώνονται στις 3000 στροφές για 10 λεπτά. 2) Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε μίγμα κατάψυξης, που αποτελείται από 950μl εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS), ο οποίος χρησιμοποιείται για την επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος μετά την φυγοκέντρηση, και 50μl διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Χρησιμοποιείται DMSO, διότι είναι κρυοπροστατευτικό, εμποδίζοντας τους παγοκρυστάλλους που δημιουργούνται να τρυπήσουν την κυτταρική μεμβράνη. 3) 1 ml του παραπάνω μίγματος μεταφέρεται σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης (cryotubes), τα οποία ψύχονται σταδιακά. 4) Αρχικά, τα ειδικά σωληνάρια κατάψυξης τοποθετούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες. Έπειτα μεταφέρονται σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο, όπου και διατηρούνται για μακρά χρονικά διαστήματα.

Για την επανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα μεταφέρονται από το υγρό άζωτο σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  και αφήνονται να ξεπαγώσουν σταδιακά. Το περιεχόμενο του σωληναρίου αφού ξεπαγώσει μεταφέρεται σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας και γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού, έτσι ώστε ο τελικός όγκος στο τρυβλίο να είναι 10 ml. Μετά από 24 ώρες γίνεται αλλαγή θρεπτικού έτσι ώστε να απομακρυνθεί το DMSO από την καλλιέργεια, καθώς φυσιολογικά το DMSO είναι κυτταροτοξικό.

Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με βάση τις οδηγίες του προμηθευτή τους. Συγκεκριμένα, για την καλλιέργειά τους χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). Το θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του, εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού υλικού, ο οποίος παρέχει τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και με το αντιβιοτικό πενικιλίνη σε αναλογία 0,5% του όγκου του θρεπτικού υλικού. Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο, ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$ , κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5%  $\text{CO}_2$ .

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν όταν τα κύτταρα είχαν αυξήσει τον πληθυσμό τους και είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια των τρυβλίων. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτείται αρχικά η αποκόλλησή τους. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο, τα κύτταρα πλένονται με

κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer Saline (PBS) για να απομακρυνθεί η περίσσεια θρεπτικού, και κατόπιν προστίθεται θρυψίνη σε κατάλληλο όγκο. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους στο τρυβλίο και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται και μπορούν να συλλεχθούν. Για να δράση απαιτείται η πλήρης απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού (πλύσεις με PBS), ειδικά η δράση του ενζύμου απενεργοποιείται. Τα τρυβλία παραμένουν για κατάλληλο χρονικό διάστημα στον επωαστικό κλίβανο μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν (μέγιστος χρόνος 10 λεπτά). Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχεται στο μικροσκόπιο και στη συνέχεια, για την απενεργοποίηση της θρυψίνης, προστίθεται άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε δεκαπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης (10 ml). Τέλος, μεταφέρεται η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων σε ένα νέο τρυβλίο και προστίθεται ανάλογη ποσότητα καλλιεργητικού υλικού (τελικός όγκος 10 ml).

Για να ελεγχθεί η κυτταροτοξικότητα της ουσίας και για να υπολογιστεί η ανασταλτική συγκέντρωση που αναστέλλει κατά 50% την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική sulforhodamine b sodium salt (SRB, Sigma-Aldrich). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής: 1) Καλλιέργεια κυττάρων σε τρυβλίο με 96 wells. Ο αριθμός των κυττάρων καθορίζεται ανάλογα με την κυτταρική σειρά (HCEC 8000 κύτταρα/well). 2) Επώαση κυττάρων για 24h στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 3) Προσθήκη ουσίας και θρεπτικού (τελικός όγκος 200μl) και επώαση των κυττάρων με την ουσία για 48h. 4) Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και προσθήκη 50μl 10% τριχλωροακετικού οξέος (TCA) για μονιμοποίηση των κυττάρων. 5) Επώαση για 30min στους 4°C, 6) Αφαίρεση TCA και πλύσεις (5) με διαβαθμισμένους όγκους απιονισμένου νερού. 6) Παραμονή του τρυβλίου σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 24h έτσι ώστε να στεγνώσει μετά τις πλύσεις. 7) Προσθήκη 70μl SRB 0.4% w/v διαλυμένη σε 100 ml οξικού οξέος και αναρρόφηση αυτού μετά από το πέρας 20 λεπτών. 8) Ακολουθούν 5 εκπλύσεις με αυξανόμενους όγκους (80-90-100-110-120 μL) με CH<sub>3</sub>COOH 1%. 9) Αφού στεγνώσει το πλακίδιο γίνεται η προσθήκη 200μl 10mM unbuffered Tris-Base σε κάθε πηγαδάκι και ανάδευση ώστε να διαλυτοποιηθεί η χρωστική. 10) Μέτρηση της απορρόφησης του κάθε well στα 540nm.

## Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

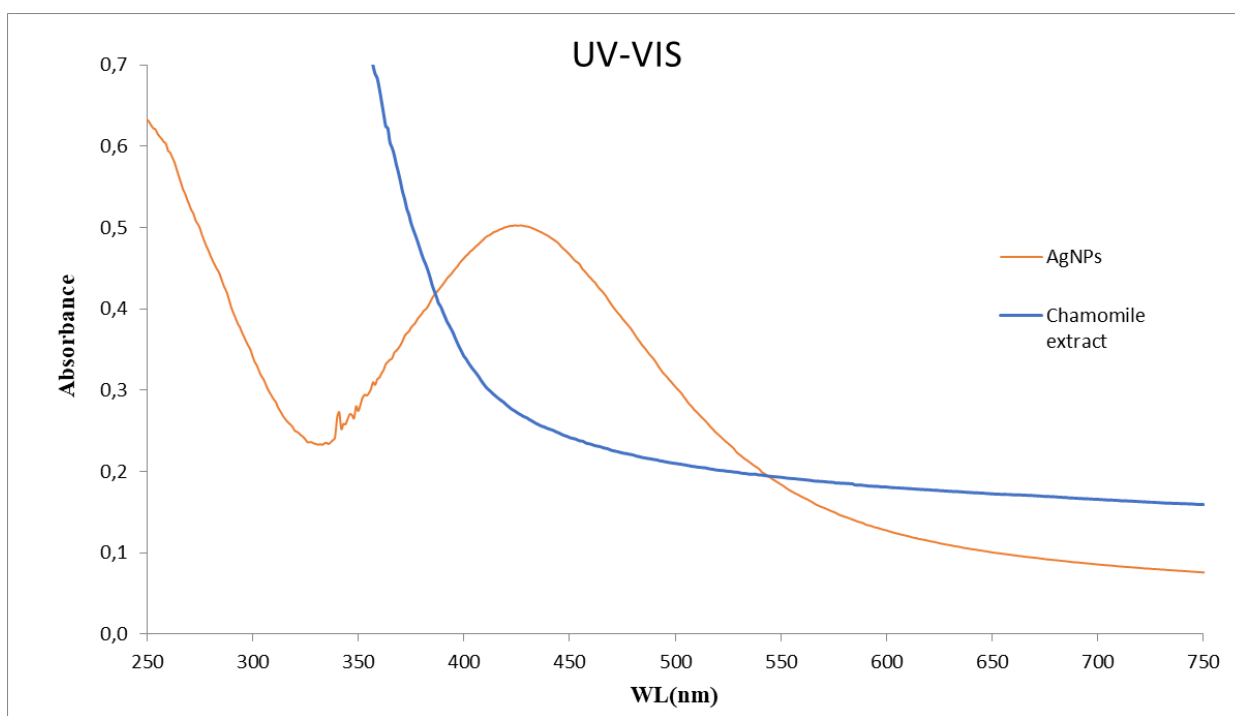
### 1. Χημικό μέρος

#### 1.1 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs

Για τον χαρακτηρισμό των AgNPs και pHEMA@AgNPs χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές UV-VIS, FTIR, XRD, XRF, DLS, SEM, TG, DSC, DTA

- **Φασματοσκοπία ορατού – υπεριώδους UV-VIS**

Λήφθηκαν φάσματα ορατού υπεριώδους αρχικά του εκχυλίσματος χαμομηλιού και στη συνέχεια του διαλύματος νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs με διαλύτη νερό για συγκέντρωση 1 mg/ml.

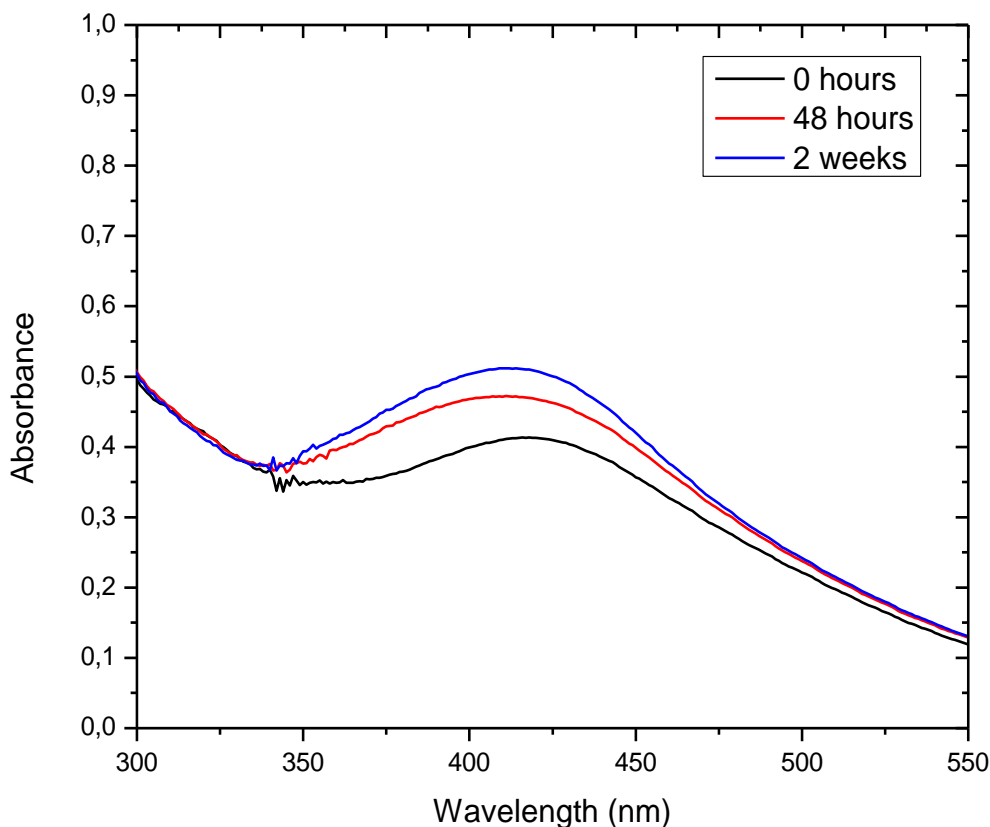


Εικόνα 26. Φάσματα ορατού υπεριώδους UV-VIS AgNPs και χαμομηλιού

Στην εικόνα 26 φαίνονται τα φάσματα ορατού υπεριώδους των AgNPs και του εκχυλίσματος χαμομηλιού. Από το φάσμα UV-VIS επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων. Όπως απεικονίζεται στο σχήμα το φάσμα του εκχυλίσματος χαμομηλιού δεν απορροφά στην περιοχή, ενώ στο φάσμα των AgNPs παρατηρείται ευρεία κορυφή στα 424 nm. Η κορυφή οφείλεται στην απορρόφηση επιφανειακού πλασμονίου (SPR) του αργύρου και είναι ενδεικτική του σχηματισμού των

νανοσωματιδίων αργύρου. Όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία, το μέγιστο μήκος κύματος του SPR των νανοσωματιδίων αργύρου εξαρτώνται από το σχήμα και το μέγεθος τους.

Με φασματοσκοπία με UV-VIS ελέγχτηκε η σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Παρασκευάστηκε διάλυμα νανοσωματιδίων συγκέντρωσης 1 mg/ml και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για 2 εβδομάδες.

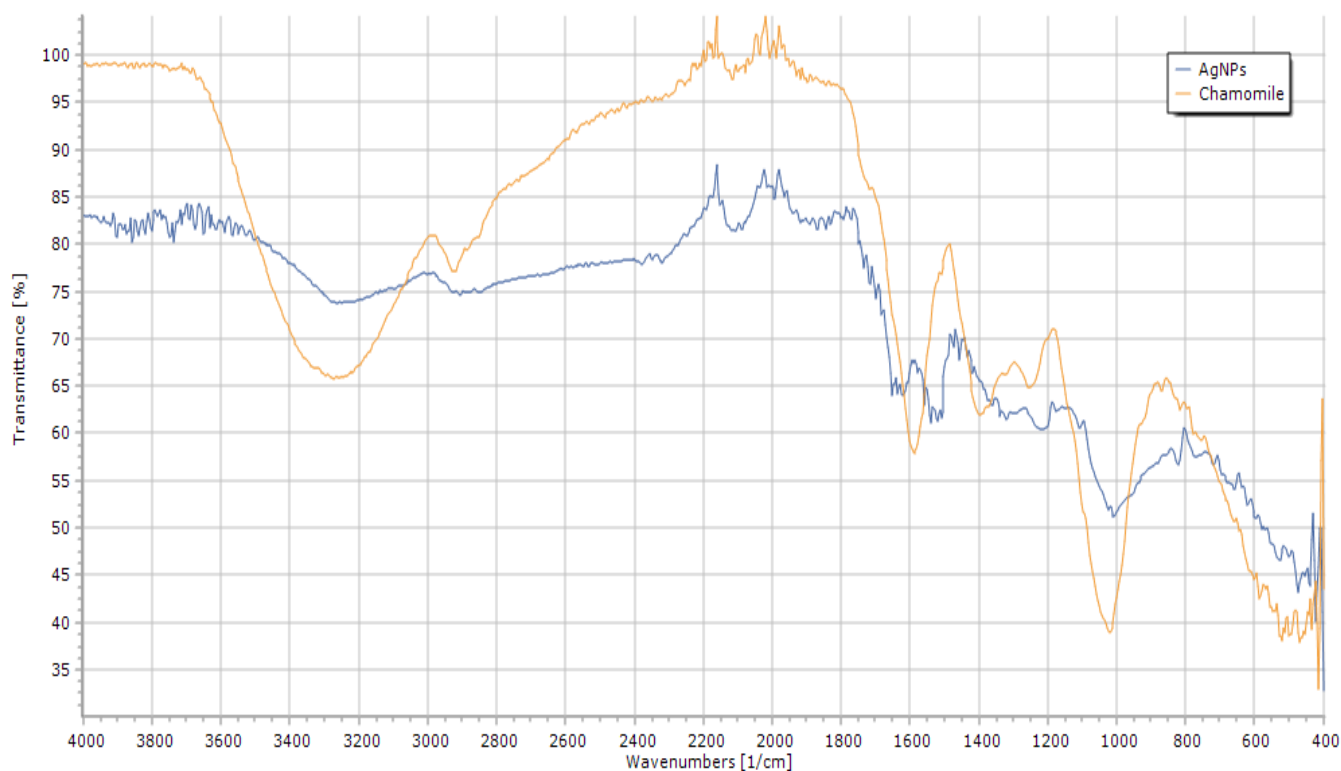


Εικόνα 27. Μέτρηση απορρόφησης UV-VIS δύο εβδομάδες για σταθερότητα των AgNPs

- **Φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR**

Το φάσμα απορρόφησης υπερύθρου αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση και για την απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης, παρέχοντας πληροφορίες για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο, καθώς και τη διάταξή τους στον χώρο. Στην συγκεκριμένη εργασία λήφθηκαν φάσματα υπερύθρου για το χαμομήλι και ύστερα για τα νανοσωματίδια αργύρου που σχηματίστηκαν και έγινε η σύγκρισή τους.



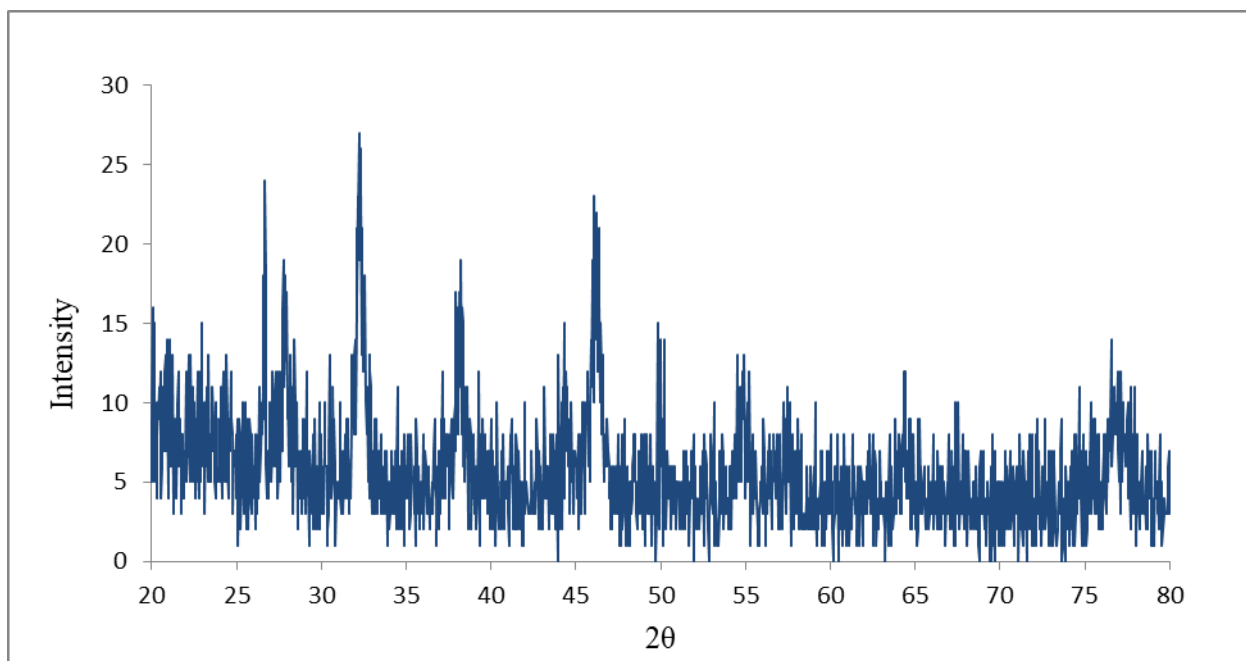


Εικόνα 28. Φάσματα υπερόθρου IR των AgNPs και χαμομηλιού

Όπως φαίνεται και στο φάσμα της εικόνας 28 το χαμομήλι εμφανίζει κορυφές στους  $3273\text{ cm}^{-1}$ ,  $1592\text{ cm}^{-1}$ ,  $1395\text{ cm}^{-1}$  και  $1022\text{ cm}^{-1}$  που οφείλονται στις δραστικές ομάδες του (φαινολικές ενώσεις, βλαβονοειδή τερπένια κλπ). Η παρουσία των δραστικών ομάδων του χαμομηλιού που είναι υπεύθυνα για την αναγωγή και σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων αργύρου στην επιφάνειά τους ταυτοποιήθηκαν από τις κοινές κορυφές του φάσματος των AgNPs με το χαμομήλι στα  $3273\text{ cm}^{-1}$ ,  $1200\text{ cm}^{-1}$   $1022\text{ cm}^{-1}$ . Το φάσμα των AgNPs εμφανίζει επιπλέον δύο κορυφές στα  $1626\text{ cm}^{-1}$  και  $1637\text{ cm}^{-1}$  που δεν εμφανίζονται στο χαμομήλι.

- **Περίθλαση ακτίνων X (XRD)**

Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής των AgNPs πραγματοποιήθηκε με την τεχνική περίθλασης ακτίνων X (XRD).



Εικόνα 29. Περίθλαση ακτίνων X των AgNPs

Στο περιθλασιογράφημα φαίνονται οι κορυφές σε τιμές  $2\theta$  στις 38.24, 44.3, 64.37 και 76.73 που από βάση δεδομένων ταυτοποιήθηκε πως οφείλονται σε μεταλλικό άργυρο Ag και αντιστοιχεί στις τιμές δεικτών Miller (hkl)- (111), (200), (220) και (311). Η μελέτη με την τεχνική XRD έδειξε πως τα σωματίδια του δείγματος είναι νανοσωματίδια αργύρου AgNPs που έχουν κυβική εδροκεντρωμένη κρυσταλλική δομή (FCC). Επιπλέον, εμφανίζονται άλλες δύο κορυφές σε τιμές  $2\theta$  στις 32.25 και 54.5 που πιθανώς οφείλονται σε νανοσωματίδια οξειδίου του αργύρου  $Ag_2O$ . Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι κορυφές.

Πίνακας 1. Πίνακας κορυφών που εμφανίζονται στο περιθλασιογράφημα και αντιστοιχούν σε Άργυρο και οξείδιο του αργύρου

<b>2θ</b>	<b>(hkl)</b>	
32.25		$Ag_2O$
38.24	(111)	Ag
44.3	(200)	Ag
64.37	(220)	Ag
76.73	(311)	Ag

Από το περιθλασιογράφημα επίσης υπολογίστηκε το μέσο κρυσταλλικό μέγεθος  $D$  των νανοσωματιδίων αργύρου από την εξίσωση Debye – Scherrer :  $D=0.9*\lambda/\beta*\cos\theta$ , όπου  $\lambda$  είναι το μήκος κύματος των ακτίνων X που χρησιμοποιούνται για την περίθλαση,  $\beta$  είναι το μέγιστο πλάτος στο μέσο της κορυφής (FWHM) και υπολογίστηκε από το Origin από την καμπύλη Gauss. Στον πίνακα 2 φαίνονται οι υπολογισμοί για τον προσδιορισμό του μεγέθους για τις κορυφές στις τιμές 2 $\theta$ , 32.24 και 38,24 μοίρες.

Πίνακας 2. Υπολογισμός μεγέθους κρυστάλλου νανοσωματιδίων αργύρου

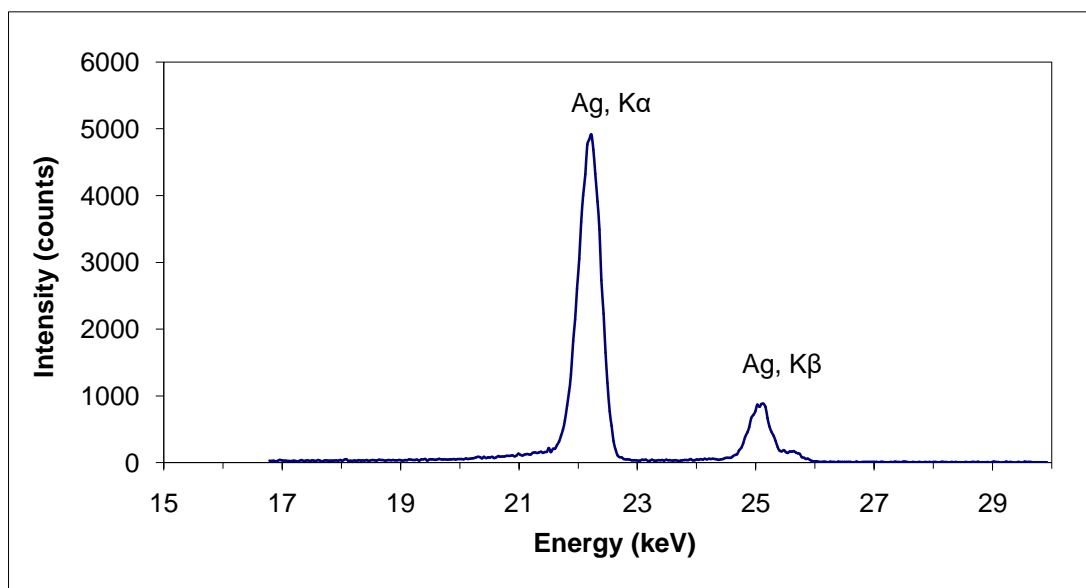
<b>2<math>\theta</math></b>	<b>FWHM</b>	<b><math>\theta</math></b>	<b><math>\theta</math> radian</b>	<b>FWHM radian</b>	<b>Crystalline size D (nm)</b>	<b>Average size (nm)</b>
32.21	0.5508	16.105	0.28	0.096	13.85	<b>14.33</b>
38.14	0.5065	19.07	0.33	0.088	14.82	

Από την εξίσωση Debye – Scherrer υπολογίστηκε το μέσο μέγεθος κρυστάλλου των νανοσωματιδίων αργύρου και βρέθηκε 14.33 nm.

- **Φθορισμός ακτίνων X (XRF)**

Για την στοιχειακή ανάλυση των AgNPs χρησιμοποιήθηκε η τεχνική φθορισμού ακτίνων X (XRF).

Από τη μέτρηση βρέθηκε άργυρος σε ποσοστό 49 % κ.β.



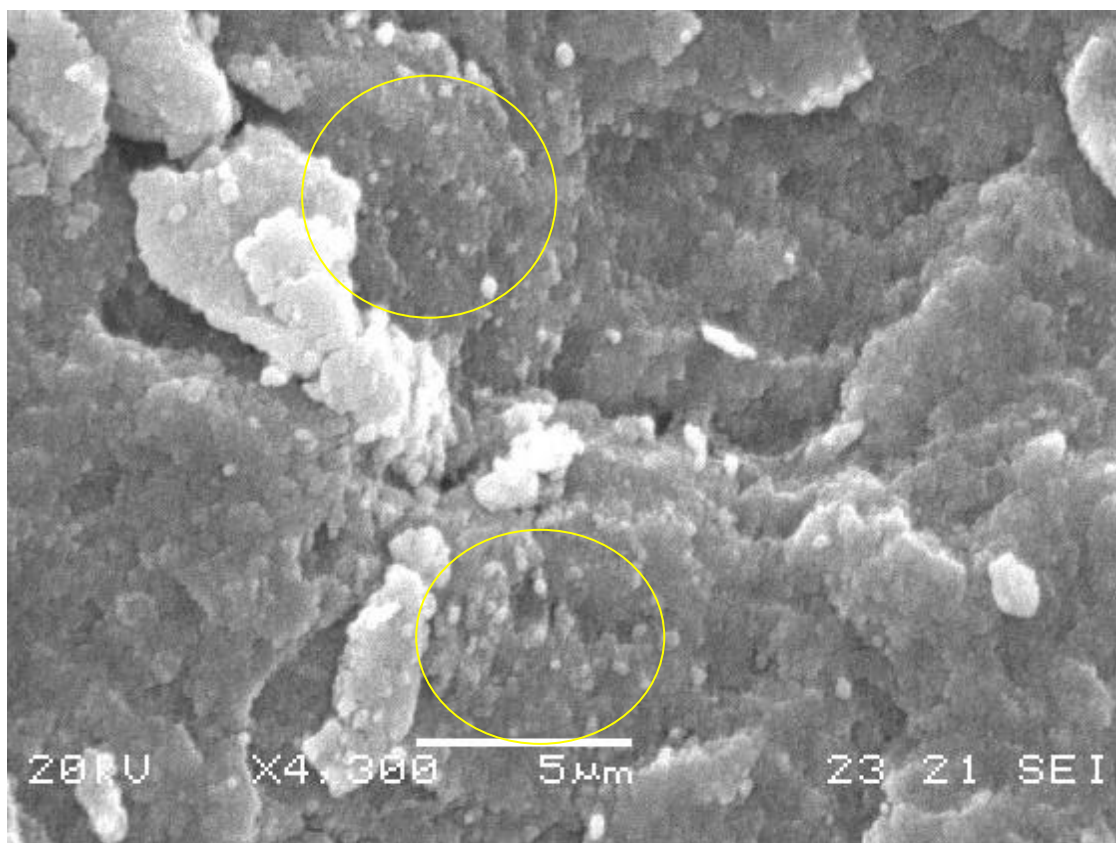
Εικόνα 30. Φάσμα φθορισμού ακτίνων X νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs

- **Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)**

Η δυναμική σκέδαση φωτός αποτελεί μια τεχνική που παρέχει γρήγορη, ακριβή και επαναλαμβανόμενες πληροφορίες για το μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς μπορεί να μετρηθεί το μέγεθος των νανοσωματιδίων σε διασπορά ταχύτητα, απαιτώντας ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Στην τεχνική DLS από την σκέδαση του φωτός στα σωματίδια ανιχνεύεται η συχνότητα ταλάντωσης του μοτίβου που καταγράφεται στον ανιχνευτή. Η συχνότητα αυτή είναι ανάλογη της κίνησης Brown των σωματιδίων η οποία εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων, καθώς μικρότερα σωματίδια δίνουν γρηγορότερη κίνηση Brown, ενώ επίσης εξαρτάται και από το ιξώδες του διαλύτη. Από την τεχνική DLS η διάμετρος που μετράται καλείται υδροδυναμική διάμετρος [60]. Για τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) που συντέθηκαν βρέθηκε υδροδυναμική διάμετρος 178 nm.

- **Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)**

Από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης εξετάστηκε η επιφάνεια και η μορφολογία των συνθεθειμένων νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs από εκχύλισμα χαμομηλιού. Από την εικόνα 31 παρατηρούμε νανοσωματίδια σφαιρικού σχήματος διαφόρων μεγεθών.



Εικόνα 31. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης SEM των συνθεθειμένων AgNPs από εκχύλισμα χαμομηλιού

- **Θερμική ανάλυση**

Ο όρος θερμική ανάλυση περιλαμβάνει μια ομάδα τεχνικών όπου μετρώνται μία ή περισσότερες φυσικές ιδιότητες ενός σώματος. Για την θερμική ανάλυση των νανοσωματιδίων αργύρου και χαμομηλιού χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές TGA, DTA και DSC.

Κατά την θερμοβαρυτομετρική ανάλυση TGA καταγράφεται η μεταβολή βάρους του δείγματος συναρτήσει της θερμοκρασίας. Η Διαφορική Θερμική Ανάλυση DTA καταγράφει μόνο μεταβολές που συνοδεύονται από μεταβολή ενθαλπίας, δηλαδή φυσικές διεργασίες ή χημικές μεταβολές.

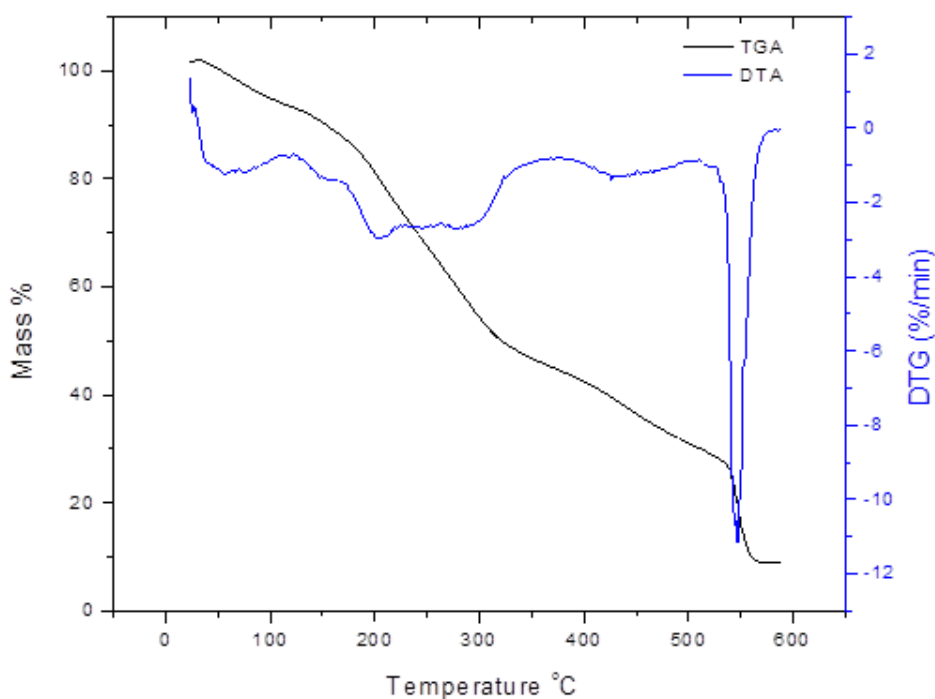
Οι πληροφορίες που μπορούμε να αντλήσουμε από ένα τέτοιο διάγραμμα είναι :

1. Φυσικές ενδόθερμες διεργασίες είναι η τήξη, η εξάτμιση, η εξάχνωση, η απορρόφηση και η εκρόφηση.
2. Εξώθερμες διεργασίες είναι συνήθως η προσρόφηση και η κρυστάλλωση.
3. Οι χημικές αντιδράσεις μπορούν επίσης να είναι ενδόθερμες ή εξώθερμες. Ενδόθερμες αντιδράσεις είναι η αφυδάτωση, η αναγωγή σε ατμόσφαιρα αερίου και η διάσπαση.

4. Εξώθερμες αντιδράσεις είναι η οξείδωση παρουσία αέρα ή οξυγόνου, ο πολυμερισμός και οι καταλυτικές αντιδράσεις.

Τέλος, η τεχνική της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης DSC, συνδέεται στενά με το DTA. Η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC) είναι ένα αποτελεσματικό αναλυτικό εργαλείο για τον χαρακτηρισμό των φυσικών ιδιοτήτων ενός υλικού. Το DSC επιτρέπει τον προσδιορισμό των θερμοκρασιών τήξης, κρυστάλλωσης και μεσομορφικής μετάβασης, καθώς και τις αντίστοιχες αλλαγές ενθαλπίας και εντροπίας, και χαρακτηρισμό της υαλώδους μετάβασης που δείχνουν είτε αλλαγές στη χωρητικότητα θερμότητας είτε σε λανθάνουσα θερμότητα.

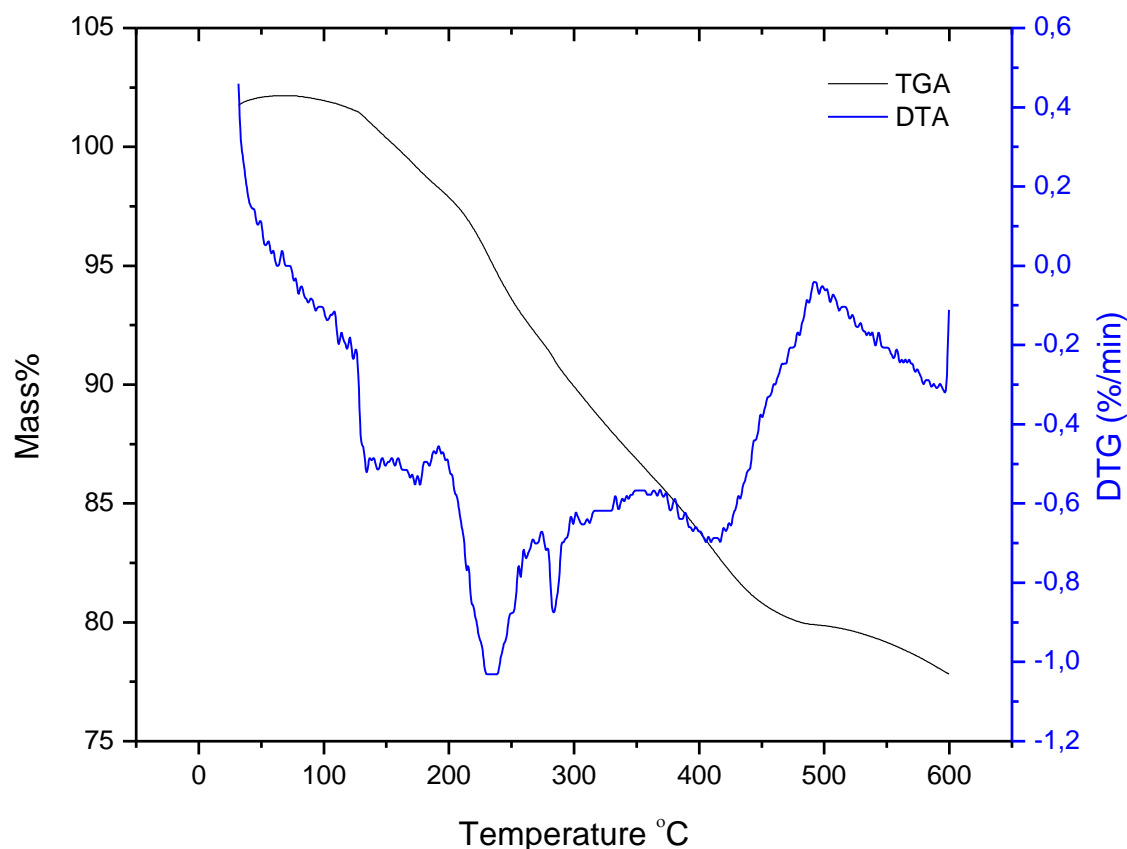
- TGA-DTA Χαμομηλιού



Εικόνα 32. TGA-DTA θερμογράφημα χαμομηλιού

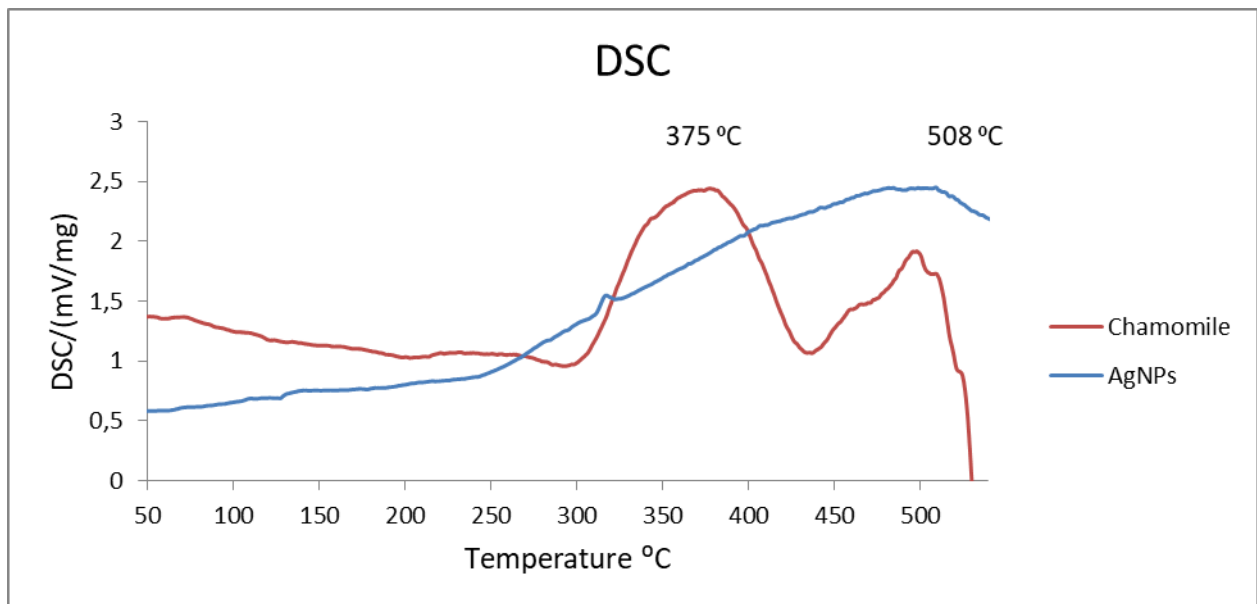
Από το θερμογράφημα της εικόνας 32 παρατηρούνται μεταβολές στη μάζα με αύξηση της θερμοκρασίας. Στην περιοχή θερμοκρασίας μεταξύ 120 και 511 °C παρατηρείται η κυρίαρχη απώλεια βάρους σε ποσοστό 63% , που πιθανώς οφείλεται στην εξάτμιση νερού και καύση διάφορων οργανικών συστατικών. Στην περιοχή μεταξύ 511 και 547 °C στην καμπύλη DTA εμφανίζεται μια έντονη εξώθερμη καμπύλη και άλλη μια μεταβολή στο βάρος 21%.

- TGA-DTA AgNPs



Εικόνα 33. Θερμογράφημα TGA-DTA των AgNPs

Στην εικόνα 33 φαίνεται το θερμογράφημα TGA-DTA των AgNPs. Μια μικρή απώλεια βάρους καταγράφεται στην περιοχή μεταξύ 119 και 190 °C, ενώ η κύρια απώλεια βάρους καταγράφεται στην περιοχή μεταξύ 190 και 490 °C που μπορούν να αποδοθούν στην εξάτμιση νερού και οργανικών συστατικών του χαμομηλιού που βρίσκονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αργύρου. Σε αυτήν την περιοχή εμφανίζονται και δύο εξώθερμες καμπύλες στο γράφημα DTA. Η συνολική απώλεια βάρους για τα AgNPs είναι 22%.



Εικόνα 34. Γράφημα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης DSC των AgNPs συγκριτικά με το χαμομήλι

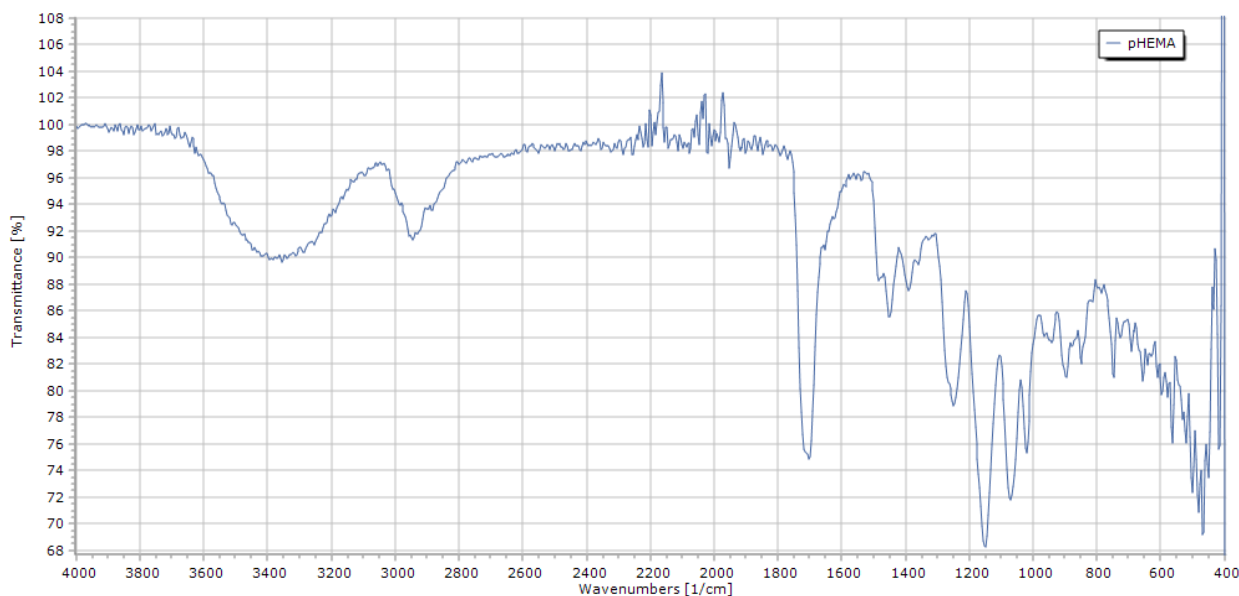
Στο γράφημα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης DSC των AgNPs όπου εμφανίζεται μια ενδόθερμη καμπύλη στους 508 περίπου °C ενώ στο χαμομήλι εμφανίζεται μία ευρεία ενδόθερμη στους 375 °C και μία στους 496 °C. Από το γράφημα βλέπουμε ότι οι εκάστοτε μεταβολές παρατηρούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες επομένως διαφέρουν και πρόκειται για καινούργια ένωση.

## 1.2 Χαρακτηρισμός pHEMA και pHEMA@AgNPs - 1&2

Για τον χαρακτηρισμό των υλικών φακών επαφής χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές FTIR, XRF, XRD, TGA και UV-VIS στερεάς κατάστασης.



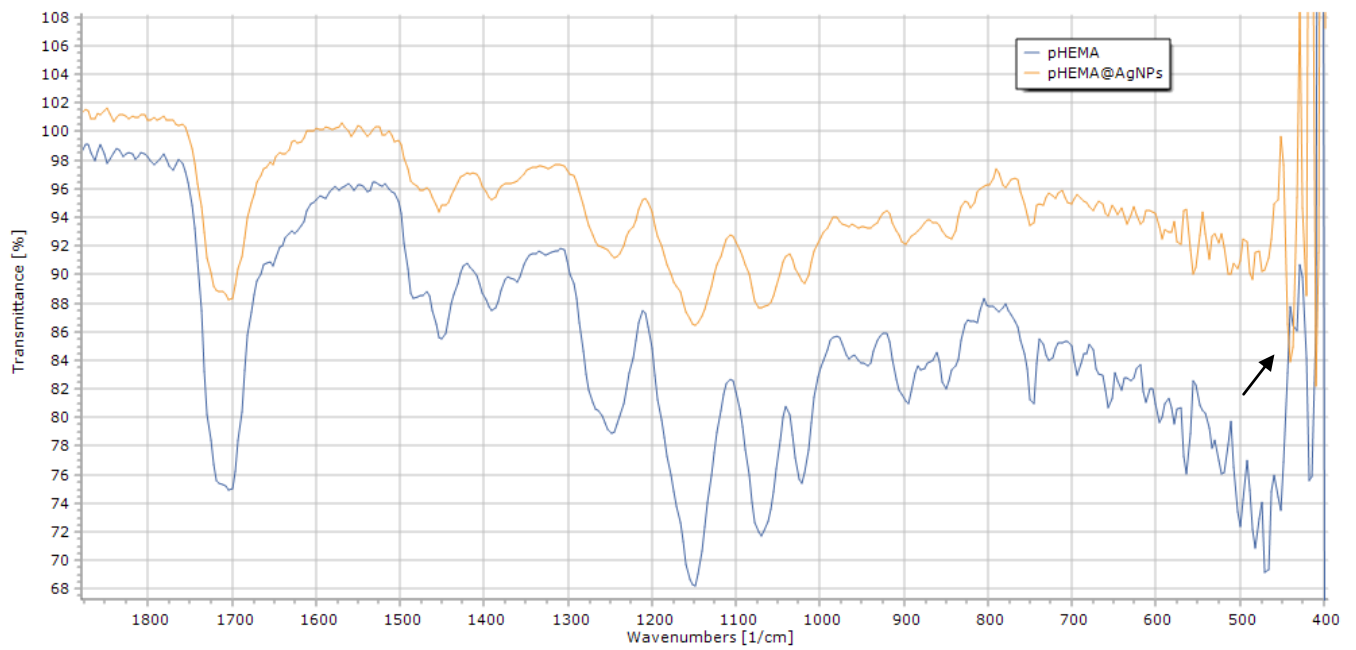
- **FTIR pHEMA και pHEMA@AgNPs - 1&2**



Εικόνα 35. Φάσμα υπερόθρου IR pHEMA

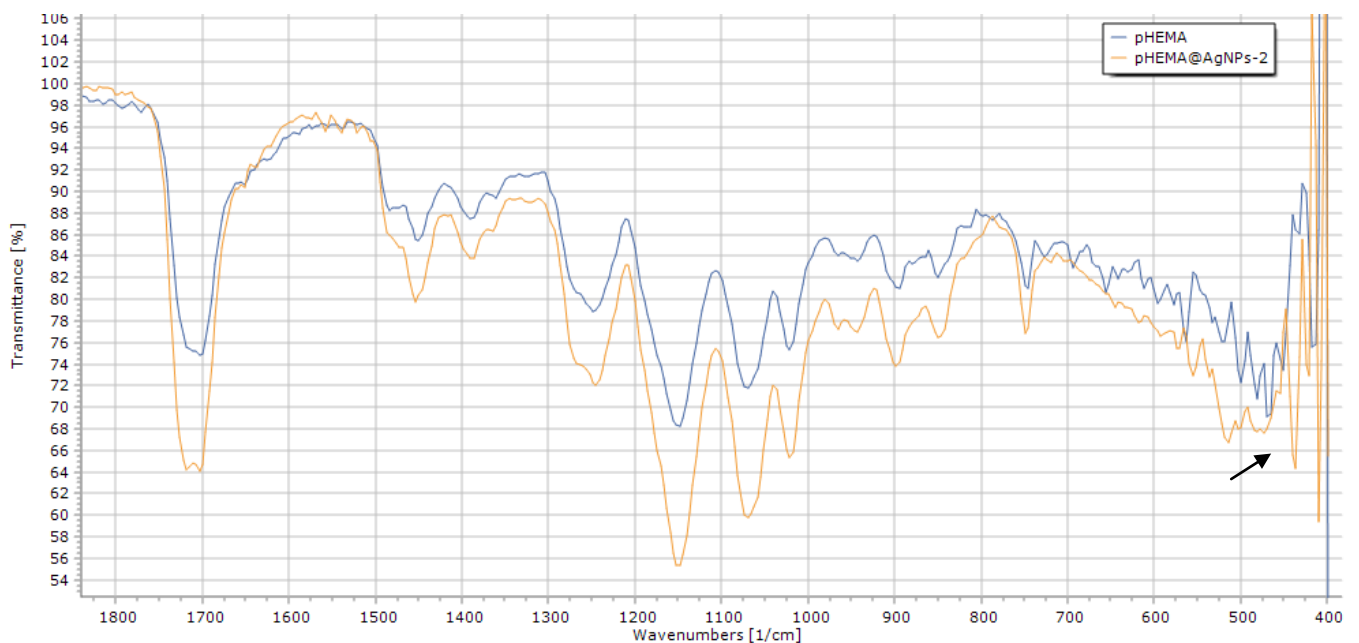
Στην εικόνα 35 φαίνεται το φάσμα υπερόθρου IR του pHEMA όπου παρατηρούνται οι αναμενόμενες απορροφήσεις δονήσεων των χαρακτηριστικών ομάδων του (C-O, C-H<sub>2</sub>, C=O, C-O-C). Στους 3355 cm<sup>-1</sup> η κορυφή απορρόφησης αποδίδεται στο δεσμό O-H, στους 2945 cm<sup>-1</sup> η κορυφή οφείλεται στο κορεσμένο δεσμό C-H. Στους 1700 cm<sup>-1</sup> εμφανίζεται δόνηση C=O ενώ οι κορυφές στους 1064-1148 cm<sup>-1</sup> αποδίδονται στον δεσμό C-O κορεσμένο.

Στην συνέχεια συγκρίνονται τα φάσματα υπερόθρου των pHEMA και pHEMA@AgNPs 1 και 2.



Εικόνα 36. Σύγκριση φασμάτων υπέρυθρου IR των pHEMA και pHEMA@AgNPs-1

Στην εικόνα 36 παρουσιάζονται και συγκρίνονται τα φάσματα υπέρυθρου για το pHEMA και pHEMA@AgNPs-1 (συγκέντρωσης 1 mg/ml). Στο φάσμα του pHEMA@AgNPs-1 εμφανίζονται οι ίδιες δονήσεις των δεσμών σε σχέση με το pHEMA, με τη μόνη διαφορά να εμφανίζεται στους  $467\text{ cm}^{-1}$  που πιθανώς οφείλεται σε δόνηση δεσμού Ag-O



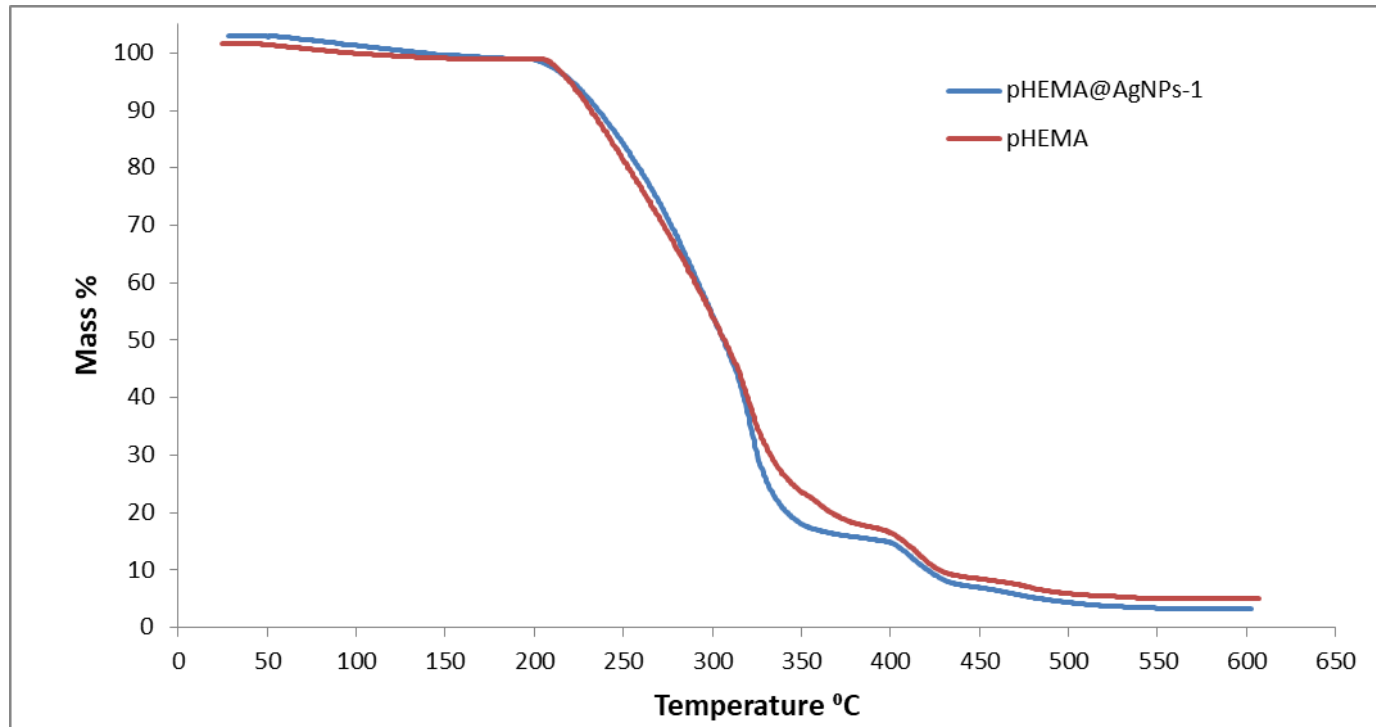
Εικόνα 37. Σύγκριση φασμάτων υπέρυθρου IR των pHEMA και pHEMA@AgNPs-2

Αντίστοιχα στην εικόνα 37 παρουσιάζονται και συγκρίνονται τα φάσματα υπερόθρου IR των pHEMA και pHEMA@AgNPs-2 (συγκέντρωσης 2 mg/ml). Παρόμοια, στο φάσμα του pHEMA@AgNPs-2 εμφανίζονται οι δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων του pHEMA, και εμφανίζεται μια επιπλέον δόνηση στους  $432\text{ cm}^{-1}$  που πάλι πιθανώς οφείλεται στην δόνηση δεσμού Ag-O, εξαιτίας της παρουσίας των AgNPs στην υδρογέλη. Επομένως, από τα φάσματα IR και τη σύγκρισή τους συμπερένουμε την παρασκευή των σύνθετων υδρογελών με τα νανοσωματίδια αργύρου.

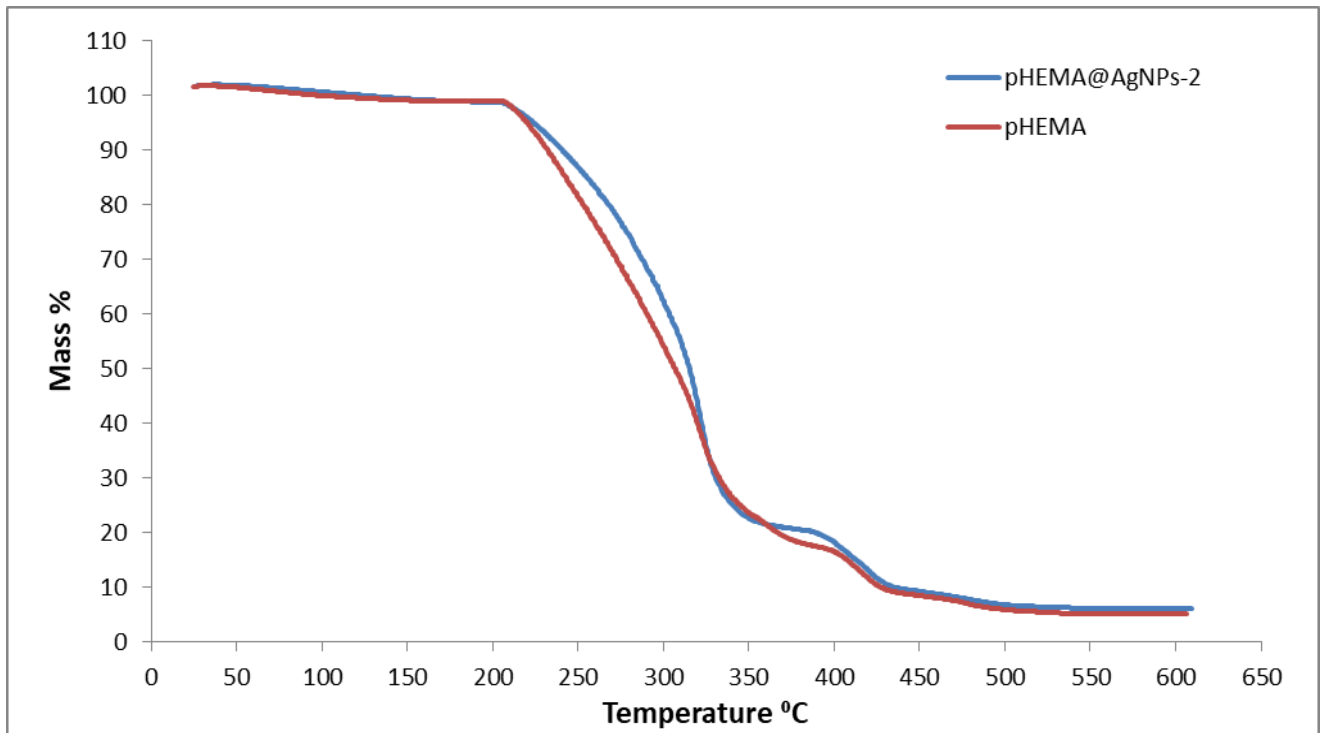
- **Θερμική ανάλυση**

- **Θερμοβαρουμετρική ανάλυση TGA**

Το TG είναι μια τεχνική που μετρά τις αλλαγές της μάζας ενός υλικού συναρτήσει της θερμοκρασίας υπό ελεγχόμενη ατμόσφαιρα. Καταγράφηκε η απώλεια μάζας για τα υλικά υδρογέλης και έγινε σύγκριση των διαφορών τους.



Εικόνα 38. Συγκριτικό TGA των pHEMA και pHEMA@AgNPs-1



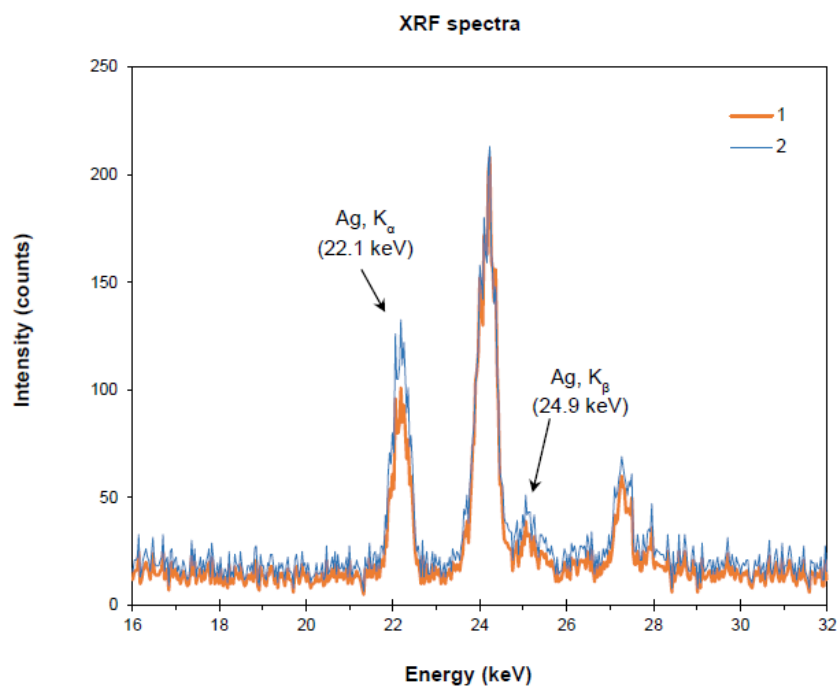
Εικόνα 39. Συγκριτικό TGA των pHEMA και pHEMA@AgNPs-2

Από τα θερμογραφήματα TGA των εικόνων 38 και 39 βλέπουμε τη σύγκριση του απλού pHEMA με τα αντίστοιχα pHEMA@AgNPs-1&2 και παρατηρούμε πως μοιάζουν αρκετά κατά τη θερμική διάσπασή τους. Όμως, εμφανίζουν κάποιες μικρές διαφορές που οφείλονται στα AgNPs που έχουν ενσωματωθεί σε αυτά και μπορούν να αποδοθούν στην διαφορά της απώλειας μαζών μεταξύ του pHEMA και των αντίστοιχων pHEMA@AgNPs-1&2. Για το pHEMA η κύρια απώλεια της μάζας του συμβαίνει στην θερμοκρασιακή περιοχή μεταξύ 193.1 και 389.1 °C, ενώ για το pHEMA@AgNPs-2 μεταξύ 196 και 377 °C.

- **Φθορισμός ακτίνων X (XRF)**

Με την τεχνική περίθλασης ακτίνων X πραγματοποιήθηκε η στοιχειακή ανάλυση των υλικών pHEMA@AgNPs όπου και βρέθηκε ποσότητα αργύρου που οφείλεται στην ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs στην μήτρα υδρογέλης pHEMA. Για το υλικό pHEMA@AgNPs-1 συγκέντρωσης 1 mg/ml βρέθηκε 0.15% κ.β άργυρος Ag, ενώ για το υλικό pHEMA@AgNPs-2

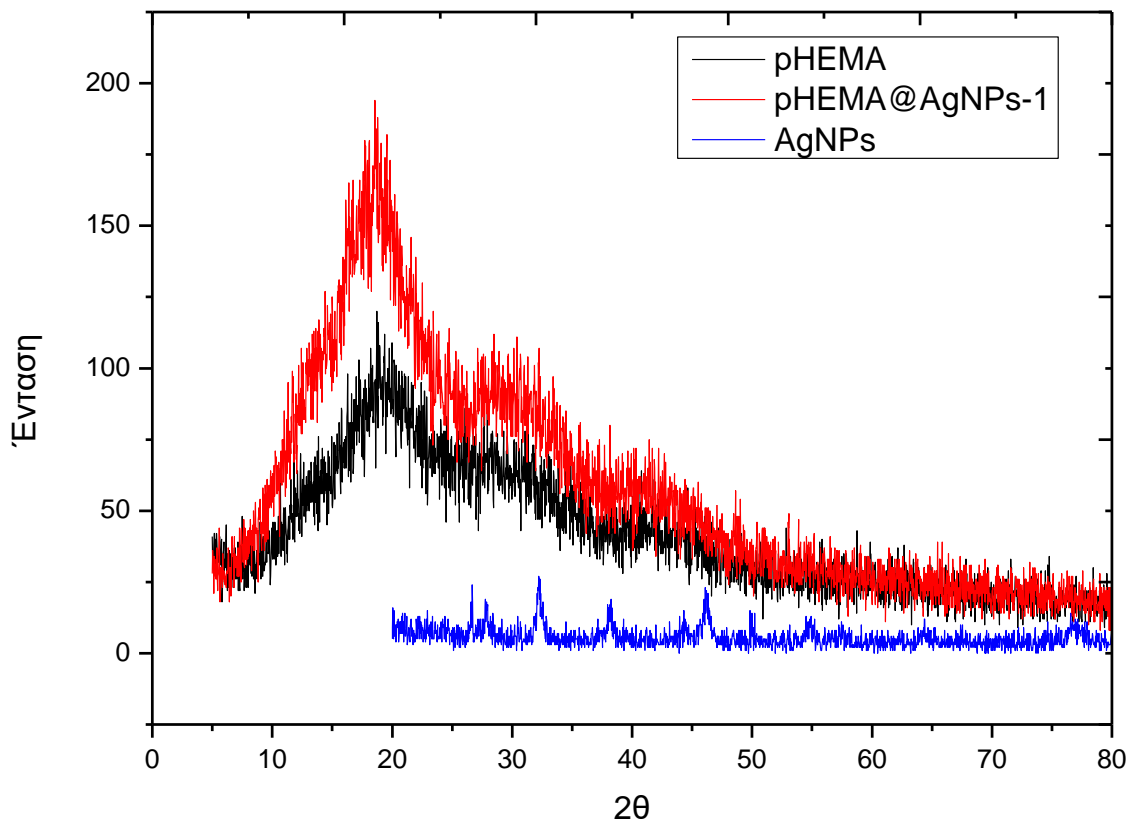
συγκέντρωσης 2 mg/ml βρέθηκε άργυρος σε ποσοστό 0.19% κ.β. Στην εικόνα 40 φαίνεται το φάσμα φθορισμού ακτίνων X για τα δύο υλικά.



Εικόνα 40. Φάσμα φθορισμού ακτίνων X (XRF) των δύο υλικών pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2

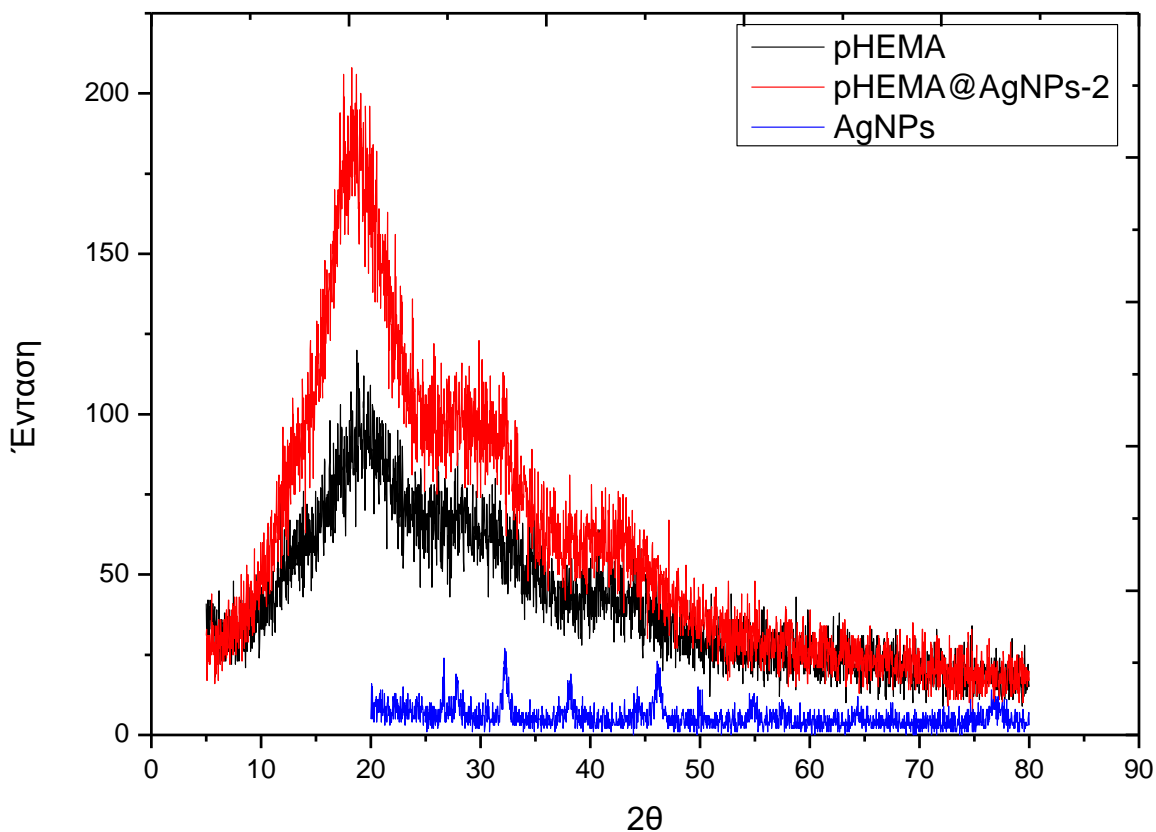
- **Περιθλαση ακτίνων X (XRD)**

Στην εικόνα 41 απεικονίζονται τα περιθλασιογραφήματα των pHEMA, pHEMA@AgNPs-1 και το αντίστοιχο των AgNPs και συγκρίνονται. Στο περιθλασιογράφημα εμφανίζονται κορυφές (σε τιμές  $2\theta$   $19^\circ$ ,  $31^\circ$  και  $42^\circ$ ) που σχετίζονται με την άμορφη φύση του pHEMA και εμφανίζονται και για το υλικό pHEMA@AgNPs-1. Λόγω της μικρής ποσότητας των AgNPs στο υλικό δεν εμφανίζεται κάποια κορυφή κρυσταλλικής φάσης που να σχετίζεται με τα AgNPs. Οπότε το υλικό pHEMA@AgNPs-1 είναι άμορφο και η μόνη διαφορά με το περιθλασιογράφημα του pHEMA είναι ότι οι κοινές κορυφές εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ένταση.



Εικόνα 41. Περιοθλασιογραφήματα των pHEMA και pHEMA@AgNPs-1 και AgNPs

Το ίδιο συμβαίνει και με το υλικό pHEMA@AgNPs-2 όπως απεικονίζεται στην εικόνα 42. Το pHEMA@AgNPs-2 είναι άμορφο και λόγω της μικρής ποσότητας των AgNPs δεν εμφανίζουν κάποια καθαρή κορυφή που να σχετίζεται με τα AgNPs που να φανερώνει κρυσταλλική δομή.



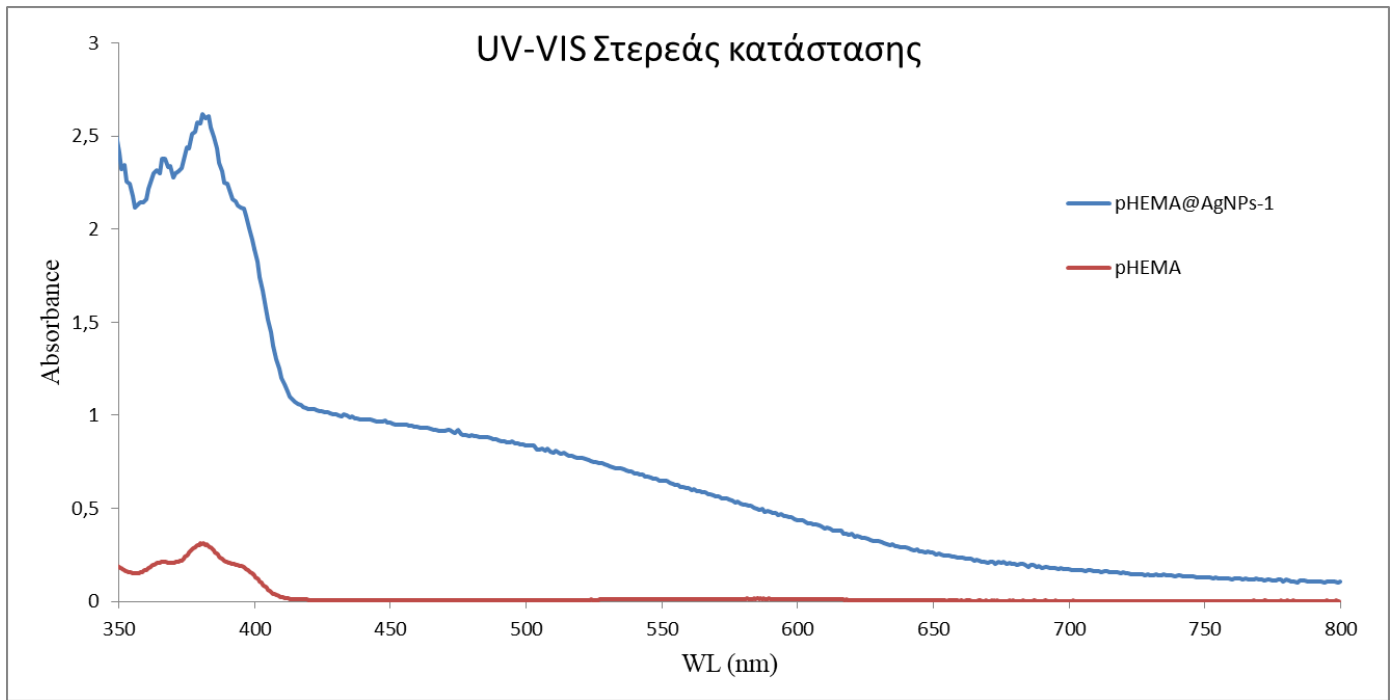
Εικόνα 42. Περιθλασιογράφημα των pHEMA, pHEMA@AgNPs-2 και AgNPs

- **UV-VIS Στερεάς κατάστασης**

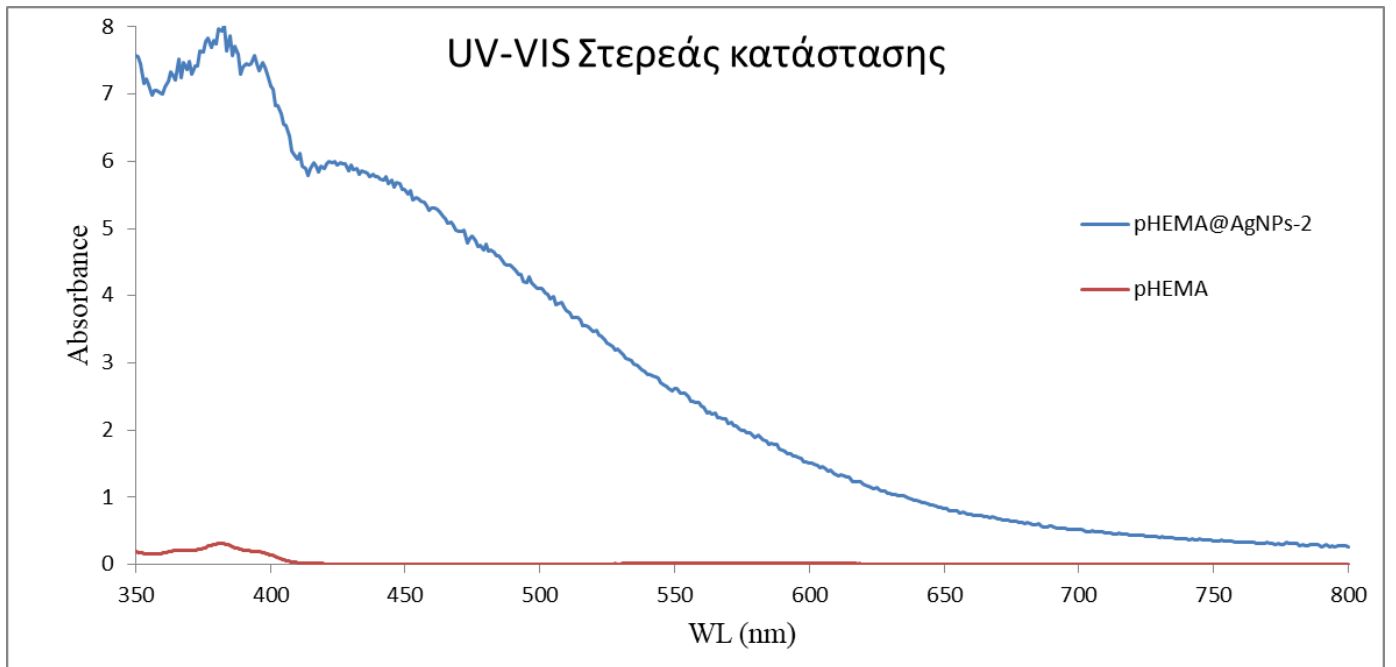
Η παρουσία των AgNPs στην μήτρα της υδρογέλης προσδιορίστηκε με την φασματοσκοπία UV-VIS στερεάς κατάστασης. Χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία UV-VIS στερεάς κατάστασης λόγω της μη διαλυτότητας της υδρογέλης pHEMA. Πάρθηκαν τα φάσματα για τα pHEMA, pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2. Στην στερεά κατάσταση στο φάσμα UV-VIS μετράται η ανακλαστικότητα συναρτήσει του μήκους κύματος και για την μετατροπή της σε απορρόφηση χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση KUBELKA MUNK :

$$A = \frac{(1 - \%R/100)^2}{2 * \%R/100}$$

όπου A είναι η απορρόφηση και R η ανακλαστικότητα.



Εικόνα 43. Φάσμα UV-VIS στερεάς κατάστασης για pHEMA και pHEMA@AgNPs-1



Εικόνα 44. Φάσματα UV-VIS στερεάς κατάστασης pHEMA και pHEMA@AgNPs-2



Από τα φάσματα παρατηρούμε πως για τα υλικά pHEMA@AgNPs 1 και 2 εμφανίζεται ένας ώμος που δεν εμφανίζεται στο φάσμα του απλού pHEMA. Αυτός οφείλεται στην παρουσία των AgNPs και το χαρακτηριστικό συντονισμό επιφανειακού πλασμονίου που εμφανίζουν και εμφανίζεται μεταξύ 410 και 550 nm. Στο pHEMA@AgNPs-2 εμφανίζεται υψηλότερη απορρόφηση λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης των AgNPs.

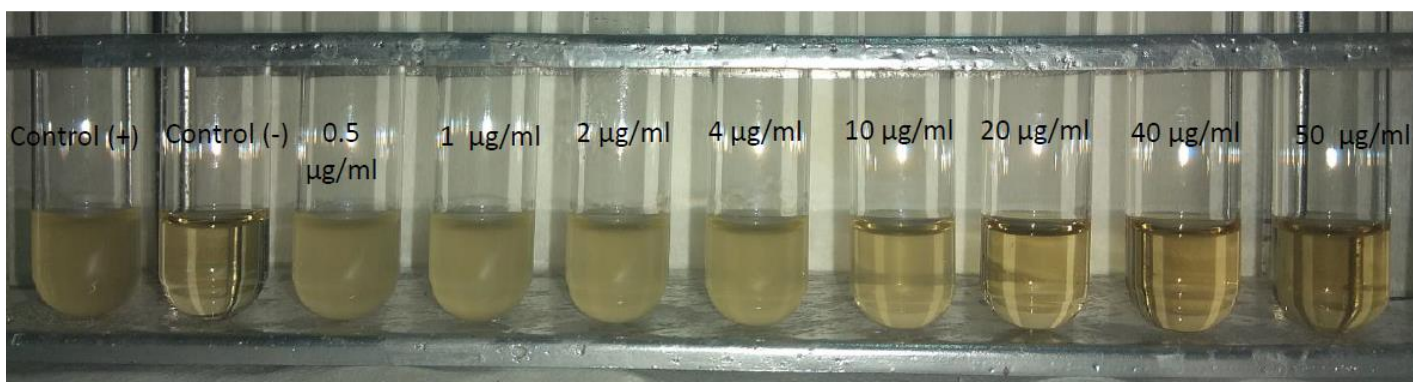
## 2. Βιολογικό μέρος

### 2.1 Αντιμικροβιακή μελέτη

#### 2.1.1 MIC AgNPs

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας, συνήθως ενός φαρμάκου, που αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροβίων. Η MIC εξαρτάται από τον μικροοργανισμό και το ίδιο το αντιβιοτικό [56,57]. Η MIC προσδιορίζεται με παρασκευή διαλυμάτων της χημικής ουσίας *in vitro* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, επώαση των διαλυμάτων με χωριστές παρτίδες καλλιεργημένων βακτηρίων και μέτρηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας υγρό θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα μπορούν να ταξινομηθούν σε ευαίσθητα, ενδιάμεσα ή ανθεκτικά σε κάποιο αντιβιοτικό.

#### *Pseudomonas Aeruginosa.*



Εικόνα 45. Υγρή καλλιέργεια PAOI παρουσία AgNPs

Στην εικόνα 45 απεικονίζεται η υγρή καλλιέργεια για το βακτήριο της *Pseudomonas aeruginosa*. Περιέχει το θετικό κοντρόλ όπου υπάρχει το θρεπτικό υλικό και το βακτήριο, το αρνητικό κοντρόλ που περιέχει μόνο το θρεπτικό υλικό και στους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες περιέχεται θρεπτικό υλικό σταθερή ποσότητα βακτηρίου και αυξανόμενες συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs). Μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των παραπάνω διαλυμάτων στα 620 nm για τον

υπολογισμό της επί της εκατό βιωσιμότητα των μικροβίων συναρτήσει της συγκέντρωσης. Τα AgNPs εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 0.5-70  $\mu\text{g/ml}$ .

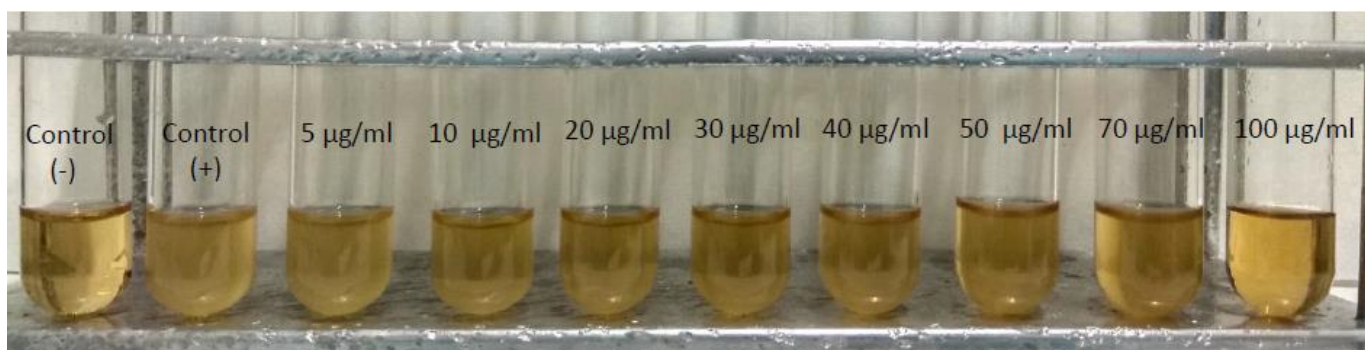
Πίνακας 3. Οπτικές απορροφήσεις *P. aeruginosa*-AgNPs

Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbance 1	Absorbance 2
Control (+)	0.858	0.852
0.5	0.835	0.908
1	0.830	0.830
2	0.801	0.745
4	0.760	0.664
10	0.280	0.234
20	0.026	0.034
30	0.031	0.044
40	0	0
50	0	0
60	0	0
70	0	0

Με κατάλληλη επεξεργασία των δεδομένων και μετά από τρεις επαναλήψεις υπολογίσθηκε η MIC των AgNPs στο βακτήριο της ψευδομονάδας και η τιμή της είναι 37.66  $\mu\text{g/ml}$  ( $\pm 1.38$ ).

### *Escherichia Coli*

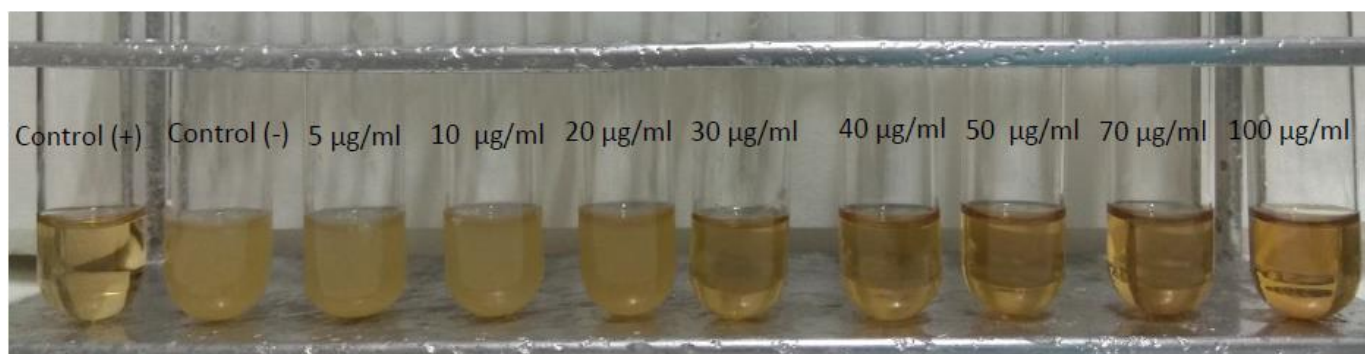
Η δράση των AgNPs στο βακτήριο της *E.Coli* μελετήθηκε στο εύρος των συγκεντρώσεων από 5-100 µg/ml.



Εικόνα 46. Υγρή καλλιέργεια *E.Coli* παρουσία AgNPs

Με αντίστοιχο τρόπο μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις των διαλυμάτων στα 620 nm και μετά από τρεις επαναλήψεις υπολογίστηκε η MIC των AgNPs στην *E.Coli* και βρέθηκε > 100 µg/ml.

### *Staphylococcus Epidermidis*



Εικόνα 47. Υγρή καλλιέργεια *S. Epidermidis* παρουσία AgNPs

Για το βακτήριο *S.Epidermidis* η δράση των AgNPs μελετήθηκε στο εύρος συγκεντρώσεων 5-100 µg/ml και πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Αντίστοιχα, μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις των διαλυμάτων στα 620 nm και μετά από επεξεργασία των δεδομένων υπολογίστηκε η MIC.

Πίνακας 4. Οπτικές απορροφήσεις S. Epidermidis-AgNPs

Concentrations (μg/ml)	Absorbance 1	Absorbance 2
Control (+)	1.46	1.192
5	1.286	1.299
10	1.116	1.201
20	1.021	1.178
30	0.042	0.212
40	0.098	0.092
50	0.08	0.9
70	0.037	0.037
100	0.06	0.06

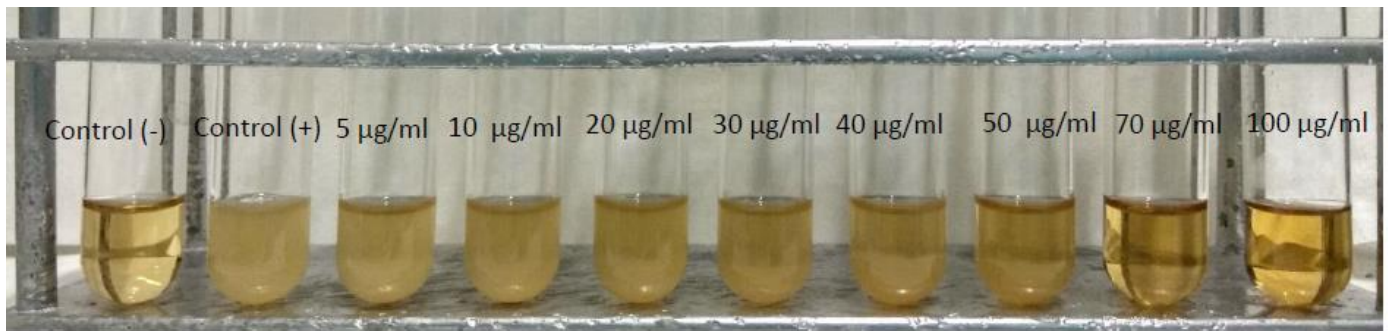
Η MIC των AgNPs στο βακτήριο S.Epidermidis βρέθηκε 77.11 μg/ml ( $\pm$  11.48)

Πίνακας 5. Πίνακας στατιστική επεξεργασία της MIC

Average	77.11
Counts	7
Stdev	15.49072666
Conf limit	11.48

### **Staphylococcus aureus**

Η δράση των AgNPs για το βακτήριο *S.Aureus* μελετήθηκε για τις συγκεντρώσεις 5-100 μg/ml όπου πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.



Εικόνα 48. Υγρή καλλιέργεια *S.Aureus*-AgNPs

Μετά από μέτρηση των οπτικών απορροφήσεων των διαλυμάτων στα 620 nm και επεξεργασία τους υπολογίστηκε η MIC.

Πίνακας 6. Οπτικές απορροφήσεις *S. Epidermidis*-AgNPs

<b>Concentrations (µg/ml)</b>	<b>Absorbance 1</b>	<b>Absorbance 2</b>
Control +	1.35	1.322
5	0.747	1.292
10	1.033	1.078
20	0.144	0.974
30	0.617	0.47
40	0.35	0.353
50	0.264	0.216
70	0.066	0.063
100	0.071	0.086

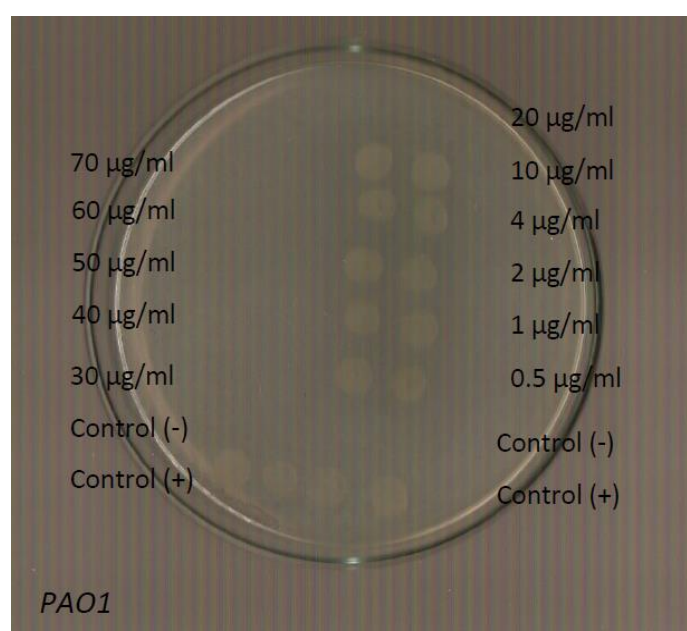
Μετά από επεξεργασία των δεδομένων υπολογίστηκε η τιμή της MIC 69.46 µg/ml ( $\pm$  7.63).

Πίνακας 7. Πίνακας στατιστική επεξεργασία της MIC

Average	69.46
Counts	8
Stdev	11.016
Conf limit	7.63

### 2.1.2 Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) AgNPs

Με τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) γίνεται εκτίμηση της βακτηριοκτόνου δράσης. Η MBC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που απαιτείται για να σκοτώσει το 99,9% του βακτηριακού πληθυσμού μετά από 24 ώρες επώαση. Για το προσδιορισμό της MBC πραγματοποιήθηκε πείραμα μάκροαραιωσης με την υποκαλλιέργεια ενός μικρού δείγματος (της τάξεως των 4  $\mu\text{L}$ ) σε τρυβλίο με 10 ml στερεό θρεπτικό υλικό κατάλληλο για το κάθε βακτήριο. Η μικρότερη συγκέντρωση που δε θα εμφανιστούν αποικίες βακτηριακού πληθυσμού θεωρείται ως η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC).



Εικόνα 49. MBC του βακτηρίου *P. Aeruginosa*

Στην εικόνα 49 απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *P. aeruginosa* παρουσία των AgNPs, όπου η θανάτωση του βακτηρίου επιτεύχθηκε στα 20 µg/ml. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα MBC των AgNPs για όλα τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις τρεις επαναλήψεις που έγιναν.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα MBC των AgNPs για τα βακτήρια

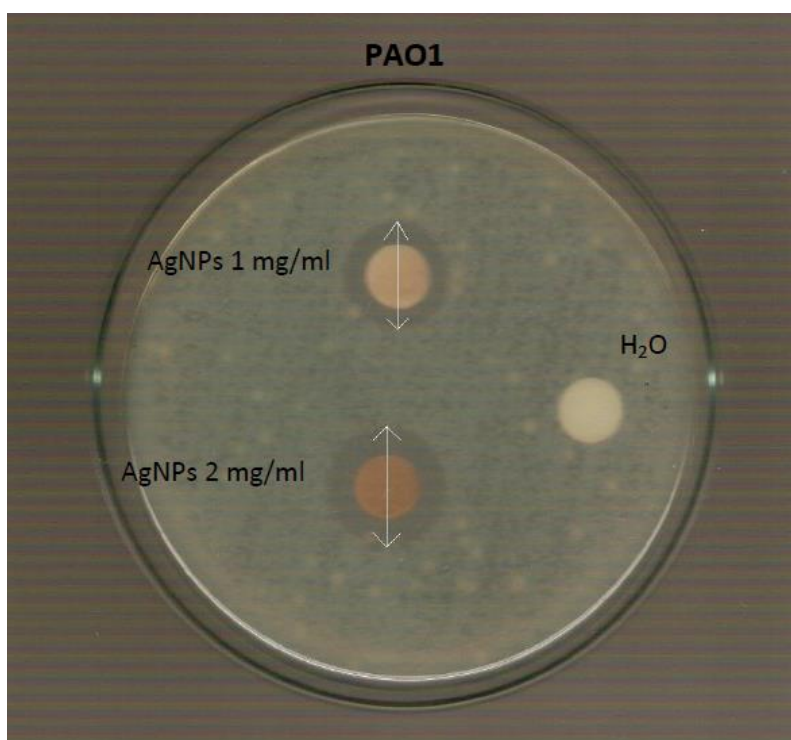
P.aeruginosa	24 µg/ml
S.aureus	>100µg/ml
S.epidermidis	>100 µg/ml
E.coli	>100 µg/ml

### 2.1.3 Ζώνη αναστολής (IZ) AgNPs

Παρασκευάστηκαν τρυβλία με 20ml θρεπτικό άγαρ. Κατόπιν το μικρόβιο (108 cfu/ml) απλώθηκε καλά σ' όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με την βοήθεια βαμβακοφόρου σπειλεού, ο οποίος είχε αποστειρωθεί. Ο βαμβακοφόρος σπειλεός εμβαπτίστηκε στο διάλυμα το μικροβίου και αφού διώχθηκε η περίσσεια του υγρού στα τοιχώματα του σωλήνα, με κατάλληλες κινήσεις απλώθηκε το μικρόβιο στο θρεπτικό άγαρ.

Παρασκευάστηκαν stock διαλύματα των AgNPs για δύο συγκεντρώσεις 1 mg/ml και 2 mg/ml. Αποστειρωμένοι χάρτινοι δίσκοι διαμέτρου 9 mm εμβαπτίστηκαν στα διαλύματα της ουσίας και αφού διώχθηκε η περίσσεια της ουσίας στα τοιχώματα του Eppendorf τοποθετήθηκαν στο τρυβλίο στην επιφάνεια του θρεπτικού. Μετά από επώαση 24h στους 37°C ελέγχθηκε η δημιουργία ζώνης αναστολής της οποίας η διάμετρος μετρήθηκε. Για κάθε βακτήριο πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

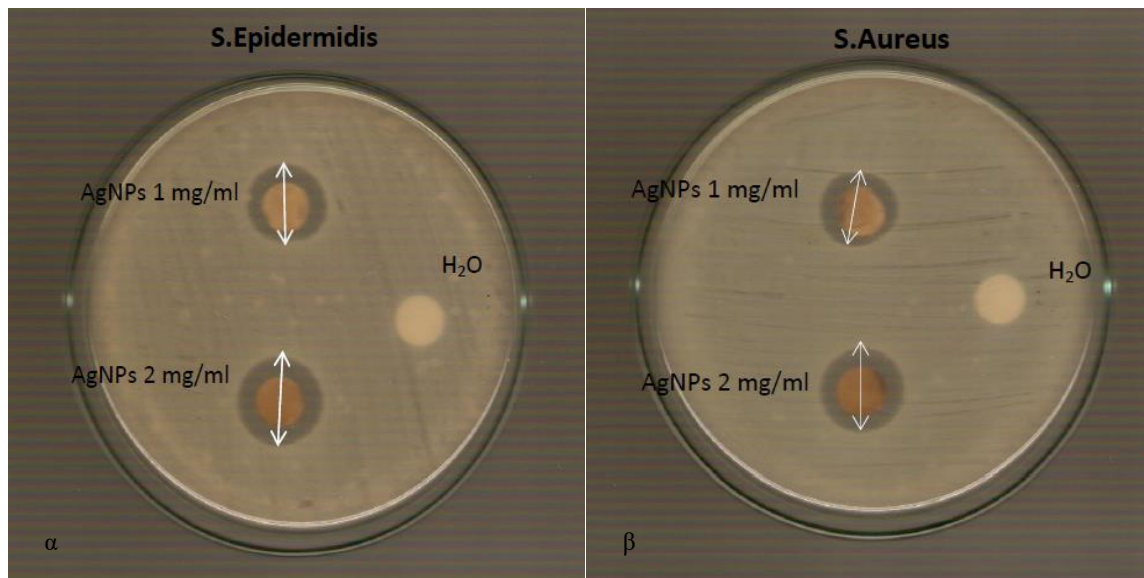




Εικόνα 50. Απεικόνιση ζώνης αναστολής των AgNPs για το βακτήριο *P. Aeruginosa*

Πίνακας 9. Συγκεντρωτικός πίνακας IZ για τα βακτήρια PAO1, E.Coli, S.Aureus και S.Epidermidis

Bacteria	IZ (mm) AgNPs 1 mg/ml	IZ (mm) AgNPs 2 mg/ml	IZ (mm) H <sub>2</sub> O
<i>P. Aeruginosa</i>	15.16 ( $\pm 1.17$ )	17.25 ( $\pm 0.49$ )	9
<i>E.Coli</i>	10.66 ( $\pm 0.65$ )	12 ( $\pm 0.65$ )	9
<i>S.Epidermidis</i>	15.33 ( $\pm 1.73$ )	17	9
<i>S.Aureus</i>	15	16.66 ( $\pm 1.3$ )	9



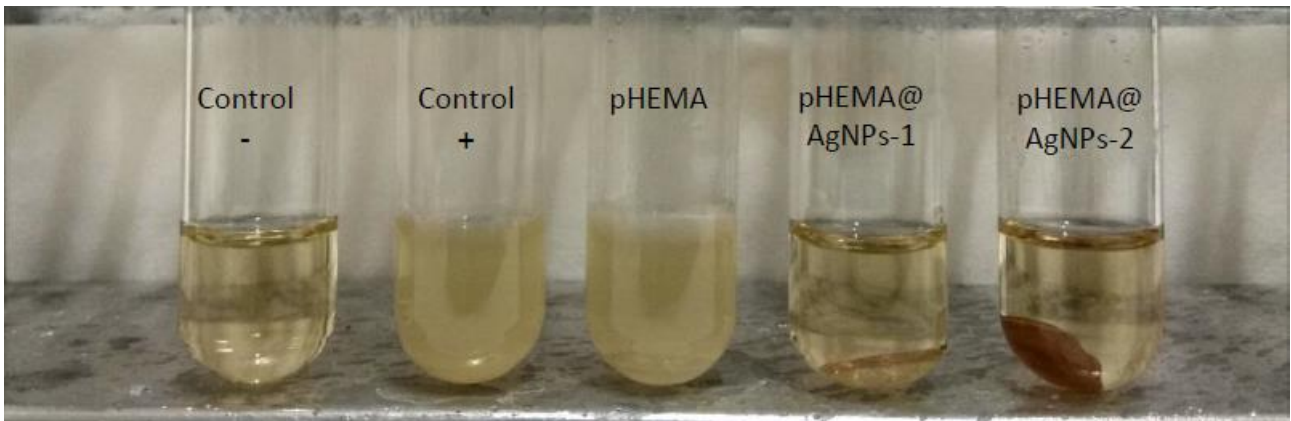
Εικόνα 51. IZ για τα βακτήρια (α) *S.Epidermidis* και (β) *S.Aureus*

## 2.2 Αντιμικροβιακή μελέτη υδρογελών pHEMA@AgNPs 1&2

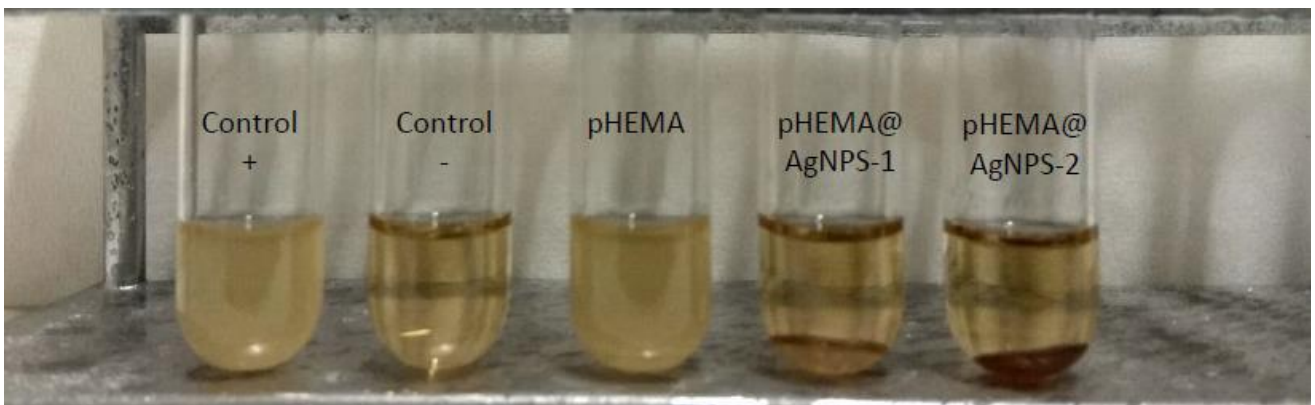
- Ποσοστό βακτηριακής βιωσιμότητας

Η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα των AgNPs οδήγησε στην διασπορά τους σε υδρογέλη pHEMA με σκοπό την επέκταση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων και στις υδρογέλες pHEMA@AgNPs. Για την αξιολόγηση αυτών των ιδιοτήτων οι δίσκοι pHEMA@AgNPs-1&2 τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν  $5 \cdot 10^5$  cfu/ml για κάθε βακτήριο. Τα βακτήρια στα οποία δοκιμάστηκε η αντιμικροβιακή δράση των δίσκων pHEMA@AgNPs είναι τα *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* και *S. aureus*, που είναι και κυρίαρχα για τις μολύνσεις που σχετίζονται με την χρήση φακών επαφής. Η επί τοις εκατό βιωσιμότητα των μικροβίων υπολογίστηκε από την εξίσωση :

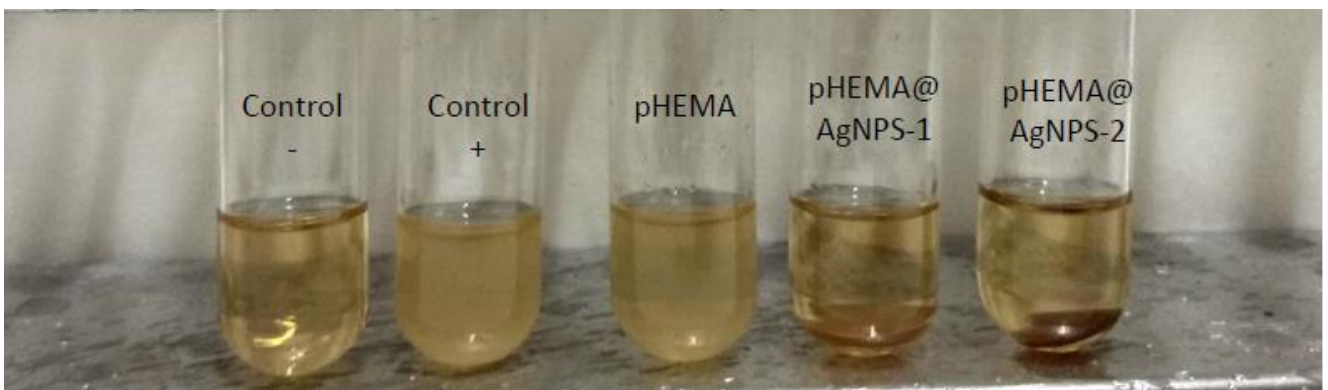
$$\text{Βιωσιμότητα κυττάρων \%} = \frac{\text{οπτική πυκνότητα διαλύματος στα 620 nm}}{\text{οπτική πυκνότητα διαλύματος του Control (+) στα 620 nm}}$$



Εικόνα 52. % Βιωσιμότητα βακτηρίου *P. aeruginosa* μετά από επώαση με δίσκους υδρογέλης pHEMA@AgNPs-1&2



Εικόνα 53. % Βιωσιμότητα βακτηρίου *S. epidermidis* μετά από επώαση με δίσκους υδρογέλης pHEMA@AgNPs-1&2



Εικόνα 54. % Βιωσιμότητα βακτηρίου *S. epidermidis* μετά από επώαση με δίσκους υδρογέλης pHEMA@AgNPs-1&2

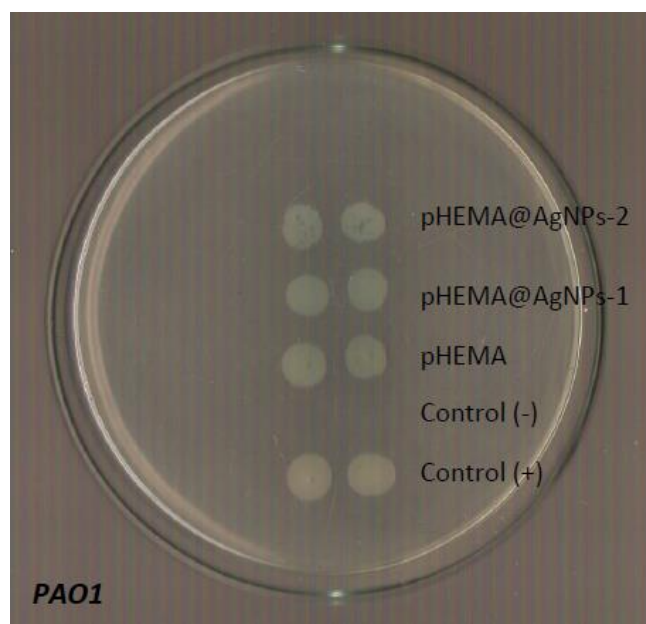
Υπολογίστηκε το ποσοστό βακτηριακής βιωσιμότητας για κάθε βακτήριο, μετά από επώαση για περίπου 20 ώρες με τους δίσκους των υδρογελών, με την παραπάνω εξίσωση και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9. Αποτελέσματα %ποσοστού βακτηριακής βιωσιμότητας

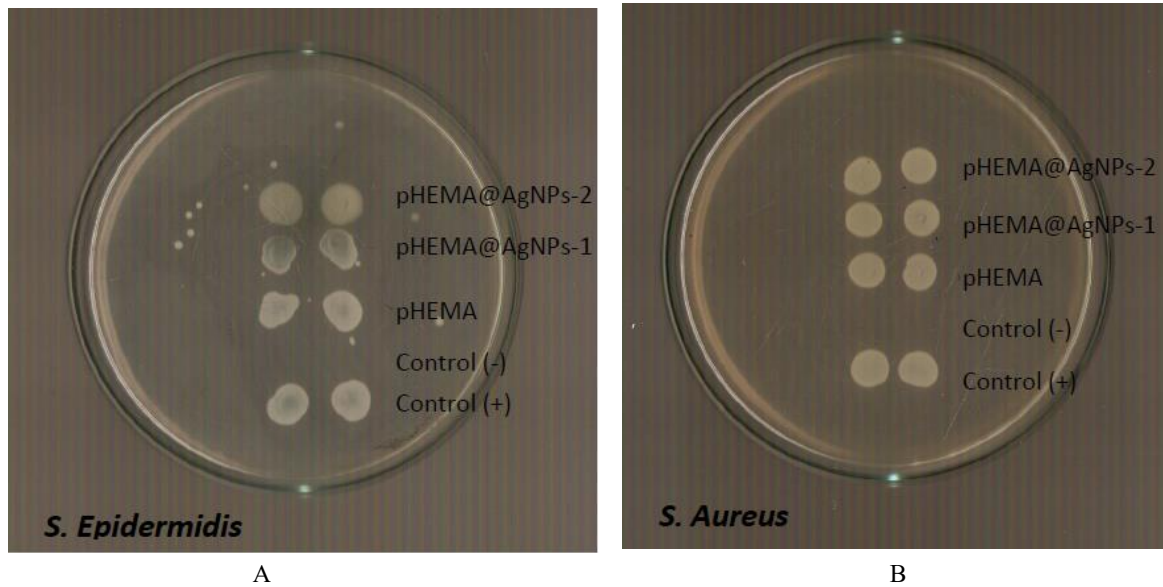
<b>Bacteria</b>	<b>Cell viability(%)</b>	
	<b>pHEMA@AgNPs-1</b>	<b>pHEMA@AgNPs-2</b>
<i>P. aeruginosa</i>	1.2 (± 1.9)	0.1 (± 0.2)
<i>S. epidermidis</i>	2.3 (± 2.6)	1.8(± 2.7)
<i>S. aureus</i>	3.4 (± 5.3)	3.3 (± 2)

- **Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) pHEMA@AgNPs**

Στην συνέχεια πάρθηκαν 4 μL από τα παραπάνω διαλύματα και μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο (10 ml) με κατάλληλο στερεό θρεπτικό για κάθε βακτήριο. Όπως φαίνεται και στις εικόνες 55 και 56 αναπτύσσονται αποικίες και για τα δύο υλικά pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2, που υποδεικνύει ότι οι δίσκοι των υδρογελών εμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροβίων μόνο υπό την παρουσία τους.



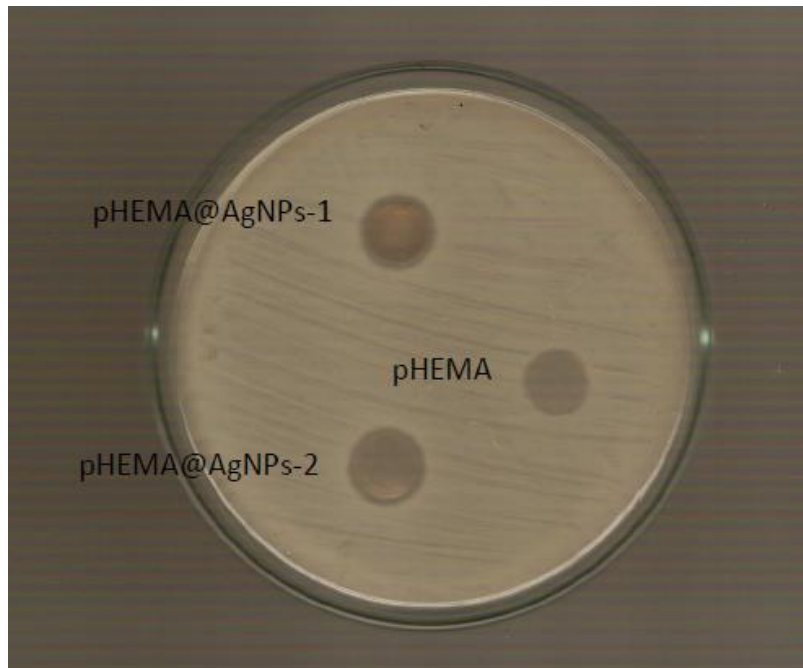
Εικόνα 55. MBC από διαλύματα βακτηρίου *P. Aeruginosa* ύστερα από επώαση με pHEMA, pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2



Εικόνα 56. MBC από διαλύματα βακτηρίου (A) *S.Epidermidis* και (B) *S.Aureus* ύστερα από επώαση με pHEMA, pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2

- **Ζώνη αναστολής (IZ)**

Τέλος, η αντιμικροβιακή μελέτη των δίσκων υδρογέλης ολοκληρώθηκε με τον προσδιορισμό της ζώνης αναστολής, ώστε να ελεγχθεί η ευαισθησία των βακτηρίων έναντι των pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2. Για τον έλεγχο αυτό, δίσκοι διαμέτρου 10 mm με και χωρίς αντιμικροβιακό παράγοντα τοποθετούνται σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ, το οποίο περιέχει βακτηριακά στελέχη (108 cfu/ml). Ύστερα από επώαση περίπου 20 ώρες για τα βακτήρια *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* και *S.aureus* προσδιορίστηκε η ζώνη αναστολής. Στο βακτήριο *P.aeruginosa* για το pHEMA@AgNPs-1 δημιουργήθηκε ζώνη αναστολής είναι 11,83 mm ενώ για το pHEMA@AgNPs-2 είναι 11,33 mm. Στο βακτήριο *S.aureus* η ζώνη αναστολής για το pHEMA@AgNPs-1 βρέθηκε 11.66 mm και για το pHEMA@AgNPs-2 13.66 mm. Τέλος για το βακτήριο *S.epidermidis* μετρήθηκε 11 mm για το δίσκο pHEMA@AgNPs-1 και για το δίσκο pHEMA@AgNPs-2 11.83 mm. Για το δίσκο pHEMA σε κανένα βακτήριο δεν αναπτύχθηκε ζώνη αναστολής. Έτσι ο προσδιορισμός της ζώνης αναστολής έδειξε ότι οι ζώνες που αναπτύσσονται είναι αμελητέες.



Εικόνα 57. Ζώνη αναστολής δίσκων pHEMA, pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2 για το βακτήριο *S.aureus*

### 2.3 Μελέτη τοξικότητας για AgNPs και pHEMA @AgNPs-1&2

Ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα τόσο των AgNPs όσο και των pHEMA@AgNPs-1 και pHEMA@AgNPs-2 σε κύτταρα του κερατοειδούς χιτώνα HCEC. Μετά από στατιστική επεξεργασία των οπτικών απορροφήσεων της SRB, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων αργύρου AgNPs που αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων 50% (IC<sub>50</sub>) είναι 19.75 µg/ml ( $\pm$  2.07). Η in vitro τοξικότητα των υλικών pHEMA@AgNPs-1&2 στα κύτταρα του κερατοειδούς χιτώνα HCEC αξιολογήθηκε για 48 ώρες και έγινε μέτρηση των οπτικών απορροφήσεων της SRB. Ως control κύτταρα, ορίστηκαν τα επωασμένα κύτταρα με καθαρό pHEMA. Η κυτταρική βιωσιμότητα των HCEC με τους δίσκους pHEMA@AgNPs-1 βρέθηκε 31.76 ( $\pm$  5.14) % και για τους δίσκους pHEMA@AgNPs-2 βρέθηκε 15.3 ( $\pm$ 1.83) %.

## Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) μέσω μιας φιλικής προς το περιβάλλον μεθοδολογίας χρησιμοποιώντας εκχύλισμα χαμομηλιού και ο χαρακτηρισμός τους. Στην συνέχεια τα νανοσωματίδια αργύρου ενσωματώθηκαν σε μήτρα υδρογέλης pHEMA με σκοπό τη σύνθεση στείρων φακών επαφής, όπου τα βακτήρια δεν αναπτύσσονται υπό την παρουσία τους.

Η βιολογική μελέτη των AgNPs έδειξε ότι έχουν σημαντική δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων και έναντι των αρνητικών. Η μεγαλύτερη δράση βρέθηκε έναντι του βακτηρίου *P. aeruginosa* όπου η MIC βρέθηκε 37.66  $\mu\text{g/ml}$  (η αντίστοιχη τιμή του νιτρικού αργύρου  $\text{AgNO}_3$  είναι 60  $\mu\text{M}$  [58]). Αξίζει επίσης να σημειωθεί η μεγάλη δραστηριότητα έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων *S.epidermidis* και *S.aureus* όπου η τιμές MIC βρέθηκαν 77.11  $\mu\text{g/ml}$  και 69.46  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα. Για τον  $\text{AgNO}_3$  οι αντίστοιχες MIC είναι 122  $\mu\text{M}$  για τον *S.epidermidis* και 95  $\mu\text{M}$  για τον *S.aureus* [59]. Όσον αφορά την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των σύνθετων υδρογελών, από τη ζώνη αναστολής των δίσκων pHEMA@AgNPs-1&2 (διαμέτρου 10 mm) για *P. aeruginosa*, *S.epidermidis* και *S.aureus*, είδαμε ότι αναπτύχθηκαν πολύ μικρές IZ σχεδόν αμελητέες και σε σχέση με τις αντίστοιχες IZ των AgNPs. Ενδεικτικά η ζώνη αναστολής του pHEMA@AgNPs-2 στην *P. aeruginosa* βρέθηκε 11.33 mm ενώ για τα AgNPs (2 mg/ml) 17.25 mm. Αυτό μας δείχνει πως οι δίσκοι pHEMA@AgNPs-1&2 δεν απελευθερώνουν την δραστική τους ουσία που θα ήταν επικίνδυνο για το μάτι, αλλά δεν επιτρέπουν στα βακτήρια να αναπτυχθούν πάνω τους. Αυτό φάνηκε και όταν οι φακοί ήρθαν σε επαφή με τα βακτήρια σε διάλυμα όπου το ποσοστό βακτηριακής αναστολής για *P. aeruginosa*, *S.epidermidis* και *S.aureus* υπολογίστηκε 98.8%, 97.7% και 96.6% αντίστοιχα, ενώ με την απομάκρυνση των φακών, το παραμένον διάλυμα ανέπτυξε αποικίες.

Από την μελέτη τοξικότητας σε κύτταρα του κερατοειδούς HCEC βρέθηκε για τα AgNPs βρέθηκε πως η συγκέντρωση που αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων 50% είναι 19.75  $\mu\text{g/ml}$  ( $\pm 2.07$ ), ενώ από την μελέτη τοξικότητας στα κύτταρα HCEC βρέθηκε πως το ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας για τα pHEMA@AgNPs-1&2 είναι 31.76 ( $\pm 5.14$ ) % και 15.3 ( $\pm 1.83$ ) % αντίστοιχα, σε σχέση με το απλό pHEMA.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Drexler, K. Eric (1986). [Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology](#). Doubleday. [ISBN 978-0-385-19973-5](#).
- [2] Gnach, A.; Lipinski, T.; Bednarkiewicz, A.; Rybka, J.; Capobianco, J.A. Upconverting nanoparticles: Assessing the toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 1561–1584.
- [3] Mansoori, G.; Fauzi Soelaiman, T. Nanotechnology—An Introduction for the Standards Community. *J. ASTM Int.* **2005**, 2, 1–22.
- [4] Samer Bayda, Muhammad Adeel, Tiziano Tuccinardi, Marco Cordani and Flavio Rizzolio(2005). *The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine*.
- [5] K. M. Krishnan "Biomedical Nanomagnetism: A spin through possibilities in imaging diagnostics and therapy" *IEEE Transactions on Magnetics* 2010; 46:2523-2558.
- [6] "ISO/TS 80004-2: Nanotechnologies Vocabulary Part 2: Nano-objects" . International Organization for Standardization . 2015 . Retrieved 18 January 2018
- [7] Vert, Michel; Doi, Yoshiharu; Hellwich, Karl-Heinz; Hess, Michael; Hodge, Philip; Kubisa, Przemyslaw; Rinaudo, Marguerite; Schué, François (2012). "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)" (PDF) . *Pure and Applied Chemistry* . 84 (2): 377 410. doi : 10.1351/PAC-REC-10-12-04 .
- [8] E.C. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang, C.J. Murphy, M.A. El-Sayed. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012), pp. 2740-2779



- [9] Astruc D, Lu F, Aranzaes JR (2005) Nanoparticles as recyclable catalysts: the frontier between homogeneous and heterogeneous catalysis. *Angew Chem Int Ed* 44:7852–7872
- [10] Thielbeer F, Donaldson K, Bradley M (2011) Zeta potential mediated reaction monitoring on nano and microparticles. *Bioconjug Chem* 22:144–150
- [11] Polshettiwar V, Varma RS (2010) Green chemistry by nanocatalysis. *Green Chem* 12:743–754
- [12] Khlebtsov, N., Dykman, L., 2010. Plasmonic nanoparticles. pp. 37–85. <http://dx.doi.org/10.1201/9781439806296-c2>.
- [13] G. Reiss, A. Hütten Magnetic nanoparticles: applications beyond data storage. *Nat. Mater.*, 4 (2005), pp. 725-726, 10.1038/nmat1494 CrossRefView Record in ScopusGoogle Scholar
- [14] M. Qi, K. Zhang, S. Li, J. Wu, C. Pham-Huy, X. Diao, D. Xiao, H. He. Superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: synthesis by a solvothermal process and functionalization for a magnetic targeted curcumin delivery system, *New J. Chem.*, 4480 (2016), pp. 4480-4491, 10.1039/c5nj02441b, CrossRefView Record in ScopusGoogle Scholar
- [15] Julia L. Clement and Penelope S. Jarrett ANTIBACTERIAL SILVER
- [16] McConnell WP, Novak JP, Brousseau LC, Fuierer RR, Tenent RC, Feldheim DL. Electronic and optical properties of chemically modified metal nanoparticles and molecularly bridged nanoparticle arrays. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2000;104(38):8925-8930. DOI: 10.1021/jp000926t

- [17] Collier CP, Saykally RJ, Shiang JJ, Henrichs SE, Heath JR. Reversible tuning of silver quantum dot monolayers through the metal-insulator transition. *Science*. 1997;277(5334):1978-1981. DOI: 10.1126/science.277.5334.1978
- [18] Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advanced Colloidal Interface Science*. 2009;145:83-96. DOI: 10.1016/j.cis.2008.09.002
- [19] Krutyakov YA, Kudrinskiy AA, Olenin AY, Lisichkin GV. Synthesis and properties of silver nanoparticles: Advances and prospects. *Russian Chemical Reviews*. 2008;77(3):233-257. DOI: 10.1070/RC2008v077n03ABEH003751
- [20] Sarkar, D.K.; Cloutier, F.; El Khakani, M.A. *J. Appl. Phys.* 2005, 97, 084302
- [21] Εικόνα από (<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>)
- [22] Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B. Biosynthesis of silver nano-flakes by *Crossandra infundibuliformis* leaf extract. *Mater Lett* 2011a;67:64–6
- [23] M.H. El-Rafie, A.A. Mohamed, T.I. Shaheen, A. Hebeish. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics
- [24] J.Sweet, I.Singleton. 2011, Chapter 5 - Silver Nanoparticles: A Microbial Perspective. *Advances in Applied Microbiology*, Volume 77, 2011, Pages 115-133
- [25] Guzmán MG, Dille J, Godet S (2009) Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Int J Chem Biomol Eng* 2:3

- [26] Rodríguez-Sánchez ML, Blanco MC, López-Quintela MA (2000) Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *J Phys Chem B* 104:9683–9688
- [27] Sharma VK, Yngard RA, Lin Y (2009) Silver nanoparticles green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interf Sci* 145:83–96
- [28] Elghanian R, Stohoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* 1997;277:1078
- [29] Shakeel Ahmed, Mudasir Ahmad, Babu Lal Swami, Saiqa Ikram. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research* (2016) 7, 17–28
- [30] Kseniya Hileuskaya, Alena Ladutska, Viktoryia Kulikouskaya, Aliaksandr Kraskouski, Galina Novik, Irina Kozerozhets, Artem Kozlovskiy, Vladimir Agabekova. ‘Green’ approach for obtaining stable pectin-capped silver nanoparticles: Physico-chemical characterization and antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 585, 20 January 2020, 124141
- [31] S. Ahmed, M. Ahmad, B.L. Swami, S. Ikram. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise *J. Adv. Res.*, 7 (2016), 10.1016/j.jare.2015.02.007

- [32] Ill-Min Chung<sup>1</sup>, Inmyoung Park, Kim Seung-Hyun, Muthu Thiruvengadam and Govindasamy Rajakumar. Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic Properties and Therapeutic Applications. *Nanoscale Research Letters* (2016). DOI 10.1186/s11671-016-1257-4
- [33] R. Rajan, K. Chandran, S.L. Harper, S. Il Yun, P.T. Kalaichelvan. Plant extract synthesized silver nanoparticles: an ongoing source of novel biocompatible materials. *Ind. Crops Prod.*, 70 (2015), 10.1016/j.indcrop.2015.03.015
- [34] Dubey M, Bhadauria S, Kushwah B. Green synthesis of nanosilver particles from extract of *Eucalyptus hybrida* (safeda) leaf. *Dig J Nanomater Biostruct* 2009;4:537–43.
- [35] Huang H, Yang X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydrate Res* 2004;339:2627–31.
- [36] Amit Kumar Mittal , Yusuf Chisti , Uttam Chand Banerjee. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances* 31, 346–356
- [37] Fatih DUMAN, Ismail OCSOY, Fatma OZTURK KUP. “Chamomile Flower Extract-Directed CuO Nanoparticle Formation for Its Antioxidant and DNA Cleavage Properties”. *Materials Science and Engineering C*. MSEC-D-15-01246. Biology Department, Kayseri. Turkey 2016
- [38] EMILIANE A. ARAUJO, NE LIO J. ANDRADE, LUIS HENRIQUE M. DA SILVA PATRICIA C. BERNARDES (2012). Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles against Bacterial Cells Adhered to Stainless Steel Surfaces, *Journal of Food Protection*, Vol. 75, No. 4, Pages 701–705
- [39] Ompal Singh, Zakia Khanam, [...], and Manoj Kumar Srivastava. (2011) Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview

[40] Sílvia Petronilhoa, Marcelo Maraschinb, Manuel A. Coimbraa, Sílvia M. Rochaa(2012) In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.)

[41] WHO Monograph on selected Medicinal plants

[42] Diane L. McKay\* and Jeffrey B. Blumberg (2006) A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.)

[43] Crevin JK, philpott J. Herbal Medicine Past and Present. Vol. II Duke University Press;1990

[44] Haidan Yuan 1,2, Qianqian Ma 1 , Li Ye 1 and Guangchun Piao 1,2,( 2016), The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products

[45] Janmejai K Srivastava, Eswar Shankar, and Sanjay Gupta(2010) Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future

[46] Κ. Γαλιώτης ,ΔΕ Μουζάκης, ΓΧ Ψαρράς Σύνθετα Υλικά, Πάτρα, 2004.

[47] Καραβασίλη, Μ. Νανοςύνθετα πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας ( HDPE ) / νανοϊνών χαλκού ( Cu-nanofibers ) με βελτιωμένη σταθερότητα στην υπεριώδη ακτινοβολία. (Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2013).

[48] Hussain, F. Polymer-matrix Nanocomposites, Processing, Manufacturing, and Application: An Overview. J. Compos. Mater. 40, 1511–1575 (2006)

[49] Mittal, V. Synthesis Techniques for Polymer Nanocomposites. Polymer (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014). doi:10.1002/9783527670307

[50] Montheard, J.-P., Chatzopoulos, M. & Chappard, D. 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA): Chemical Properties and Applications in Biomedical Fields. J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev. 32, 1–34 (1992).

[51] Καραγιαννίδης Γ. , Σιδερίδου Ε. , Χημεία Πολυμέρων, Θεσσαλονίκη 2010, Εκδόσεις Ζήτη

[52] N. Efron, C. Maldonado-Codina, [Comprehensive Biomaterials II](#), 2017

[53] Carmen M. González-Henríquez Guadalupe del C. Pizarro Mauricio A. Sarabia-Vallejos, Claudio A. Terraza Zoraya E. López-Cabaña. In situ-preparation and characterization of silver-HEMA/PEGDA hydrogel matrix nanocomposites: Silver inclusion studies into hydrogel matrix, Arabian Journal of Chemistry, [Volume 12, Issue 7](#), November 2019, Pages 1413-1423

[54] Γεώργιος Κριατσιώτης: «Φακοί επαφής: Η ιστορία και το μέλλον τους», Περισκόπιο της Επιστήμης, Νοέμβριος 1996, σελ. 62

[55] John Stamler. "Contact Lens Complications." eMedicine.com. 1 September 2004

[56] I Wiegand, "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances" Nature Protocols, 2008

[57] M Balouiri, " Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review", Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016

[58] I. Sainis, C.N. Banti, A.M. Owczarzak, L. Kyros, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, S.K. Hadjikakou, New antibacterial, non-genotoxic materials, derived from the functionalization of the anti-thyroid drug methimazole with silver ions, *J. Inorg. Biochem.* 160 (2016) 114–124.

[59] S. Pal, E.J. Yoon, S.H. Park, E.C. Choi, J.M. Song, Metallopharmaceuticals based on silver(I) and silver (II) polydiguanylate complexes: activity against burn wound pathogens, *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2010) 2134–2140.

[60] Malvern Instruments Ltd, “DLS technical note”

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

### Συντομογραφίες

AgNPs Νανοδοματίδια αργύρου

HEMA μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας

pHEMA πολυ(μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας)

EGDMA διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης

TPO Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide

MIC Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση

MBC Ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση

IZ Ζώνη αναστολής