ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



ΣΧΟΛΕΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ – ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑΤΑ ΧΗΜΕΙΑΣ – ΙΑΤΡΙΚΗΣ – ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ Δ.Π.Μ.Σ. «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»



ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΝΑΟΫΛΙΚΩΝ ΜΕ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΠΟΜΠΟΤΣΙΑΡΗ ΘΕΟΔΩΡΑ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

A.M.: 308

IΩANNINA, ΙΟΥΛΙΟΣ 2024

Επιβλέπων Καθηγητής: ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΚΑΤΑΠΟΔΗΣ ΠΕΤΡΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΓΟΥΡΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Καθηγητής Τμήματος Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Ιατρική Χημεία».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Χαράλαμπο Σταμάτη, για την όμορφη συνεργασία μας τα τελευταία χρόνια. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, το ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές του που με βοήθησαν να φέρω σε πέρας τη διπλωματική μου εργασία. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Καταπόδη Πέτρο και κ. Δημήτριο Γουρνή για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ρένια Φωτιάδου για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τις γνώσεις που μου μετέφερε ώστε να μπορώ να ανταπεξέλθω στις απαιτήσεις της διπλωματικής εργασίας. Ήταν διαθέσιμη για ότι χρειαζόμουν και με καθοδηγούσε για τη διδασκαλία των συστημάτων και των τεχνικών που αξιοποιήθηκαν στα πλαίσια της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μιχαέλα Πατήλα, η οποία από την αρχή της συνεργασίας μας, μέχρι και τώρα βρίσκεται δίπλα μου, για τις συμβουλές και τα εποικοδομητικά σχόλιά της μεταδίδοντάς μου το ενδιαφέρον της για το αντικείμενο της βιοτεχνολογίας και όλη τη στήριξή της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, υποψήφιους διδάκτορες, μεταπτυχιακούς και πτυχιακούς φοιτητές για το όμορφο κλίμα, τη συνεργασία και τη βοήθεια τους σε ό,τι χρειάστηκα όλο το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την κατανόηση και τη βοήθειά τους σε κάθε μου βήμα, καθώς και στους φίλους μου για τη στήριξη και τις συμβουλές τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιολογική σύνθεση νανοσωματιδίων έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς είναι φιλική προς το περιβάλλον, οικονομικά αποδοτική και οδηγεί σε «πράσινα» νανοϋλικά, τα οποία εμφανίζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σχέση με τα συμβατικά. Οι τεχνικές βιοσύνθεσης αξιοποιούν φυτικά εκχυλίσματα ή εκχυλίσματα αποβλήτων που περιέχουν διάφορες οργανικές ενώσεις όπως πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, καροτενοειδή και βιταμίνες και δρουν ως παράγοντες αναγωγής και σταθεροποίησης, καθορίζοντας το μέγεθος και τη μορφολογία των νανοσωματιδίων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιοποίηση εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς και οινολάσπη για την ανάπτυξη ανόργανων «πράσινων» μεταλλικών νανοσωματιδίων αργύρου (Silver NPs, AgNPs) και οξειδίου του ψευδαργύρου (Zinc oxide NPs, ZnONPs) στο πρώτο μέρος, καθώς και οργανικά νανοσωματίδια χιτοζάνης (Chitosan NPs, ChNPs) στο δεύτερο μέρος, με στοχευμένες βιολογικές δράσεις.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας χρησιμοποιούνται υγρά εκχυλίσματα φύλλων ελιάς και οινολάσπης για τη σύνθεση ZnONPs και AgNPs. Οι μορφολογικές και δομικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-Vis και FT-IR και μικροσκοπία AFM. Στα φάσματα UV-Vis η σύνθεση επιβεβαιώθηκε, ενώ τα φάσματα FT-IR έδειξαν ότι τα μόρια των φλαβονοειδών, των γλυκοζιτών, των πρωτεϊνών και των φαινολών μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων. Επίσης, το μέγεθος τους κυμάνθηκε μεταξύ 5-7 nm. Περαιτέρω, πραγματοποιήθηκαν μελέτες της αντιοξειδωτικής δράσης των συντιθέμενων μεταλλικών NPs μέσω του πρωτοκόλλου του οξειδωμένου ABTS (ABTS^{*+}) και του φωσφομολυβδαινίου, καθώς και της αντιμικροβιακής δράσης παρατηρώντας τις καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Corynebacterium glutamicum* μετά από προ-επώαση με τον αντιμικροβιακό παράγοντα, υπολογισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για τα δύο βακτηριακά στελέχη, και μέσω της παρατήρησης ζωνών αναστολής σε τρυβλία μετά από επώαση των βακτηρίων με τα νανοσωματίδια.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα φύλλων ελιάς για τη σύνθεση ChNPs μέσω δύο μεθόδων ιονικής πηκτωμάτωσης με τη βοήθεια του τριπολυφωσφορικού νατρίου (TPP). Παράλληλα αξιολογήθηκε η ικανότητα φόρτωσης των ChNPs με εκχύλισμα με τη διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και της αναλογίας μάζας χιτοζάνης:TPP στη σύνθεση. Ακολούθησαν χαρακτηρισμοί μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) όπου επιβεβαιώθηκε η ενθυλάκωση του εκχυλίσματος, ενώ μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR παρατηρήθηκε ότι τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, ανεξάρτητα με τον τρόπο σύνθεσης, παρουσιάζουν τις χαρακτηριστικές κορυφές της χιτοζάνης και των επιμέρους συστατικών. Η απελευθέρωση του εκχυλίσματος από τα

ChNPs ήταν δυνατή στο όξινο pH και στο φυσιολογικό pH των κυττάρων. Επιπλέον, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των ChNPs μέσω του πρωτοκόλλου του οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺) και η αντιμικροβιακή τους δράση μέσω υπολογισμού της MIC για τα δύο βακτηριακά στελέχη.

Συμπερασματικά, συντέθηκαν ZnONPs και AgNPs από εκχυλίσματα φύλλων ελιάς και οινολάσπης, και ChNPs από εκχύλισμα φύλλων ελιάς. Τα αποτελέσματα έδειξαν νανοϋλικά με υποσχόμενα χαρακτηριστικά και καταγράφηκε σημαντική αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση για όλα τα δείγματα. Περαιτέρω μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν για την εφαρμογή των συντιθέμενων νανοσωματιδίων σε πιθανές μελλοντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

ABSTRACT

Biological synthesis of nanoparticles has attracted scientific interest, as it is environmentally friendly, cost-effective and leads to "green" nanomaterials, which have many advantages over conventional ones. Biosynthesis techniques utilise plant extracts or waste extracts containing various organic compounds such as polyphenols, flavonoids, carotenoids and vitamins, which act as reducing and stabilizing agents, determining the size and morphology of the nanoparticles. The aim of the present work is to utilize olive leaf extracts and wine lees for the development of inorganic "green" metallic silver nanoparticles (Silver NPs, AgNPs) and zinc oxide nanoparticles (Zinc oxide NPs, ZnONPs) in the first part, and organic chitosan nanoparticles (Chitosan NPs, ChNPs) in the second part, with targeted biological activities.

In the first part of the work, liquid extracts of olive leaves and wine lees are used for the synthesis of ZnONPs and AgNPs. The morphological and structural properties of the synthesized nanoparticles were characterized using UV-Vis and FT-IR spectroscopy and AFM microscopy. In UV-Vis spectra the synthesis was confirmed, while FT-IR spectra showed that flavonoid, glycoside, protein and phenol molecules can play an important role in the stabilization of the nanoparticles. Also, their size ranged between 5-7 nm. Further, studies of the antioxidant activity of the synthesized metal NPs through the oxidized ABTS (ABTS⁺⁺) and phosphomolybdenum protocol, as well as the antimicrobial activity were carried out by observing the growth curves of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* bacteria after pre-incubation with the antimicrobial agent, calculating the minimum inhibitory concentration (MIC) for the two bacterial strains, and by observing zones of inhibition in dishes after incubation of the bacteria with the nanoparticles.

In the second part of the study, olive leaf extract was used to synthesize ChNPs via two ionic gelation methods using sodium tripolyphosphate (TPP). In parallel, the loading capacity of ChNPs with extract was evaluated by investigating the effect of extract concentration and chitosan: TPP mass ratio on the synthesis. This was followed by visible-ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy characterization where the encapsulation of the extract was confirmed, while FT-IR spectroscopy was used to observe that the chitosan nanoparticles, regardless of the synthesis mode, exhibit the characteristic peaks of chitosan and individual components. The release of the extract from ChNPs was possible at acidic pH and at normal cell pH. In addition, the antioxidant activity of ChNPs was studied by the oxidized ABTS protocol (ABTS⁺⁺) and their antimicrobial activity by MIC calculation for the two bacterial strains.

In conclusion, ZnONPs and AgNPs were synthesized from olive leaf and wine lees extracts, and ChNPs from olive leaf extract. The results showed nanomaterials with promising

characteristics and significant antioxidant and antimicrobial activity was recorded for all samples. Further studies should be carried out to apply the synthesized nanoparticles to possible future biotechnological applications.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ
1. Βιοτεχνολογία
1.1. Κόκκινη βιοτεχνολογία
2. Νανοβιοτεχνολογία
2.1. Νανοσωματίδια
2.2. Σύνθεση νανοσωματιδίων
2.2.1. Πλεονεκτήματα βιολογικής σύνθεσης
2.2.2. Μηχανισμός βιολογικής σύνθεσης
2.2.3. Βιολογική σύνθεση από φυτά9
2.2.3.1. Ελιά
2.2.4. Βιολογική σύνθεση από απόβλητα
2.2.4.1. Οινολάσπη14
2.2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιολογική σύνθεση15
3. Κατηγορίες νανοσωματιδίων
3.1. Ανόργανα μεταλλικά νανοσωματίδια
3.1.1. Νανοσωματίδια αργύρου
3.1.2. Νανοσωματίδια ψευδαργύρου21
3.2. Οργανικά νανοσωματίδια χιτοζάνης
3.2.1. Σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης
3.2.2. Νανοσωματίδια χιτοζάνης για την ενθυλάκωση φυτικών εκχυλισμάτων 24
3.2.3. Απελευθέρωση βιοδραστικής ουσίας από νανοσωματίδια χιτοζάνης25
4. Βιολογικές δράσεις νανοσωματιδίων
4.1 Αντιοξειδωτική δράση νανοσωματιδίων27
4.2. Βακτήρια
4.2.1. Καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων 30
4.2.2. Αντιμικροβιακός μηχανισμός νανοσωματιδίων αργύρου και ψευδαργύρου31
4.2.3. Αντιμικροβιακός μηχανισμός νανοσωματιδίων χιτοζάνης
5. Βιοϊατρικές εφαρμογές
5.1. Βιοϊατρικές εφαρμογές μεταλλικών νανοσωματιδίων
5.2. Βιοϊατρικές εφαρμογές νανοσωματιδίων χιτοζάνης
5.3. Εφαρμογή στην οδοντιατρική39
5.3.1. Νανοσωματίδια στην οδοντιατρική40
5.3.1.1. Εφαρμογές νανοσωματιδίων αργύρου και ψευδαργύρου στην
οδοντιατρική

5.3.	.1.2. Εφαρμογές νανοσωματιδίων χιτοζάνης στην οδοντιατρική	43
ҮЛІКА К А	ΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
6. Υλικά	ź	44
6.1.	Πρώτη ύλη	44
6.2.	Νανοσωματίδια	44
6.3.	Βακτηριακά στελέχη	44
6.4.	Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων	44
6.5.	Υποστρώματα	44
6.6.	Διαλύτες	44
6.7.	Διαλύματα	45
6.8.	Λοιπά αντιδραστήρια	45
7. Μέθο	δοι	46
7.1.	Επεξεργασία οινολάσπης	46
7.2.	Παρασκευή εκχυλισμάτων	46
7.2.1.	Παρασκευή αιθανολικού εκχυλίσματος οινολάσπης	46
7.2.2.	Παρασκευή υδατικών εκχυλισμάτων οινολάσπης και φύλλων ελιάς.	46
7.3. Ciocalte	Μέτρηση περιεκτικότητας ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο eu	Folin- 47
7.3.1. οινολο	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων στα υγρά εκχυλίσματα άσπης και φύλλων ελιάς	48
7.4. βιολογικ	Βιολογική σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων, χαρακτηρισμός και ι ςών δράσεων	μελέτη 48
7.4.1.	Βιολογικές συνθέσεις	
7.4.	.1.1. Σύνθεση ZnONPs	
7.4.	.1.2. Σύνθεση AgNPs	49
	7.4.1.2.1. Βελτιστοποίηση σύνθεσης AgNPs από εκχύλισμα φύλλων	ελιάς 50
7.4.2.	Χαρακτηρισμοί	
7.4. Zn	.2.1. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των εκχυλισμάτ ONPs και AgNPs	ων, των 50
7.4.	.2.2. Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR) των ZnONPs και AgNPs	51
7.4.	.2.3. Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) των ZnONPs και AgN	Ps 51
7.4.3.	Βιολογικές δράσεις	51
7.4.	.3.1. Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης	
	7.4.3.1.1. Μέθοδος ΑΒΤS	
	7.4.3.1.2. Μέθοδος φωσφομολυβδαινίου	53
7.4.	.3.2. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης	55

7.4.3.2.1. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης νανοσωματιδίων σε βακτηριακά στελέχη, απουσία θρεπτικού μέσου (Πρωτόκολλο Α)	55
7.4.3.2.2. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης νανοσωματιδίων σε	
βακτηριακά στελέχη και υπολογισμός ΜΙC (Πρωτόκολλο Β)	56
7.4.3.2.3. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης AgNPS σε βακτηριακά στα με μελέτη ζωνών αναστολής βακτηρίων (Πρωτόκολλο Γ)	ε λέχη 57
7.5. Σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης, χαρακτηρισμός και μελέτη βιολογικ	ών
δράσεων	58
7.5.1. Σύνθεση ChNPs	58
7.5.1.1. Παρασκευή διαλυμάτων χιτοζάνης	58
7.5.1.2. 1 ^η μέθοδος σύνθεσης ChNPs	58
7.5.1.2.1. Βελτιστοποίηση σύνθεσης ChNPs	59
7.5.1.3. 2 ^η μέθοδος σύνθεσης ChNPs	59
7.5.2. Χαρακτηρισμοί	60
7.5.2.1. Απόδοση ενθυλάκωσης και ποσοστό φόρτωσης εκχυλίσματος	60
7.5.2.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)	61
7.5.2.3. Μελέτη απελευθέρωσης εκχυλίσματος	61
7.5.2.4. Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR) των ChNPs	61
7.5.3. Βιολογικές δράσεις	61
7.5.3.1. Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης	62
7.5.3.1.1. Μέθοδος ABTS	62
7.5.3.2. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης	62
7.5.3.2.1. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης νανοσωματιδίων σε	
βακτηριακά στελέχη και υπολογισμός ΜΙC (Πρωτόκολλο Β)	62
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
8. Εκχυλίσματα	63
8.1. Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθο Folin-Ciocalteu	δ ο 63
9. Σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων, χαρακτηρισμός και μελέτη βιολογικών	
δράσεων	66
9.1. Βιολογικές συνθέσεις	66
9.2. Χαρακτηρισμοί	66
9.2.1. Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)	66
9.2.1.1. Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των ZnONPs	66
9.2.1.2. Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των AgNPs	68
9.2.2. Φάσματα υπερύθρου (FT-IR) των ZnONPs και AgNPs	72
9.2.3. Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) των ZnONPs και AgNPs	73

9.3. Βιολογικές δράσεις	76
9.3.1. Αντιοξειδωτική δράση	76
9.3.1.1. Μέθοδος ΑΒΤS	77
9.3.1.2. Μέθοδος φωσφομολυβδαινίου	78
9.3.2. Αντιμικροβιακή δράση	79
9.3.2.1. Αντιμικροβιακή δράση ZnONPs και AgNPs σε δυο βακτηριακά στελέχη, απουσία θρεπτικού μέσου	80
9.3.2.2. Υπολογισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των ZnONPs και AgNPs για δυο βακτηριακά στελέχη	84
9.3.2.3. Μελέτη ζωνών αναστολής βακτηριακών πληθυσμών με AgNPs	85
10. Σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης, χαρακτηρισμός και μελέτη βιολογικών	00
ορασεων	88
10.1. Συνθέσεις ιονικής πηκτωμάτωσης	88
10.1.1. Αποδόσεις συνθέσεων	88
10.2. Χαρακτηρισμοί	90
10.2.1. Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)	91
10.2.2. Φάσματα υπερύθρου (FT-IR) των ChNPs	92
10.2.3. Μελέτη απελευθέρωσης εκχυλίσματος από τα ChNPs	94
10.3. Βιολογικές δράσεις	98
10.3.1. Αντιοζειδωτική δράση	98
10.3.1.1. Μέθοδος ΑΒΤS	98
10.3.2. Αντιμικροβιακή δράση1	01
10.3.2.1. Υπολογισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των	
ChNPs για δυο βακτηριακά στελέχη1	01
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	04
ПАРАРТНМА	08
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	13

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Βιοτεχνολογία

Η βιοτεγνολογία αποτελεί μια εφαρμοσμένη επιστήμη που έχει τις βάσεις της στη βιοχημεία και τη μικροβιολογία, ενώ υποστηρίζεται από τη βιομηχανική χημεία και τη χημική μηγανική. Αφορά την πραγματοποίηση αντιδράσεων με ζωντανά βακτήρια, φυτικά ή ζωικά κύτταρα, ή με ένζυμα που προέρχονται από τα προαναφερθέντα κύτταρα. Επίσης, τμήμα της επιστήμης είναι η παραγωγή βιομάζας από διαφόρους μικροοργανισμούς. Μπορεί να θεωρηθεί ένα επιστημονικό πεδίο, από τους προϊστορικούς χρόνους, πριν το 3,000 π.Χ. όπου εκτρέφονταν επιλεκτικά φυτά και ζώα και χρησιμοποιούνταν μικροοργανισμοί για τη παραγωγή μπύρας, κρασιού, τυριού και ψωμιού. Ο όρος βιοτεχνολογία, ωστόσο, επινοήθηκε πρώτη φορά τον 20° αιώνα, συγκεκριμένα το 1919 από τον μηγανικό Karl Ereky για να αναφερθεί στην επιστήμη και στις μεθόδους που επιτρέπουν σε προϊόντα να παράγονται από πρώτες ύλες, με τη συνεισφορά ζωντανών οργανισμών. Μετά το 1980 η βιοτεχνολογία αναπτύχθηκε με ταχύ ρυθμό, καθώς η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA άρχισε να γρησιμοποιείται ευρέως και έδινε σπουδαίες εφαρμογές. Σήμερα, η Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία Βιοτεχνολογίας ορίζει τη βιοτεχνολογία ως τον «διεπιστημονικό κλάδο που αφορά στην τεχνολογική αξιοποίηση των κυττάρων (μικροβιακών, ζωικών, φυτικών) ή συστατικών τους ή/και ολόκληρων οργανισμών ή συστημάτων στην παραγωγή προϊόντων, αγαθών ή στην προσφορά υπηρεσιών» (Κυριακίδη, 2000, Σταμάτης, 2018, Gupta et al., 2017).

Οι δραστηριότητες της βιοτεγνολογίας γωρίζονται σε επιμέρους κατηγορίες. Ο νέος κώδικας χρησιμοποιεί σχεδόν όλους τους χρωματικούς τόνους του ουράνιου τόξου για την ταξινόμηση της βιοτεχνολογίας (Εικόνα 1.1). Το πράσινο περιλαμβάνει εφαρμογές στη γεωργία και την αγροτική ανάπτυξη με ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικών λύσεων, το κίτρινο αφορά τη βιοτεχνολογία τροφίμων, το λευκό αφορά βιοχημικούς σκοπούς (βιοδραστικά μόρια, διατροφικά πρόσθετα, εξειδικευμένα χημικά, βιοχημικά μεταβολικά μονοπάτια) από ανανεώσιμες πηγές, το γκρι αναφέρεται στα προβλήματα και την προστασία του περιβάλλοντος. Το μπλε αναφέρεται στη βιοτεχνολογία που εξειδικεύεται σε προσεγγίσεις για την αξιοποίηση των υδάτινων οικοσυστημάτων και θαλάσσιων οργανισμών στην παραγωγή προϊόντων, το καφέ αφορά τις ερημικές και ξηρές περιοχές, το χρυσό συνδέεται με τη βιοπληροφορική και την τεχνολογία των τσιπ, το βιολετί ασχολείται με νομικά, ηθικά και φιλοσοφικά θέματα, ενώ η σκούρα βιοτεχνολογία συνδέεται με τη βιοτρομοκρατία και τα βιολογικά όπλα. Τέλος, η κόκκινη βιοτεχνολογία, που αφορά την εφαρμογή βιολογικών συστημάτων για τη βελτίωση ιατρικών διαδικασιών και της ανθρώπινης υγείας, θα μας απασχολήσει στην παρούσα διπλωματική εργασία (Σταμάτης, 2018, Gupta et al., 2017; Kafarski, 2012).



Εικόνα 1.1. Χρωματικός κώδικας ουράνιου τόζου ταξινόμησης των κλάδων βιοτεχνολογίας.

1.1. Κόκκινη βιοτεχνολογία

Η κόκκινη ή ιατρική βιοτεχνολογία περιλαμβάνει εφαρμογές της ιατρικής επιστήμης. Έχει συνδράμει με την πάροδο των ετών στην εύρεση της μοριακής αιτιολογίας πολλών νοσημάτων και στοχεύει την καταπολέμηση, διάγνωση και μείωση των ποσοστών των ασθενειών και των απειλητικών για τη ζωή καταστάσεων με τη χρήση της γενετικής σύνθεσης των οργανισμών και την αξιοποίηση των τεράστιων διαθέσιμων φυσικών πόρων τους. Αυξημένης σημασίας είναι η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος που έχει βοηθήσει τους ερευνητές στην πραγματοποίηση γενετικών συσχετίσεων με ορισμένες γενετικές παθήσεις. Επίσης, η ιατρική βιοτεχνολογία εμπλέκεται στον σχεδιασμό οργανισμών για την παραγωγή και βελτίωση φαρμακευτικών προϊόντων (αντιβιοτικά, εμβόλια), προϊόντων μηχανικής ιστών, φαρμάκων αναγεννητικής, στην ανάπτυξη θεραπειών μέσω της μηχανικής γονιδίων (βλαστοκύτταρα, γονιδιακή θεραπεία) και στην ανάπτυξη υπηρεσιών στην ιατροδικαστική μέσω της ανάλυσης του DNA. Τα βιοτεχνολογικά εργαλεία αυτά στοχεύουν στην προαγωγή της υγείας και στη γενικότερη βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής (Σταμάτης, 2018, Amarakoon et al., 2017; Gupta et al., 2017).

2. Νανοβιοτεχνολογία

Ο Richard Feynman, το 1959 υποστήριξε ότι η νανοτεχνολογία θα μπορούσε να φέρει επανάσταση στον κόσμο της σύγχρονης επιστήμης προτείνοντας έναν γενικό τρόπο μεταστοιχείωσης ενός μορίου σε ένα άλλο μέσα από ριζική ανακατανομή των ατόμων στο χώρο. Στην ουσία, η νανοτεχνολογία σήμερα εφαρμόζει τις αρχές της μηχανικής, της ηλεκτρονικής, της φυσικής και της επιστήμης των υλικών για την κατασκευή λειτουργικών δομών μεγέθους συνήθως μεταξύ 1 και 100 νανομέτρων, στη μία τουλάχιστον διάσταση. Η ύλη σε αυτήν την κλίμακα παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά με την ενεργοποίηση διαφορετικών ιδιοτήτων από ότι στη μακροκλίμακα (Κίντζιος, 2016, Clark, 2012).

Ο όρος της Νανοβιοτεχνολογίας προέκυψε για την χρήση της νανοτεχνολογίας σε βιολογικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, αφορά την κατασκευή συστημάτων, συσκευών και διατάξεων για τη μελέτη βιολογικών συστημάτων και την ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών στον τομέα της βιοτεχνολογίας, σε επίπεδο νανοκλίμακας. Όταν το μέγεθος ενός υλικού κατατάσσεται στη νανοκλίμακα, τότε συνήθως συνοδεύεται από βελτιωμένες φυσικοχημικές, μηγανικές, ηλεκτρομαγνητικές, οπτικές και θερμικές ιδιότητες. Το πολύ μικρό μέγεθος τέτοιων νανοσυστημάτων, που είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτό των βασικών βιολογικών συστημάτων, επιτρέπει την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα επέμβασης σε επίπεδο ενός βιομορίου ή κυττάρου και θέτει τη βάση για την ανάπτυξη πλήθους εφαρμογών στη βιοτεχνολογία. Ορισμένες από τις εφαρμογές είναι η στοχευμένη μεταφορά και αποδέσμευση πρωτεϊνικών και μακρομοριακών φαρμάκων, η μερική ή ολική αντικατάσταση ή ανανέωση ιστών, η κατασκευή βιοϊατρικών συσκευών και βιοαισθητήρων για την ανίχνευση βιομορίων και βιολογικών διεργασιών, η ανάπτυξη απεικονιστικών μεθόδων και η κατασκευή νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω ακινητοποίησης ενζύμων και κυττάρων στα νανοσυστήματα (Σταμάτης, 2018, Clark, 2012, Maheshwari et al., 2019).

2.1. Νανοσωματίδια

Οι βασικές δομικές μονάδες κάθε συστήματος στην νανοβιοτεχνολογία είναι τα νανοσωματίδια (Nanoparticles, NPs). Σύμφωνα με την ISO, «Τα νανοσωματίδια είναι νανοαντικείμενα, των οποίων όλες οι διαστάσεις βρίσκονται εντός της νανοκλίμακας και τα μήκη των μεγαλύτερων και μικρότερων αξόνων δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές». Αν υπάρχει μεγάλη διαφορά στις διαστάσεις, προτιμώνται οι χαρακτηρισμοί νανοΐνες ή νανοσωλήνες, κ.λπ., ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του νανοϋλικού. Τα NPs μπορούν να έχουν διαφορετικά σχήματα, μεγέθη και δομές. Μπορούν να είναι σφαιρικά, κυλινδρικά, κωνικά, σωληνοειδή, σπειροειδή ή ακανόνιστα. Το μέγεθος τους μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως 100 nm, ενώ αν το μέγεθος είναι μικρότερο από 1 nm, προτιμάται ο όρος συστάδες ατόμων (Clark, 2012, Joudeh & Linke, 2022).

Με βάση τις διαστάσεις τους, τα νανοϋλικά κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες:

- Νανοϋλικά μηδενικών διαστάσεων (0-D): τα νανοϋλικά αυτής της κατηγορίας έχουν και τις τρεις διαστάσεις τους στην περιοχή της νανοκλίμακας (κβαντικές τελείες, φουλερένια).
- Μονοδιάστατα νανοϋλικά (1-D): τα νανοϋλικά αυτής της κατηγορίας έχουν μία διάσταση εκτός της νανοκλίμακας (νανοσωλήνες, νανοφυσίνες, νανοράβδοι, νανοκαλώδια).
- Νανοϋλικά δύο διαστάσεων (2-D): τα νανοϋλικά αυτής της κατηγορίας έχουν δύο διαστάσεις εκτός της νανοκλίμακας (νανοφύλλα, νανοστρώσεις) (Joudeh & Linke, 2022).

Με βάση τη σύνθεσή τους, κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

- Οργανικά νανοσωματίδια: μπορούν να προέρχονται από διάφορα οργανικά υλικά (λιπίδια, πολυσακχαρίτες) και σε αυτά ανήκουν τα δενδρομερή, τα λιποσώματα, τα μικκύλια και σύμπλοκα όπως με φερριτίνη.
- Νανοσωματίδια με βάση τον άνθρακα: κατασκευάζονται αποκλειστικά με άτομα άνθρακα και σε αυτά ανήκουν τα φουλερένια, οι νανοσωλήνες άνθρακα και οι κβαντικές τελείες.
- Ανόργανα νανοσωματίδια: δεν αποτελούνται από άνθρακα, αλλά από μέταλλα και οξείδια μετάλλων. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μέταλλα είναι ο χρυσός (Au), ο σίδηρος (Fe), ο άργυρος (Ag), ο χαλκός (Cu) και ο ψευδάργυρος (Zn), ενώ από τα πιο συνήθη οξείδια μετάλλων αποτελούν το οξείδιο σιδήρου (Fe₂O₃), ο μαγνητίτης (Fe₃O₄), το οξείδιο του ψευδαργύρου και του τιτανίου (ZnO και TiO₂) (Joudeh & Linke, 2022).

Ένα τυπικό νανοσωματίδιο αποτελείται από διαφορετικά στρώματα με διαφορετικές λειτουργίες. Εσωτερικά διαθέτει ένα κεντρικό λειτουργικό στρώμα ή πυρήνα, ακολουθεί ένα προστατευτικό στρώμα και εξωτερικά υπάρχει το κέλυφος (Εικόνα 2.1). Ο ρόλος του κεντρικού λειτουργικού στρώματος είναι να επιδεικνύει κάποια χρήσιμη οπτική ή μαγνητική συμπεριφορά. Το προστατευτικό στρώμα, προφυλάσσει το λειτουργικό στρώμα από συστατικά του αέρα και του νερού και παράλληλα προστατεύει τον πυρήνα από τοξικές ιδιότητες των χημικών που συνθέτει το λειτουργικό στρώμα. Στη συνέχεια μπορεί να ακολουθεί ένα οργανικό στρώμα. Τέλος, το εξωτερικό περίβλημα κάνει τα NPs βιοσυμβατά, επιτρέποντας τη διαλυτότητα τους στο νερό και την εξειδικευμένη πρόσδεσή τους σε βιομόρια ή κύτταρα (Clark, 2012; Feugang, 2017).



Εικόνα 2.1. Τυπική δομή νανοσωματιδίου (Feugang, 2017).

2.2. Σύνθεση νανοσωματιδίων

Η σύνθεση των NPs μπορεί να γίνει με φυσικές και χημικές μεθόδους, οι οποίες μέχρι πρόσφατα αποτελούσαν τις κεντρικές μεθόδους σύνθεσης νανοϋλικών, ενώ πλέον το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στις βιολογικές μεθόδους. Γενικά, ακολουθούνται δύο είδη μεθοδολογιών σύνθεσης, η «από πάνω προς τα κάτω» (top-down) και η «από κάτω προς τα πάνω» (bottom-up) (**Εικόνα 2.2**). Στην πρώτη μεθοδολογία ένα υλικό μεγάλων διαστάσεων τεμαχίζεται σε μικρότερη κλίμακα χρησιμοποιώντας μηχανική, χημική ή άλλης μορφής ενέργεια, ενώ στη δεύτερη το νανοϋλικό συντίθεται από μόρια ή άτομα μέσω χημικών αντιδράσεων, με αποτέλεσμα τα στοιχειώδη σωματίδια να μεγαλώνουν σε μέγεθος (Alsaiari, 2023; Hussain et. al., 2016; Yazdanian et al., 2022).



Εικόνα 2.2. Οι δύο μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση νανοσωματιδίων (Yazdanian et al., 2022).

Οι φυσικές και οι χημικές μέθοδοι ακολουθούν την top-down ή bottom-up προσέγγιση. Οι φυσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τεχνικές όπως λιθογραφία, ακτινοβόληση υψηλής ενέργειας και αποκόλληση με laser, ενώ οι χημικές περιλαμβάνουν τεχνικές όπως χημική αναγωγή, ηλεκτροχημεία και φωτοχημική αναγωγή. Οι τεχνικές αυτές απαιτούν τη χρήση επικίνδυνων αντιδραστηρίων (αναγωγικά αντιδραστήρια, σταθεροποιητές, παράγοντες συσσώρευσης), υψηλής ενέργειας και οδηγούν στην παραγωγή επιβλαβών παραπροϊόντων. Το κόστος της συνολικής διαδικασίας είναι αυξημένο και μπορεί να οδηγούν σε ανεπαρκή απόδοση. Τα παραπάνω προκαλούν ανησυχίες σχετικά με την τοξικότητα και την ασφάλεια των μεθόδων, τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας της διαδικασίας, τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις και κυρίως τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Η κατάσταση έχει προκαλέσει στροφή του ενδιαφέροντος των βιομηχανιών στην «πράσινη χημεία» και γενικότερα στις «πράσινες πρακτικές». Στην παρούσα διπλωματική θα ασχοληθούμε με την βιολογική σύνθεση που ανήκει στις «πράσινες πρακτικές» και ακολουθεί την bottom-up μεθοδολογία. Χρησιμοποιούνται φυσικές πηγές, αποφεύγοντας οποιαδήποτε τοξικά γημικά αντιδραστήρια και επικίνδυνα παραπροϊόντα, συνήθως με χαμηλή ενεργειακή κατανάλωση. Στις φυσικές πηγές εντάσσονται συστατικά όπως μικροοργανισμοί, φυτά ή ακόμα και οικιακά παραπροϊόντα και απόβλητα (Alsaiari, 2023; Gkantzou et al., 2021; Gour & Jain, 2019; Singh J. et al., 2018; Singh P. et al., 2016).

2.2.1. Πλεονεκτήματα βιολογικής σύνθεσης

Η βιολογική σύνθεση οδηγεί σε πράσινα νανοϋλικά τα οποία εμφανίζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σχέση με τα συμβατικά. Αρχικά, η βιολογική σύνθεση είναι φιλική προς το περιβάλλον διαδικασία, καθώς δεν χρησιμοποιούνται τοξικά, χημικά αντιδραστήρια αλλά μεταλλικά άλατα και δεν παράγονται επιβλαβή παραπροϊόντα. Η σύνθεση πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες (θερμοκρασίας, pH), χωρίς τη χρήση υψηλών ενεργειακών πηγών. Κατά βάση χρησιμοποιείται το νερό ως ο βασικός διαλύτης και φυσικές πηγές όπως εκχυλίσματα μικροοργανισμών, φυτών, ζυμών και αποβλήτων. Δεν απαιτεί τη χρήση περίπλοκου εξοπλισμού και έχει χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με τις φυσικο-χημικές μεθόδους, αφού το κόστος σα αναγωγικούς παράγοντες. Επιπλέον, ο χρόνος που απαιτείται για την βιολογική σύνθεση είναι λιγότερος σε σχέση με τις φυσικές και χημικές και χημικές μεθόδους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν μελέτες όπου έχουν βιοσυντεθεί νανοσωματίδια αργύρου, ψευδαργύρου και σιδήρου από εκχυλίσματα φυτών μέσα σε 2, 5 ή 45 λεπτά και 1 ή 2 ώρες (Fotiadou et al., 2021; Gour & Jain, 2019; Singh et al., 2018).

Η διαδικασία πράσινης σύνθεσης εκτός από ενεργειακά ωφέλιμη είναι επίσης απλή, εύκολη και αναπαραγώγιμη. Τα πράσινα νανοϋλικά μπορούν να παραχθούν γρήγορα και μαζικά, σε μεγάλη κλίμακα και είναι περισσότερο σταθερά και αποτελεσματικά από τα συμβατικά. Αυτό συμβαίνει διότι φέρουν λειτουργικές ομάδες στην επιφάνειά τους που τα σταθεροποιούν και τα αποτρέπουν από τη συσσώρευση, χωρίς να χρειάζονται πρώτα ενεργοποίηση όπως συμβαίνει στα συμβατικά υλικά. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής τους σε ελεγχόμενα μεγέθη και σχήματα, ελέγχοντας τις φυσικές και χημικές παραμέτρους στη διαδικασία σύνθεσης, ενώ στις φυσικές και χημικές μεθόδους σύνθεσης περισσότεροι παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν αυτόν τον έλεγχο. Έτσι, η βιολογική σύνθεση αποφέρει πράσινα νανοϋλικά «καθαρά», μη τοξικά και βιοσυμβατά, με μειωμένη κυτταροτοξικότητα, που βρίσκουν χώρο σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Fotiadou et al., 2021; Gkantzou et al., 2021; Singh J. et al., 2018; Singh P. et al., 2016).

2.2.2. Μηχανισμός βιολογικής σύνθεσης

Η βιολογική σύνθεση μπορεί να συμβεί είτε σε έμβιο οργανισμό (*in vivo*) είτε σε δοκιμαστικό σωλήνα (*in vitro*). Στην πρώτη περίπτωση της *in vivo* σύνθεσης χρησιμοποιούνται διάφοροι μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, μικροφύκη) ή φυτά, που διαθέτουν βιοχημικά μονοπάτια, φυτοχημικά συστατικά, ένζυμα, πρωτεΐνες, σάκχαρα και άλλες ενώσεις. Έχουν την ικανότητα κατά την ανάπτυξή τους να απορροφούν και να συσσωρεύουν ανόργανα μεταλλικά ιόντα από το περιβάλλον τους και έπειτα να τα μετατρέπουν σε νανοσωματίδια. Στην δεύτερη περίπτωση της *in vitro* σύνθεσης χρησιμοποιούνται βιολογικά εκχυλίσματα μικροοργανισμών ή φυτών και επιτελείται η ελεγχόμενη ανάμιξή τους με ένα υδατικό διάλυμα μιας ένωσης μετάλλου (Hussain et al., 2016).

Ωστόσο, στην πλειοψηφία της βιολογικής σύνθεσης νανοσωματιδίων ακολουθείται η in vitro σύνθεση λόγω αυξημένης ευκολίας. Πιο συγκεκριμένα, ο προτεινόμενος μηχανισμός είναι ότι το εκχύλισμα μικροοργανισμών ή φυτών αναμιγνύεται με συγκεκριμένα άλατα για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση με τη μεθοδολογία bottom-up, σε ήπιες συνθήκες, με τη χρήση του νερού ως διαλύτη. Τα εκχυλίσματα περιέχουν μακρομόρια και σημαντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι μπορούν να ανάγουν αποτελεσματικά το σθένος των χρησιμοποιούμενων μεταλλικών αλάτων και να δημιουργηθούν άτομα μηδενικού σθένους (ουδέτερα άτομα). Ακολουθεί η φάση της ανάπτυξης ώστε να συναθροιστούν πολλά άτομα και έπειτα το νέο νανοσωματίδιο που σχηματίζεται, εμπλουτίζεται και σταθεροποιείται στην επιφάνειά του με τις λειτουργικές ομάδες που προέρχονται από συστατικά των χρησιμοποιούμενων εκχυλισμάτων (**Εικόνα 2.3**) (El-Seedi et al., 2019; Hussain et al., 2016; Singh et al., 2016).



Εικόνα 2.3. Πιθανός μηχανισμός της βιολογικά μεσολαβούμενης σύνθεσης νανοσωματιδίων. Μ: μεταλλικό αλάτι, M+; ιόν μετάλλου, Mo: ουδέτερο άτομο (Hussain et al., 2016).

2.2.3. Βιολογική σύνθεση από φυτά

Τα φυτά μπορούν να αποτελούν κινητήρια δύναμη για τη βιολογική σύνθεση των NPs στα πλαίσια της φυτονανοτεχνολογίας. Οι τεχνικές βιοσύνθεσης που χρησιμοποιούν φυτικά εκχυλίσματα έχουν ενδιαφέρον διότι είναι απλές, γρήγορες, αποτελεσματικές, φιλικές προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτικές. Τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν ποσότητες βαρέων μετάλλων στα διάφορα μέρη τους και να τα ανάγουν είτε στην επιφάνειά τους, είτε στα διάφορα όργανά τους και έπειτα να τα αποθηκεύουν ως νεοσυντιθέμενα νανοσωματίδια. Τα φυτά είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες όπως αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, σαπωνίνες, στεροειδή, ταννίνες, βιταμίνες, σάκχαρα, πολυφαινόλες και φαινολικά οξέα. Πολλοί από αυτούς τους μεταβολίτες δρουν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες στη βιολογική σύνθεση νανοσωματιδίων (Makarov et al., 2014; Singh J. et al., 2018; Singh P. et al., 2016).

Η σύνθεση μπορεί να γίνει *in vitro* χρησιμοποιώντας φυτικά εκχυλίσματα διαφόρων τμημάτων του φυτού σε τρεις φάσεις, τη φάση ενεργοποίησης, τη φάση ανάπτυξης και μια τελική φάση σύνθεσης (Εικόνα 2.4). Η διαδικασία της σύνθεσης ξεκινάει με την ανάμειξη του δείγματος του φυτικού εκχυλίσματος με ένα διάλυμα μεταλλικού άλατος. Στην πρώτη φάση ενεργοποίησης τα ιόντα των μετάλλων ανάγονται από τις μονοσθενείς ή δισθενείς καταστάσεις οξείδωσής τους σε μηδενικού σθένους καταστάσεις και λαμβάνει χώρα η πυρήνωση των ανηγμένων ατόμων μετάλλου. Ακολουθεί η φάση της ανάπτυξης, όπου μικρότερα γειτονικά σωματίδια συγχωνεύονται για να σχηματίσουν μεγαλύτερα NPs που είναι θερμοδυναμικά πιο σταθερά, ενώ λαμβάνει χώρα περαιτέρω βιολογική αναγωγή των μεταλλικών ιόντων. Καθώς η ανάπτυξη προχωρά, τα NPs συσσωματώνονται για να σχηματίσουν μια ποικιλία μορφολογιών όπως κύβους, σφαίρες, τρίγωνα, εξάγωνα, πεντάγωνα και ράβδους. Στο τελικό πλέον στάδιο της σύνθεσης, σταθεροποιούνται τα NPs λόγω ουσιών των αρχικών φυτικών εκχυλισμάτων και παίρνουν την τελική τους μορφή, δηλαδή την ενεργειακά πιο ευνοϊκή (Makarov et al., 2014; Shah et al., 2015).



Εικόνα 2.4. Βιολογική σύνθεση νανοσωματιδίων χρησιμοποιώντας φυτικά εκχυλίσματα (Shah et al., 2015).

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται πληθώρα παραδείγματα χρήσης φυτικών εκχυλισμάτων για βιολογική σύνθεση. Πρόσφατα, συντέθηκαν με επιτυχία νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου χρησιμοποιώντας το εκχύλισμα φύλλων και ριζών από το φαρμακευτικό φυτό *Panax ginseng*. Εκχυλίσματα *Pelargonium graveolens* έχουν χρησιμοποιηθεί για σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού, ενώ εκχυλίσματα φύλλων *Euphorbia prostrata* για νανοσωματίδια αργύρου και διοξειδίου του τιτανίου. Ωστόσο, οι έρευνες προτείνουν ότι διαφορετικοί μηχανισμοί σύνθεσης υπάρχουν σε διαφορετικά είδη φυτών ανάλογα με τα συστατικά τους. Για παράδειγμα, συστατικά όπως η εμοδίνη, η οποία υπάρχει σε ξερόφυτα φυτά (φυτά προσαρμοσμένα να επιβιώνουν σε ερήμους ή περιβάλλοντα με λίγο νερό) είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου, ενώ αντίστοιχα η ευγενόλη του *Cinnamomum zeylanisum*, βρέθηκε ότι έχει πρωταρχικό ρόλο στη σύνθεση νανοσωματιδίων χυσού και αργύρου (Makarov et al., 2014; Singh et al., 2016; Zahir et al., 2015). Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε τη σύνθεση νανοσωματιδίων από εκχύλισμα φύλλων ελιάς και οινολάσπης.

2.2.3.1. Ελιά

Η Olea europaea ανήκει στην οικογένεια Oleaceae και είναι ένα από τα παλαιότερα γνωστά καλλιεργούμενα φυτά. Πρόκειται για ελαιόδεντρα που κατανέμονται στις παράκτιες περιοχές της ανατολικής λεκάνης της Μεσογείου, στις παρακείμενες παράκτιες περιοχές της νοτιοανατολικής Ευρώπης, στο βόρειο Ιράν, στο νότιο άκρο της Κασπίας Θάλασσας, στη δυτική Ασία και στη βόρεια Αφρική. Το ελαιόδεντρο είναι ένα αειθαλές δέντρο, ύψους 12 έως 20 μέτρα, με άκαμπτα κλαδιά και φλοιό. Τα φύλλα του είναι αντίθετα, λογχοειδή ή ωοειδή-λογχοειδή, βλεννώδη, σκούρα πράσινα στη πάνω πλευρά και αργυρά στην κάτω πλευρά. Τα άνθη του είναι μικρά, σε κοντές, μασχαλιαίες τσαμπιές και πολύ κοντύτερα από τα φύλλα. Η στεφάνη είναι κοντή, λευκή, με τέσσερα πλατιά, ωοειδή τμήματα. Ο καρπός του έχει το μέγεθος ενός δαμάσκηνου και είναι λείος, πορφυρός, με σάρκα πικρή, που περικλείει έναν αιχμηρό λίθο. Το παρθένο ελαιόλαδο είναι το μόνο βρώσιμο έλαιο σε μεγάλη παραγωγή που λαμβάνεται με φυσικές μεθόδους από τον καρπό της *Olea europaea*, με οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και διατροφικές ιδιότητες που επιτρέπουν τη διάκρισή του (Rashed, 2022; Rev et al., 2007; Talhaoui et al., 2015).

Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι, οι Έλληνες, οι Ρωμαίοι και άλλοι μεσογειακοί λαοί καλλιεργούσαν την ελιά για τους βρώσιμους καρπούς της και για να πάρουν λάδι από αυτούς. Επίσης, η ελιά και ο καρπός της ήταν σημαντικά στο πλαίσιο της θρησκείας, καθώς αναφέρονται αρκετές φορές στη Βίβλο, τόσο στην Καινή όσο και στην Παλαιά Διαθήκη, αλλά έχουν επαινεθεί ως ευλογημένο δέντρο και καρπός και στο Ιερό Κοράνι. Οι θεραπευτικές χρησιμότητες της ελιάς έχουν αναφερθεί ήδη από την παραδοσιακή ιατρική. Το έλαιο

λαμβανόταν με χυμό λεμονιού για τη θεραπεία των χολόλιθων. Τα φύλλα λαμβάνονταν από το στόμα για ασθένειες του στομάχου και του εντέρου. Αφέψημα των αποξηραμένων καρπών και φύλλων λαμβάνονταν από το στόμα για τη διάρροια και για τη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος. Πλέον είναι γνωστό ότι μειώνει το σάκχαρο στο αίμα, τη χοληστερόλη και το ουρικό οξύ. Έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του διαβήτη, της υπέρτασης, της φλεγμονής, της διάρροιας, των λοιμώξεων του αναπνευστικού και ουροποιητικού συστήματος, των παθήσεων του στομάχου και του εντέρου, του άσθματος, των αιμορροΐδων, των ρευματισμών, ως καθαρτικό, καθαριστικό του στόματος και ως αγγειοδιασταλτικό (Rashed, 2022; Rev et al., 2007).

Περισσότερα από 8 εκατομμύρια εκτάρια ελαιόδεντρων καλλιεργούνται παγκοσμίως και περίπου το 98% αυτών βρίσκονται στη λεκάνη της Μεσογείου. Τα παραπροϊόντα που προέρχονται από τα ελαιόδεντρα και την διαδικασία εξαγωγής ελαιολάδου είναι γνωστά ως «παραπροϊόντα της ελιάς». Ένας μεγάλος αριθμός παραπροϊόντων και υπολειμμάτων που προέρχονται τόσο από την καλλιέργεια ελαιόδεντρων, όσο και από τη βιομηχανία επεξεργασίας ελιάς ετησίως. Τα περισσότερα από αυτά δεν έχουν πρακτικές εφαρμογές, ωστόσο τα φύλλα ελιάς, που αντιπροσωπεύουν το 10% του βάρους των ελιών που συλλέγονται για την εξαγωγή λαδιού, αποτελούν ένα από τα παραπροϊόντα που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες και μπορούν να έχουν πρακτική εφαρμογή (Talhaoui et al., 2015).

Στην ουσία τα φύλλα ελιάς περιέχουν μεγάλη ποικιλία φαινολικών παραγώγων σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης και αποτελούνται από απλές φαινόλες (οι πιο κοινές και σημαντικές φαινολικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους), φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, 3-φλαβανόλες) και σεκοϊριδοειδή. Η υδροζυτυροσόλη έχει περιγραφεί ως ένα από τα κύρια συστατικά των απλών φαινολών. Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια από τις πιο κοινές και ευρέως διαδεδομένες ομάδες πολυφαινολών των φύλλων της ελιάς και αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται μέσω τριών ανθράκων σχηματίζοντας ένα οξυγονωμένο ετεροκύκλιο. Μπορεί να υπάρχουν σε μορφή αγλυκόνης (κερκετίνη, απιγενίνη, λουτεολίνη, διοσμετίνη) ή σε γλυκοζυλιωμένη μορφή (κερκετίνη-7-Ορουτινοσίδη, λουτεολίνη-7-Ο-ρουτινοσίδη, λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοσίδη, λουτεολίνη-5-Ογλυκοσίδη). Τα σεκοϊριδοειδή, τα οποία είναι μια υποκατηγορία ιριδοειδών, προέρχονται από τη διάσπαση του δακτυλίου του κυκλοπεντανίου στο δεσμό 7, 8 και περιέχουν τμήματα φαινόλης. Είναι χαρακτηριστικά καθώς εμφανίζονται αποκλειστικά στην οικογένεια Oleaceae και αποτελούν τη κύρια οικογένεια ενώσεων που περιέχονται στα φύλλα της ελιάς. Μεταξύ αυτών, η ελαιοευρωπαΐνη είναι η κύρια ένωση στα φύλλα της ελιάς. Πρόκειται για το σημαντικότερο συστατικό του γλυκοζιτικού κλάσματος της Olea europaea από ποσοτική και ιστορική άποψη. Στην πραγματικότητα, η ελαιοευρωπαΐνη είναι το πρώτο σεκοϊριδοειδές που απομονώθηκε σε όλο τον κόσμο. Αποτελεί την ουσία που ευθύνεται για την πικρή γεύση των καρπών και των φύλλων του φυτού και τη δραστική ένωση που ευθύνεται για τη γνωστή υποτασική δράση των εκχυλισμάτων του φυτού της ελιάς. Το ενδιαφέρον για τα φύλλα ελιάς, ως πηγή πλούσια σε αντιοξειδωτικά, έχει αυξηθεί με στόχο την περαιτέρω χρήση τους σε τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής. Η ενσωμάτωση εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς στη βιομηχανία τροφίμων μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην υγεία των καταναλωτών και να παρατείνει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων (Rashed, 2022; Rev et al., 2007; Talhaoui et al., 2015).

2.2.4. Βιολογική σύνθεση από απόβλητα

Το περιβάλλον αποτελεί «θησαυρό» αποβλήτων, τα οποία προέρχονται είτε από γεωργικές διαδικασίες, είτε από τρόφιμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για τη πράσινη σύνθεση NPs. Τα απόβλητα περιέχουν διάφορες οργανικές ενώσεις όπως πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, καροτενοειδή και βιταμίνες και δρουν ως παράγοντες διαμόρφωσης, που μπορούν να καθορίσουν το μέγεθος και τη μορφολογία των συντιθέμενων NPs. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία αναφέρεται η χρήση βιοαποικοδομήσιμων αποβλήτων για τη σύνθεση διαφορετικών NPs. Ενδεικτικά τέτοιες πηγές αποτελούν φλούδες μπανάνας, κέλυφος αυγών, φλούδες μάνγκο, κρεμμυδιού, ροδιού, ρυζιού, καρπουζιού, πορτοκαλιού, ανθρώπινες τρίχες, απόβλητα τσαγιού, ξηρών καρπών, θαλάσσια απόβλητα και απόβλητα σφαγείων και οινοποιίας (Aswathi et al., 2023; Sharma et al., 2019).

Βιβλιογραφικά, έχουν καταγραφεί πολλές περιπτώσεις χρήσης αυτών των πηγών για την πράσινη σύνθεση. Η φλούδα πορτοκαλιού αποτελεί μεταξύ 50 και 65% του συνολικού βάρους του καρπού και είναι πλούσια σε διαλυτές ίνες, πρωτεΐνες, φλαβονοειδή και αδιάλυτες ίνες, οι οποίες έχουν πιθανές εφαρμογές στη σύνθεση NPs. Τα υπολείμματα ξηρών καρπών από διάφορα μέρη τους, όπως το κέλυφος ή ο πυρήνας, είναι πλούσια σε συστατικά, όπως ημικυτταρίνη, λιγνίνη και κυτταρίνη και μπορεί να βοηθήσουν στη σύνθεση βιονανοϋλικών. Ένα από τα γεωργικά απόβλητα που έχουν συγκεντρώσει τη προσοχή πρόσφατα είναι τα τσόφλια αυγών. Καθημερινά, ένας μεγάλος αριθμός κελυφών αυγών παράγεται ως βιοαπόβλητα σε όλο τον κόσμο. Το καθαρό ανθρακικό ασβέστιο με χαμηλό πορώδες είναι το κύριο συστατικό του κελύφους των αυγών, το οποίο έχει τη δυνατότητα να μετατραπεί σε γρήσιμα προϊόντα. Λόγω του πορώδους της δομής, η μεμβράνη του κελύφους αυγού χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μαγνητικών νανοϋλικών CuFe2O4 με πολυλειτουργικές ιδιότητες όπως καταλυτικές και αντιβακτηριακές λειτουργίες που έχουν εφαρμογή στη βιομηγανική επεξεργασία του νερού. Τα ανθρώπινα μαλλιά είναι επίσης ένα βιοαπόβλητο, το οποίο είναι ένας πολύπλοκος ιστός που περιέχει λιπίδια, νερό, πρωτεΐνες και γρωστικές ουσίες. Νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου μπορούν να συντεθούν χρησιμοποιώντας κερατίνη που προέρχεται από ανθρώπινες τρίχες και να σταθεροποιηθούν με τη χρήση ενός παράγοντα κάλυψης, όπως το αμινοξύ κυστεΐνη με λειτουργικές ομάδες αμίνης και θειόλης, οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία στα ανθρώπινα μαλλιά. Τα απόβλητα τσαγιού περιέχουν συστατικά όπως πολυσακχαρίτες, καφεΐνη και ταννικό οξύ, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να σταθεροποιήσουν NPs μετάλλων και οξειδίων μετάλλων, καθώς μπορούν να λειτουργήσουν ως αναγωγικός και καλυπτικός παράγοντας. Εκχυλίσματα από το φρούτο μάνγκο έχει χρησιμοποιηθεί για παραγωγή νανοσωματιδίων χρυσού, ενώ φλούδα μπανάνας για σύνθεση νανοσωματιδίων με υδροξυαπατίτη. Απόβλητα της βιομηχανίας κρασιού (σπόροι σταφυλιών) έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση μεταλλικών NPs. Παράλληλα, μέσω της διαδικασίας αυτής μπορεί να ανοίξει ο δρόμος για τη διαχείριση αποβλήτων (Aswathi et al., 2023; Sharma et al., 2019). Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με την σύνθεση νανοσωματιδίων από εκχύλισμα ελιάς και οινολάσπης.

2.2.4.1. Οινολάσπη

Η οινοποίηση αποτελεί έναν κλάδο υψηλής αξίας και πολιτιστικής σημασίας. Το 2022 η παγκόσμια παραγωγή κρασιού υπολογίστηκε σε 258 εκατομμύρια hL, με την Ιταλία, τη Γαλλία και την Ισπανία να αντιπροσωπεύουν περίπου το 50% αυτής. Ωστόσο, σημαντική συνέπεια αποτελεί η παραγωγή παραπροϊόντων καθώς η επεξεργασία 100 τόνων σταφυλιών μπορεί να παράγει έως 20-22 τόνους διαφορετικών τύπων παραπροϊόντων. Ο τύπος αυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη κάθε διαδικασία οινοποίησης, η οποία επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του κάθε προϊόντος. Τα τυπικά απόβλητα αποτελούν σε ποσοστό περίπου 60% τα στέμφυλα (φλοιός και σπόροι σταφυλιών), σε ποσοστό 14% οι μίσχοι, σε ποσοστό 25% η οινολάσπη και άλλα απόβλητα πλούσια σε οργανικές ενώσεις και διοξείδιο του άνθρακα από την διαδικασία της ζύμωσης (De Iseppi et al., 2020, 2021; International Organization of Vine and Wine, 2022; Teixeira et al., 2014).

Σύμφωνα με τον κανονισμό ΕΟΚ αριθ. 337/79, οι οινολάσπες ορίζονται ως «Υπολείμματα που σχηματίζονται στον πυθμένα των δοχείων κρασιού, μετά τη ζύμωση, κατά την αποθήκευση ή μετά από επεξεργασία κρασιού, καθώς και τα υπολείμματα που λαμβάνονται μετά τη διήθηση ή τη φυγοκέντρηση του προϊόντος». Τα κύρια χαρακτηριστικά της οινολάσπης είναι το όξινο pH μεταξύ 3 και 6, η ζήτηση χημικού οξυγόνου πάνω από 30,000 mg/L, τα επίπεδα καλίου περίπου 2,500 mg/L και οι φαινολικές ενώσεις σε ποσότητες έως 1,000 mg/L. Οι οινολάσπες χρησιμοποιούνται για τη παλαίωση του κρασιού, συνήθως σε λευκά και αφρώδη κρασιά, αν και μερικές φορές εφαρμόζονται και σε ερυθρά κρασιά. Η αυτόλυση των ζυμομυκήτων οδηγεί στην απελευθέρωση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, λιπιδίων και πολυσακχαριτών και παρέχονται οι συνθήκες ώστε πολλά συστατικά να διαρρεύσουν στο κρασί και να βελτιωθεί η ποιότητα των κρασιών, καθώς μειώνεται η

στυφότητα και η πικράδα και βελτιώνεται η δομή και η σταθερότητα του χρώματος του κρασιού (Jara-Palacios, 2019; Teixeira et al., 2014).

Η οινολάσπη χωρίζεται σε στερεά και υγρά κλάσματα όταν τεθεί για φυγοκέντρηση ή φιλτράρισμα. Το στερεό κλάσμα είναι μείγμα ζυμομυκήτων, οργανικών οξέων (κυρίως τρυγικού οξέος), αδιάλυτων υδατανθράκων (όπως κυτταρινικά ή ημικυτταρινικά υλικά), ανόργανων αλάτων, λιγνίνης, πρωτεϊνών, φαινολικών ενώσεων και άλλων μερών του σταφυλιού. Το υγρό κλάσμα αποτελείται κυρίως από αιθανόλη και οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ. Βιβλιογραφικά, οι πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον γαρακτηρισμό του στερεού κλάσματος, προσδιορίζοντας αρκετές φαινολικές ενώσεις που ανήκουν στις υποκατηγορίες φαινολικών οξέων, φλαβονολών, φλαβανολών και ανθοκυανινών (De Iseppi et al., 2020; Jara-Palacios, 2019). Οι φαινολικές ενώσεις έχουν προσεγγίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω των πλεονεκτημάτων που παρατηρούνται ενάντια των καρδιαγγειακών παθήσεων, των φλεγμονωδών διεργασιών και των εκφυλιστικών παθοφυσιολογικών καταστάσεων που μπορούν να αναπτυχθούν σε ενήλικες ανθρώπους (Bosiljkov & Dujmi, 2017). Η ταννίνη είναι μια πολυφαινολική ένωση, η οποία έχει οφέλη για την ανθρώπινη υγεία λόγω του υψηλού αντιοξειδωτικού δυναμικού. Βιβλιογραφικά, σε μελέτη συντέθηκαν πράσινα νανοσωματίδια αργύρου με τη χρήση Vitis vinifera, της τανίνης εκχυλισμένης από τον πυρήνα σταφυλιού, χαρακτηρίστηκαν και αξιολογήθηκαν in vitro ou αντιδιαβητικές και αντιοξειδωτικές δράσεις τους, καθώς και η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα τους έναντι καλλιεργειών παθογόνων βακτηρίων (Saratale et al., 2021).

2.2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιολογική σύνθεση

Στην διαδικασία της βιολογικής σύνθεσης NPs, η επίτευξη ενός σταθερού συστήματος για την παραγωγή NPs με ομοιογενές μέγεθος και μορφολογία αποτελεί πρόκληση. Οι φυσικοχημικοί παράμετροι επηρεάζουν τον ρυθμό βιοσύνθεσης, την ποιότητα, το μέγεθος και τη μορφολογία των συντιθέμενων NPs και πρέπει να ελέγχονται για τη βελτιστοποίηση της σύνθεσης. Μεταξύ αυτών των παραγόντων είναι η σύσταση και η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου εκχυλίσματος, το pH του μίγματος αντίδρασης, η θερμοκρασία, ο αερισμός, το φως, η χρονική διάρκεια επώασης της αντίδρασης, η συγκέντρωση του μεταλλικού άλατος και το δυναμικό του (**Εικόνα 2.5**) (El-Seedi et al., 2019; Shah et al., 2015; Singh et al., 2016).



Εικόνα 2.5. Παράμετροι που επηρεάζουν την σύνθεση μονοδιεσπαρμένων, σταθερών και υψηλής απόδοσης βιολογικών νανοσωματιδίων (Singh et al., 2016).

Σύσταση και συγκέντρωση εκχυλίσματος

Η σύσταση των βιομορίων που εντοπίζονται στα εκχυλίσματα της πηγής που χρησιμοποιείται και κατ΄ επέκταση η ποσότητα του εκχυλίσματος είναι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση των βιολογικών NPs. Στα βιοδραστικά αυτά μόρια ανήκουν πολυσακχαρίτες, ένζυμα, αμίνες, βιταμίνες, πρωτεΐνες και οργανικά οξέα. Στα φυτικά εκχυλίσματα έχουν εντοπιστεί πληθώρα τέτοιων δευτερογενών μεταβολιτών που χρησιμοποιούνται στη βιολογική σύνθεση (Πίνακας 2.1). Παράδειγμα, αποτελεί μελέτη όπου με μεταβολή της ποσότητας εκχυλίσματος φύλλων του *Cinnamomum camphora* επηρεαζόταν το σχήμα νανοσωματιδίων χρυσού και αργύρου. Ομοίως, μεταβάλλοντας την ποσότητα του εκχυλίσματος φύλλων *Aloe vera* στο μέσο αντίδρασης που περιέχει ιόντα χλωροαυρικού, επηρεαζόταν η αναλογία τριγωνικών νανοσωματιδίων προς σφαιρικά νανοσωματίδια χρυσού (El-Seedi et al., 2019; Shah et al., 2015; Singh et al., 2016).

Πίνακας 2.1. Φυσικοί μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται στη βιολογική σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων (El-Seedi et al., 2019).

		-
Chemical name	Class	Source
21-Hydroxyonocera-8(26),14-diene-3-one	Terpenoids	Plants
3β-Hydroxyonocera-8(26),14-dien-21-one	Terpenoids	Plants
A reducing hexose with the open chain form	Sugar	Plants
Diosgenin	Steroids	Plants
Eugenol	Terpenoids	Plants
Glutathione	Tripeptide	Yeast & fungi
Lansionic acid	Terpenoids	Plants
Lansic acid	Terpenoids	Plants
Lansiosides A	Terpenoids	Plants
Lansiosides B	Terpenoids	Plants
Lansiosides C	Terpenoids	Plants
Luteolin	Flavonoids	Plants
Quercetin	Flavonoids	Plants
Rosmarinic acid	Acids	Plants
Tryptophan	Amino acids	Plants
Tyrosine	Amino acids	Plants
Vitamin B2	Alkaloids	
Vitamin C (ascorbic acid)	Acids	_

Συγκέντρωση μεταλλικού άλατος

Η συγκέντρωση του μεταλλικού άλατος που επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί παίζει επίσης ρόλο στην αποτελεσματικότητα της σύνθεσης, στη μορφολογία και στο μέγεθος των NPs. Πιο συγκεκριμένα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να αναχθούν ευκολότερα σε σύγκριση με τις υψηλές συγκεντρώσεις που μπορούν να προκαλέσουν συσσωματώσεις. Για παράδειγμα, όταν το εκχύλισμα φύλλων του *Coleus aromaticus* χρησιμοποιήθηκε για τη βιοαναγωγή των ιόντων αργύρου, βρέθηκε ότι τα NPs συντέθηκαν αποτελεσματικά όταν η συγκέντρωση των ιόντων ήταν 1 mM ή μικρότερη, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις προκάλεσαν συσσωμάτωση των σωματιδίων (El-Seedi et al., 2019; Makarov et al., 2014).

Διάρκεια αντίδρασης

Ο χρόνος της αντίδρασης σύνθεσης αποτελεί έναν βασικό παράγοντα που επηρεάζει το μέγεθος και τη μορφολογία των NPs. Η σύνθεση συμβαίνει σε λίγα λεπτά και συνήθως παρατηρείται αλλαγή χρώματος. Μετά το πέρας αυτών των λεπτών ή κάποιων ωρών, έχει παρατηρηθεί πως μπορεί είτε να μην παρατηρηθεί καμία αλλαγή, είτε λίγα μόνο επιπλέον NPs συνεχίζουν να παράγονται. Συνεπώς, ο ρυθμός παραγωγής τους μειώνεται αλλά ο συνολικός αριθμός τους συνεχίζει να αυξάνεται. Για παράδειγμα, σε μελέτη σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου με εκχύλισμα από *Ananas comosus* παρατηρήθηκε μια γρήγορη αλλαγή χρώματος μέσα σε 2 λεπτά. Η αντίδραση συνεχίστηκε έως και 5 λεπτά, αλλά μετά από αυτό παρατηρήθηκε ελάχιστη διακύμανση στο χρώμα. Τα παραγόμενα NPs ήταν σφαιρικά και είχαν μέσο μέγεθος 12 nm. Σε παρόμοια μελέτη με εκχύλισμα φύλλων *Chenopodium* για την παραγωγή νανοσωματιδίων αργύρου και χρυσού, τα NPs εμφανίστηκαν μέσα σε 15 λεπτά και συνέχισαν να σχηματίζονται σε διάστημα 2 ωρών. Πέρα των 2 ωρών παρήχθησαν πολύ λίγα NPs (Shah et al., 2015; Singh et al., 2016).

• <u>pH</u>

Το pH στο μέσο της αντίδρασης έχει σημαντικές επιπτώσεις στα σχήματα και στο μέγεθος των συντιθέμενων NPs. Πιο συγκεκριμένα, η αλλαγή του pH αλλάζει το φορτίο των ενώσεων του εκχυλίσματος, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ικανότητά τους να δεσμεύουν και να ανάγουν τα μεταλλικά ιόντα. Συνήθως, οι χαμηλότερες τιμές pH προωθούν το μεγαλύτερο μέγεθος στα NPs σε σχέση με τις μεγαλύτερες τιμές. Για παράδειγμα, τα νανοσωματίδια χρυσού σε σχήμα ράβδου που συντέθηκαν με χρήση του Avena sativa ήταν μεγαλύτερα (25 έως 85 nm) όταν σχηματίστηκαν σε pH 2 και μικρότερα (5 έως 20 nm) σε pH 3 και 4. Η μελέτη πρότεινε ότι μεταξύ pH 3 και 4 ήταν πιο προσβάσιμες οι λειτουργικές ομάδες που περιέχονται στο εκχύλισμα και διαθέσιμες για πυρήνωση σωματιδίων. Αντίθετα, σε pH 2 ήταν διαθέσιμες λιγότερες λειτουργικές ομάδες που οδήγησαν σε συσσωμάτωση σωματιδίων, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν μεγαλύτερα νανοσωματίδια χρυσού (El-Seedi et al., 2019; Shah et al., 2015; Singh et al., 2016).

<u>Θερμοκρασία</u>

Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει έντονα το μέγεθος και το σχήμα των βιοσυντιθέμενων NPs καθώς και τον ρυθμό σχηματισμού τους. Ο ρυθμός αντίδρασης και σχηματισμού σωματιδίων αυξάνονται σταθερά με την αύξηση της θερμοκρασίας, ωστόσο το κατά μέσο όρο μέγεθος των σωματιδίων μειώνεται. Για παράδειγμα, η σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου σε θερμοκρασία 25°C με χρήση εκχυλίσματος φλούδας *Citrus* sinensis απέδωσε NPs με μέσο μέγεθος 35 nm, ενώ όταν η θερμοκρασία της αντίδρασης αυξήθηκε στους 60°C, το μέσο μέγεθος των σωματιδίων μειώθηκε στα 10 nm. Επιπλέον, οι Gericke και Pinches έχουν δείξει ότι οι υψηλότερες θερμοκρασίες ευνόησαν τον υψηλότερο ρυθμό σχηματισμού νανοσωματιδίων χρυσού και σχηματίστηκαν NPs σε σχήματα ράβδου και πλάκας, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες σχηματίστηκαν κυρίως NPs σφαιρικού σχήματος (El-Seedi et al., 2019; Shah et al., 2015; Singh et al., 2016).

<u>Φως</u>

Το φως είναι ένας παράγοντας που έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τον ρυθμό των διεργασιών βιοσύνθεσης. Σε μελέτη δείχθηκε ότι το ηλιακό φως μείωσε τον χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση της βιοσύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου από 12 ώρες σε 5 λεπτά. Αυτή η δραματική μείωση αποδόθηκε σε μια φωτοχημική διεργασία, η οποία αύξησε πολύ τον ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μεταλλικά ιόντα. Επίσης, έχει μελετηθεί η επίδραση της μεταβολής του μήκους κύματος του προσπίπτοντος φωτός, με τύλιγμα των δοχείων αντίδρασης με βιολετί, κόκκινο, πράσινο και κίτρινο χαρτί σελοφάν. Το βιολετί βρέθηκε ότι ευνοεί το σχηματισμό μικρότερων σφαιρικών νανοσωματιδίων αργύρου με διάμετρο περίπου 20 nm (El-Seedi et al., 2019).

3. Κατηγορίες νανοσωματιδίων

Όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2.1, τα νανοσωματίδια με βάση τον πυρήνα σύνθεσης τους κατατάσσονται σε ανόργανα και οργανικά. Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με τα ανόργανα «πράσινα» μεταλλικά νανοσωματίδια αργύρου (Silver NPs, AgNPs) και οξειδίου του ψευδαργύρου (Zinc oxide NPs, ZnONPs), καθώς και με τα οργανικά νανοσωματίδια χιτοζάνης (Chitosan NPs, ChNPs).

3.1. Ανόργανα μεταλλικά νανοσωματίδια

Τα μεταλλικά νανοσωματίδια έχουν ως βάση κάποιο μέταλλο όπως άργυρο, χαλκό, χρυσό, τιτάνιο, πλατίνα, ψευδάργυρο, μαγνήσιο, σίδηρο ή κάποιο οξείδιο μετάλλου, όπως το διοξείδιο του τιτανίου, το οξείδιο του αργύρου και το οξείδιο του ψευδαργύρου. Όλα τα ζωντανά βιολογικά συστήματα περιλαμβάνουν διαφορετικά είδη μεταλλικών ιόντων για την επιτέλεση των λειτουργιών τους, για το λόγο αυτό τα μέταλλα χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες βιοϊατρικές εφαρμογές από την αρχαιότητα. Ωστόσο, πρόσφατες τοξικολογικές έρευνες καταδεικνύουν διάφορους περιορισμούς τους όπως τοξικότητα, χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και μη ειδικότητα. Ως εκ τούτου, οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη υλικών νανομεγέθους με βάση τα μέταλλα, ώστε να αλλάξουν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες για να είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν στις διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Το μικρό τους μέγεθος τους επιτρέπει να ενδοκυτταρώνονται εύκολα, να έχουν μεγάλη εύκολα τροποποιήσιμη επιφάνεια, βιοσυμβατότητα και χαμηλή τοξικότητα (Barui, 2018; Clark, 2012; Yaqoob et al., 2020).

3.1.1. Νανοσωματίδια αργύρου

Ο άργυρος είναι ένα μαλακό γκριζόλευκο στοιχείο με ατομικό βάρος 47. Είναι αδιάλυτος στο νερό, ενώ τα μεταλλικά του άλατα, όπως το AgNO₃ (νιτρικός άργυρος) και το AgCl (χλωριούχος άργυρος), είναι διαλυτά στο νερό. Ο μεταλλικός άργυρος στη λεπτόρρευστη μορφή του παρουσιάζει μοναδικές ιδιότητες που συνήθως συνδέονται με τα ευγενή μέταλλα. Χρησιμοποιήθηκε ήδη από τα αρχαία χρόνια για ιατρικούς σκοπούς. Πιο συγκεκριμένα, οι αρχαίοι Έλληνες και οι πρώτοι Αμερικάνοι τον χρησιμοποιούσαν ως απολυμαντικό μέσο για την αποθήκευση νερού και άλλων υγρών. Το 1520, ο πατέρας της φαρμακολογίας, ο Παράκελσος, χρησιμοποίησε τον άργυρο για τη θεραπεία των πληγών και το 1614 ο Angio Sala για τις λοιμώξεις του εγκεφάλου. Αργότερα, ο νιτρικός άργυρος χρησιμοποιήθηκε ως οφθαλμικές σταγόνες για την πρόληψη της γονόρροιας σε νεογέννητα μωρά, από τη δεκαετία του 1880 έως τα τέλη του 1900, ενώ πιο στοχευμένα οι Moyer και Monafo εισήγαγαν διάλυμα νιτρικού αργύρου 0.5% για τη θεραπεία πληγών από εγκαύματα στα τέλη της δεκαετίας του 1960 (Barui, 2018; Tarannum et al., 2019).

Η χρήση του αργύρου αποτέλεσε σημαντική καινοτομία στη νανοτεχνολογία. Τα συντιθέμενα AgNPs διαθέτουν ποικίλες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες, όπως ηλεκτρική αγωγιμότητα, υψηλή θερμική αντοχή, οπτικές ιδιότητες, χημική σταθερότητα, ελεγχόμενη γεωμετρία, καταλυτικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες. Οι παραπάνω ιδιότητες είναι απαραίτητες για τη μεγιστοποίηση των πιθανών εφαρμογών των AgNPs σε διάφορους τομείς, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τους κινδύνους που ενέχουν για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Ωστόσο, οι ιδιότητες βιοσυσσώρευσης, οι τοξικές επιδράσεις και η παραμονή του αργύρου στο περιβάλλον για μεγάλα διαστήματα κατέστησαν επιτακτική την ανάγκη περαιτέρω ελέγχου της χρήσης του και της έκθεσης σε αυτόν (Corciovă et al., 2022; Dhaka et al., 2023).

3.1.2. Νανοσωματίδια ψευδαργύρου

Ο ψευδάργυρος είναι ένα γαλαζο-άσπρο, λαμπερό, διαμαγνητικό μέταλλο με ατομικό βάρος 30. Είναι λιγότερο πυκνό από τον σίδηρο και έχει εξαγωνική δομή κρυστάλλου. Ο μεταλλικός ψευδάργυρος είναι σκληρός και εύθραυστος στο μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών αλλά γίνεται ελαστικός μεταξύ 100 και 150 °C. Άνω των 210 °C, το μέταλλο γίνεται ξανά εύθραυστο και μπορεί να καταστραφεί με ένα χτύπημα. Αρχικά, αναγνωρίστηκε ως μέταλλο τον 14° αιώνα και αργότερα, το 1789, εισήχθη στον περιοδικό πίνακα από τον Antoine Lavoisier. Ο Παράκελσος χρησιμοποίησε για πρώτη φορά θειικό ψευδάργυρο σε συνταγή του, η οποία έφερε επανάσταση στον τομέα της βιοϊατρικής για την ανάπτυξη φαρμάκων με βάση τον ψευδάργυρο σε θεραπευτικές εφαρμογές. Αργότερα ανακαλύφθηκαν οι μοναδικές ιδιότητες του οξειδίου ψευδαργύρου (ZnO). Έχει ημιαγώγιμες, οπτικές, πυροηλεκτρικές, πιεζοηλεκτρικές ικανότητες και είναι βιοδιασπώμενο, καθιστώντας το την πιο «προικισμένη» ουσία που είναι γνωστή μεταξύ των ημιαγώγιμων υλικών. Επιπλέον, έχει ελάχιστη τοξικότητα και ως εκ τούτου χαρακτηρίζεται ως «γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές» υλικό από τον FDA (Barui, 2018; Muthukathija et al., 2023).

Τα ZnONPs διαθέτουν ποικίλες ενδιαφέρουσες ιδιότητες όπως οπτική διαφάνεια με ιδιότητες φιλτραρίσματος υπεριώδους ακτινοβολίας, φωτοχημική δραστηριότητα και υψηλή φωτοσταθερότητα, ηλεκτρική αγωγιμότητα, υψηλή καταλυτική δράση και αντιμικροβιακή δράση. Παράλληλα, σημαντική είναι η ευρεία διαθεσιμότητα τους, η σταθερότητα, η βιοσυμβατότητα, η χαμηλή τοξικότητα με παράλληλα χαμηλό κόστος σύνθεσης. Έτσι, δοκιμάζονται σε αρκετές πιθανές εφαρμογές στον τομέα της ιατρικής και της βιολογίας (Mayolo-Deloisa et al., 2020; Vijayakumar et al., 2016).

3.2. Οργανικά νανοσωματίδια χιτοζάνης

Η χιτίνη, από την οποία προέρχεται η χιτοζάνη, αποτελεί το δεύτερο σε αφθονία φυσικό πολυμερές στη γη. Προέρχεται τόσο από φυτικές όσο και από ανόργανες πηγές, αλλά

συνήθως εξάγεται από κελύφη οστρακοειδών και καρκινοειδών και από τα κυτταρικά τοιχώματα μυκήτων. Πρόκειται για έναν φυσικό πολυσακχαρίτη που αποτελείται από μονάδες β -(1 \rightarrow 4)-N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης με υψηλό μοριακό βάρος (Mw 1000 kDa). Το μοναδικό χαρακτηριστικό της χιτίνης είναι ότι σε αντίθεση με άλλους πολυσακχαρίτες, διαθέτει άζωτο σε ποσοστό περίπου 6 %, υπό μορφή αμινοομάδων, εκτός από άνθρακα, οζυγόνο και υδρογόνο. Έχει χαρακτηριστικές ιδιότητες όπως βλεννοσυγκολλητική ιδιότητα και είναι εγκεκριμένη από τον FDA των ΗΠΑ για τη μηχανική ιστών και τη χορήγηση φαρμάκων. Ωστόσο, οι εφαρμογές της περιορίζονται σημαντικά λόγω της υδροφοβικότητάς της. Για το λόγο αυτό, η προσοχή της επιστημονικής κοινότητας στρέφεται στη χιτοζάνη, το πρωτογενές παράγωγο που λαμβάνεται από την αποακετυλίωση της χιτίνης. Η χιτίνη από φυσικές πηγές βρίσκεται συνδεδεμένη με πρωτεΐνες και ανόργανα άλατα, τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν πριν από την παρασκευή χιτοζάνης, μέσω διαδικασιών οξίνισης και αλκαλοποίησης. Η καθαρισμένη χιτίνη στη συνέχεια αποακετυλιώνεται με N-δεακετυλίωση σε χιτοζάνη (Εικόνα 3.1) (Fakhri et al., 2020; Mohammed et al., 2017).



Εικόνα 3.1. Δεακετυλίωση της χιτίνης σε χιτοζάνη (Mohammed et al., 2017).

Η χιτοζάνη είναι ένα εγκεκριμένο από τον FDA συμπολυμερές που αποτελείται από μονάδες β-(1 \rightarrow 4)-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-b-D-γλυκάνη (n-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη) και μονάδες β-(1 \rightarrow 4)-2-αμινο-2-δεοξυ-b-D-γλυκάνη (D-γλυκοζαμίνη) με μικρότερο μοριακό βάρος και κρυσταλλικότητα από τη χιτίνη (Mw 100 kDa). Η χιτοζάνη και τα παράγωγά της, όπως οι ολιγοσακχαρίτες χιτοζάνης (Mwb 10 kDa), έχουν χρήσιμες ιδιότητες όπως βιοδραστικότητα, βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα, μη τοξικότητα, βλεννοσυγκολλητικότητα και αντιμικροβιακή δράση έναντι τόσο θετικών όσο και αρνητικών
κατά Gram βακτηρίων. Τα περισσότερα από τα φυσικά, χημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά της χιτοζάνης, όπως η έκταση του μοριακού βάρους, το ιξώδες, η διαλυτότητα και η βιοδιασπασιμότητα της, εξαρτώνται από το βαθμό αποακετυλίωσης, επομένως η διαδικασία αποακετυλίωσης πρέπει να είναι ανάλογη με τις επιθυμητές ιδιότητες της χιτοζάνης για την εκάστοτε εφαρμογή. Η χιτοζάνη μελετάται σε πλήθος ιατρικών εφαρμογών και μπορεί επίσης να αποτελέσει μια πιθανή ουσία για τη σύνθεση διαφόρων οδοντιατρικών υλικών, συμπεριλαμβανομένων των ικριωμάτων και των φορέων φαρμάκων (Fakhri et al., 2020; Özdamar et al., 2023).

Η χιτοζάνη έχει αναδειχθεί ως ένα από τα πιο υποσχόμενα πολυμερή για το σχηματισμό NPs. Τα ChNPs μοιράζονται τα χαρακτηριστικά τόσο της χιτοζάνης όπως η βιοδιασπασιμότητα, η βιοσυμβατότητα, η χαμηλή ή καθόλου τοξικότητα για τα ζώα και τον άνθρωπο, καθώς και η αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή της δράση, όσο και τα χαρακτηριστικά των NPs γενικότερα, όπως το μικρό μέγεθος, τη μεγάλη επιφάνεια και τα κβαντικά φαινόμενα λόγω μεγέθους νανοκλίμακας. Έτσι, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον ως φορέας για τη μεταφορά δραστικών συστατικών σε διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Murugesan & Ki Deok, 2020; Muzzalupo et al., 2020).

3.2.1. Σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης

Τα ChNPs μπορούν να παρασκευαστούν με διάφορες μεθόδους, μεταξύ των οποίων είναι η ιονική πηκτωμάτωση, η ξήρανση με ψεκασμό και η γαλακτωματοποίηση ή συνδυασμός αυτών. Παράλληλη με την σύνθεση μπορεί να επιτευχθεί και η ενθυλάκωση φυσικών προϊόντων σε αυτά. Η πιο συχνή μέθοδος είναι η ιονική πηκτωμάτωση και βασίζεται στην διακαι ενδο- μοριακή διασύνδεση της πολυκατιονικής χιτοζάνης με έναν ανιονικό σταυροδεσμοποιητή. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος είναι το τριπολυφωσφορικό νάτριο (TPP), το οποίο μπορεί να προσδεθεί στις ελεύθερες αμινομάδες της χιτοζάνης. Στη μέθοδο αυτή, η χιτοζάνη διαλύεται σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος και το υδατικό διάλυμα του TPP προστίθεται στη συνέχεια σταγδήν στο διάλυμα χιτοζάνης. Τα NPs σχηματίζονται αμέσως υπό μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Επίσης, στη διαδικασία μπορεί να περικλυστεί στα νανοσωματίδια κάποιο φυσικό προϊόν που θα αποτελεί την βιοδραστική ουσία (**Εικόνα 3.2**). Αλλάζοντας την αναλογία της χιτοζάνης προς το TPP, το μέγεθος και το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων μπορούν να τροποποιηθούν. Σημαντικό πλεονέκτημα είναι η απουσία χημικών στη διαδικασία της διασύνδεσης, γεγονός που μειώνει τις τοξικές παρενέργειες των NPs (Detsi et al., 2020; Murugesan& Ki Deok, 2020).



Εικόνα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση του σχηματισμού νανοσωματιδίων χιτοζάνης με ταυτόχρονο εγκλεισμό βιοδραστικής ουσίας με ιονική πηκτωμάτωση (Detsi et al., 2020).

3.2.2. Νανοσωματίδια χιτοζάνης για την ενθυλάκωση φυτικών εκχυλισμάτων

Τα φυτικά εκχυλίσματα λαμβάνονται συνήθως από διάφορα μέρη των φυτών, όπως φύλλα, φλοιούς, σπόρους, άνθη, ρίζες, χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές εκχύλισης και διαλύτες. Ανάλογα με την τεχνική εκχύλισης, μπορεί να ευνοείται η εκχύλιση μιας συγκεκριμένης ομάδας δευτερογενών μεταβολιτών που να δρουν σε έναν αριθμό υποδοχέων στον ανθρώπινο οργανισμό για να εξυπηρετήσουν την εφαρμογή που μας ενδιαφέρει. Όμως τα εκχυλίσματα αυτά αποτελούν «πλούσια κλάσματα» και εκτός από τα επιθυμητά φυτοχημικά συστατικά, εξάγονται μαζί και άλλες ενώσεις, ενισχύοντας συνήθως τη λειτουργικότητα και μεγιστοποιώντας τα οφέλη του προϊόντος. Τα εκχυλίσματα δεδομένου ότι μπορούν να αποτελούνται τόσο από γνωστά όσο και από άγνωστα συστατικά απαιτούν αυστηρό ποιοτικό έλεγγο σε πολλές παραμέτρους όσον αφορά την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα τους, γεγονός που παραμένει ένα βασικό μειονέκτημα. Παρά τις τεράστιες δυνατότητές τους, η χρήση των φυσικών προϊόντων για τη θεραπεία ασθενειών περιορίζεται λόγω των μη βέλτιστων φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων, χαμηλής σταθερότητας, υδατοδιαλυτότητας, βιοδιαθεσιμότητας και χρόνου ημιζωής. Οι περιορισμοί αυτοί μπορούν να εξαλειφθούν κατά την ενθυλάκωση των εκχυλισμάτων των φυσικών προϊόντων σε μήτρες νανοσωματιδίων (Detsi et al., 2020; Özdamar et al., 2023).

Σήμερα υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που περιγράφουν την ενθυλάκωση φυτικών εκχυλισμάτων σε ChNPs, κυρίως με την μεθόδο ιονικής πηκτωμάτωσης με χρήση TPP (Detsi et al., 2020). Σε μελέτη οι επιστήμονες ενθυλάκωσαν με επιτυχία εκχύλισμα καρπών κερασιού *Crognola capannile*, σε δύο τύπους παραγώγων χιτοζάνης με υψηλό ποσοστό φόρτωσης~80 %, μέγεθος νανοσωματιδίων γύρω στα 340 nm και θετικό δυναμικό Z γύρω στα 15 mV. Τα αποτελέσματα έδειξαν για τον τύπο των ChNPs που περιέχουν προστατευμένες ομάδες θειόλης, υψηλή προστασία των ενδοθηλιακών κυττάρων από το οξειδωτικό στρες, το οποίο σχετίζεται με την αγγειακή δυσλειτουργία που συνεπάγεται σε μια σειρά από καρδιαγγειακές παθήσεις, μόνο από τον τύπο των ChNPs που περιέχουν προστατευμένες ομάδες θειόλης (Beconcini et al., 2018). Σε άλλη μελέτη έγινε ενθυλάκωση εκχυλίσματος σπόρων του *Physalis alkekengi* σε νανομάζες χιτοζάνης και παρατηρήθηκε βελτιωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος και ενισχυμένη σταθερότητα των βιοδραστικών συστατικών του (Mahmoudi et al., 2019). Επίσης, τα ChNPs μελετώνται σε εφαρμογές στον καρκίνο. Σε μελέτη πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση του εκχυλίσματος των φύλλων της *Annona squamosa*, σε ChNPs (nano-ASLE) και παρατηρήθηκε κυτταροτοξική δράση και πρόκληση απόπτωσης σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου WiDr (Fadholly et al., 2019). Εκτός αυτού, η αντιμυκητιασική δράση των ChNPs στα οποία έχει ακινητοποιηθεί εκχύλισμα φύλλων ελιάς (OLE) έχει καταδειχθεί σε διάφορες μελέτες (Özdamar et al., 2023).

3.2.3. Απελευθέρωση βιοδραστικής ουσίας από νανοσωματίδια χιτοζάνης

Εφόσον υπάρξει εγκλεισμός βιοδραστικής ουσίας στα ChNPs υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που διέπουν την απελευθέρωση της ουσίας από αυτά όπως η διάχυση της προσροφημένης ουσίας, η διόγκωση και διάχυση μέσω της πολυμερικής μήτρας, η διάβρωση ή αποδόμηση του πολυμερούς και ο συνδυασμός τους (Εικόνα 3.3). Συνήθως, η αρχική απελευθέρωση της ουσίας από τα ChNPs οφείλεται είτε στη διόγκωση του πολυμερούς, δημιουργώντας πόρους, είτε στη διάχυση της ουσίας από την επιφάνεια του πολυμερούς. Σημαντικό είναι ότι μπορεί να γίνει απελευθέρωση εξαρτώμενη από το pH λόγω της διαλυτότητας της χιτοζάνης. Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί ρυθμιζόμενη απελευθέρωση φαρμάκου, επηρεάζοντας το φαρμακοκινητικό προφίλ του φορτωμένου φαρμάκου στα ChNPs (Herdiana et al., 2022; Mohammed et al., 2017).



Εικόνα 3.3. Απεικόνιση των πιθανών μηχανισμών απελευθέρωσης βιοδραστικής ουσίαςφαρμάκου από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης (Mohammed et al., 2017).

4. Βιολογικές δράσεις νανοσωματιδίων

Τα βιολογικά NPs έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον και μελετώνται σε ποικίλες εφαρμογές καθώς εμφανίζουν τόσο αντιοξειδωτική όσο και αντιμικροβιακή δράση έναντι σε Gram θετικά ή αρνητικά βακτήρια, αλλά και σε βακτήρια που μπορεί να εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.

4.1 Αντιοξειδωτική δράση νανοσωματιδίων

Τα δισεκατομμύρια κύτταρα στο σώμα μας απειλούνται διαρκώς από ρίζες που μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ασθενειών. Οι ασθένειες δεν αναπτύσσονται από τη μια μέρα στην άλλη, αναπτύσσονται αργά με μία βασική αιτία το «οξειδωτικό στρες» που αφορά τις ελεύθερες ρίζες. Το οξειδωτικό στρες διαταράσσει τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και είναι υπεύθυνο για πολλές κυτταρικές βλάβες, που οδηγούν σε πολυάριθμες εκφυλιστικές ασθένειες, όπως νευροεκφυλιστικές διαταραχές (νόσος του Alzheimer, νόσος του Parkinson), καρκίνους, καρδιαγγειακές παθήσεις, πάθηση του αμφιβληστροειδούς και δερματολογικές παθήσεις. Το σώμα μας φυσιολογικά αντιδρά σε κάθε δεδομένο στρες για να εξασφαλίσει την κυτταρική ομοιόσταση με τη βοήθεια αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ωστόσο, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που υπάρχουν μερικές φορές δεν επαρκούν για την καταπολέμηση των ελεύθερων ριζών. Έτσι, είναι ζωτικής σημασίας είτε να καταναλώνουμε τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά, είτε εναλλακτικά να βασιζόμαστε σε φάρμακα για την πρόληψη και τη θεραπεία εκφυλιστικών διαταραχών (Sadeer et al., 2020).

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται «κάθε ουσία που όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με αυτήν του οξειδώσιμου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωσή του». Γενικά τα αντιοξειδωτικά είναι είτε οργανικές είτε ανόργανες ενώσεις και κατηγοριοποιούνται σε πρωτογενή και δευτερογενή με βάση τον μηχανισμό δράσης τους. Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες με τη μεταφορά ενός ατόμου Η (μεταφορά ατόμου υδρογόνου, HAT) ή με μηγανισμό μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (SET) ή με συνδυασμό HAT-SET (Εικόνα 4.1). Είναι πολύ αποτελεσματικά και συνήθως απαιτούνται σε μικρή ποσότητα για να εξουδετερώσουν μεγάλο αριθμό ελευθέρων ριζών (Εικόνα 4.2a). Οι υψηλές καταλυτικές ιδιότητες αυτών των αντιοξειδωτικών είναι ένας βασικός λόγος για την ποικιλομορφία τους στη φύση. Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά έχουν χαρακτηριστεί από το μηγανισμό εξουδετέρωσης των προ-οξειδωτικών καταλυτών. Σε αυτά περιλαμβάνονται γηλικοί παράγοντες των προ-οξειδωτικών μεταλλικών ιόντων (π.χ. Fe και Cu), όπως το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και το κιτρικό οξύ (CA). Αυτά τα αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν συνήθως μια ρίζα και εξαντλούνται εύκολα (Εικόνα 4.2β). Πιο πρόσφατα, μια τρίτη κατηγορία έχει προστεθεί που ονομάζονται τριτογενή αντιοξειδωτικά και μπορούν να επιδιορθώνουν κατεστραμμένα βιομόρια, όπως DNA ή πρωτεΐνες (Martins et al., 2016; Zeb, 2020).



Εικόνα 4.1. Μηχανισμοί αντίδρασης του αντιοζειδωτικού με τις ελεύθερες ρίζες (Zahra, 2021).



Εικόνα 4.2. Αντιπροσωπευτικές αντιδράσεις πρωτογενών και δευτερογενών αντιοζειδωτικών στα τρόφιμα. (α) Αντίδραση πρωτογενούς αντιοζειδωτικού με μεγάλο αριθμό ελεύθερων ριζών και (β) αντίδραση δευτερογενούς αντιοζειδωτικού με μία ελεύθερη ρίζα (Zeb, 2020).

Όπως έχει αναφερθεί τα εκχυλίσματα ελιάς και οινολάσπης που χρησιμοποιούνται για τη βιολογική σύνθεση νανοσωματιδίων περιέχουν μεγάλη ποικιλία φαινολικών παραγώγων σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, τα οποία δρουν ως διαμορφωτικοί παράγοντες. Οι φαινολικές ενώσεις είναι φυσικά αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στα φυτικά εκχυλίσματα. Βιοσυντίθενται συνήθως από τη φαινυλαλανίνη ή τη τυροσίνη μέσω της οδού του σικιμικού οξέος. Το υδροξύλιο στον βενζολικό δακτύλιο είναι υπεύθυνο για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους, ενώ η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από τον χημικό τύπο και τον τρόπο κατανομής των υδροξυλομάδων στο μόριο τους. Ο μηχανισμός κάθε αντιοξειδωτικού εξαρτάται επίσης από τη δομή, τη διαλυτότητα και τις συνθήκες του μέσου αντίδρασης (pH, θερμοκρασία) (Martins et al., 2016).

4.2. Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί με μέγεθος από 0.5 έως 5 μm που χαρακτηρίζονται από μεγάλες μορφολογικές και φυσιολογικές διαφορές. Είναι μονοκύτταροι οργανισμοί που δεν διαθέτουν οργανίδια. Μεταφέρουν τη γενετική πληροφορία σε ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και ορισμένα είδη περιέχουν επίσης μικρά κυκλικά πλασμίδια DNA. Στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων περιέχονται ριβοσώματα και υπάρχει τόσο κυτταρική μεμβράνη όσο και ένα πολύπλοκο κυτταρικό τοίχωμα, σε όλα τα είδη εκτός από το Μυκόπλασμα. Ορισμένα βακτήρια διαθέτουν ειδικούς σχηματισμούς για τη μετακίνηση τους όπως κάψουλες, μαστίγια ή πτερύγια. Τα βακτήρια αναπαράγονται με σχάση και υπό τις κατάλληλες συνθήκες, μπορούν να διαιρούνται και να πολλαπλασιάζονται γρήγορα. Σε αντίζοες συνθήκες έχουν την ικανότητα να μετατρέπονται σε ανθεκτικές μορφές τα ενδοσπόρια (Madigan, et al., 2005).

Τα βακτήρια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες σε θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Η διάκριση αυτή βασίστηκε αρχικά στην τεχνική της χρώσης κατά Gram, η οποία διακρίνει τα κύτταρα βάσει των διαφορών στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος (Εικόνα 4.3). Το τοίχωμα του αρνητικού κατά Gram βακτηρίου είναι πιο σύνθετο, ενώ το τοίχωμα του θετικού κατά Gram βακτηρίου είναι παχύτερο και συγκροτείται από έναν μόνο τύπο μορίου, την πεπτιδογλυκάνη. Τα θετικά κατά Gram στελέχη συγκρατούν τη χρώση Crystal Violet λόγω της παρουσίας του παχέος στρώματος πεπτιδογλυκάνης στα κυτταρικά τους τοιχώματα, στα οποία είναι ενσωματωμένα αρνητικά φορτισμένα γλυκοπολυμερή που ονομάζονται τειχοϊκά οξέα. Η αρκετά πορώδης δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος επιτρέπει τη διέλευση εξωγενών μορίων στα βακτηριακά κύτταρα. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, έχουν πιο πολύπλοκες δομές κυτταρικού τοιχώματος. Λόγω της απουσίας μορίων τειχοϊκών οξέων, το στρώμα πεπτιδογλυκάνης τους είναι πιο λεπτό, όμως συνδέεται με μια εξωτερική μεμβράνη επικαλυμμένη με λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Οι LPS είναι αμφίφιλοι, αποτελούμενοι από μια υδρόφοβη λιπιδική περιοχή (λιπίδιο Α) που συνδέεται ομοιοπολικά με ένα πολυσακχαρίτη και μειώνουν σημαντικά τη βακτηριακή διαπερατότητα σε αντιβιοτικά (Munteanu & Uivarosi, 2021, Madigan, et al., 2005).



Εικόνα 4.3. Σύγκριση μεταξύ των κυτταρικών τοιχωμάτων αρνητικών κατά Gram και θετικών κατά Gram βακτηρίων (Munteanu & Uivarosi, 2021).

4.2.1. Καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων

Η βακτηριακή ανάπτυξη αναπαρίσταται με μια καμπύλη ανάπτυξης, η οποία απεικονίζει την ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού σε ένα κλειστό σύστημα. Αποτελεί διάγραμμα οπτικής πυκνότητας συναρτήσει του χρόνου επώασης. Η καμπύλη ανάπτυξης αποτελείται από πέντε φάσεις: (1) φάση επώασης ή προσαρμογής, (2) εκθετική φάση, (3) φάση στασιμότητας, (4) φάση επιβράδυνσης και (5) φάση θανάτου (Εικόνα 4.4). Η πρώτη φάση επώασης διαρκεί από τον εμβολιασμό των βακτηριακών στελεχών μέχρι την ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, τα βακτήρια αυξάνουν το μέγεθος των κυττάρων τους, αλλά δεν διαιρούνται, καθώς αποτελεί περίοδο προσαρμογής κατά την οποία τα βακτήρια προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον. Πραγματοποιούνται διαδικασίες όπως η βιοσύνθεση διαφόρων βασικών συστατικών, η μεταγραφή RNA, η συσσώρευση διαφόρων μετάλλων (σίδηρος, ασβέστιο, μαγγάνιο) και ο σχηματισμός συστάδων Fe-S, που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του πληθυσμού. Η επόμενη φάση αντιπροσωπεύει την εκθετική φάση κατά την οποία ο κυτταρικός πληθυσμός διπλασιάζεται σε τακτά χρονικά διαστήματα με διαφορετικούς ρυθμούς ανάπτυξης (μ). Ο χρόνος κατά τον οποίο ο βακτηριακός πληθυσμός διπλασιάζεται είναι γνωστός ως χρόνος διπλασιασμού ή γενεάς (td). Οι χρόνοι γενεάς εξαρτώνται από τις συνθήκες επώασης και τον ίδιο τον βακτηριακό οργανισμό και μπορεί να διαρκέσουν από λίγα λεπτά έως μερικές ημέρες. Η εκθετική φάση ακολουθείται από τη φάση επιβράδυνσης μία σύντομη σε διάρκεια φάση, κατά την οποία η ανάπτυξη επιβραδύνεται λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών, είτε λόγω συσσώρευσης τοξικών για τον μικροοργανισμό προϊόντων. Ακολουθεί η φάση στασιμότητας, όπου ο αριθμός των νέων κυττάρων σε κάθε χρονικό διάστημα ισούται με τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν στο ίδιο χρονικό διάστημα. Όταν εξαντληθούν τα θρεπτικά συστατικά του μέσου ανάπτυξης,

ο βακτηριακός πληθυσμός αρχίζει να μειώνεται. Αυτή η τελική φάση ονομάζεται φάση θανάτου (Σταμάτης, 2018, Štumpf et al., 2020).



Εικόνα 4.4. Τυπική καμπύλη μικροβιακής ανάπτυζης σε κλειστό σύστημα, όπου το N αντιπροσωπεύει τον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων σε συνάρτηση με τον χρόνο (Štumpf et al., 2020).

4.2.2. Αντιμικροβιακός μηχανισμός νανοσωματιδίων αργύρου και ψευδαργύρου

Τα AgNPs έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά έναντι περισσότερων από 650 μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων (θετικών και αρνητικών κατά Gram), μυκήτων και ιών. Η αντιμικροβιακή δράση των AgNPs συνδέεται με τέσσερις μηχανισμούς (Εικόνα 4.5):



Εικόνα 4.5. Οι τέσσερις σημαντικότερες οδοί αντιμικροβιακής δράσης των AgNPs (Dakal et al., 2016).

- Προσκόλληση των AgNPs στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης: Το θετικό επιφανειακό φορτίο των AgNPs προσδίδει ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των AgNPs και της αρνητικά φορτισμένης κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών, διευκολύνοντας έτσι την προσκόλληση των AgNPs στις κυτταρικές μεμβράνες. Μεταβάλλεται η δομή της μεμβράνης, η διαπερατότητα και η δραστηριότητα μεταφοράς ουσιών. Οι μορφολογικές αλλαγές γίνονται εμφανείς κατά την αλληλεπίδραση αυτή και μπορούν να χαρακτηριστούν από συρρίκνωση του κυτταρικό συρλάσματος και αποκόλληση της μεμβράνης που τελικά οδηγεί σε ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος.
- Διείσδυση των AgNPs στο εσωτερικό του κυττάρου και καταστροφή των ενδοκυτταρικών δομών (μιτοχόνδρια, ριβοσώματα) και των βιομορίων (πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA): Οι πορίνες, κανάλια γεμάτα νερό που υπάρχουν στην εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, εμπλέκονται στην πρόσληψη των AgNPs στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων. Όταν τα AgNPs διεισδύσουν στο εσωτερικό του μικροβιακού κυττάρου, μπορούν να αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν επιβλαβή αποτελέσματα στα κύτταρα. Η αλληλεπίδραση των AgNPs με τα ριβοσώματα προκαλεί αναστολή της μετάφρασης και της πρωτεϊνοσύνθεσης, ενώ παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι τα ιόντα Ag⁽⁺⁾ μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις λειτουργικές ομάδες πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους.

- Επαγόμενη από τα AgNPs κυτταρική τοξικότητα και οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τη δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και ελεύθερων ριζών: Η αυξημένη συγκέντρωση ιόντων Ag⁽⁺⁾ αναμένεται να προκαλέσει αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού στρες. Η ισχυρή αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή και αντιική δράση των AgNPs οφείλεται στην ικανότητά τους να παράγουν ROS και είδη ελεύθερων ριζών, όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H2O2), ανιόν υπεροξείδιου (O2), ρίζα υδροξυλίου (OH), υπογλωριώδες οξύ (HOCl). Η σύνδεση των ιόντων Ag⁽⁺⁾ στην κυτταρική μεμβράνη, προκαλεί σηματοδότηση που εμποδίζει τη μιτοχονδριακή αναπνευστική λειτουργία των κυττάρων. Τα ιόντα Ag⁽⁺⁾ είναι γνωστό ότι προκαλούν δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, αποσυνδέοντάς την από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και αναστέλλοντας τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Η υπερβολική ποσότητα των παραγόμενων ελεύθερων ριζών προκαλεί άμεση βλάβη στη μιτοχονδριακή μεμβράνη προκαλώντας νέκρωση και τελικά κυτταρικό θάνατο. Άλλα αποτελέσματα της αύξησης των επιπέδων ROS στα κύτταρα περιλαμβάνουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA.
- Τροποποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος: Ο κύκλος του καταρράκτη φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης είναι μηχανισμός μετάδοσης σημάτων στους μικροοργανισμούς, απαραίτητος για τη μικροβιακή ανάπτυξη και την κυτταρική δραστηριότητα. Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες που προκύπτουν έχουν ουσιαστικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA, στον ανασυνδυασμό, στον μεταβολισμό και στον βακτηριακό κυτταρικό κύκλο. Επομένως, η αναστολή της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών θα αναστείλει την ενζυμική τους δραστηριότητα, η οποία με τη σειρά της θα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης.

Εκτός από τους τέσσερις παραπάνω μηχανισμούς, τα AgNPs διαμορφώνουν επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα των ανθρώπινων κυττάρων ενορχηστρώνοντας τη φλεγμονώδη απόκριση, η οποία βοηθά περαιτέρω στην αναστολή των μικροοργανισμών (Dakal et al., 2016; Yazdanian et al., 2022).

Παρόμοιος με τον παραπάνω μηχανισμό είναι και ο αντιμικροβιακός μηχανισμός των ZnONPs, με τρείς κύριους διακριτούς μηχανισμούς να έχουν προταθεί (Εικόνα 4.6):



Εικόνα 4.6. Οι τρείς σημαντικότερες οδοί αντιμικροβιακής δράσης των ZnONPs (Gomaa, 2022).

- Άμεση επαφή των ZnONPs με τα κυτταρικά τοιχώματα, με αποτέλεσμα την καταστροφή της ακεραιότητας των βακτηριακών κυττάρων: Το θετικό δυναμικό των ZnONPs προάγει την προσκόλληση τους στην αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη του μικροβιακού κυττάρου και μπορεί να οδηγήσει στη διείσδυση των ZnONPs στα κύτταρα. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να βλάψει την ακεραιότητα του μικροβιακού κυττάρου, με αποτέλεσμα τη διαρροή ενδοκυτταρικού περιεχομένου που καταλήγει σε κυτταρικό θάνατο.
- Απελευθέρωση ιόντων Zn²⁺: Η συσσώρευση των ZnONPs στην εξωτερική μεμβράνη ή εσωτερικά στο κυτταρόπλασμα των μικροβιακών κυττάρων προκαλεί απελευθέρωση Zn²⁺. Τα απελευθερωμένα ιόντα Zn⁺² διεισδύουν στην κυτταρική μεμβράνη και διασπούν την ακεραιότητα της διπλοστιβάδας φωσφολιπιδίων. Η διατάραξη αυτή της κυτταρικής μεμβράνης συνοδεύεται από τη διαρροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου, όπως ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, γενετικό υλικό, ATP και λιποπολυσακχαριτών. Επιπλέον, τα ελεύθερα ιόντα Zn²⁺ δεσμεύονται με βιομόρια όπως πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, και στη συνέχεια προκαλούν βλάβες, τα αναστέλλουν και προκαλούν διαταραχές στα βιολογικά μονοπάτια.
- Οξειδωτικό στρες: Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) που οδηγεί σε διαταραχή των μιτοχονδριακών λειτουργιών και της γονιδιακής έκφρασης και προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο (Gomaa, 2022; Sirelkhatim et al., 2015; Yazdanian et al., 2022).

4.2.3. Αντιμικροβιακός μηχανισμός νανοσωματιδίων χιτοζάνης

Ο μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης των ChNPs που προτείνεται αφορά την ηλεκτροστατική επικοινωνία μεταξύ των αμινομάδων της γλυκοζαμίνης οι οποίες είναι θετικά φορτισμένες, με αρνητικά φορτισμένα επιφανειακά συστατικά στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων (Εικόνα 4.7). Ο λιποπολυσακχαρίτης στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και το τειχοϊκό οξύ στα θετικά κατά Gram βακτήρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση της γιτοζάνης και τη μεταβολή και αποσταθεροποίηση της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης τροποποιείται η διαπερατότητα της μεμβράνης και υποκινείται ωσμωτική ανισορροπία με αποτέλεσμα την εκροή ενδοκυτταρικών ουσιών που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, μπορούν τα ChNPs να διεισδύσουν μέσω της μεμβράνης και να υπάρξει συσσώρευση τους. Στη συνέχεια, συνδέονται με το DNA και αναστέλλουν την αντιγραφή του, οδηγώντας σε βακτηριακό κυτταρικό θάνατο. Ακόμη, προτείνεται ότι είναι ικανά να επάγουν την τροποποίηση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων των βακτηρίων. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η χηλική ικανότητα των ChNPs προς τα μεταλλικά ιόντα, η οποία διεγείρει παραγωγή τοξινών και εμποδίζει τη βιωσιμότητα των βακτηρίων. Τα ChNPs παρουσιάζουν μεγαλύτερη γηλική δράση για διάφορα ιόντα μετάλλων $(Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}$ και Zn^{2+}) σε όξινες συνθήκες. Τα ιόντα μετάλλων που συνδέονται με μόρια του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθερότητά τους. Έτσι, η μεσολάβηση της χηλικοποίησης των εν λόγω μεταλλικών ιόντων διαταράσσει τις φυσιολογικές δραστηριότητες των βακτηρίων και οδηγεί σε βακτηριακό κυτταρικό θάνατο (Ma et al., 2017; Murugesan & Ki Deok, 2020).



Εικόνα 4.7. Προτεινόμενος μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης νανοσωματιδίων χιτοζάνης (Murugesan & Ki Deok, 2020).

Διάφοροι παράγοντες είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την αντιμικροβιακή δράση των ChNPs. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες:

- Μικροβιακοί παράγοντες: μικροβιακός τύπος και φάση ανάπτυξης κυττάρου
- Ενδογενείς παράγοντες της χιτοζάνης και των νανοσωματιδίων της: μοριακό βάρος, συγκέντρωση, βαθμός ακετυλίωσης, ζήτα δυναμικό, αλληλεπιδράσεις με μεταλλικά ιόντα
- Περιβαλλοντικοί παράγοντες: pH, θερμοκρασία (Ma et al., 2017; Murugesan & Ki Deok, 2020).

Όσον αφορά το την αντιμυκητιασική ιδιότητα της χιτοζάνης, αν και δεν έχει βρεθεί συγκεκριμένος μηχανισμός, αναφέρεται ότι η στόχευση μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων είναι το κλειδί του τρόπου δράσης των νανοσωματιδίων, ο οποίος μπορεί να είναι παρόμοιος με τον αντιμικροβιακό μηχανισμό (Ma et al., 2017).

5. Βιοϊατρικές εφαρμογές

5.1. Βιοϊατρικές εφαρμογές μεταλλικών νανοσωματιδίων

Οι ιδιότητες των βιολογικά συντιθέμενων NPs είναι διαφορετικές από αυτά που συντίθενται με συμβατικές μεθόδους. Τα νανοϋλικά είναι πολλά υποσχόμενα στην αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντιπαρασιτική, αντιοξειδωτική θεραπεία λόγω των βελτιωμένων και ξεγωριστών φυσικογημικών ιδιοτήτων τους, συμπεριλαμβανομένων των πολύ μικρών διαστάσεων και της τεράστιας επιφάνειας σε σύγκριση με τη μάζα τους. Με την προσθήκη πολλών λειτουργικών ομάδων στα NPs, η ποιότητα τους μπορεί να βελτιωθεί. Ως εκ τούτου, τα νανοπροϊόντα μπορεί να είναι ποικίλα και μελετώνται ευρέως για τη χρήση τους σε διάφορες εφαρμογές στη βιολογία και την ιατρική (Εικόνα 5.1). Τα πράσινα νανοϋλικά σε βιοϊατρικές εφαρμογές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ορμονών ή μορίων που σχετίζονται με ασθένειες, την ανίχνευση μικροοργανισμών και ιών που σχετίζονται με λοιμώξεις, με την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμεύσουν ως συστήματα διανομής φαρμάκων, καθώς λόγω του μεγέθους τους δεν αναγνωρίζονται από το ανθρώπινο σώμα και μπορούν να ταξιδεύουν μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες και να περνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Σε μελέτη, τα νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου που προέρχονται από το εκχύλισμα φύλλων του Butea monosperma, εμφάνισαν σταθερότητα και βιοσυμβατότητα. Συνδυάστηκαν με δοξορουβικίνη και έδειξαν σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων B16F10, MCF-7. Επίσης, σε διαφορετική μελέτη περιγράφεται ότι τα βιολογικά συντιθέμενα νανοσωματίδια ψευδαργύρου έχουν περισσότερες αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι της Salmonella typhimurium, του Bacillus subtilis και του Micrococcus luteus σε σύγκριση με τα γημικά συντιθέμενα νανοσωματίδια ψευδαργύρου. Επιπλέον, τα NPs εκτός από θεραπευτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαγνωστικά σε διάφορες εφαρμογές βιοαπεικόνισης, όπως ως φθορίζοντες βιολογικοί δείκτες, δείκτες για την ανίχνευση πρωτεϊνών, την αναζήτηση δομών δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος και για τον διαχωρισμό και καθαρισμό βιολογικών μορίων και κυττάρων. Άλλη εφαρμογή, είναι να περιλαμβάνονται ως βιοϋλικά σε ιατρικά εμφυτεύματα και ικριώματα για μοσγεύματα. Πλέον μελετώνται και στο πεδίο της οδοντιατρικής, συμπεριλαμβανομένης της πρόγνωσης, της πρόληψης, της αναγέννησης των ιστών, της επιδιόρθωσης και της φροντίδας της στοματικής υγιεινής (Ganachari et al., 2018; Shah et al., 2015; Singh et al., 2016; Yazdanian et al., 2022).



Εικόνα 5.1. Εφαρμογές πράσινων μεταλλικών νανοσωματιδίων στη βιολογία και την ιατρική (Yazdanian et al., 2022).

5.2. Βιοϊατρικές εφαρμογές νανοσωματιδίων χιτοζάνης

Η χιτοζάνη μπορεί να διεισδύσει μέσω του επιθηλίου και να προάγει την παρακυτταρική ή διακυτταρική μεταφορά φαρμάκων. Αλληλεπιδρά με τη βλέννα (αρνητικά φορτισμένη) για το σχηματισμό συμπλόκου μέσω ιοντικών δεσμών ή δεσμών υδρογόνου καθώς και μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η pKa της πρωτοταγούς αμίνης της χιτοζάνης είναι ~6,5, ανάλογα με το βαθμό N-ακετυλίωσης. Αυτή η ομάδα συμβάλλει στη διαλυτότητα της χιτοζάνης σε περιβάλλοντα με όξινο pH και η μερική εξουδετέρωση αυτής της πρωτοταγούς αμίνης μπορεί επίσης να εξηγήσει γιατί έχει αναφερθεί ότι η χιτοζάνη συσσωματώνεται σε ουδέτερο και υψηλό pH (Mohammed et al., 2017).

Πολλές έρευνες δείχνουν ότι τα ChNPs έχουν ευρύ φάσμα αποτελεσματικότητας σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Μπορούν να δράσουν ως μεταφορέας φαρμάκου στοχευμένα, βελτιώνοντας το φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ, λόγω της ενίσχυσης της διαλυτότητας, της σταθερότητας και της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της χρήσης είναι ότι μέσω της βλεννοσυγκολλητικής ικανότητας, επιτρέπουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων *in vivo*. Σε μελέτη οι Santhi et al. χρησιμοποίησαν την τεχνική παρασκευής γαλακτωματοποίησης για να συνθέσουν ChNPs φορτωμένα με φλουκοναζόλη, με μέσο μέγεθος σωματιδίων 152.85±13.7 nm και μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της αντιμυκητιασικής δράσης με χρήση ChNPs φορτωμένων με φλουκοναζόλη σε σύγκριση με εκείνη των οφθαλμικών σταγόνων φλουκοναζόλης. Η ικανότητα φόρτωσης φλουκοναζόλης στα ChNPs βρέθηκε να είναι $h \leq 50\%$ και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα ChNPs παρουσίασαν πολλά υποσχόμενη ικανότητα φόρτωσης φαρμάκου, αντιμυκητιασικής δραστικότητας και παρατεταμένης φαρμακευτικής απελευθέρωσης, για τη χορήγηση φαρμάκου φλουκοναζόλη σε οφθαλμολογικές λοιμώξεις (Jha & Mayanovic et al., 2023, Santhi et al., 2017).

Οι νανοδομές με βάση τη χιτοζάνη είναι μια κατηγορία νανοϋλικών που προβλέπεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο και στην παροχή στοχευμένων θεραπειών για τον καρκίνο με την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων που θα ελαχιστοποιήσουν τις ανεπιθύμητες ενέργειες (Jha & Mayanovic et al., 2023). Οι Sekar et al. συνέθεσαν ChNPs φορτωμένα με ασκορβικό οξύ για δοκιμές αποτελεσματικότητας στη χορήγηση φαρμάκων για θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Διαπίστωσαν από *in vitro* μελέτες ότι τα ChNPs με ασκορβικό οξύ είναι αποτελεσματικά στη στόχευση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας HeLa χωρίς καμία επίδραση στα φυσιολογικά κύτταρα ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών (στέλεχος WI-38), αποδεικνύοντας έτσι τη δυνατότητα χρήσης αυτών των φορέων ως συστημάτων χορήγησης φαρμάκων για τον καρκίνο (Sekar et al., 2018). Ακόμη, τα ChNPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικό εργαλείο. Οι Mathew et al. παρασκεύασαν ChNPs με κβαντικές τελείες ZnS και πρόσμιξη Mn ως φορείς φαρμάκων και ως παράγοντα απεικόνισης καρκινικών κυττάρων με χρήση φθορίζουσας μικροσκοπίας (Elizabeth et al., 2010).

5.3. Εφαρμογή στην οδοντιατρική

Μια πιο στοχευμένη εφαρμογή των βιολογικών NPs είναι η μελέτη τους στη στοματική υγιεινή. Η τερηδόνα και η περιοδοντίτιδα αποτελούν στοματικές ασθένειες και είναι οι πιο διαδεδομένες μη μεταδοτικές ασθένειες που πλήττουν άτομα όλων των ηλικιών, προκαλώντας πόνο, δυσφορία, απώλεια δοντιών και παραμόρφωση. Το 2017, οι στοματικές διαταραχές επηρέασαν 3,47 δισεκατομμύρια ανθρώπους στον κόσμο και αποτέλεσαν μια από τις τρεις συχνότερες ασθένειες παγκοσμίως. Η τερηδόνα εκτιμάται ότι προσβάλλει το 60-90% των παιδιών και σχεδόν το 100% των ενηλίκων παγκοσμίως. Η περιοδοντική νόσος ταξινομείται σε τέσσερα στάδια, εκ των οποίων η σοβαρή περιοδοντίτιδα κατατάχθηκε ως η έκτη πιο συχνή πάθηση της υγείας μεταξύ 1990 και 2010 και εκτιμάται ότι επηρεάζει το 10% του παγκόσμιου πληθυσμού. Η οδοντική τερηδόνα και η περιοδοντίτιδα μπορεί να εξελιχθούν σε συστηματικές λοιμώξεις, οδηγώντας σε λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα, διαβήτη και λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, όπως η πνευμονία, εάν δεν εφαρμόζεται η κατάλληλη πρόληψη και διαχείριση τους (Ahmed et al., 2022; Carrouel et al., 2020).

Η αιτιολογία τόσο της οδοντικής τερηδόνας όσο και της περιοδοντίτιδας είναι πολυμικροβιακή, δηλαδή προκύπτουν όταν οι υπερ- και υπο-ουλικές μικροβιακές κοινότητες παρουσιάζουν διαταραχή της ομοιόστασης, σχηματίζοντας ένα βιοφίλμ, τη γνωστή πλάκα στα δόντια και στους γύρω ιστούς. Η πλάκα προστατεύει τους παθογόνους μικροοργανισμούς από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται οδοντικές λοιμώξεις. Η στοματική υγιεινή μέσω της χρήσης αντιμικροβιακών και επανορθωτικών παραγόντων, εκτός από τη μηχανική απομάκρυνση της πλάκας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία και την πρόληψη των οδοντικών παθήσεων. Το πρόγραμμα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για τον κατάλογο βασικών φαρμάκων (EML) (2017-2021) συνέστησε ότι η έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στην ανάπτυξη προσιτών, ασφαλών και φιλικών προς το περιβάλλον προϊόντων στοματικής υγιεινής (Ahmed et al., 2022).

5.3.1. Νανοσωματίδια στην οδοντιατρική

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση πράσινων συνθετικών νανοϋλικών που θα συμπεριληφθούν σε προϊόντα οδοντιατρικής φροντίδας. Τα νανοσωματίδια μπορούν να δράσουν ως αντιμικροβιακός, αντιφλεγμονώδης παράγοντας ή παράγοντας επαναμεταλλικοποίησης (Εικόνα 5.2) (Ahmed et al., 2022; Carrouel et al., 2020).



Εικόνα 5.2. Δράση των νανοσωματιδίων που περιέχονται σε προϊόντα στοματικής υγιεινής (Carrouel et al., 2020).

Για να δράσουν ως αντιμικροβιακός παράγοντας, τα NPs πρέπει να έρθουν σε άμεση επαφή με τα βακτήρια μέσω δυνάμεων Van der Waals, ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και υποδοχέων. Στη συνέχεια, τα NPs περνούν μέσα από τη βακτηριακή μεμβράνη και οργανώνονται κατά μήκος της μεταβολικής οδού που τροποποιεί τη

δομή και τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των NPs και των βακτηριακών συστατικών (ένζυμα, ριβοσώματα, λυσοσώματα και DNA) θα προκαλέσει στη συνέχεια οξειδωτικό στρες και ετερογενείς μεταβολές, τροποποιώντας τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, διαταράσσοντας την ισορροπία των ηλεκτρολυτών, αναστέλλοντας ορισμένα ένζυμα, απενεργοποιώντας πρωτεΐνες και τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων (Carrouel et al., 2020).

Αρκετά NPs μετάλλων (άργυρος, χρυσός) και οξειδίων μετάλλων (οξείδιο του ψευδαργύρου, διοξείδιο του τιτανίου) έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Για να δράσουν ως αντιφλεγμονώδη μόρια, τα NPs πρέπει να εισέλθουν στο κύτταρο μέσω ιοντικών καναλιών ή πόρων. Ανάλογα με το μέγεθος των NPs, παρατηρούνται διαφορετικές κυτταρικές επιδράσεις, όταν τα μικρά NPs βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, τα περισσότερα κυτταρικά κυστίδια μπορούν να τα ενδοκυτταρώσουν. Η φαγοκυττάρωση και η μακρο-πινοκυττάρωση επιτυγχάνονται από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Επιπλέον, εάν τα NPs είναι επικαλυμμένα με πρωτεΐνη πλάσματος, τότε η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας των μακροφάγων ή των ουδετερόφιλων. Η πρωτεΐνη ενεργεί ως συνδέτης για τους υποδοχείς μακροφάγων και στη συνέχεια ενεργοποιούνται τα αντιφλεγμονώδη μακροφάγα M2, που είναι απαραίτητα για την αφομοίωση των NPs. Διάφορα NPs μετάλλων ή οξειδίων μετάλλων, όπως NPs χρυσού, αργύρου, οξειδίου του ψευδαργύρου, διοξειδίου του χαλκού και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων ή/και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Carrouel et al., 2020).

Για τον έλεγχο του κινδύνου της τερηδόνας και της οδοντικής ευαισθησίας του απομεταλλωμένου σμάλτου, η δράση παραγόντων επαναμεταλλοποίησης απαιτείται για την αποκατάσταση της δομής και τη διασφάλιση της διατήρησης των μηχανικών χαρακτηριστικών της αδαμαντίνης. Η τερηδόνα προάγει την απομεταλλοποίηση των σκληρών ιστών του δοντιού (αδαμαντίνη και οδοντίνη) λόγω της προσβολής από οξέα που παράγονται από βακτήρια της οδοντικής πλάκας. Ένα άλλο σημαντικό οδοντιατρικό πρόβλημα είναι η οδοντική διάβρωση, η οποία αντιστοιχεί σε μια προοδευτική και μη αναστρέψιμη απώλεια των σκληρών οδοντικών ιστών λόγω μιας χημικής διαδικασίας, δηλαδή διάλυσης από οξέα που δεν εμπλέκουν βακτήρια. Αυτό μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως απώλεια οδοντικών ιστών, αισθητικές ατέλειες, μειωμένες κάθετες διαστάσεις και λειτουργικά προβλήματα που μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα ζωής. Επιπλέον, η έκθεση της οδοντίνης, του εσωτερικού ιστού του δοντιού, μπορεί να οδηγήσει σε οδοντική υπερευαισθησία. Τα κυριότερα NPs που είναι γνωστά και χρησιμοποιούνται για την επαναμεταλλοποίηση είναι τα NPs υδροξυαπατίτη (HA) (Carrouel et al., 2020).

5.3.1.1. Εφαρμογές νανοσωματιδίων αργύρου και ψευδαργύρου στην οδοντιατρική

Λόγω της αντιμικροβιακής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους, τα AgNPs μελετώνται για την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα στοματικής υγιεινής, όπως οδοντόκρεμες, οδοντόβουρτσες και στοματικά διαλύματα, με στόχο την καταπολέμηση των περιοδοντικών παθογόνων μικροοργανισμών. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Ahmed et al. όπου αξιολόγησαν, in vitro, τη δράση οδοντόκρεμας με και χωρίς AgNPs κατά του Streptococcus mutans, δηλαδή στα κυριότερα παθογόνα που εμπλέκονται στις τερηδονικές βλάβες και απέδειξαν την αντιμικροβιακή δράση της. Σε διαφορετική μελέτη σε στοματικό διάλυμα με AgNPs παρατηρήθηκε εξαιρετικά σημαντική μείωση του δείκτη πλάκας και του δείκτη αιμορραγίας ούλων μετά από 2 και 4 εβδομάδες. Μια άλλη χρήση του στοματικού διαλύματος που περιέχει τα AgNPs ήταν στην καταπολέμηση του αποικισμού από ορισμένα βακτήρια ανθεκτικά στα φάρμακα και από μύκητες που προκαλούν λοιμώζεις σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, όπως η στοματική καντιντίαση. Επιπλέον, σε μελέτη των Nascimento et al. συνέκριναν τη χρήση οδοντόβουρτσας με τρίχες επικαλυμμένες με CHX και τρίχες επικαλυμμένες με AgNPs ή συμβατικές τρίχες για 30 ημέρες. Οι τρίχες των οδοντοβουρτσών με τα AgNPs μείωσαν τον ατομικό και συνολικό αριθμό των γονιδίων στο υπερ- και υποουλικό βιοφίλμ και ήταν σε θέση να μειώσουν ή να διατηρήσουν χαμηλότερα επίπεδα βακτηριακών αριθμών των περιοδοντικών παθογόνων βακτηρίων Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Tanerella forsythia, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Fusobacterium nucleatum kai Parvimonas micra (Carrouel et al., 2020; Prabhu & Poulose, 2012).

Τα ZnONPs αποτελούν ένα βιολογικά ασφαλές υλικό που δεν παρουσιάζει τοξικότητα στα ανθρώπινα κύτταρα, αλλά είναι τοξικό για τα βακτήρια. Έτσι, τα ZnONPs χρησιμοποιούνται συνήθως ως αντιμικροβιακοί παράγοντες σε προϊόντα στοματικής υγιεινής, όπως οδοντόκρεμα και στοματικό διάλυμα. Επιπλέον, μια άλλη ενδιαφέρουσα ιδιότητα, για την καταπολέμηση της ουλίτιδας ή της τερηδόνας, είναι η αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα τους. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη ενσωμάτωσης ZnONPs σε οδοντόκρεμα που επιτρέπει την καταπολέμηση της ουλίτιδας λόγω των βακτηριοκτόνων επιδράσεων. Η αύξηση της ποσότητας του Zn στην οδοντόκρεμα θα μπορούσε να οδηγήσει σε καλύτερη αντιβακτηριακή και αντιγηραντική δράση. Ακόμη, έχει αποδειχθεί η θετική επίδραση στην οδοντίνη μειώνοντας την απομεταλλικοποίηση. Σε διαφορετική μελέτη στοματικό διάλυμα που περιέχει άλατα ψευδαργύρου (γλυκονικός ψευδάργυρος, χλωριούχος ψευδάργυρος) ή ZnONPs παρουσιάζεται υψηλή αντιβακτηριακή δράση έναντι των *S. mutans* και του *Streptococcus sanguis* που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην τερηδόνα και στις περιοδοντικές παθήσεις. Ακόμη, σε μελέτη έχει δοκιμαστεί ο συνδυασμός AgNPs με ZnONPs και κατέδειξαν συνεργιστική αντιμικροβιακή δράση, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις AgNPs/ZnONPs (Carrouel et al., 2020; Yazdanian et al., 2022).

5.3.1.2. Εφαρμογές νανοσωματιδίων χιτοζάνης στην οδοντιατρική

Τα ευνοϊκά χαρακτηριστικά της χιτοζάνης καθιστούν δυνατή την ενσωμάτωσή της στην οστική, περιοδοντική και οδοντική αναγέννηση. Τα ChNPs αποτελούν αποικοδομήσιμους πιθανούς φαρμακευτικούς φορείς στην οδοντιατρική. Στοχεύουν στη διαρκή χορήγηση αντιβιοτικών, αντιφλεγμονωδών και οστεογενετικών φαρμάκων σε διάφορες μορφές σε περιοδοντικούς θύλακες ή ριζικούς σωλήνες. Επιπλέον, αναφέρεται ο ρόλος της χιτοζάνης στην ενίσχυση της αποτελεσματικότητας διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων, με παράλληλη μείωση παρενεργειών (Fakhri et al., 2020; Ma et al., 2017). Σε μελέτη φορτωμένα με τετρακυκλίνη ChNPs κατάφεραν να μεταφέρονται από ίνες πολυκαπρολακτόνης και έδειξαν αρχική απελευθέρωση τετρακυκλίνης της τάξης του 70%, ακολουθούμενη από μια συνεχή αργή απελευθέρωση για τις επόμενες 24 ώρες (Fakhri et al., 2020; Guarino et al., 2013). Το PLGA είναι ένα βιοσυμβατό και βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές εγκεκριμένο από τον FDA και ο συνδυασμός του με χιτοζάνη αποδίδει έναν σύνθετο φορέα φαρμάκων. Σε μελέτη το σύνθετο σύστημα PLGA-λοβαστατίνη-ChNPs-τετρακυκλίνη παρουσίασε τα πλεονεκτήματα της ενισχυμένης βιοσυμβατότητας, της αντιμικροβιακής δράσης και της συνεχούς απελευθέρωσης τετρακυκλίνης και λοβαστατίνης με αποτέλεσμα τον έλεγχο λοίμωξης και την προώθηση του σχηματισμού των οστών σε σκύλους (Fakhri et al., 2020; Lee et al., 2016).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6. Υλικά

6.1. Πρώτη ύλη

- Οινολάσπη από σταφύλια ποικιλιών Merlot, Syrah, και Cabernet σε αναλογία 60%, 30% και 10% αντίστοιχα, από αμπελώνες βιολογικής καλλιέργειας στη Ζίτσα Ιωαννίνων. Η προμήθεια της έγινε από το οινοποιείο στη θέση Ρίζωμα (Άνω Λαψίστα, Ιωάννινα, 455 00), με την "επωνυμία" Κήτας Βασίλειος, τον Νοέμβριο του 2020
- Φύλλα ελιάς τα οποία συλλέχθηκαν από την περιοχή των Σερρών

6.2. Νανοσωματίδια

Στην παρούσα εργασία γίνεται σύνθεση και έπειτα χρησιμοποιούνται τα:

- Νανοσωματίδια οξειδίου ψευδαργύρου (ZnONPs) από εκχύλισμα ελιάς (OLE)
- ZnONPS από εκχύλισμα οινολάσπης (WL)
- Νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) από OLE
- AgNPs από WL
- Νανοσωματίδια χιτοζάνης (ChNPs) από OLE

6.3. Βακτηριακά στελέχη

- Βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* BL21(DE3)
- Βακτηριακό στέλεχος Corynebacterium glutamicum ATCC 21253

6.4. Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων

- Θρεπτικό μέσο για υγρή καλλιέργεια LB Broth (Lennox), (NEOGEN)
- LB Agar (Lennox L Agar) για τρυβλία (Invitrogen)
- Mueller Hinton Agar για τρυβλία (Sigma-Aldrich)

6.5. Υποστρώματα

Πολυσακχαρίτες

• Χιτοζάνη (χαμηλό MW, 75-85% αποακετυλιωμένη) (Sigma-Aldrich)

6.6. Διαλύτες

- Αιθανόλη 70% (Histanol) (Sigma-Aldrich)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (Merck)
- Υδροχλωρικό οξύ (Riedel)
- Οξικό οξύ (>99.8%, 17.4 M) (Sigma-Aldrich)
- Υπερκάθαρο νερό (ddH₂O)

- Θειϊκό οξύ (95-97%) (Riedel)
- Τριπολυφωσφορικό νάτριο (TPP) (Alfa Aesar)
- Φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄),(Sigma)
- Μολυβδαινικό αμμώνιο (Fluka)

6.7. Διαλύματα

- Υδατικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS buffer, pH 5.8 και 7.4)
- Διάλυμα χιτοζάνης 0.5% w/v σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 1% v/v
- Διάλυμα χιτοζάνης 0.75% w/v σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2% v/v
- Φυσιολογικός ορός (NaCl) 0.9% w/v
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) 20% w/v
- Υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 2M
- Διάλυμα θειϊκού οξέος (H₂SO₄) 2M
- Διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Na₂HPO₄) 93.3 mM
- Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου ((NH4)6M07O24) 13.3 mM

6.8. Λοιπά αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο ανίχνευσης ολικών φαινολικών συστατικών Folin-Ciocalteu (Sigma)
- Διαμμώνιο 2,2'-αζινο-δι (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό) (ABTS) (Sigma)
- Ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃) (Riedel)
- Υπερθειικό κάλιο (K₂S₂O₈) (Merck)
- Βρωμιούχο κάλιο (KBr) (Sigma)
- Ενυδατωμένος οξικός ψευδάργυρος (Zn(CH₃COOH₂)₂(*2H₂O)) (Merck)
- Νιτρικός άργυρος (AgNO₃) (Sigma)

7. Μέθοδοι

7.1. Επεξεργασία οινολάσπης

Από το δοχείο της ακατέργαστης οινολάσπης λαμβάνονται 300 mL οινολάσπης έπειτα από καλή ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 9,000 rpm για 10 min και η υδατική φάση (υπερκείμενο) απορρίπτεται. Το ίζημα τοποθετείται για λυοφυλίωση για 2 μέρες και αποθηκεύεται στους -20 °C μέχρι τη χρήση του.

7.2. Παρασκευή εκχυλισμάτων

Η εκχύλιση πραγματοποιείται με τη μέθοδο των υπερήχων ή της θέρμανσης. Στην περίπτωση των υπερήχων η μέθοδος στηρίζεται στην εφαρμογή κυμάτων υψηλής συχνότητας που επιτρέπουν τον σχηματισμό φυσαλίδων και τη ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών στο δείγμα, βελτιώνοντας τη μεταφορά ενώσεων μεταξύ της στερεάς και της υγρής φάσης. Έχει αποδειχθεί κατάλληλη τεχνική για την εκχύλιση πολυφαινολών από δείγματα φυτικής προέλευσης. Στην περίπτωση της θέρμανσης το φυτικό μέρος τοποθετείται για βρασμό και η διάρκεια του βρασμού θα εξαρτηθεί από τη φύση των φυτικών ιστών. Συνήθως, τα ευαίσθητα μέρη του φυτού, όπως τα φύλλα, οι ρίζες, τα άνθη και οι τρυφεροί μίσχοι, βράζονται για 15 λεπτά, ενώ τα σκληρά μέρη των φυτών, όπως τα κλαδιά και οι φλοιοί δέντρων μπορούν να υποβληθούν σε βρασμό για μία ώρα (Bitwell et al., 2023; Tapia-Quirós et al., 2020).

7.2.1. Παρασκευή αιθανολικού εκχυλίσματος οινολάσπης

Τζημα οινολάσπης προστίθεται σε διάλυμα αιθανόλης 70%, ώστε να επιτευχθεί η αναλογία οινολάσπης: διαλύτη 1:5. Ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση σε λουτρό υπερήχων για 20 min. Μετά το πέρας της επώασης, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 9,000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο διηθείται και αποθηκεύεται στους -20 °C μέχρι τη χρήση του (Athanasiou et al., 2024).

7.2.2. Παρασκευή υδατικών εκχυλισμάτων οινολάσπης και φύλλων ελιάς

Σε 2 g ιζήματος οινολάσπης ή θρυμματισμένων φύλλων ελιάς προστίθενται 20 mL υπερκάθαρο νερό ώστε να επιτευχθεί η αναλογία 1:10.

- Για το μίγμα του ιζήματος οινολάσπης ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Μετά το πέρας της επώασης, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 9,000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο διηθείται και αποθηκεύεται στους 4 °C μέχρι τη χρήση του.
- Για το μίγμα των φύλλων ελιάς ακολουθεί θέρμανση στους 90 °C για 30 min. Έπειτα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και διηθείται ώστε να απομακρυνθούν στερεά υπολείμματα. Ύστερα το διήθημα φυγοκεντρείται στις 9,000 rpm για 10 min,,

διηθείται εκ νέου και αποθηκεύεται στους 4 °C μέχρι τη χρήση του (Fotiadou et al., 2021). Μέρος υγρού εκχυλίσματος τοποθετείται για λυοφυλίωση ώστε να ληφθεί στερεό εκχύλισμα.

7.3. Μέτρηση περιεκτικότητας ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα πραγματοποιείται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων σε φυτικά εκγυλίσματα. Βασίζεται στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με φαινολικές ενώσεις σε αλκαλική κατάσταση. Η ακριβής χημική σύσταση του αντιδραστηρίου δεν είναι καθορισμένη, αλλά πιστεύεται ότι περιέχει ένα σύμπλεγμα φωσφομολυβδικού/ φωσφοβολφραμικού οξέος που ανάγεται για να ληφθεί ένα μπλε χρωμοφόρο με μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm (Εικόνα 7.1β). Το κεντρικό ιόν μολυβδαινίου στο σύμπλοκο λειτουργεί ως αναγωγική θέση, όπου το ιόν Mo⁶⁺ ανάγεται σε Μο⁵⁺ με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από φαινολικό συστατικό (Εικόνα 7.1α). Η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση πρότυπη καμπύλη και το γαλλικό οξύ είναι το κοινώς χρησιμοποιούμενο πρότυπο αναφοράς. Συνολικά, αποτελεί μια απλή, γρήγορη μέθοδο και Ωστόσο, μπορούν να υπάρξουν μειονεκτήματα στη μέθοδο, για είναι φωτομετρική. παράδειγμα η υπερεκτίμηση των αποτελεσμάτων είναι μια σημαντική ανησυχία, λόγω της συμβολής των μη φαινολικών αναγωγικών παραγόντων που υπάρχουν στο σύστημα κατά την αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Ainsworth & Gillespie, 2007; Munteanu & Apetrei, 2021).



Εικόνα 7.1. (α) Απεικόνιση αντίδρασης μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και των παραγώγων του φωσφοβολφραμικού και του φωσφομολυβδικού οξέος σε αλκαλικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μπλε χρώματος. (β) Διακύμανση χρώματος που παρατηρήθηκε στον προσδιορισμό (Munteanu & Apetrei, 2021).

7.3.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων στα υγρά εκχυλίσματα οινολάσπης και φύλλων ελιάς

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ολικών φαινολικών συστατικών, σε πηγαδάκι του Elisa plate προστίθενται ποσότητα του εκάστοτε υγρού εκχυλίσματος, 10 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και ποσότητα υπερκάθαρου νερού μέχρι τελικό όγκο 180 μL. Έπειτα από 3 min προστίθενται 20 μL ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃, 20% w/v) και ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 200 μL. Για τα εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται:

- 25 μL υγρού αιθανολικού εκχυλίσματος οινολάσπης (et.WL) αραιωμένου 1:100
- 10 μL υγρού υδατικού εκχυλίσματος οινολάσπης (aq.WL)
- 20 μL υγρού υδατικού εκχυλίσματος ελιάς (aq.OLE) αραιωμένου 1:100

Μετά από επώαση για 1 h σε σκοτάδι, μετρούνται οι απορροφήσεις των δειγμάτων στα 725 nm. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται εις διπλούν, ενώ κάθε φορά παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα (blank) απουσία του εκχυλίσματος. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών στα δείγματα πραγματοποιείται με τη βοήθεια της εξίσωσης:

y=0,0391x

όπου y είναι η απορρόφηση στα 725 nm και x η συγκέντρωση φαινολικών σε μg/mL.

7.4. Βιολογική σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων, χαρακτηρισμός και μελέτη βιολογικών δράσεων

Σε αυτή την ενότητα χρησιμοποιούνται τα εκχυλίσματα ελιάς και οινολάσπης για τη βιολογική σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων ZnONPs και AgNPs. Στην περίπτωση των AgNPs μελετώνται σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση. Ακολουθούν χαρακτηρισμοί των NPs και έπειτα μελετώνται οι βιολογικές δράσεις τους, η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους δράση.

7.4.1. Βιολογικές συνθέσεις

Αρχικά χρησιμοποιούνται τα υγρά εκχυλίσματα et.WL και aq.OLE για την πράσινη σύνθεση ZnONPs και τα aq.WL και aq.OLE για τη σύνθεση AgNPs. Το εκχύλισμα et.WL δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση των AgNPs για πρακτικούς λόγους του πρωτοκόλλου στο στάδιο ρύθμισης pH.

7.4.1.1. Σύνθεση ZnONPs

Σε 49 mL υπερκάθαρου νερού διαλυτοποιείται το άλας Zn(CH₃COOH₂)₂·2H₂O σε συγκέντρωση 100 mM και το διάλυμα αναδεύεται αργά σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Ύστερα στο διάλυμα προστίθεται στάγδην 1 mL εκχυλίσματος (et.WL ή aq.OLE) με συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και αφήνεται για 10 min. Ακολουθεί η ρύθμιση του pH του μίγματος στο 12.0 προσθέτοντας στάγδην 2 M υδροξείδιο του νατρίου και έπειτα το μίγμα επωάζεται στους 90 °C για 60 min. Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται στις 9,000 rpm για 15 min και πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με υπερκάθαρο νερό. Τέλος, το ίζημα αφυδατώνεται στους 37 °C και αποθηκεύεται στους 4 °C μέχρι τη χρήση του (**Εικόνα 7.2**) (Fotiadou et al., 2021).



Εικόνα 7.2. Βήματα βιολογικής σύνθεσης ZnONPs με εκχυλίσματα et.WL ή aq.OLE.

Επισημαίνεται πως κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων το χρώμα του μίγματος της αντίδρασης αλλάζει από πορτοκαλί (aq.OLE) ή κόκκινο (et.WL) πριν την ρύθμιση του pH, σε σκούρο μπλε μετά την ρύθμιση του pH.

7.4.1.2. Σύνθεση AgNPs

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χωρίζεται σε 2 εργαστηριακές μέρες.

<u>1^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Σε 10 mL υπερκάθαρου νερού προστίθενται 10 mL εκχυλίσματος (aq.WL ή aq.OLE). Ακολουθεί η ρύθμιση του pH του μίγματος στο 10.0 προσθέτοντας στάγδην 2 M υδροξείδιο του νατρίου και έπειτα στο μίγμα διαλυτοποιείται το άλας AgNO₃ σε συγκέντρωση 10 mM. Στη συνέχεια, το μίγμα επωάζεται ολονύχτια στους 30 °C και 130 rpm.

Επισημαίνεται πως κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων το χρώμα του μίγματος της αντίδρασης αφού έχει ρυθμιστεί το pH, αλλάζει από πορτοκαλί (aq.OLE) ή πράσινο (aq.WL) πριν την επώαση σε σκούρο καφέ μετά την ολονύχτια επώαση.

<u>2^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 9,000 rpm για 10 min και πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με υπερκάθαρο νερό. Τέλος, το ίζημα τοποθετείται για λυοφυλίωση και αποθηκεύεται στους 4 °C μέχρι τη χρήση του (Εικόνα 7.3) (Chouhan & Guleria, 2020).



Εικόνα 7.3. Βήματα βιολογικής σύνθεσης AgNPs με εκχυλίσματα aq.WL ή aq.OLE..

7.4.1.2.1. Βελτιστοποίηση σύνθεσης AgNPs από εκχύλισμα φύλλων ελιάς

Το πρωτόκολλο σύνθεσης AgNPs με aq.OLE επιλέγεται σαν μοντέλο για τις μελέτες παραμέτρων που επηρεάζουν τη σύνθεση. Πραγματοποιείται διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του άλατος (1, 3, 5, 10 mM), της αναλογίας όγκων εκχυλίσματος aq.OLE: νερού (0.06:1, 0.08:1, 0.1:1, 1:1) και του pH (6.0, 7.0, 8.0, 10.0, 12.0), διατηρώντας κάθε φορά σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους.

7.4.2. Χαρακτηρισμοί

Ακολουθούν χαρακτηρισμοί των συντιθέμενων NPs μέσω φασματοσκοπίας ορατούυπεριώδους (UV-Vis), φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR) και μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM).

7.4.2.1. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των εκχυλισμάτων, των ZnONPs και AgNPs

Πραγματοποιείται λήψη φάσματος ορατού-υπεριώδους ποσότητας διεσπαρμένων NPs σε νερό και των αντίστοιχων υγρών εκχυλισμάτων από τα οποία συντέθηκαν.

Αρχικά, ορίζεται το baseline του οργάνου με 1 mL υπερκάθαρου νερού σε κυψελίδα χαλαζία. Η λήψη του φάσματος πραγματοποιείται σε εύρος μήκους κύματος 200-800 nm (Agilent Cary 60 Spectrophotometer). Οι ποσότητες για τη λήψη φασμάτων:

- Για τα εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται 20 μL του et.WL, 10 μL του aq.WL και 10 μL του aq.OLE και προστίθεται νερό μέχρι τελικό όγκο 1 mL.
- Για τα ZnONPs από stock 1 mg/mL πραγματοποιούνται 5 διαδοχικές αραιώσεις 1:2 σε νερό και χρησιμοποιείται η τελευταία αραίωση για τη λήψη του φάσματος σε τελικό όγκο 1 mL.

 Για τα AgNPs από stock 1 mg/mL χρησιμοποιούνται 50 μL και προστίθεται νερό μέχρι τελικό όγκο 1 mL.

7.4.2.2. Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR) των ZnONPs και AgNPs

Στη φασματοσκοπία υπερύθρου εκπέμπεται υπέρυθρη ακτινοβολία σε ένα δείγμα και στη συνέχεια το φάσμα που προκύπτει αναλύεται σε μονοχρωματικό και καταγράφεται η απορρόφηση που οφείλεται στο δείγμα σε κάθε συχνότητα. Η υπέρυθρη ακτινοβολία απορροφάται από τα μόρια για να μετατραπεί σε ενέργεια μίας μοριακής δόνησης. Το φάσμα υπερύθρου είναι αποτέλεσμα της απορρόφησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας κατά τις δονήσεις των δεσμών και οι βασικές δονητικές μεταπτώσεις παρατηρούνται στην περιοχή του μέσουυπερύθρου, δηλαδή 400-4000 cm⁻¹ (Σταμάτης, 2018).

Με φασματοσκοπία υπερύθρου μελετώνται τα στερεά δείγματα των ZnONPs και AgNPs, τα οποία αραιώνονται κατάλληλα σε KBr, σε φασματοφωτόμετρο FT/IR-4700 της JASCO (Tokyo, Japan). Πραγματοποιούνται 32 σαρώσεις ανά φάσμα, για την επίτευξη ικανοποιητικού λόγου σήματος-θορύβου. Τα φάσματα λαμβάνονται στην περιοχή 400–4000 cm⁻¹, με ανάλυση 4 cm⁻¹, σε θερμοκρασία δωματίου. Το αποτέλεσμα αποτελεί γράφημα απορρόφησης συναρτήσει των κυματαριθμών συχνότητας. Ως φάσμα αναφοράς ορίζεται ο αέρας.

7.4.2.3. Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) των ZnONPs και AgNPs

Η Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM) είναι μια τεχνική απεικόνισης υψηλής ανάλυσης που παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τους Binnig, Quate και Gerber το 1985. Από τότε έχει εξελιχθεί σε ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση επιφανειών και επιτρέπει ακριβείς και μη καταστροφικές μετρήσεις των ηλεκτρικών, μαγνητικών, χημικών, οπτικών και μηχανικών ιδιοτήτων μιας επιφάνειας δείγματος με πολύ υψηλή ανάλυση (Kosareva et al., 2022).

Η λήψη των εικόνων AFM πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (Atomic force microscopy, AFM) Bruker Multimode Nanoscope 3D του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των εικόνων ήταν αυτή της περιοδικής επαφής (Tapping Mode) με χρήση ακίδων πυριτίου τύπου TAP300-G, συχνότητας <10 nm και σταθερά δύναμης ~20–75 N m⁻¹. Τα υμένια που μετρήθηκαν εναποτέθηκαν σε υποστρώματα πυριτίου (Si-wafers).

7.4.3. Βιολογικές δράσεις

Ακολουθούν μελέτες της αντιοξειδωτικής δράσης των συντιθέμενων NPs μέσω του πρωτοκόλλου του οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺) και του φωσφομολυβδαινίου, καθώς και της αντιμικροβιακής δράσης παρατηρώντας τις καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων *Escherichia* coli και Corynebacterium glutamicum μετά από προ-επώαση με τον αντιμικροβιακό παράγοντα, υπολογισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για τα δυο βακτηριακά στελέχη, και μέσω της παρατήρησης ζωνών αναστολής σε τρυβλία μετά από επώαση των βακτηρίων με τα νανοσωματίδια.

7.4.3.1. Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης

7.4.3.1.1. Μέθοδος ΑΒΤS

Για την μέθοδο μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης με ABTS προκειμένου να οξειδωθεί το ABTS προστίθεται υπερθειικό κάλιο. Το οξειδωμένο ABTS, έχει χαρακτηριστικό γαλαζοπράσινο χρώμα που μετριέται φωτομετρικά στα 734 nm. Όταν το οξειδωμένο ABTS έρθει σε επαφή με μία αντιοξειδωτική ένωση, αποχρωματίζεται και γίνεται σχεδόν διάφανο. Πιο συγκεκριμένα, ένα άτομο υδρογόνου μεταφέρεται από την αντιοξειδωτική ένωση στη ρίζα ABTS με αποτέλεσμα να κυριαρχήσει η ανηγμένη του μορφή, και έτσι μειώνεται σταδιακά η ένταση του πράσινου χρώματος (Εικόνα 7.4) (Sadeer et al., 2020).

Chemical reactions:



Εικόνα 7.4. Απεικόνιση βασικού μηχανισμού αδρανοποίησης της ρίζας ABTS και αποχρωματισμός του ABTS (Sadeer et al., 2020).

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των NPs, ποσότητα 14.4 mg ABTS [2,2'-αζινο-δι (3 -αιθυλοβεζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ] (6.5 mM) αναμιγνύεται με ποσότητα 2.64 mg υπερθειϊκού καλίου (K₂SO₄) (2.45 mM) και διαλυτοποιούνται σε 4 mL υπερκάθαρου νερού (διάλυμα Α). Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 16-18 h σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση του.

Μετά από δύο διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος Α για την παρασκευή του τελικού αντιδραστηρίου (διάλυμα Γ), το εύρος τιμών απορρόφησης του τελικού διαλύματος ABTS στην αντίδραση απουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα (μάρτυρας) είναι μεταξύ 0.700 ± 0.025 Abs στα 734 nm.

Παρασκευάζονται stocks των NPs:

- Για τα ZnONPs stocks 8 mg/mL σε νερό και για καθένα από τα δείγματα μελετώνται οι συγκεντρώσεις 0, 100, 200, 400, 800 και 1000 μg/mL.
- Για τα AgNPs, stocks 1 mg/mL σε νερό και για καθένα από τα δείγματα μελετώνται οι συγκεντρώσεις 0, 10, 20, 40, 80 και 100 μg/mL.

Προστίθενται σταθερή ποσότητα 875 μL αντιδραστηρίου ABTS διαλύματος Γ, ο κατάλληλος όγκος διαλύματος δείγματος και υπερκάθαρου νερού μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL. Η αντίδραση διεξάγεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση ώστε να απομακρυνθούν τα NPs και καταγράφεται η απορρόφηση στα 734 nm (Athanasiou et al., 2024; Manimaran et al., 2021). Επίσης, κάθε φορά παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα (blank) απουσία των NPs. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται εις διπλούν. Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$AA\% = [(A_{control} - A_{\delta\epsilon i\gamma\mu\alpha\tau\circ\varsigma})/A_{control}] \times 100,$$

όπου A_{control} είναι η απορρόφηση του αραιωμένου οξειδωμένου ABTS και Α_{δείγματος} είναι η απορρόφηση του υπό μελέτη δείγματος. Τέλος, για κάθε δείγμα σχεδιάζεται διάγραμμα της % αντιοξειδωτικής δράσης συναρτήσει της συγκέντρωσης δείγματος.

7.4.3.1.2. Μέθοδος φωσφομολυβδαινίου

Η μέθοδος φωσφομολυβδαινίου είναι μια ποσοτική μέθοδος που αναπτύχθηκε αρχικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιταμίνης Ε σε σπόρους. Λαμβάνοντας υπόψιν την απλότητα και την ευαισθησία της, η εφαρμογή της επεκτάθηκε για την αντιοξειδωτική δράση σε φυτικά εκχυλίσματα. Η μέθοδος του φωσφομολυβδαινίου ακολουθεί μηχανισμό αναγωγής του μολυβδαινίου (VI) σε μολυβδαίνιο (V). Προκύπτει γαλαζοπράσινο σύμποκο λόγω της αναγωγής του μολυβδαινικού αμμωνίου σε ένα οξείδιο γνωστό ως ιόν Keggin [H₃PO₄(MoO₃)₁₂] υπό όξινες συνθήκες. Στη συνέχεια, το ιόν Keggin ανάγεται σε [H₄PMo₈ ^{VI}Mo₄^VO₄₀]³⁻ παρουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα. Η απορρόφηση του γαλαζοπράσινου συμπλόκου μπορεί να διαβαστεί στα 695 nm (**Εικόνα 7.5**) (Sadeer et al., 2020). Chemical reactions:



Εικόνα 7.5. Μηχανισμός μεθόδου φωσφομολυβδαινίου (Sadeer et al., 2020).

Παρασκευάζονται διαλύματα αντιδραστηρίων 2 Μ θειικού οξέος, 93.3 mM φωσφορικού νατρίου και 13.3 mM μολυβδαινικού αμμωνίου. Επίσης, παρασκευάζονται stocks των NPs:

- Για τα ZnONPs stocks 50 mg/mL σε νερό και για καθένα από τα δείγματα μελετώνται οι συγκεντρώσεις 0, 0.5, 2.5, 5.0 mg/mL.
- Για τα AgNPs stocks 5 mg/mL σε νερό και για καθένα από τα δείγματα μελετώνται οι συγκεντρώσεις 0, 0.05, 0.25, 0.50 mg/mL.

Στην ποσότητα του δείγματος NPs προστίθενται οι όγκοι αντιδραστηρίων με τελικές συγκεντρώσεις 0.6 M θειικού οξέος, 28 mM φωσφορικού νατρίου, 4 mM μολυβδαινικού αμμωνίου και υπερκάθαρου νερού μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL. Τα δείγματα επωάζονται στους 95 °C για 90 min, για την επίτευξη του πλήρη σχηματισμού του συμπλόκου φωσφομολυβδαινίου. Ο σχηματισμός του συμπλόκου είναι δυνατός σε θερμοκρασία δωματίου ωστόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 95 °C επιταχύνει τον ρυθμό της αντίδρασης και αυξάνει την απόδοση του γαλαζοπράσινου συμπλόκου. Τέλος, η απορρόφηση του δείγματος διαβάζεται στα 695 nm (Hashemi et al., 2016). Επίσης, κάθε φορά παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα (blank) απουσία των NPs. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται εις διπλούν. Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίζεται από την εξίσωση:

AA % = $[(A_{\delta\epsilon i\gamma\mu\alpha\tau\sigma\varsigma} - A_{control})/A_{\delta\epsilon i\gamma\mu\alpha\tau\sigma\varsigma}] \times 100$,

όπου A_{control} είναι η απορρόφηση του τυφλού (blank) και Α_{δείγματος} είναι η απορρόφηση του υπό μελέτη δείγματος. Τέλος, για κάθε δείγμα σχεδιάζεται διάγραμμα της % αντιοξειδωτικής δράσης συναρτήσει της συγκέντρωσης δείγματος.

7.4.3.2. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης

7.4.3.2.1. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης νανοσωματιδίων σε βακτηριακά στελέχη, απουσία θρεπτικού μέσου (Πρωτόκολλο Α)

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χωρίζεται σε 3 εργαστηριακές μέρες.

<u>1^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Παρασκευάζεται προκαλλιέργεια μέσω εμβολιασμού περίπου 100 μL βακτηριακού πληθυσμού *Escherichia coli* και *Corynebacterium glutamicum* από stock βακτηριακών κυττάρων αποθηκευμένα σε γλυκερόλη, σε 5 mL φρέσκου θρεπτικού μέσου LB Broth. Ακολούθως, η υγρή καλλιέργεια τοποθετείται για επώαση στους 37 °C, O/N (overnight) υπό ανάδευση στα 160 rpm.

<u>2^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Μετά από Ο/Ν επώαση της προκαλλιέργειας στους 37 °C και στα 160 rpm, μετράται η απορρόφηση της στα 600 nm και αραιώνεται με θρεπτικό μέσο LB Broth, έτσι ώστε η απορρόφηση της ανακαλλιέργειας να είναι 0.08 σε τελικό όγκο 5 mL. Η ανακαλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C, υπό ανάδευση στα 160 rpm, για περίπου 1-2 ώρες προκειμένου ο βακτηριακός πληθυσμός να περάσει στην εκθετική φάση, εμφανίζοντας απορρόφηση που κυμαίνεται από 0.2-0.6. Μετά την επώαση, μετράται η απορρόφηση της ανακαλλιέργειας, η οποία θα χρησιμοποιηθεί ώστε να προσδιορίστει ο βακτηριακός πληθυσμός της ανακαλλιέργειας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της ανακαλλιέργειας στα 4,000 rpm για 10 min, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος σε 4 mL ορό (NaCl 0,9% w/v). Έπειτα, πραγματοποιούνται 3 διαδοχικές πλύσεις του ιζήματος με ορό και τελικά επαναδιαλυτοποίηση του σε 4 mL ορό.

Παρασκευάζονται stocks των ZnONPs και AgNPs συγκέντρωσης 0.5 mg/mL σε φυσιολογικό ορό. Οι συγκεντρώσεις που μελετώνται για κάθε δείγμα είναι 0, 2, 4, 6, 7 και 8 μg/mL. Σε eppendorfs των 1.5 mL, μεταφέρεται ποσότητα ορού, δείγματος και ανακαλλιέργειας των βακτηρίων, τέτοια ώστε να περιέχονται 10⁸ CFU/mL βακτηριακών κυττάρων κάθε φορά. Η ποσότητα αυτή υπολογίζεται, γνωρίζοντας ότι η απορρόφηση 0.5009 αντιστοιχεί σε 1.7*10⁸ CFU/mL βακτηριακών κύτταρων *E.coli* και η απορρόφηση 0.5184 αντιστοιχεί σε 3.3*10⁸ CFU/mL βακτηριακών κύτταρων *C.glutamicum* και λαμβάνοντας υπόψιν την απορρόφηση που λαμβάνεται μετά την ανακαλλιέργεια. Αφού παρασκευαστούν όλες οι απαραίτητες συγκεντρώσεις, τα δείγματα τοποθετούνται για επώαση στους 37 °C, υπό ανάδευση στα 160 rpm, O/N.

<u>3^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Μετά την επώαση των δειγμάτων, πραγματοποιείται εμβολιασμός 25 μL από αυτά, που αντιστοιχούν σε 10⁷ βακτηριακά κύτταρα, σε πηγαδάκι αποστειρωμένης πλάκας Elisa και φόρτωση των αντίστοιχων πηγαδιών με 225 μL θρεπτικού μέσου LB Broth, έτσι ώστε ο τελικός όγκος κάθε πηγαδιού να είναι 250 μL. Ανά μία ώρα, για διάστημα 8 ωρών, μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων στην πλάκα Elisa με επώαση αυτής στους 37 °C για τα χρονικά διαστήματα μεταξύ των μετρήσεων. Τέλος, κατασκευάζονται καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου, απουσία και παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων των NPs. Όλες οι παραπάνω διεργασίες πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες (Chatzikonstantinou et al., 2022).

7.4.3.2.2. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης νανοσωματιδίων σε βακτηριακά στελέχη και υπολογισμός MIC (Πρωτόκολλο Β)

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χωρίζεται σε 4 εργαστηριακές μέρες.

<u>1^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Παρασκευάζονται προκαλλιέργειες βακτηριακών πληθυσμών Escherichia coli και Corynebacterium glutamicum υπό όμοιες πειραματικές συνθήκες με την 1^η εργαστηριακή ημέρα του πρωτοκόλλου Α. Επιπλέον υδατικό διάλυμα LB Agar, επιστρώνεται σε τρυβλία (20 mL) με στόχο την επίστρωση καλλιεργειών. Μετά τη στερεοποίηση τα τρυβλία αποθηκεύονται στους 4 °C.

<u>2^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Ακολουθείται η διαδικασία παρασκευής ανακαλλιεργειών (πρωτόκολλο A 2^η εργαστηριακή ημέρα) μέχρι η απορρόφηση τους να πλησιάσει τις τιμές 0.5 Abs στα 600 nm. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις σε υγρό θρεπτικό μέσο ή ορό για την κάθε ανακαλλιέργεια και 100 μL αραιωμένης ανακαλλιέργειας εμβολιάζονται σε τρυβλίο. Τα κύτταρα *E.coli* και *C.glutamicum* εμβολιάζονται σε τρυβλία θρεπτικού μέσου LB agar. Χρησιμοποιείται η αραίωση 10². Μετά την επίστρωση τα τρυβλία σφραγίζονται με parafilm και τοποθετούνται ανάποδα για Ο/Ν επώαση στους 37 °C χωρίς ανάδευση.

<u>3^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Την επόμενη μέρα, 4-5 αποικίες (του ίδιου περίπου μεγέθους και μορφολογίας) για το κάθε βακτήριο μεταφέρονται από τα τρυβλία ανάπτυξης σε διάλυμα υδατικού θρεπτικού μέσου LB Broth και φωτομετρούνται στα 600 nm για τον προσδιορισμό της θολερότητας τους. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο McFarland 0.5, η επιθυμητή θολερότητα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0.10 και 0.15 Abs αντιστοιχώντας σε πληθυσμό (1-2) x 10⁸ CFU mL⁻¹ (η τιμή αυτή αφορά τα βακτήρια, όπως έχει συσταθεί από τις οδηγίες του οργανισμού CSLI). Ακολουθεί

αραίωση των βακτηριακών εναιωρημάτων 1:150 στο μέσο ανάπτυξης LB Broth και αποθήκευση των καλλιεργειών σε πάγο. Παρασκευάζονται διαλύματα stocks συγκέντρωσης 16 mg/mL (σε LB broth) των δειγμάτων NPs αλλά και διαλύματα προτύπων ενώσεων (αμπικιλλίνη) 1 mg/mL τα οποία αραιώνονται κατάλληλα (1:10). Προστίθενται 50 μL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB broth στην πλάκα Elisa. Στα πηγαδάκια της πρώτης σειράς, προστίθενται 50 μL από τον εκάστοτε αντιμικροβιακό παράγοντα και πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις (1:2) κατά μήκος της πλάκας, με αποτέλεσμα τον υποδιπλασιασμό της επιθυμητής συγκέντρωσης. Ακολουθεί ο εμβολιασμός των αραιωμένων βακτηριακών εναιωρημάτων, μεταφέροντας 50 μL σε κάθε πηγαδάκι. Η συγκέντρωση των βακτηριων πρέπει να είναι 10^5 - 10^6 CFU mL⁻¹. Μελετώνται οι συγκεντρώσεις 50-0.78 μg/mL για την αμπικιλλίνη, 6,400-100 μg/mL για τα ZnONPs, 800-12.5 μg/mL για τα AgNPs. Η πλάκα Elisa σφραγίζεται με parafilm και επωάζεται O/N στους 37 °C χωρίς ανάδευση.

<u>4^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Παρασκεύαζεται stock ρεσαζουρίνης 2.5 mg/mL. Μετά την Ο/Ν επώαση προστίθενται 5 μL ρεσαζουρίνης στο κάθε πηγαδάκι και η πλάκα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Πραγματοποιείται προσδιορισμός της MIC (minimum inhibitory concentration) μέσω οπτικής παρατήρησης του πηγαδιού. Το ροζ χρώμα στα πηγαδάκια παραπέμπει στην ύπαρξη βακτηριακής ανάπτυξης, ενώ το σκούρο μπλε σε μη βακτηριακή ανάπτυξη. Όλες οι παραπάνω διεργασίες πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες (Chakansin et al., 2022).

7.4.3.2.3. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης AgNPS σε βακτηριακά στελέχη με μελέτη ζωνών αναστολής βακτηρίων (Πρωτόκολλο Γ)

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χωρίζεται σε 4 εργαστηριακές μέρες.

<u>1^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Παρασκευάζονται προκαλλιέργειες βακτηριακών πληθυσμών *E.coli* και *C.glutamicum* υπό όμοιες πειραματικές συνθήκες με την 1^η εργαστηριακή ημέρα του πρωτοκόλλου A, καθώς και η επίστρωση υδατικού διαλύματος Mueller Hinton Agar σε τρυβλία με όμοιες πειραματικές συνθήκες με την 2^η εργαστηριακή ημέρα του πρωτοκόλλου B.

<u>2^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Ακολουθείται η διαδικασία όμοια με την 2^η εργαστηριακή μέρα του πρωτοκόλλου

В.

<u>3^η εργαστηριακή μέρα:</u>

Ακολουθείται η διαδικασία μεταφοράς 4-5 αποικιών, ώστε σύμφωνα με το πρωτόκολλο McFarland 0.5, η επιθυμητή θολερότητα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0.10 και 0.15 Abs αντιστοιχώντας σε πληθυσμό (1-2) x 10⁸ CFU mL⁻¹, όμοια με την **3^η εργαστηριακή**

μέρα του πρωτοκόλλου B. Το βακτηριακό εναιώρημα αραιώνεται διαδοχικά έως 10^6 CFU/mL και 100 μL απλώνονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια τρυβλίου (10^5 CFU/mL). Παρασκευάζονται stocks των AgNPs 1, 2 και 4 mg/mL σε DMSO. Αποστειρωμένοι δίσκοι φορτώνονται με κάθε δείγμα και τοποθετούνται στα τριβλύα. Στη συνέχεια, τα τρυβλία επωάζονται για 24 h στους 37 °C. Επίσης, κάθε φορά παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα (blank), με θετικό μάρτυρα την αμπικιλλίνη και αρνητικό μάρτυρα το DMSO, απουσία των NPs (Bharathi et al., 2023).

4^η εργαστηριακή μέρα:

Η δραστικότητα των NPs αξιολογείται παρατηρώντας την βακτηριακή ανάπτυξη στα τρυβλία και με τη μέτρηση με χάρακα της ζώνης αναστολής (ZOI) έναντι των εξεταζόμενων βακτηριακών στελεχών. Όλες οι παραπάνω διεργασίες πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες.

7.5. Σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης, χαρακτηρισμός και μελέτη βιολογικών δράσεων

Σε αυτή την ενότητα χρησιμοποιείται εκχύλισμα ελιάς για τη σύνθεση ChNPs, μέσω ιονικής πηκτωμάτωσης με δύο μεθόδους. Μελετώνται σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση και ακολουθούν χαρακτηρισμοί των NPs. Επίσης, μελετώνται η απελευθέρωση του εκχυλίσματος που αποτελεί τη δραστική ουσία από τα NPs, καθώς και οι βιολογικές δράσεις τους, η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους δράση.

7.5.1. Σύνθεση ChNPs

Η σύνθεση ChNPs πραγματοποιείται από υγρό ή λυοφυλιωμένο aq.OLE, με 2 μεθόδους ιονικής πηκτωμάτωσης που διαφοροποιούνται ως προς το χρόνο προσθήκης του εκχυλίσματος και του τριπολυφωσφορικού νατρίου (TPP).

7.5.1.1. Παρασκευή διαλυμάτων χιτοζάνης

Για την παρασκευή διαλυμάτων χιτοζάνης 0.5% w/v και 0.75% w/v ζυγίζεται αρχικά η χιτοζάνη (0.5g και 0.75g αντίστοιχα). Στην απαγωγό παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 1% v/v και 2% v/v οξικού οξέος και σε αυτά προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα χιτοζάνης (0.5g στο διάλυμα 1%, 0.75g στο διάλυμα 2%) και σταδιακά, ώστε να μη δημιουργηθούν συσσωματώματα. Το διάλυμα αφήνεται υπό ολονύκτια ανάδευση, στους 50 °C. Έπειτα, αποθηκεύεται στους 4 °C μέχρι τη χρήση της.

7.5.1.2. 1^η μέθοδος σύνθεσης ChNPs

Σε 10 mL χιτοζάνης (0.5g χιτοζάνης διαλυτοποιημένης σε διάλυμα οξικού οξέος 1% (w/v)), το pH ρυθμίζεται σε 5.0, προσθέτοντας στάγδην 2 M υδροξείδιο του νατρίου. Στο διάλυμα χιτοζάνης προστίθεται <u>λυοφυλιωμένο</u> aq.OLE και το μείγμα επωάζεται για 30 min.
Στη συνέχεια, 10 mL διαλύματος TPP (0.1% w/v) προστίθενται στο μείγμα και αφήνεται για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 9,500 rpm για 30 min και πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με υπερκάθαρο νερό. Από την πρώτη φυγοκέντρηση φυλάσσονται 2 mL υπερκειμένου για προσδιορισμό ολικών φαινολικών και τη λήψη φασμάτων ορατού-υπεριώδους. Στη συνέχεια, τα NPs τοποθετούνται για λυοφυλίωση και αποθηκεύονται στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους (Εικόνα 7.6). Η διαδικασία σύνθεσης πραγματοποιείται επίσης χωρίς το βήμα προσθήκης εκχυλίσματος ή TPP (Özdamar et al., 2023).



Εικόνα 7.6. Βήματα σύνθεσης ChNPs μέσω ιονικής πηκτωμάτωσης με την 1^η μέθοδο.

7.5.1.2.1. Βελτιστοποίηση σύνθεσης ChNPs

Η ικανότητα φόρτωσης των ChNPs με εκχύλισμα βελτιστοποιείται με τη διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος (0.1, 0.25, 0.5, 1.0 και 1.5% w/v), διατηρώντας σταθερή την αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP (2.5:1), το pH (5.0), τον χρόνο επώασης του εκχυλίσματος (30 min) και του TPP (60 min). Στην συνέχεια, γίνεται διερεύνηση της επίδρασης την αναλογίας μάζας χιτοζάνης: TPP (2:1, 2.5:1, 3:1, 4:1, 5:1), διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση εκχυλίσματος (0.25%), το pH (5.0), τον χρόνο επώασης του εκχυλίσματος (30 min) και του TPP (60 min). Σε κάθε περίπτωση γίνεται και το αντίστοιχο τυφλό (blank) με απουσία του TPP ή με απουσία εκχυλίσματος και φυλάσσεται ποσότητα για τον προσδιορισμό τον ολικών φαινολικών μετά την πρώτη φυγοκέντρηση.

7.5.1.3. 2^η μέθοδος σύνθεσης ChNPs

160 mg TPP προστίθενται σε 20 mL διαλύματος χιτοζάνης (0.75g χιτοζάνης διαλυτοποιημένης σε 100 mL διαλύματος οξικού οξέος 2%) και αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 30 min. Στη συνέχεια, αναπτύσσονται ChNPs με την προσθήκη σταγδήν 10 mL aq.OLE (εκχύλισμα αναλογίας φύλλων ελιάς: υπερκάθαρου νερού 1:10) σε 20 mL του μίγματος χιτοζάνης: TPP και αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 30 min. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 9,500 rpm για 20 min και πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με υπερκάθαρο νερό. Από την πρώτη φυγοκέντρηση φυλάσσονται 2 mL υπερκειμένου για προσδιορισμό ολικών φαινολικών και τη λήψη φασμάτων ορατού-υπεριώδους. Στη συνέχεια, τα NPs τοποθετούνται για λυοφυλίωση και αποθηκεύονται στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους (**Εικόνα** 7.7). Η διαδικασία πραγματοποιείται επίσης χωρίς το βήμα προσθήκης εκχυλίσματος ή TPP (Abdallah et al., 2020).



Εικόνα 7.7. Βήματα σύνθεσης ChNPs μέσω ιονικής πηκτωμάτωσης με την 2^η μέθοδο.

7.5.2. Χαρακτηρισμοί

Μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu υπολογίζονται η απόδοση ενθυλάκωσης OLE και το ποσοστό φόρτωσης OLE, μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) λαμβάνονται φάσματα που απεικονίζουν τις κορυφές των φαινολικών ενώσεων του OLE κατά τη διαδικασία σύνθεσης, ενώ περαιτέρω χαρακτηρισμός γίνεται μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR) στα ChNPs.

7.5.2.1. Απόδοση ενθυλάκωσης και ποσοστό φόρτωσης εκχυλίσματος

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ολικών φαινολικών συστατικών στη διαδικασία σύνθεσης ακολουθείται η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Σε πηγαδάκι του Elisa plate προστίθενται κατάλληλη ποσότητα του υπερκειμένου που φυλάσσονταν από την πρώτη φυγοκέντρηση της σύνθεσης των NPs με εκχύλισμα ή των αντίστοιχων υπερκειμένων σύνθεσης απουσία OLE ή TPP, 10 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και ποσότητα υπερκάθαρου νερού μέχρι τελικό όγκο 180 μL. Έπειτα από 3 min προστίθενται 20 μL ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃, 20% w/v) και ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 200 μL. Μετά από επώαση για 1 h σε σκοτάδι, μετρούνται οι απορροφήσεις των δειγμάτων στα 725 nm. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται εις διπλούν, ενώ κάθε φορά παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα (blank) απουσία του υπερκειμένου. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων στα δείγματα πραγματοποιείται με τη βοήθεια της εξίσωσης:

y=0,0391x,

όπου y είναι η απορρόφηση στα 725 nm και x η συγκέντρωση φαινολικών σε μg/mL. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της απόδοσης ενθυλάκωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού φόρτωσης εκχυλίσματος με βάση τις εξισώσεις:

% Απόδοση ενθυλάκωσης OLE =
$$\left(\frac{Da-Ds}{Da}\right)$$
 * 100
% Φόρτωση OLE = $\left(\frac{Da-Ds}{Na}\right)$ * 100,

όπου *Da* είναι η συνολική ποσότητα του εκχυλίσματος που προστίθεται στο σύστημα, *Ds* η ποσότητα του ελεύθερου εκχυλίσματος στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μετά τη σύνθεση των NPs και *Na* η συνολική ποσότητα των NPs που ζυγίζονται μετά τη λυοφυλίωση.

7.5.2.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Πραγματοποιείται λήψη φασμάτων ορατού-υπεριώδους ποσότητας των υπερκειμένων που φυλάσσονται από την πρώτη φυγοκέντρηση της σύνθεσης των NPs και των αντίστοιχων υπερκειμένων σύνθεσης απουσία TPP, αραιωμένα κατάλληλα σε υπερκάθαρο νερό για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του OLE στις δύο μεθόδους, αναλογίες μάζας χιτοζάνης: TPP και σε τελικό όγκο 1 mL. Επίσης, λαμβάνεται το φάσμα 1 mL του χρησιμοποιούμενου διαλύματος χιτοζάνης. Η λήψη του φάσματος πραγματοποιείται σε εύρος μήκους κύματος 200-800 nm (Agilent Cary 60 Spectrophotometer).

7.5.2.3. Μελέτη απελευθέρωσης εκχυλίσματος

Για τη μελέτη της απελευθέρωσης OLE (δραστική ουσία) από τα ChNPs παρασκευάζονται stocks των ChNPs 2 mg/mL σε buffer PBS με pH 5.8 και 7.4 αντίστοιχα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου σε ήπια ανάδευση. Λαμβάνονται φωτομετρήσεις των απορροφήσεων 1 mL του δείγματος σε κυψελίδα χαλαζία, στα 280 και 325 nm (Agilent Cary 60 Spectrophotometer), στους χρόνους 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 24 h. Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιείται για τα σκέτα ChNPs χωρίς ενθυλακωμένο OLE. Πριν κάθε μέτρηση πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12,000 rpm για να απομακρυνθούν τα NPs. Τέλος, για τα δείγματα στα διαφορετικά pH σχεδιάζεται διάγραμμα της απορρόφησης του δείγματος συναρτήσει του χρόνου επώασης (Agarwal, S & Verma, 2014).

7.5.2.4. Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR) των ChNPs

Πραγματοποιείται η διαδικασία με όμοιες πειραματικές συνθήκες της Ενότητας 7.4.2.2. Τα δείγματα που μελετώνται είναι η χιτοζάνη, τα ChNPs της 1^{ης} μεθόδου με συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 1.5% και αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP 5:1, τα ChNPs της 2^{ης} μεθόδου. Σε όλες τις περιπτώσεις λαμβάνονται τα φάσματα των αντίστοιχων σκέτων ChNPs χωρίς την προσθήκη του OLE.

7.5.3. Βιολογικές δράσεις

Ακολουθούν μελέτες της αντιοξειδωτικής δράσης των συντιθέμενων ChNPs μέσω του πρωτοκόλλου ABTS καθώς και αντιμικροβιακής δράσης μέσω πρωτοκόλλου υπολογισμού της MIC των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Corynebacterium glutamicum*.

7.5.3.1. Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης

7.5.3.1.1. Μέθοδος ΑΒΤS

Πραγματοποιείται η διαδικασία με όμοιες πειραματικές συνθήκες της Ενότητας 7.4.3.1.1. Τα δείγματα που μελετώνται είναι τα ChNPs της 1^ης μεθόδου με συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 1.5% και αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP 5:1, τα CHNPs της 2^ης μεθόδου. Ζυγίζονται ποσότητες 0.5, 1 και 2 mg των ChNPs και προστίθεται σταθερή ποσότητα 1 mL αντιδραστηρίου ABTS διαλύματος Γ. Η αντίδραση διεξάγεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 40 min με ήπια ανάδευση. Πριν τις μετρήσεις πραγματοποιείται φυγοκέντρηση ώστε να απομακρυνθούν τα NPs και καταγράφεται η απορρόφηση του δείγματος στα 734 nm στους χρόνους 0, 10, 20, 30 και 40 min (Athanasiou et al., 2024). Επίσης, κάθε φορά παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα (blank) απουσία των NPs. Σε όλες τις περιπτώσεις λαμβάνονται οι απορροφήσεις και των αντίστοιχων ChNPs χωρίς την προσθήκη του OLE. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται εις διπλούν. Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$AA\% = [(A_{control} - A_{\delta\epsilon i\gamma\mu\alpha\tau\circ\varsigma})/A_{control}] \times 100,$$

όπου A_{control} είναι η απορρόφηση του αραιωμένου οξειδωμένου ABTS και Α_{δείγματος} είναι η απορρόφηση του υπό μελέτη δείγματος. Τέλος, για κάθε δείγμα σχεδιάζεται διάγραμμα της % αντιοξειδωτικής δράσης συναρτήσει του χρόνου επώασης.

7.5.3.2. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης

7.5.3.2.1. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης νανοσωματιδίων σε βακτηριακά στελέχη και υπολογισμός ΜΙC (Πρωτόκολλο Β)

Πραγματοποιείται η διαδικασία με όμοιες πειραματικές συνθήκες της **Ενότητας 7.4.3.2.2**. Τα δείγματα που μελετώνται είναι τα CHNPs της 1^{ης} μεθόδου με συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 1.5% και αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP 5:1, τα ChNPs της 2^{ης} μεθόδου. Το πρωτόκολλο διαφοροποιείται μόνο στην 3^η εργαστηριακή μέρα. Ζυγίζονται ποσότητες 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 3.00 mg των ChNPs σε eppendorfs και σε αυτά προστίθενται 50 μL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB broth. Ακολουθεί ο εμβολιασμός των αραιωμένων βακτηριακών εναιωρημάτων, μεταφέροντας 50 μL σε κάθε eppendorf. Η συγκέντρωση των βακτηρίων πρέπει να είναι 10⁵-10⁶ CFU mL⁻¹. Τα δείγματα επωάζονται Ο/N στους 37 °C χωρίς ανάδευση. Σε όλες τις περιπτώσεις η μελέτη επιτελείται και για τα αντίστοιχα σκέτα ChNPs χωρίς την προσθήκη του OLE (Chakansin et al., 2022).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8. Εκχυλίσματα

Στην ενότητα αυτή παρασκευάζονται τα υγρά εκχυλίσματα από πρώτη ύλη οινολάσπη και φύλλα ελιάς.

8.1. Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Πραγματοποιείται εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων με διάλυμα αιθανόλης 70% στην περίπτωση του λυοφυλιωμένου ιζήματος οινολάσπης και με νερό στην περίπτωση τόσο του ιζήματος οινολάσπης, όσο και των φύλλων ελιάς. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει επώαση σε λουτρό υπερήχων για 20 min για το ίζημα οινολάσπης και θέρμανση στους 90 °C για 30 min για τα φύλλα ελιάς. Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης προσδιορίζεται η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 8.1.

Πίνακας 8.1. Περιεκτικότητα ολικών φαινολικών ενώσεων στα υγρά εκχυλίσματα από ίζημα οινολάσπης και φύλλα ελιάς. Το αποτέλεσμα της τελικής συγκέντρωσης φαινολικών εκφράζεται σε mg ολικών φαινολικώ/mL εκχυλίσματος.

Εκχύλισμα	Τελική συγκέντρωση ολικών φαινολικών
	(mg/mL)
αιθανολικό εκχύλισμα ιζήματος οινολάσπης (et. WL)	3.57±0.26
υδατικό εκχύλισμα ιζήματος οινολάσπης (aq. WL)	0.20
υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς (aq. OLE)	4.65±0.16

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 8.1, στην πρώτη περίπτωση παράγεται εκχύλισμα από το λυοφυλιωμένο ίζημα οινολάσπης με διαλύτη αιθανόλη 70% και με τελική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων 3.57 mg ολικών φαινολικών/mL εκχυλίσματος. Η περιεκτικότητα αυτού ήταν μεγαλύτερη κατά περίπου 18 φορές σε σύγκριση με τη δεύτερη περίπτωση, παραγωγής εκχυλίσματος με διαλύτη το νερό. Φαίνεται δηλαδή πως η διαφορά περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις των δύο εκχυλισμάτων οφείλεται στη διαφορά του διαλύτη αλλά και στη διαφορά αναλογίας στερεού αποβλήτου: διαλύτη εκχύλισης. Η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται

από τον τύπο του φυτού, το μέρος του φυτού που πρόκειται να εξαχθεί, τη φύση των βιοδραστικών ενώσεων και τη διαθεσιμότητα του διαλύτη. Σε γενικές γραμμές, πολικοί διαλύτες όπως το νερό, η μεθανόλη και η αιθανόλη χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση πολικών ενώσεων (Poojar et al., 2017). Οι Romero-Díez et al., μελέτησαν την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από ίζημα οινολάσπης ύστερα από ξήρανσή του με πλήθος διαφορετικών διαλυτών. Ο διαλύτης αιθανόλη έδωσε μεγαλύτερη περιεκτικότητα 94±8 φαινολικών/g ξηρού εκχυλίσματος εκχύλισης σε σχέση με το νερό που έδωσε 38±3 mg φαινολικών/g ξηρού εκχυλίσματος. Ωστόσο, ο συνδυασμός αιθανόλη: νερό στην αναλογία οινολάσπης: διαλύτη 75:25, βρέθηκε να είναι ο αποτελεσματικότερος διαλύτης εκχύλισης, δίνοντας εκχύλισμα με 254±24 mg φαινολικών/g ξηρού εκχυλίσματος (Romero-Díez et al., 2018).

Σε μελέτη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για την εκχύλιση οινολάσπης με σύστημα υπερήχων χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα αιθανόλης με διαφορετική περιεκτικότητα σε αιθανόλη (0, 30, 50, 70 και 100% v/v) και χρόνους εκχύλισης (2, 5, 10 και 20 min), χρησιμοποιώντας αναλογία στερεού προς διαλύτη 1:5. Το χημικό προφίλ του εκχυλίσματος οινολάσπης εξετάστηκε μέσω της ανάλυσης GC-MS. Στα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος οινολάσπης ταυτοποιήθηκαν άφθονες φαινολικές ενώσεις, που ανήκουν στις υποκατηγορίες των φαινολικών οξέων, των φλαβονοειδών και των φαινυλαιθανοειδών, όπως το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, η επικατεχίνη, η μυρικετίνη, η κερκετίνη κ.λπ. Επιβεβαιώθηκε επίσης η παρουσία γ-τοκοφερόλης, η οποία προέρχεται από την υψηλή περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες σε πολλές ποικιλίες σταφυλιών και η παρουσία τρυγικού οξέος, το οποίο αποτελεί ένα από τα κύρια οργανικά οξέα της σύνθεσης των οινολάσπης (Athanasiou et al., 2024). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με πολλές μελέτες της βιβλιογραφίας που έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα οινολάσπης αποτελούνται από άφθονες φαινολικές ενώσεις, πηγή φλαβονολών όπως η κερκετίνη, η κερκιτρίνη, η καεμφερόλη και η μυρικετίνη, πηγή ανθοκυανινών με παράγωγα των ανθοκυανιδινών δελφινιδίνη, κυανιδίνη, πετουνιδίνη, πεονιδίνη και μαλβιδίνη, αλλά και φαινολικά οξέα, με το καφεϊκό οξύ και το trans-καφταρικό οξύ να είναι οι κυρίαρχες ενώσεις (Jara-Palacios, 2019).

Όσον αφορά την τρίτη περίπτωση παράγεται το εκχύλισμα από τα φύλλα ελιάς με διαλύτη νερό και τη μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων 4.65 mg ολικών φαινολικών/mL εκχυλίσματος, διαφορά που οφείλεται στην αρχική μας πρώτη ύλη και στις διαφορετικές συνθήκες στη μέθοδο εκχύλισης. Οι Monteleone et al., σε μελέτη χρήσης του νερού ως διαλύτη για τη λήψη εκχυλισμάτων πλούσιων σε ελαιοευρωπαΐνη από φύλλα ελιάς πήραν μετά από ξήρανση περιεκτικότητα 40.31±0.08 mg καφεϊκού οξέος/g ξηρών φύλλων (Monteleone et al., 2021). Σε μελέτη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας η ανάλυση LC-MS χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των κύριων φαινολικών ουσιών στο υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς που προετοιμάστηκε με αναλογία ξηρών φύλλων ελιάς: διαλύτη νερό 1:5 και ακολούθησε βρασμός 60 min. Αναγνωρίστηκαν κυρίως γλυκοζυλιωμένες φαινόλες όπως η ελαιοευρωπαΐνη, η ελαιοευρωσίδη, η βερβασκοσίδη, η δημεθυλοελαιοευρωπαΐνη, η υδροζυτυροσόλη, γλυκοσίδη και γλυκοζίτες λουτεολίνης. Η ποσοτική ανάλυση αποκάλυψε ότι η κύρια ένωση του εκχυλίσματος είναι η ελαιοευρωπαΐνη με συγκέντρωση 86 mg/g (75,4% των φαινολικών) (Chatzikonstantinou et al., 2022). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτες της βιβλιογραφίας που έχουν περιγραφεί ότι τα φύλλα ελιάς περιέχουν μεγάλη ποικιλία φαινολικών παραγώγων, απλές φαινόλες με την υδροξυτυροσόλη ως ένα από τα κύρια συστατικά, φλαβονοειδή που μπορεί να υπάρχουν σε μορφή αγλυκόνης (κερκετίνη, απιγενίνη, λουτεολίνη-7-Ο-ρουτινοσίδη, λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοσίδη, λουτεολίνη-5-Ο-γλυκοσίδη) και σεκοϊριδοειδή με την ελαιοευρωπαΐνη να είναι η κύρια ένωση στα φύλλα της ελιάς (Rashed, 2022; Talhaoui et al., 2015).

Τα τρία αυτά εκχυλίσματα θα χρησιμοποιηθούν ως κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων και νανοσωματιδίων χιτοζάνης.

9. Σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων, χαρακτηρισμός και μελέτη βιολογικών δράσεων

9.1. Βιολογικές συνθέσεις

Στην ενότητα αυτή χρησιμοποιούνται τα υγρά εκχυλίσματα et.WL και aq.OLE για την «πράσινη» σύνθεση ZnONPs χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο Zn(CH₃COOH₂)₂·2H₂O και τα εκχυλίσματα aq.WL και aq.OLE για τη σύνθεση AgNPs χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο AgNO₃. Στην **Εικόνα 9.1** φαίνονται τα ZnONPs τα οποία είναι λευκού χρώματος από το εκχύλισμα aq.OLE (**Εικόνα 9.1***α*), από το εκχύλισμα et.WL (**Εικόνα 9.1***β*) και τα νανοσωματίδια AgNPs από το εκχύλισμα aq.OLE (**Εικόνα 9.1***α*) τα οποία είναι μαύρου χρώματος.



Εικόνα 9.1. Απεικόνιση των «πράσινων» μεταλλικών νανοσωματιδίων από τα διαφορετικά εκχυλίσματα, (a) ZnONPs από το aq.OLE, (β) ZnONPs από το et.WL, (γ) AgNPs από το aq.OLE και (δ) AgNPs από το aq.WL.

9.2. Χαρακτηρισμοί

Ακολουθούν χαρακτηρισμοί των συντιθέμενων μεταλλικών NPs μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και υπερύθρου (FT-IR) και μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM).

9.2.1. Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

9.2.1.1. Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των ZnONPs

Αρχικά, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σύνθεση των ZnONPs από τα εκχυλίσματα και να εξεταστούν τα οπτικά χαρακτηριστικά τους πραγματοποιείται φασματοσκοπία UV-Vis. Επίσης, λαμβάνονται τα φάσματα των χρησιμοποιούμενων εκχυλισμάτων. Τα φάσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.2.



Εικόνα 9.2. Φάσματα UV-Vis (α) των ZnONPs από aq. OLE και (β) των ZnONPs από et. WL.

Στα φάσματα UV-Vis καταγράφεται η μέγιστη κορυφή απορρόφησης στα 364 nm, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9.2α** για τα ZnONPs από aq. OLE και στα 358 nm, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9.2β** για τα ZnONPs από et. WL. Οι κορυφές αυτές αποτελούν ένδειξη της σύνθεσης των ZnONPs. Σε μελέτη των Hashemi et al., τα συντιθέμενα ZnONPs από εκχύλισμα *Olea europaea* επιβεβαιώθηκαν από τα μέγιστα απορρόφησης στο μήκος κύματος 370 nm (Hashemi et al., 2016), ενώ το ίδιο συμπέραναν σε μελέτη τους οι Abdelbaky et al., για τα ZnONPs χρησιμοποιώντας το εκχύλισμα του *P. Odoratissimum* (Abdelbaky et al., 2022). Η εμφάνιση της κορυφής απορρόφησης οφείλεται στο φαινόμενο SPR, δηλαδή στην ιδιότητα του επιφανειακού πλασμονικού συντονισμού των νανοσωματιδίων, η οποία εμφανίζεται λόγω των ταλαντώσεων των ελεύθερων ηλεκτρονίων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, όταν αυτά ευθυγραμμίζονται σε συντονισμό με το μήκος κύματος του ακτινοβολούμενου φωτός (Hashemi et al., 2016).

Οι κορυφές των ZnONPs διαφοροποιούνται από τις κορυφές στα 280 nm και 325 nm των αντίστοιχων χρησιμοποιούμενων εκχυλισμάτων. Το φάσμα φυτικών εκχυλισμάτων παρουσιάζει δύο κορυφές στα 280 και 325 nm, υποδεικνύοντας την παρουσία φαινολικών ενώσεων, με την πρώτη στα 280 nm να είναι χαρακτηριστική της απορρόφησης του βενζολίου των φαινολών (Aleixandre-Tudo, Jose Luis ; du Toit, et. al., 2019). Δεν καταγράφονται άλλες κορυφές στο φάσμα των ZnONPs, γεγονός που σημαίνει ότι τα βιοσυντιθέμενα NPs αποτελούν καθαρό προϊόν της σύνθεσης.

Η διαφορά στο μήκος κύματος που παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}) μεταξύ των ZnONPs από aq. OLE και et. WL, οφείλεται στη διαφορά της σύστασης του εκχυλίσματος και σηματοδοτεί αλλαγές στη μορφολογία, το μέγεθος και την επιφανειακή δομή των σωματιδίων (Basnet et al., 2018). Στη μελέτη των Hashemi et al., παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος παίζει ρόλο στη σύνθεση καθώς όταν αυξήθηκε από 20 σε 80 mL, η μέγιστη κορυφή απορρόφησης μετατοπίστηκε από τα 380 στα 370 nm (μπλε μετατόπιση). Η μετατόπιση υποδεικνύει μείωση της διαμέτρου των νανοσωματιδίων. Αυτό συμβαίνει καθώς οι διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων περιέχουν διαφορετικούς οργανικούς αναγωγικούς παράγοντες και φαινολικές ενώσεις. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων, περισσότερα βιομόρια δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες και καλύπτουν τις επιφάνειες των νανοσωματιδίων προστατεύοντάς τα από τη συσσωμάτωση, ενώ από την άλλη πλευρά, εκχύλισμα σε χαμηλές ποσότητες μπορεί να μειώσει τα ιόντα Zn²⁺, αλλά δεν προστατεύει τα νανοσωματίδια από τη συσσωμάτωση λόγω της ανεπάρκειας των βιομορίων να δράσουν ως προστατευτικοί παράγοντες (Hashemi et al., 2016).

9.2.1.2. Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των AgNPs

Προκειμένου να μελετηθούν σημαντικοί παράγοντες (συγκέντρωση άλατος, αναλογία εκχυλίσματος; νερού, pH) που επηρεάζουν τη σύνθεση των AgNPs επιλέχθηκε σαν μοντέλο το πρωτόκολλο σύνθεσης από το aq. OLE. Για να εξεταστούν τα οπτικά χαρακτηριστικά τους πραγματοποιείται φασματοσκοπία UV-Vis και τα φάσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 9.3**.



Εικόνα 9.3. Φάσματα UV-Vis των AgNPs από aq.OLE (a) με διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (1, 3, 5, 10 mM), διατηρώντας σταθερή την αναλογία όγκων εκχυλίσματος aq.OLE: νερού 1:1 και του pH 10.0, (β) με διαφορετική αναλογία εκχυλίσματος: νερού (0.06:1, 0.08:1, 0.1:1, 1:1, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση άλατος 3 mM και το pH 10.0, (γ) με διαφορετικές τιμές ρύθμισης pH (6.0, 7.0, 8.0, 10.0, 12.0), διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση άλατος 10 mM και την αναλογία όγκων εκχυλίσματος aq.OLE: νερού 1:1.

Αρχικά, σημειώνεται ότι η προσθήκη του εκχυλίσματος aq. OLE σε διάλυμα νιτρικού αργύρου άλλαξε το χρώμα του διαλύματος των AgNPs από ανοιχτό κίτρινο σε κοκκινωπόκαφέ που σηματοδοτεί τη διαδικασία της σύνθεσης των AgNPs και αυτό επιβεβαιώνεται περαιτέρω μέσω της εμφάνισης της κορυφής SPR μεταξύ 400 και 450 nm στη φασματοσκοπία, δηλαδή στην ιδιότητα του επιφανειακού πλασμονικού συντονισμού των νανοσωματιδίων. Η ίδια παρατήρηση αλλαγής χρώματος έγινε από τους Chouhan & Guleria et al., όπου χρησιμοποιήθηκε υδατικό εκχύλισμα φύλλων της *Cannabis sativa* σε διάλυμα νιτρικού αργύρου (Chouhan & Guleria, 2020). Στα γραφήματα της **Εικόνας 9.3**, παρατηρείται ότι η σύνθεση των AgNPs επηρεάζεται από τη μεταβολή των παραμέτρων που μελετήθηκαν (συγκέντρωση άλατος, αναλογία εκχυλίσματος: νερού, pH).

Η επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος νιτρικού αργύρου στη σύνθεση των AgNPs παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.3α. Παρατηρείται αύξηση του μήκους κύματος που παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση από 466 σε 473 nm με την αύξηση της συγκέντρωσης άλατος από 1 σε 3 mM, ενώ στην περίπτωση της συγκέντρωσης 10 mM η μέγιστη κορυφή εμφανίζεται στα 456 nm. Στην περίπτωση των 3 mM εμφανίζεται η κορυφή στενή, ενώ οι κορυφές των 1 και 10 mM εμφανίζονται διευρυμένες. Οι διαφορές αυτές των κορυφών οφείλονται πιθανά στη διαφορετική μορφολογία και στο μέγεθος των συντιθέμενων AgNPs. Σε μελέτη βελτιστοποίησης παραμέτρων σύνθεσης AgNPs από διάλυμα Ocimum gratissimum των Sharma et al., έχει παρατηρηθεί διευρυμένη κορυφή SPR σε συγκέντρωση νιτρικού αργύρου 1 mM που υποδεικνύει το σχηματισμό πολυδιασπασμένων AgNPs μεγάλου μεγέθους. Επίσης, επισημαίνουν ότι η θέση της κορυφής SPR εξαρτάται γενικά από το σχήμα και το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Η μέγιστη ένταση της κορυφής παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση νιτρικού αργύρου 5 mM με σταδιακή μετατόπιση του λ_{max} από 450 σε 436 nm, όταν η συγκέντρωση νιτρικού αργύρου στο μείγμα αντίδρασης αυξήθηκε από 1 σε 5 mM υποδεικνύοντας τον σχηματισμό μονοδιασπαρμένων AgNPs μικρού μεγέθους (Sharma et al., 2020).

Στην Εικόνα 9.3β, φαίνεται ότι η αλλαγή των αναλογιών του εκχυλίσματος προς το νερό στο εύρος από 0.06:1 έως 0.1:1 (v/v) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του μήκους κύματος που παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση από 448 σε 471 nm με στενές κορυφές, ενώ η αναλογία 1:1 έδωσε μέγιστο στα 456 nm με διεύρυνση της κορυφής. Δηλαδή η αναλογία εκχυλίσματος: νερού διαφοροποιεί τις κορυφές που σηματοδοτούν πιθανή διαφορετική μορφολογία και μέγεθος των συντιθέμενων AgNPs. Στη μελέτη των Chouhan & Guleria et al., η αύξηση της αναλογίας του υδατικού εκχυλίσματος προς το διάλυμα νιτρικού αργύρου από 0.005:1 σε 0.1:1 (v/v), οδήγησε σε στενή κορυφή SPR με αυξημένη ένταση που έχει μέγιστο απορρόφησης στα 412 nm, υποδεικνύοντας τη βέλτιστη παραγωγή μικρού μεγέθους και μονοδιάσπαρτων AgNPs, σε σχέση με τις άλλες εξεταζόμενες αναλογίες, η οποία αναφέρεται ότι θα μπορούσε να αποδοθεί σε μεγαλύτερο βαθμό αναγωγής στην επιφάνεια των σχηματιζόμενων πυρήνων παρουσία υψηλότερης συγκέντρωσης αναγωγικών παραγόντων (Chouhan & Guleria, 2020).

Στην Εικόνα 9.3γ, φαίνεται ότι η αύξηση του pH από 6 σε 8 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του μήκους κύματος που παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση από 471 σε 497 nm με διεύρυνση της κορυφής στο pH 8 και πιθανά μεγάλα στο μέγεθος σωματίδια. Περαιτέρω αύξηση του pH από 8 σε 11 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του μήκους κύματος που παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση από 497 σε 424 nm, που συνεπάγεται πιθανή μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Σε μελέτη σύνθεσης AgNPs με εκχύλισμα *Citrullus lanatus* των Matin et. al., εξετάστηκε το εύρος pH 6-10. Σε χαμηλό pH 6, η κορυφή συνδέθηκε με συσσωμάτωση των AgNPs και σχηματισμό μεγάλων νανοσωματιδίων που ευνοείται έναντι της πυρηνοποίησης. Υπάρχει μετατόπιση καθώς το pH αυξάνεται από pH 8 σε pH 10 λόγω της μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων. Καθώς το pH αυξάνεται, η συγκέντρωση ιόντων H⁺ στον όγκο μειώνεται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η επιφανειακή φόρτιση του σωματιδίου. Οι επιφανειακές αντιδράσεις πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης χρησιμοποιούνται για την επίτευξη τοπικής επιφανειακής φόρτισης η οποία εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων και το pH. Σε υψηλότερο pH, ο υψηλός αριθμός φαινολικών λειτουργικών ομάδων που είναι διαθέσιμες για τη δέσμευση αργύρου διευκολύνει μεγαλύτερο αριθμό ιόντων Ag⁺ να δεσμευτούν και στη συνέχεια να σχηματίσουν μεγάλο αριθμό νανοσωματιδίων με μικρότερες διαμέτρους. Δεν υπήρξε σχηματισμός AgNPs σε pH < 5, λόγω αστάθειας των νανοσωματιδίων σε όξινο pH. Το βέλτιστο pH που επιλέχθηκε για τη σύνθεση ήταν το pH 10 (Matin et al., 2019).

Τα AgNPs από το aq. OLE, που έδωσαν την καλύτερη απόδοση σε ποσότητα (17 mg) και την καλύτερη διασπορά για τις μελέτες που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια, σε συνδυασμό με τις παραπάνω παραμέτρους που εξετάστηκαν ήταν με 10 mM συγκέντρωση άλατος, 1:1 αναλογία εκχυλίσματος: νερού και pH 10. Στη συνέχεια, οι ίδιες συνθήκες χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση AgNPs από aq.WL και τα τελικά φάσματα UV-Vis των AgNPs από aq. OLE και aq. WL που θα μελετηθούν στη συνέχεια της εργασίας φαίνονται στην **Εικόνα 9.4**.



Εικόνα 9.4. Φάσματα UV-Vis (α) των επιλεγμένων AgNPs από aq. OLE και (β) των AgNPs από aq. WL, μαζί με τα αντίστοιχα χρησιμοποιούμενα εκχυλίσματα.

Στα φάσματα UV-Vis καταγράφεται η μέγιστη κορυφή απορρόφησης στα 456 nm, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.4α για τα AgNPs από aq. OLE και στα 453 nm, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.4β για τα AgNPs από aq. WL. Οι κορυφές αυτές επαληθεύουν τη σύνθεση των AgNPs και διαφοροποιούνται από τις κορυφές των αντίστοιχων χρησιμοποιούμενων εκχυλισμάτων. Η μικρή διαφορά στο μήκος κύματος που παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}) μεταξύ των AgNPs από aq. OLE και WL, οφείλεται στη διαφορά της σύστασης των εκχυλισμάτων και σηματοδοτεί αλλαγές στη μορφολογία, το μέγεθος και την επιφανειακή μικροδομή των σωματιδίων.

9.2.2. Φάσματα υπερύθρου (FT-IR) των ZnONPs και AgNPs

Στη συνέχεια μελετώνται τα δείγματα των ZnONPs και AgNPs με φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR. Τα φάσματα FT-IR των ZnONPs παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.5 και των AgNPs στην Εικόνα 9.6.



Εικόνα 9.5. Φάσματα υπερύθρου FT-IR των ZnONPs.

Τα φάσματα FT-IR των ZnONPs από aq. OLE και et. WL εμφανίζουν χαρακτηριστικές κορυφές όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9.5**. Η ευρεία κορυφή στους 3100-3600 cm⁻¹ είναι αποτέλεσμα των δονήσεων έκτασης των -OH ομάδων (Yedurkar et al., 2016). Οι μικρές κορυφές στα 2926 και 2854 cm⁻¹ που φαίνονται στο φάσμα των ZnONPs από et.WL οφείλονται στη συμμετρική δόνηση C-H των ομάδων CH₂ και CH₃ (Vijayalakshmi et al., 2016). Η κορυφή στους 1633 cm⁻¹ αντιστοιχεί στις δονήσεις έκτασης των ομάδων C=O, η κορυφή στους 1485 cm⁻¹ οφείλεται στην ασύμμετρη έκταση C-C=C του αρωματικού δακτυλίου (Fotiadou et al., 2021), ενώ η κορυφή στους 1400 cm⁻¹ είναι αποτέλεσμα δονήσεων κάμψης των -OH ομάδων και δονήσεων έκτασης των C=C δεσμών (Amutha, 2022). Η κορυφή στους 907 cm⁻¹ αντιστοιχεί στις δονήσεις κάμψης των δεσμών C-H της ομάδας των αρωματικών. Τέλος, Zn-O κορυφές δεν υπάρχουν λόγω θορύβου στην ευρύτερη περιοχή 500-700 cm⁻¹.



Εικόνα 9.6. Φάσματα υπερύθρου FT-IR των AgNPs.

Τα φάσματα FT-IR των AgNPs από aq. OLE και aq. WL εμφανίζουν χαρακτηριστικές κορυφές όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9.6**. Η ευρεία κορυφή στους 3100-3600 cm⁻¹ οφείλεται σε δονήσεις έκτασης των -OH ομάδων (Yedurkar et al., 2016). Η κορυφή στους 1657 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική των δονήσεων έκτασης καρβονυλίων από καρβοξυλικά οξέα και φαινόλες (Rout et al., 2013) και η κορυφή στους 1628 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική των δονήσεων έκτασης 1628 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική των δονήσεων έκτασης των ομάδων C=O (Fotiadou et al., 2021). Η κορυφή στους 1594 cm⁻¹ αντιστοιχεί σε δονήσεις έκτασης του διπλού δεσμού C=C από αρωματικούς δακτυλίους των φυτικών μεταβολιτών (Thirunavoukkarasu et al., 2013). Στη συνέχεια, η κορυφή στους 1392 cm⁻¹ είναι αποτέλεσμα δονήσεων έκτασης του -NO₃ που οφείλονται στα υπολείμματα του νιτρικού αργύρου (Dasaradhudu & Arunachalam Srinivasan, 2020). Οι κορυφές στους 1017 και 1071 cm⁻¹ αντιστοιχούν σε δονήσεις έκτασης των C-O από αλκοόλη, καρβοξυλικό οξύ, εστέρα και αιθέρα (Thirunavoukkarasu et al., 2013). Τέλος, η κορυφή στους 560 cm⁻¹ μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη Ag-O ή καθαρών Ag-NPs (Dasaradhudu & Arunachalam Srinivasan, 2020).

9.2.3. Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) των ZnONPs και AgNPs

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων ZnONPs και AgNPs αποκαλύπτεται μέσω μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM). Αντιπροσωπευτικές εικόνες AFM και ανάλυσης διατομής των νανοσωματιδίων παρουσιάζονται στις Εικόνες 9.7, 9.8, 9.9 και 9.10.



Εικόνα 9.7. (α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) και (β) προφίλ ανάλυσης διατομής των νανοσωματιδίων ZnONPs από aq.OLE.



Εικόνα 9.8. (α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) και (β) προφίλ ανάλυσης διατομής των νανοσωματιδίων ZnONPs από et.WL.



Εικόνα 9.9. (α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) και (β) προφίλ ανάλυσης διατομής των νανοσωματιδίων AgNPs από aq.OLE.



Εικόνα 9.10. (α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) και (β) προφίλ ανάλυσης διατομής των νανοσωματιδίων AgNPs από aq.WL.

Από τις απεικονίσεις και την ανάλυση της διατομής των νανοσωματιδίων όπως φαίνεται στις Εικόνες 9.7 και 9.8, προκύπτει το μέσο μέγεθος 5 nm για τα ZnONPs από

aq.OLE αλλά και για τα ZnONPs από et.WL, ενώ για τα AgNPs όπως φαίνεται στις **Εικόνες** 9.9 και 9.10 αποκαλύπτεται το μέσο μέγεθος 5-6 nm για τα AgNPs από aq.OLE και 7 nm για τα AgNPs από aq.WL. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη βιβλιογραφία όπου αναφέρεται ότι συνήθως, τα πράσινα συντιθέμενα NPs που περιέχουν συστατικά φυτικών εκχυλισμάτων είναι σφαιρικά, τριγωνικά, κυβικά ή εξαγωνικά με μεγέθη που κυμαίνονται μεταξύ 5-30 nm (Raghavendra et al., 2022). Σε μελέτη σύνθεσης και χαρακτηρισμού ZnONPs με τη χρήση εκχυλίσματος *Coccinia abyssinica* για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής τους δράσης προσδιόρισαν μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM) το μέσο μέγεθος σωματιδίων 10.4 nm (Safawo et al., 2018), ενώ σε μελέτη σύνθεσης ZnONPs από εκχύλισμα *Olea europaea* το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων προσδιορίστηκε στα 41 nm μέσω TEM (Hashemi et al., 2016). Σε μελέτη χρήσης ταννίνης από εκχυλίσματα σταφυλιών για την πράσινη σύνθεση AgNPs, οι εικόνες TEM υπέδειξαν ότι το μέγιστο μέγεθος των NPs είναι στην περιοχή των 15 έως 20 nm και αναφέρουν ότι για το λόγο αυτό αυξάνεται η πιθανότητα εφαρμογής τους σε διάφορες εφαρμογές (Saratale et al., 2021).

9.3. Βιολογικές δράσεις

Ακολουθούν μελέτες της αντιοξειδωτικής δράσης των συντιθέμενων μεταλλικών NPs μέσω του πρωτοκόλλου του οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺) και του φωσφομολυβδαινίου, καθώς και της αντιμικροβιακής δράσης παρατηρώντας τις καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Corynebacterium glutamicum* μετά από προ-επώαση με τον αντιμικροβιακό παράγοντα, υπολογισμού της MIC για τα δύο βακτηριακά στελέχη, και μέσω της παρατήρησης ζωνών αναστολής σε τρυβλία μετά από επώαση των βακτηρίων με τα νανοσωματίδια.

9.3.1. Αντιοξειδωτική δράση

Καμία προσέγγιση από μόνη της δεν είναι αρκετή για να αντικατοπτρίσει με ακρίβεια τον μηχανισμό δράσης όλων των αντιοξειδωτικών ενώσεων με βάση τα πρωτόκολλα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Για να αποκτηθεί μια ακριβέστερη αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών χαρακτηριστικών των υπό μελέτη δειγμάτων θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια σειρά από *in vitro* αντιοξειδωτικές μεθόδους και ένας συνδυασμός αυτών. Ως αποτέλεσμα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν το πρωτόκολλο του οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺) και του φωσφομολυβδαινίου για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των NPs.

9.3.1.1. Μέθοδος ABTS

Αρχικά, μελετάται η αντιοξειδωτική δράση των ZnONPs και AgNPs που συντέθηκαν, μέσω του πρωτοκόλλου του οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺). Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα γίνονται έπειτα από 30 min επώαση και στην **Εικόνα 9.11** φαίνονται τα διαγράμματα της % αντιοξειδωτικής δράσης συναρτήσει της συγκέντρωσης δείγματος των NPs.



Εικόνα 9.11. Αντιοξειδωτική δράση (%) των (α) ZnONPs και (β) AgNPs συναρτήσει της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος με βάση το πρωτόκολλο οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺).

Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 9.11** είναι εμφανές ότι τα ZnONPs και AgNPs εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση με το πρωτόκολλο οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺). Επίσης, φαίνεται σε όλες τις περιπτώσεις δοσο-εξαρτώμενη δράση. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των NPs στο εύρος 100 έως 1000 μg/mL για τα ZnONPs (**Εικόνα 9.11α**) και 10 έως 100 μg/mL για τα AgNPs (**Εικόνα 9.11β**), αυξάνεται η αντιοξειδωτική δράση.

Για τα ZnONPs, φαίνεται στην **Εικόνα 9.11α** ότι τα συντιθέμενα από το et. WL εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα συντιθέμενα από aq. OLE. Συγκεκριμένα σημειώνεται η δράση 47.7% στη συγκέντρωση 1000 μg/mL για τα ZnONPs, et. WL, ενώ τα ZnONPs, aq. OLE φτάνουν μόλις το 24.5% στην ίδια συγκέντρωση. Η διαφορά στη δράση τους μπορεί να αποδοθεί αρχικά στη διαφορετική επικάλυψη με δραστικές ομάδες που έχουν τα ZnONPs, καθώς προέρχονται από διαφορετικά εκχυλίσματα, αλλά και στη διαφορετική μορφολογία και μέγεθος των ZnONPs που φάνηκαν μέσω των κορυφών στα φάσματα UV-Vis. Σε μελέτη των Manimaran et al., με χρήση ZnONPs από *Pleurotus djamor* επιβεβαιώνεται το αντιοξειδωτικό δυναμικό των ZnONPs και σημειώνουν ότι οφείλεται στις βιοδραστικές ενώσεις που συμμετέχουν στη δωρεά ατόμων υδρογόνου για την αναστολή της αντίδρασης των ελευθέρων ριζών, φτάνοντας το μέγιστο ποσοστό αντιοξειδωτικής δράσης 59.30% σε συγκέντρωση 500 μg/mL των ZnONPs (Manimaran et al., 2021). Οσον αφορά τα AgNPs φαίνεται στην Εικόνα 9.11β ότι τα συντιθέμενα από το aq. OLE εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα συντιθέμενα από aq. WL. Συγκεκριμένα σημειώνεται η δράση 92.1% στη συγκέντρωση 100 µg/mL για τα AgNPs, aq. OLE, ενώ τα AgNPs, aq. WL φτάνουν το 73.1% στην ίδια συγκέντρωση. Επίσης, υπολογίζεται η τιμή IC₅₀, η οποία αντιπροσωπεύει τη δόση του δείγματος που απομακρύνει το 50% των ριζών ABTS. Για τα AgNPs, aq. OLE υπολογίστηκε 19.9 µg/mL και 52.9 µg/mL για τα AgNPs, aq. WL. Όπως και στα ZnONPs η διαφορά στη δράση των AgNPs μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική επικάλυψη με δραστικές ομάδες από τα διαφορετικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν ως κινητήρια δύναμη στη σύνθεση. Επιπλέον, θα μπορούσε να αλληλεπιδρά το κάθε ανόργανο συστατικό με διαφορετικά παράγωγα του εκχυλίσματος και γι' αυτό να βλέπουμε διαφορετική αντιοξειδωτική διαφορά. Βιβλιογραφικά, σε μελέτη των Saratale et al., χρησιμοποιήθηκε ταννίνη από εκχυλίσματα σταφυλιών για την πράσινη σύνθεση AgNPs και μέσω του πρωτοκόλλου οξειδωμένου ABTS υπολογίστηκε το IC₅₀ σε 40.9 µg/mL (Saratale et al., 2021).

9.3.1.2. Μέθοδος φωσφομολυβδαινίου

Στη συνέχεια, μελετάται η αντιοξειδωτική δράση των ZnONPs και AgNPs που συντέθηκαν, μέσω του πρωτοκόλλου του φωσφομολυβδαινίου. Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα γίνονται έπειτα από 90 min επώαση στους 95 °C και στην Εικόνα 9.12 φαίνονται τα διαγράμματα της αντιοξειδωτικής δράσης (%) συναρτήσει της συγκέντρωσης δείγματος.





Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.12, όλα τα NPs εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση με το πρωτόκολλο φωσφομολυβδαινίου. Επίσης, η αντιοξειδωτική ικανότητα των ZnONPs και AgNPs αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης των NPs σε όλες τις περιπτώσεις. Για τα ZnONPs φαίνεται στην Εικόνα 9.12α, ότι προκύπτουν παρόμοια συμπεράσματα με τα αποτελέσματα της μεθόδου ABTS. Δηλαδή τα συντιθέμενα ZnONPs από το et. WL εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα συντιθέμενα από aq. OLE. Συγκεκριμένα, σημειώνεται η δράση 85.7% στη συγκέντρωση 5 mg/mL για τα ZnONPs, et. WL, ενώ τα ZnONPs, aq. OLE φτάνουν το 80.0% στην ίδια συγκέντρωση. Βιβλιογραφικά, σε μελέτη των Hashemi et al., η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ZnONPs που συντέθηκαν από εκχύλισμα του φυτού *O.europaea* και μελετήθηκαν με το πρωτόκολλο φωσφομολυβδαινίου, αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων, ενώ η συγκέντρωση 13 mg/mL είχε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Hashemi et al., 2016).

Όσον αφορά τα AgNPs φαίνεται στην Εικόνα 9.12β, ότι τα συντιθέμενα από το aq. OLE εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα συντιθέμενα από aq. WL. Σημειώνεται η δράση 96.0% στη συγκέντρωση 0.5 mg/mL για τα AgNPs, aq. OLE, ενώ τα AgNPs, aq. WL φτάνουν το 80% στην ίδια συγκέντρωση. Βιβλιογραφικά σε μελέτη των Dhaka et al., παρασκευής και χαρακτηρισμού AgNPs που συντέθηκαν με τη μεσολάβηση του *Stachytarpheta cayennensis*, η μέγιστη παραγωγή φωσφομολυβδαινίου ήταν 68% σε συγκέντρωση 50 μg/mL, ενώ στη παρούσα μελέτη τα AgNPs με 50μg/ml φτάνουν >80%. (Dhaka et al., 2023).

Συμπερασματικά, από τα δύο πρωτοκόλλα προκύπτει ότι τα συντιθέμενα ZnONPs από το et. WL εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα συντιθέμενα από aq. OLE, ενώ το αντίστροφο ισχύει για τα AgNPs. Επιπλέον, μεταξύ των ZnONPs και των AgNPs, τα δεύτερα φαίνεται να εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις και στα δυο πρωτόκολλα, οπότε συμπεραίνουμε ότι έχουν ισχυρότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό. Η διαφορά στη δράση τους μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική φύση των NPs καθώς χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά άλατα στη σύνθεση με διαφορετική μεθοδολογία, στη διαφορετική επικάλυψη με δραστικές ομάδες που έχουν καθώς προέρχονται από διαφορετικά εκχυλίσματα και στη διαφορετική

9.3.2. Αντιμικροβιακή δράση

Πέραν της αντιοξειδωτικής δράσης μελετάται η αντιμικροβιακή δράση των ZnONPs και AgNPs με τρία πρωτόκολλα. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται είναι το BL21DE3 από το βακτήριο *Escherichia coli* και το ATCC 21253 από το *Corynebacterium glutamicum*. Το πρώτο επιλέχθηκε ως ένα κατά Gram αρνητικό κοινό βακτηριακό στέλεχος, ενώ το δεύτερο ως ένα κατά Gram θετικό βακτηριακό στέλεχος. Η δράση των μεταλλικών νανοϋλικών μελετάται και στις δύο υποκατηγορίες βακτηρίων, ώστε να γίνει εμφανές εάν

κάποια από τις ιδιότητες των συγκεκριμένων υλικών όσο αφορά την δράση τους στα βακτήρια, σχετίζεται με τις διαφορές της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος του προκαρυωτικού οργανισμού.

9.3.2.1. Αντιμικροβιακή δράση ZnONPs και AgNPs σε δυο βακτηριακά στελέχη, απουσία θρεπτικού μέσου

Στο 1° πρωτόκολλο, η αντιμικροβιακή δράση των NPs εξετάζεται έπειτα από παρακολούθηση της ανάπτυξης των δύο βακτηριακών στελεχών, αφού είχε προηγηθεί η επώασή τους με τα νανοϋλικά, απουσία θρεπτικού μέσου ανάπτυξης (LB). Κάτι τέτοιο πραγματοποιήθηκε ώστε να διατηρηθεί στοιχειομετρικά η αναλογία βακτηριακών κυττάρων και σωματιδίων νανοϋλικού, ώστε να μπορέσουν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους. Η αναλογία αυτή θα διαταρασσόταν στην περίπτωση παρουσίας θρεπτικού υλικού που θα επέτρεπε την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων. Μελετώνται η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ZnONPs και AgNPs στα επιλεγμένα βακτήρια μετά από ολονύχτια επώαση. Μετά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης προστίθεται θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και ανά μία ώρα, για διάστημα 8 ωρών, λαμβάνονται τιμές της απορρόφηση των δειγμάτων με επώαση τους στους 37 °C. Οι καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων σε συναρτήσει με το χρόνο, απουσία και παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων των NPs φαίνονται στην **Εικόνα 9.13** για τα ZnONPs και στην **Εικόνα 9.14** για τα AgNPs.



Εικόνα 9.13. Καμπύλες βακτηριακής ανάπτυξης των στελεχών E.coli και C.glutamicum, μετά από αλληλεπίδραση με ZnONPs σε συγκεντρώσεις εύρους από 0 έως 8 μg/mL, (α) βακτηριακά κύτταρα E.coli παρουσία ZnONPs από aq. OLE, (β) βακτηριακά κύτταρα E.coli παρουσία ZnONPs από et. WL, (γ) βακτηριακά κύτταρα C.glutamicum παρουσία ZnONPs από aq. OLE και (δ) βακτηριακά κύτταρα C.glutamicum παρουσία ZnONPs από et. WL.

Όπως φαίνεται από τα γραφήματα της Εικόνας 9.13, τα ZnONPs έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των βακτηριακών πληθυσμών *E.coli* και C.*glutamicum*, ενώ παράλληλα εμφανίζουν μία σχέση εξάρτησης με τη συγκέντρωση του νανοϋλικού. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των ZnONPs, τόσο μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων σε όλες τις περιπτώσεις, φτάνοντας σε πλήρη αναστολή στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ZnONPs.

Όσον αφορά τα ZnONPs από aq. OLE, όπως φαίνεται και από την Εικόνα 9.13α, τα βακτηριακά κύτταρα *E.coli* βρίσκονται ακόμα στη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης έπειτα από 3 ώρες επώασης με το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όταν η συγκέντρωση του νανοϋλικού είναι 6, 7 και 8 μg/mL, ενώ αδυνατούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν ώστε να εισέλθουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης ακόμα και μετά από 6 ώρες επώασης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όταν η συγκέντρωση του νανοϋλικού είναι 7 και 8 μg/mL. Αντίστοιχα, για τα ZnONPs από et. WL, όπως φαίνεται από την Εικόνα 9.13β, τα βακτηριακά κύτταρα *E.coli* βρίσκονται ακόμα στη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης έπειτα από 3 ώρες επώασης με το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όταν η συγκέντρωση του νανοϋλικού είναι 6, 7 και 8 μg/mL. Μετά τις 5 ώρες ανάπτυξης τα κύτταρα όταν η συγκέντρωση είναι 6 και 7 μg/mL εισέρχονται στην εκθετική φάση, ενώ αδυνατούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν μετά από 6 ώρες επώασης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όταν η συγκέντρωση του νανοϋλικού είναι 8 μg/mL.

Μετά την αλληλεπίδραση με ZnONPs από aq. OLE, όπως φαίνεται και από την **Εικόνα** 9.13γ, τα βακτηριακά κύτταρα *C.glutamicum* βρίσκονται ακόμα στη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης έπειτα από 3 ώρες επώασης με το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όταν η συγκέντρωση του νανοϋλικού είναι 4, 6, 7 και 8 μg/mL, ενώ αδυνατούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν ώστε να εισέρθουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης ακόμα και μετά από 6 ώρες επώασης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όταν η συγκέντρωση του νανοϋλικού είναι 6, 7 και 8 μg/mL. Αντίστοιχα, για τα ZnONPs από et. WL, όπως φαίνεται από την **Εικόνα 9.13δ**, τα κύτταρα *C.glutamicum* βρίσκονται ακόμα στη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης έπειτα από 3 ώρες επώασης όταν η συγκέντρωση του νανοϋλικού είναι 6, 7 και 8 μg/mL, ενώ αδυνατούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν μετά από 6 ώρες επώασης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όταν η συγκέντρωση του νανοϋλικού είναι 7 και 8 μg/mL. Επιπλέον, φαίνεται ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων *C.glutamicum* επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τον ρυθμό ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.



Εικόνα 9.14. Καμπύλες βακτηριακής ανάπτυζης των στελεχών E.coli και C.glutamicum, μετά από αλληλεπίδραση με AgNPs σε συγκεντρώσεις εύρους από 0 έως 10 μg/mL, (a) βακτηριακά κύτταρα E.coli παρουσία AgNPs από aq. OLE, (β) βακτηριακά κύτταρα E.coli παρουσία AgNPs από aq. WL, (γ) βακτηριακά κύτταρα C.glutamicum παρουσία AgNPs από aq. OLE και (δ) βακτηριακά κύτταρα C.glutamicum παρουσία AgNPs από aq. WL.

Στα γραφήματα της Εικόνας 9.14, τα AgNPs φαίνονται να έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών *E.coli* και *C.glutamicum*. Όσον αφορά τα AgNPs από aq. OLE, όπως φαίνεται από την Εικόνα 9.14α, τα βακτηριακά κύτταρα *E.coli* έπειτα από 3 ώρες επώασης με το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας έχουν εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης για όλες τις μελετώμενες συγκεντρώσεις, ωστόσο εμφανίζεται μία σχέση εξάρτησης με τη συγκέντρωση του νανοϋλικού. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των AgNPs, μειώνεται ελάχιστα ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται για τον βακτηριακό πληθυσμό *C.glutamicum* παρουσία των AgNPs από aq. OLE όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.14γ. Τα βακτηριακά κύτταρα έπειτα από 3 ώρες επώασης με το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας έχουν εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης για όλες τις μελετώμενες συγκεντρώσεις και εμφανίζεται η σχέση εξάρτησης με τη συγκέντρωση του νανοϋλικού. Σε αυτή την περίπτωση ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό.

Στα γραφήματα της Εικόνας 9.14β και 9.14δ, τα AgNPs από aq. WL φαίνονται να έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των βακτηριακών πληθυσμών *E.coli* και *C.glutamicum* στον απόλυτο βαθμό. Τα κύτταρα αδυνατούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν μετά από 8 ώρες επώασης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για όλες τις συγκεντρώσεις νανοϋλικών.

Συνεπώς, από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι τα ZnONPs και AgNPs έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των βακτηριακών πληθυσμών *E.coli* και *C.glutamicum*, επηρεάζοντας τη βιωσιμότητά τους. Για τα ZnONPs από aq. OLE και et. WL ισχύει ότι στις μεγαλύτερες μελετώμενες συγκεντρώσεις δεν παρατηρείται βακτηριακή ανάπτυξη καθώς η αλληλεπίδραση μπορεί να βλάψει την ακεραιότητα του μικροβιακού κυττάρου, με αποτέλεσμα τη διαρροή ενδοκυτταρικού περιεχομένου που καταλήγει σε κυτταρικό θάνατο (Gomaa et al., 2022). Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ZnONPs και στα AgNPs από aq. OLE υπάρχει βακτηριακή ανάπτυξη αλλά επηρεάζεται ο ρυθμός ανάπτυξης, με μία πιθανή ερμηνεία του αποτελέσματος αυτού να είναι το ότι τα NPs προκαλούν κάποιου είδους στρες στα κύτταρα με αποτέλεσμα την επιμήκυνση της λανθάνουσας φάσης αλλά μία υγιή ανάπτυξη των κυττάρων εν συνεχεία. Τα καλύτερα αποτελέσματα πλήρους αναστολής φαίνονται στην αλληλεπίδραση με AgNPs από aq. WL. Επίσης, από όλα τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται το εύρημα που αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια (*Corynebacterium glutamicum*) είναι πιο ευαίσθητα στην αναστολή σε σύγκριση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*Escherichia coli*) λόγω της δομής της μεμβράνης (Sirelkhatim et al., 2015).

9.3.2.2. Υπολογισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των ZnONPs και AgNPs για δυο βακτηριακά στελέχη

Στο 2° πρωτόκολλο, η αντιμικροβιακή δράση των ZnONPs και AgNPs εξετάζεται έπειτα από παρακολούθηση της ανάπτυξης των δύο βακτηριακών στελεχών, αφού είχε προηγηθεί η επώασή τους με τα νανοϋλικά, παρουσία θρεπτικού μέσου ανάπτυξης (LB). Η συνθήκη αυτή ύπαρξης θρεπτικού μέσου στην αλληλεπίδραση νανοϋλικών-βακτηριακών κυττάρων προσομοιάζει περισσότερο στις πραγματικές συνθήκες πιθανών εφαρμογών. Μετά από ολονύχτια επώαση με τη βοήθεια της χρωστικής ρεσαζουρίνης πραγματοποιείται οπτικά ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης - MIC (minimum inhibitory concentration). Στην ουσία πρόκειται για τη χαμηλότερη συγκέντρωση των NPs που εμποδίζει και αποτρέπει απολύτως την ανάπτυξη βακτηρίων. Το ροζ χρώμα στο δείγμα μετά την προσθήκη της χρωστικής παραπέμπει στην ύπαρξη βακτηριακής ανάπτυξης, ενώ το σκούρο μπλε σε μη βακτηριακή ανάπτυξη. Τα αποτελέσματα για την MIC του κάθε νανοϋλικού και του control-αντιβιοτικού αμπικιλλίνη παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9.1**, ενώ οι εικόνες των δειγμάτων μετά την προσθήκη της ρεσαζουρίνης που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό παρατίθενται στο τελικό **Παράρτημα**.

Δείγμα	MIC για <i>E.coli</i> (μg/mL)	MIC για <i>C.glutamicum</i> (μg/mL)
Αμπικιλλίνη	1.56	1.56
ZnONPs, aq. OLE	400	400
ZnONPs, et. WL	400	400
AgNPs, aq. OLE	100	100
AgNPs, aq. WL	100	100

Πίνακας 9.1. Τιμές MIC των δειγμάτων ZnONPs, AgNPs και της αμπικιλλίνης για τα βακτηριακά στελέχη E. coli και C.glutamicum.

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 9.1, η ΜΙC της πρότυπης ένωσης-αντιβιοτικού αμπικιλλίνη προσδιορίζεται σε 1.56 μg/mL για τα δύο στελέχη, ενώ οι τιμές ΜΙC των μελετώμενων NPs είναι υψηλότερες. Στη περίπτωση των ZnONPs από aq. OLE και et. WL

προσδιορίζονται οι τιμές MIC 400 μg/mL για τα *E.coli* και *C.glutamicum*, ενώ στην περίπτωση των AgNPs από aq. OLE και aq. WL οι συγκεντρώσεις MIC ήταν χαμηλότερες συγκριτικά με τα ZnONPs και συγκεκριμένα 100 μg/mL. Αυτό συνεπάγεται ότι για τα ZnONPs απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα ώστε να είναι δραστικά σε σχέση με τα AgNPs που εμφανίζουν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση στα δυο στελέχη.

Σε μελέτη των Gabriel et al., η αντιμικροβιακή δράση των ZnONPs από τσάι μελετήθηκε έναντι δύο αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (E.coli και S.typhimurium) και δύο θετικών κατά Gram βακτηρίων (S.aureus και B.cereus). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν αντιβακτηριακή δράση με τιμές MIC 0.31 μg/mL έναντι του S.aureus. Από την άλλη πλευρά, το S.typhimurium και ο B.cereus παρουσίασαν ανθεκτικότητα στα NPs στις δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις (MIC > 2.5 μ g/mL), ενώ το *E.coli* ήταν ευαίσθητο με τιμή MIC 0.16 μ g/mL. O θετικός έλεγχος (σιπροφλοξασίνη) έδειξε ισχυρή δραστικότητα έναντι όλων των στελεχών και οι παρατηρούμενες τιμές MIC ήταν <0.2 μg/mL έναντι των E.coli, S.typhimurium, S.aureus και B.cereus (Gabriel et al., 2024). Επίσης, βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι η αντιμικροβιακή δράση των AgNPs είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσής τους και αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους, με τα μικρότερα AgNPs να έχουν χαμηλότερη MIC. Τα AgNPs στην περιοχή μεγέθους 1-10 nm αποδείχθηκε ότι έχουν υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση, καθώς τα μικρότερα NPs είναι σε θέση να μετατοπιστούν και να διεισδύσουν στα κύτταρα πολύ ταχύτερα από τα μεγαλύτερα. Μόλις εισέλθουν στα βακτηριακά κύτταρα, τα μικρότερα NPs μπορούν εύκολα να αλληλεπιδράσουν με διάφορα κυτταρικά συστατικά με αποτέλεσμα τον βακτηριακό θάνατο. Τα AgNPs με διάμετρο 5-15 nm παρουσίασαν τετραπλάσια γαμηλότερη MIC έναντι των S. mutans (MIC = 50 μ g/mL) σε σύγκριση με τα AgNPs των 55 nm (MIC = 200 µg/mL) (Ahmed et al., 2022).

Η διαφορά αυτή της αντιμικροβιακής δράσης των μελετούμενων ZnONPs και AgNPs τόσο μεταξύ τους, όσο και με τη βιβλιογραφία μπορεί να αποδοθεί στη μορφολογία και το μέγεθος των νανοσωματιδίων, στην επιφανειακή χημεία και φορτίο τους και στις διαφορετικής πηγές εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις διαδικασίες σύνθεσης τους (Barabadi et al., 2023).

9.3.2.3. Μελέτη ζωνών αναστολής βακτηριακών πληθυσμών με AgNPs

Στο 3° πρωτόκολλο γίνεται η δοκιμή της ζώνης αναστολής που είναι κατάλληλη για τον έλεγχο των αντιμικροβιακών ουσιών που είναι ικανές να αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Μελετάται η αλληλεπίδραση των AgNPs κατά την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών *E.coli* και *C.glutamicum* σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο. Γίνεται η τοποθέτηση του δείγματος νανοϋλικού σε δίσκους μετά την επίστρωση των τρυβλίων με τα βακτήρια. Έπειτα από ολονύχτια επώαση στους 37 °C γίνεται παρατήρηση ζωνών αναστολής

βακτηρίων γύρω από τα δείγματα. Παράλληλα γίνεται η μελέτη για το θετικό control αμπικιλλίνη. Οι τιμές των ζωνών αναστολής φαίνονται στον Πίνακα 9.2, ενώ οι φωτογραφίες προσδιορισμού αυτών παρατίθενται στο τελικό Παράρτημα.

	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)		
Δείγμα	E.coli	C. glutamicum	
DMSO (αρνητικό control)	0	0	
Αμπικιλλίνη (θετικό control), 10 μg/disk	31	34	
AgNPs, aq. OLE, 10 µg/disk	8	9	
AgNPs, aq. OLE, 20 µg/disk	8	9	
AgNPs, aq. OLE, 40 µg/disk	10	10	
AgNPs, aq. WL, 10 µg/disk	10	10	
AgNPs, aq. WL, 20 µg/disk	11	11	
AgNPs, aq. WL, 40 µg/disk	11	12	

Πίνακας 9.2. Τιμές διαμέτρου ζωνών αναστολής των δειγμάτων αμπικιλλίνη και AgNPs στις διαφορετικές εζεταζόμενες συγκεντρώσεις για τα στελέχη E.coli και C.glutamicum.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 9.2 φαίνεται ότι όλα τα δείγματα AgNPs έδωσαν ζώνη αναστολής (ZOI) γύρω από τους δίσκους που είναι ενσωματωμένα με AgNPs, έναντι και των δύο εξεταζόμενων παθογόνων. Η ZOI παρουσίασε μικρή αύξηση με την αύξηση της συγκέντρωσης των AgNPs από 10 έως 40 μg/disk. Για το *E.coli*, η ZOI βρέθηκε να είναι 10 mm για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση 40 μg AgNPs aq.OLE/disk και 11 mm για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση 40 μg AgNPs aq.WL/disk. Αντίστοιχα, για το *C.glutamicum* σημειώνονται οι μετρήσεις 10 mm για τη συγκέντρωση 40 μg AgNPs aq.OLE/disk και 12 mm για τη συγκέντρωση 40 μg AgNPs aq.WL/disk. Τα αποτελέσματα της δράσης που επιτελούν τα AgNPs διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ των δυο στελεχών ανάλογα με τα ειδικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης των βακτηρίων *E.coli* και *C.glutamicum*, με το δεύτερο να είναι πιο ευαίσθητο. Οι ζώνες που μετρώνται είναι όλες μικρότερες από το θετικό control αμπικιλλίνη και συγκεκριμένα ≤14mm, οπότε τα AgNPs κατατάσσονται με βάση πρότυπους πίνακες τιμών διαμέτρου στην κατηγορία που δεν εμφανίζεται ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (Hudzicki, et. al., 2009; Microbiologie clinique, 2023). Συνολικά, τα AgNPs από aq. WL δίνουν λίγο μεγαλύτερης διαμέτρου ζώνες αναστολής σε σύγκριση με τα AgNPs από aq. OLE κάτι που οφείλεται στα διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και το μέγεθος των σωματιδίων. Βιβλιογραφικά, σε μελέτη των Bharathi et al., έχουν παρατηρηθεί παρόμοια αποτελέσματα. Συντέθηκαν με πράσινη σύνθεση AgNPs με τη μεσολάβηση βιοαποβλήτων φλούδας ακτινιδίου και μελετήθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής με την αύξηση της συγκέντρωσης των NPs. Για τον *S.aureus*, η ZOI βρέθηκε να είναι 8 mm για 10 μg/mL, 12 mm για 20 μg/mL και 14 mm για 20 μg/ mL και 16 mm για 50 μg/mL AgNPs (Bharathi et al., 2023).

Σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης, χαρακτηρισμός και μελέτη βιολογικών δράσεων

10.1. Συνθέσεις ιονικής πηκτωμάτωσης

Στην ενότητα αυτή χρησιμοποιείται το εκχύλισμα aq.OLE σε υγρή και λυοφυλιωμένη μορφή για τη σύνθεση ChNPs μέσω δύο πρωτοκόλλων ιονικής πηκτωμάτωσης. Στην πρώτη μεθοδολογία γίνεται προσθήκη της λυοφυλιωμένης μορφής εκχυλίσματος σε διάλυμα χιτοζάνης και έπειτα από επώαση 30 min γίνεται προσθήκη του ανιονικού σταυροδεσμοποιητή TPP. Αντίθετα, στη δεύτερη μεθοδολογία η σειρά προσθήκης διαφοροποιείται, με το TPP να προστίθεται αρχικά σε διάλυμα χιτοζάνης και έπειτα από επώαση 30 min γίνεται από επώαση 30 min να προσθήκης διαφοροποιείται, με το TPP να προστίθεται αρχικά σε διάλυμα χιτοζάνης και έπειτα από επώαση 30 min να προστίθεται το εκχύλισμα στην υγρή του μορφή. Στην Εικόνα 10.1 φαίνονται τα ChNPs 1^{ης} μεθοδολογίας (Εικόνα 10.1β).





Εικόνα 10.1. Απεικόνιση των συντιθέμενων ChNPs, (a) 1^{ης} μεθοδολογίας και (β) 2^{ης} μεθοδολογίας.

10.1.1. Αποδόσεις συνθέσεων

Στην 1^η μεθοδολογία η ικανότητα φόρτωσης των ChNPs με εκχύλισμα βελτιστοποιείται με τη διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος (0.1, 0.25, 0.5, 1.0 και 1.5%) και την αναλογία μάζας χιτοζάνης:TPP (2:1, 2.5:1, 3:1, 4:1, 5:1), διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση εκχυλίσματος (0.25%), το pH (5.0), τον χρόνο επώασης του εκχυλίσματος (30 min) και του TPP (60 min). Σε κάθε περίπτωση γίνεται το αντίστοιχο τυφλό (blank) απουσία του TPP και φυλάσσεται υπερκείμενο για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών που ενθυλακώθηκαν στα ChNPs μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα της απόδοσης ενθυλάκωσης εκχυλίσματος (%), της φόρτωσης εκχυλίσματος (%) και της ποσότητας των ChNPs για τη 1^η και 2^η μεθοδολογία παρουσιάζονται στον **Πίνακα** **10.1**. Επίσης, γίνεται το αντίστοιχο τυφλό (blank) απουσία εκχυλίσματος ώστε να έχουμε ChNPs σκέτα, χωρίς ενθυλάκωση εκχυλίσματος. Στην Εικόνα 10.2 φαίνονται τα ChNPs παρουσία και απουσία εκχυλίσματος.

Μέθοδος	Δείγμα	Ενθυλάκωση OLE	Φόρτωση OLE	Ποσότητα
Μεθοοος		(%)	(%)	(mg)
	OLE 0.10%	7.5	0.2	40
1 ^η μέθοδος	OLE 0.25%	45.7	5.3	36
με CS:TPP	OLE 0.50%	14.7	2.2	36.3
2.5:1	OLE 1.00%	3.8	1.2	25.3
	OLE 1.50%	6.4	6.4	10
	CS:TPP 2:1	11.5	1.2	42
1 ^η μέθοδος	CS:TPP 2.5:1	45.7	5.3	36
με OLE	CS:TPP 3:1	36.8	5.4	30
0.25%	CS:TPP 4:1	25.8	6.3	18
	CS:TPP 5:1	48.7	5.8	37
2 ^η μέθοδος	CS:TPP 0.9:1	14.7	0.5	167

Πίνακας 10.1. Τιμές απόδοσης ενθυλάκωσης εκχυλίσματος (%), φόρτωσης εκχυλίσματος (%) και ποσότητας των συντιθέμενων ChNPs για τη 1^η και 2^η μεθοδολογία.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 10.1, η συγκέντρωση του εκχυλίσματος και η αναλογία μάζας χιτοζάνης: TPP επηρεάζει τα ποσοστά ενθυλάκωσης και φόρτωσης εκχυλίσματος στα ChNPs. Για τα ChNPs της 1^{ης} μεθοδολογίας υψηλότερο ποσοστό ενθυλάκωσης OLE παρατηρείται στην περίπτωση ChNPs με OLE 0.25% και CS:TPP 5:1 με 48.7%, ενώ ακολουθούν τα ChNPs με OLE 0.25% και CS:TPP 2.5:1 με 45.7%. Το υψηλότερο ποσοστό φόρτωσης OLE εμφανίζεται στα ChNPs με OLE 1.50% και CS:TPP 2.5:1, δηλαδή στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση OLE. Τα ChNPs της 2^{ης} μεθοδολογίας δίνουν χαμηλότερες αποδόσεις με ποσοστό ενθυλάκωσης OLE 14.7% και ποσοστό φόρτωσης OLE μόλις 0.5%. Οι διαφορές μεταξύ των ChNPs 1^{ης} και 2^{ης} μεθοδολογίας οφείλονται στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες των δυο μεθοδολογιών.

Βιβλιογραφικά σε μελέτη των Ozdamar et al., πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε νανοσωματίδια χιτοζάνης ως συμπλήρωμα για την ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας. Με παρόμοιες πειραματικές συνθήκες με την 1^η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία, οι αναλύσεις έδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες σύνθεσης ήταν η αναλογία μάζας χιτοζάνης:TPP 5:1, το pH 5.0, ο χρόνος επώασης του TPP 60 min, ο χρόνος επώασης του OLE 30 min και η συγκέντρωση του OLE 0.25%. Η ικανότητα φόρτωσης του OLE σε ChNPs βρέθηκε να είναι 97.5% και η κατανομή μεγέθους των φορτωμένων με OLE νανοσωματιδίων ήταν περίπου 100 nm με μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (Özdamar et al., 2023).



Εικόνα 10.2. Απεικόνιση των συντιθέμενων ChNPs παρουσία και απουσία ΟLE για τις δυο μεθοδολογίες.

Στην Εικόνα 10.2 φαίνονται τα ChNPs παρουσία και απουσία εκχυλίσματος με τα πρώτα να φαίνονται πιο σκούρα κίτρινα κάτι που αποτελεί ένδειξη της ενθυλάκωσης εκχυλίσματος σε σύγκριση με τα σκέτα που φαίνονται λευκά. Επίσης φαίνεται η χρωματική διαφοροποίηση με την αύξηση της προσθήκης εκχυλίσματος από 0.25 σε 1.50% με τα τελευταία να παρουσιάζονται πιο σκούρα.

10.2. Χαρακτηρισμοί

Ακολουθούν χαρακτηρισμοί των συντιθέμενων ChNPs μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των υπερκειμένων σύνθεσης και υπερύθρου (FT-IR) των ChNPs.

10.2.1. Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Πραγματοποιείται λήψη φασμάτων ορατού-υπεριώδους των υπερκειμένων που φυλάσσονται από την πρώτη φυγοκέντρηση της σύνθεσης των ChNPs και των αντίστοιχων υπερκειμένων σύνθεσης απουσία TPP. Οι % μειώσεις των απορροφήσεων των κορυφών των φαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος OLE καταγράφονται στον Πίνακα 10.2 και όλα τα φάσματα UV-Vis των εξεταζόμενων δειγμάτων παρατίθενται στο τελικό Παράρτημα.

Πίνακας 10.2. Τιμές μείωσης απορρόφησης κορυφών των φαινολικών ενώσεων (%) του εκχυλίσματος ΟLE με την προσθήκη και μη του TPP στη σύνθεση ChNPs στα 280 και 325 nm.

		Μείωση	Μείωση
Μέθοδος	Δείγμα	απορρόφησης στα	απορρόφησης στα
		280 nm (%)	325 nm (%)
	OLE 0.10%	12.7	11.4
1 ^η μέθοδος	OLE 0.25%	52.9	49.9
με CS:TPP	OLE 0.50%	7.2	13.9
2.5:1	OLE 1.00%	9.6	14.0
	OLE 1.50%	28.1	32.8
	CS:TPP 2:1	52.2	51.0
1 ^η μέθοδος	CS:TPP 2.5:1	52.9	49.9
με OLE	CS:TPP 3:1	47.5	48.1
0.25%	CS:TPP 4:1	33.8	32.5
	CS:TPP 5:1	40.1	40.2
2 ^η μέθοδος	CS:TPP 0.9:1	4.4	4.8

Το φάσμα του φυτικού εκχυλίσματος OLE παρουσιάζει δύο κορυφές στα 280 και 325 nm, υποδεικνύοντας την παρουσία φαινολικών ενώσεων, με την πρώτη στα 280 nm να είναι χαρακτηριστική της απορρόφησης του βενζολίου των φαινολών (Aleixandre-Tudo, Jose Luis; du Toit, et. al., 2019). Με την προσθήκη TPP στη διαδικασία ιονικής πηκτωμάτωσης αρχίζει η σύνθεση ChNPs και η συνεπαγόμενη ενθυλάκωση OLE στα ChNPs. Από τα αποτελέσματα του **Πίνακα 10.2** φαίνεται η % μείωση των κορυφών σε υπερκείμενα που φυλλάσονται από τη σύνθεση ChNPs με OLE, μετά από προσθήκη ή μη του TPP. Σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει μείωση της απορρόφησης των κορυφών των φαινολικών στα 280 και 325 nm με την προσθήκη TPP που σηματοδοτεί τη σύνθεση ChNPs με παράλληλη ενθυλάκωση OLE και στις 2 μεθόδους. Οι μεγαλύτερες % μειώσεις απορρόφησης υφίστανται στην περίπτωση των ChNPs $1^{\eta\varsigma}$ μεθοδολογίας με OLE 0.25% και συγκεκριμένα με αναλογίες CS:TPP 2:1 με 52.2% μείωση στα 280 nm και 51.0% στα 325 nm, με CS:TPP 2.5:1 με 52.9% μείωση στα 280 nm και 49.9% στα 325 nm και με CS:TPP 3:1 με 47.5% μείωση στα 280 nm και 48.1% στα 325 nm. Συνεπώς, η συγκέντρωση OLE 0.25% σε συνδυασμό με τις αναλογίες CS:TPP 2:1, 2.5:1 και 3:1 ευνοούν την ενθυλάκωση εκχυλίσματος στα συντιθέμενα ChNPs.

10.2.2. Φάσματα υπερύθρου (FT-IR) των ChNPs

Μελετώνται τα δείγματα ChNPs της 1^{ης} μεθόδου με συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας CS:TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 1.50% και αναλογία μάζας CS:TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας CS:TPP 5:1 και τα ChNPs της 2^{ης} μεθόδου. Σε όλες τις περιπτώσεις λαμβάνονται τα φάσματα των υπερκειμένων των αντίστοιχων σκέτων ChNPs χωρίς την προσθήκη του OLE. Τα φάσματα FT-IR της χιτοζάνης και των σκέτων ChNPs εμφανίζονται στην **Εικόνα 10.3**, ενώ τα φάσματα των ChNPs με προσθήκη OLE παρουσιάζονται στην **Εικόνα 10.4**.



Εικόνα 10.3. Φάσματα υπερύθρου FT-IR της χιτοζάνης και των σκέτων ChNPs διαφορετικών αναλογιών χιτοζάνης:TPP (2.5:1 και 5:1) της 1ης και 2ης μεθοδολογίας σύνθεσης.

Το φάσμα της χιτοζάνης εμφανίζει χαρακτηριστικές κορυφές όπως φαίνεται στην Εικόνα 10.3. Η ευρεία κορυφή στους 3447 cm⁻¹ είναι αποτέλεσμα των δονήσεων έκτασης των -NH₂ και -OH ομάδων (Lustriane et al., 2018). Η κορυφή στους 1657 cm⁻¹ αντιστοιχεί στις δονήσεις έκτασεις C=O του αμιδικού δεσμού (-CONH₂, Amide I) και η κορυφή στους 1598 cm⁻¹ οφείλεται στις δονήσεις των -NH₂ ομάδων(Lustriane et al., 2018). Οι κορυφές στους 1422 και 1382 cm⁻¹ οφείλονται στις δονήσεις κάμψεις των -CH και -OH ομάδων, αντίστοιχα (Yasmeen et al., 2016). Η μικρή κορυφή στους 1156 cm⁻¹ είναι αποτέλεσμα των αντισυμμετρικών δονήσεων έκτασης των C-O-C δεσμών (Yasmeen et al., 2016). Τέλος, οι κορυφές στους 1078 και 1029 cm⁻¹ οφείλονται σε σκελετικές δονήσεις που περιλαμβάνει και τις δονήσεις των δεσμών C-O (Yasmeen et al., 2016), ενώ η κορυφή στους 895 cm⁻¹ αντιστοιχεί στους δεσμούς -CH που κάμπτονται έξω από το επίπεδο του δακτυλίου των μονοσακχαριτών (Queiroz et al., 2015).

Τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, ανεξάρτητα με τον τρόπο σύνθεσης, παρουσιάζουν τις χαρακτηριστικές κορυφές της χιτοζάνης, ενώ αλλαγές παρατηρούνται σε συγκεκριμένες κορυφές του αρχικού υλικού (**Εικόνα 10.3**). Η πιο σημαντική αλλαγή είναι η μετατόπιση της κορυφής της χιτοζάνης από τους 1598 cm⁻¹ στους 1545 cm⁻¹ στην περίπτωση των νανοσωματιδίων αποτέλεσμα που μπορεί να αποδοθεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NH₃⁺ ομάδων της χιτοζάνης και των φωσφορικών ομάδων του TPP κατά τη δημιουργία σύνθεσης των νανοσωματιδίων (Lustriane et al., 2018). Επιπλέον, εμφανίζεται μια νέα κορυφή στους 1240 cm⁻¹ η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στις δονήσεις έκτασης των P=O ομάδων του TPP, γεγονός που αποδεικνύει την ενσωμάτωση του TPP στη δομή των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (de Carvalho et al., 2019).



Εικόνα 10.4. Φάσματα υπερύθρου FT-IR των ChNPs με και χωρίς προσθήκη OLE, (A) διαφορετικών συγκεντρώσεων προσθήκης OLE (0.25 και 1.50% OLE) της 1^{ης} μεθοδολογίας, (B) διαφορετικών αναλογιών χιτοζάνης: TPP (2.5:1 και 5:1) της 1^{ης} μεθοδολογίας και (Γ) της 2ης μεθοδολογίας σύνθεσης.

Τα φάσματα FTIR των νανοσωματιδίων χιτοζάνης με OLE δεν παρουσιάζουν πολύ μεγάλες διαφορές σε σχέση με τα σκέτα νανοσωματίδια όπως φαίνεται στην Εικόνα 10.4. Στην περίπτωση της 1^{ης} μεθόδου παρασκευής των νανοσωματιδίων με OLE (Εικόνες 10.4A και 10.4B), φαίνεται μία αύξηση στην κορυφή στους 1385 cm⁻¹ όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος OLE, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στις δονήσεις έκτασης των C-O δεσμών των καρβοξυλομάδων των φαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος (Athanasiou et al., 2024). Αντίθετα, στη περίπτωση της 2^{ης} μεθόδου παρασκευής των νανοσωματιδίων με OLE (Εικόνα 10.4Γ), δεν εμφανίζεται καμία διαφοροποίηση του φάσματος μετά την εισαγωγή του εκχυλίσματος στα νανοσωματίδια χιτοζάνης.

10.2.3. Μελέτη απελευθέρωσης εκχυλίσματος από τα ChNPs

Για την μελέτη της απελευθέρωσης OLE από τα ChNPs γίνεται μελέτη σε δύο τιμές pH 5.8 και 7.4 ώστε να συσχετιστεί η συμπεριφορά με τις συνθήκες σε βιολογικά συστήματα. Τα δείγματα των ChNPs επωάζονται σε buffer με ρυθμισμένο pH σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση και λαμβάνονται φωτομετρήσεις των απορροφήσεων στα 280 και 325 nm


στους χρόνους 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 και 24 h. Στις Εικόνα 10.5, 10.6 και 10.7 φαίνονται τα διάγραμμα της απελευθέρωσης OLE (%) των δειγμάτων συναρτήσει του χρόνου επώασης.

Εικόνα 10.5. Διαγράμματα απορρόφησης του απελευθερωμένου OLE από τα ChNPs της $1^{\eta_{\rm C}}$ μεθοδολογίας που συντίθενται με διαφορετικές συγκεντρώσεις OLE (0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 % OLE) διατηρώντας σταθερή την αναλογία CS:TPP 2.5:1, (α) σε pH 5.8 στα 280 nm, (β) σε pH 5.8 στα 325 nm, (γ) σε pH 7.4 στα 280 nm και (δ) σε pH 7.4 στα 325 nm.



Εικόνα 10.6. Διαγράμματα απορρόφησης του απελευθερωμένου OLE από τα ChNPs της $1^{\eta\varsigma}$ μεθοδολογίας που συντίθενται με διαφορετικές αναλογίες CS:TPP (2:1, 2.5:1, 3:1, 4:1, 5:1) διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση 0.25% OLE, (α) σε pH 5.8 στα 280 nm, (β) σε pH 5.8 στα 325 nm, (γ) σε pH 7.4 στα 280 nm και (δ) σε pH 7.4 στα 325 nm.



Εικόνα 10.7. Διαγράμματα απορρόφησης του απελευθερωμένου OLE από τα ChNPs της $2^{\eta\varsigma}$ μεθοδολογίας που συντίθενται (α) σε pH 5.8 και 7.4 στα 280 nm, (β) σε pH 5.8 και 7.4 στα 325 nm.

Το εκχύλισμα OLE που ενθυλακώνεται στα ChNPs αποτελεί τη δραστική ουσία που πρέπει να απελευθερωθεί από αυτά για να δράσει στις διάφορες πιθανές εφαρμογές. Από τα διαγράμματα των **Εικονών 10.5, 10.6 και 10.7** φαίνεται ότι σε όλα τα ChNPs των διαφορετικών συγκεντρώσεων ενθυλάκωσης OLE και αναλογιών CS: TPP που μελετώνται υπάρχει απελευθέρωση του εκχυλίσματος καθώς καταγράφεται απορρόφηση στα 280 και 325 nm, δηλαδή στα μήκη κύματος που υποδεικνύουν την παρουσία φαινολικών ενώσεων στο buffer. Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε για τα σκέτα ChNPs, χωρίς ενθυλακωμένο OLE στα οποία δεν καταγράφηκε απελευθέρωση.

Σε όλες τις περιπτώσεις των Εικονών 10.5 και 10.6, παρουσιάζεται απελευθέρωση του OLE από τα ChNPs σε μεγάλο ποσοστό. Το μεγαλύτερο ποσοστό απελευθέρωσης από την πρώτη 0.5 h μεταξύ των δειγμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων OLE καταγράφεται για τα ChNPs με 1.50% OLE, ενώ μεταξύ των δειγμάτων διαφορετικών αναλογιών CS:TPP καταγράφεται για τα ChNPs με CS:TPP 5:1. Ωστόσο, φαίνεται ότι ο παράγοντας αναλογία CS:TPP επηρεάζει την απελευθέρωση με τα ChNPs των αναλογιών 2:1 και 3:1 να έχουν πιο αργή απελευθέρωση και στις δύο τιμές pH. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι η απορρόφηση του κάθε δείγματος εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση OLE και την αναλογία CS:TPP στη σύνθεση των ChNPs της $1^{\eta\varsigma}$ μεθοδολογίας. Με την αύξηση της συγκέντρωση OLE ή της αναλογίας CS:TPP παρουσιάζονται υψηλότερες τιμές απορροφήσεων των φαινολικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, για τις μελετώμενες συγκεντρώσεις ΟLE οι υψηλότερες τιμές απορρόφησης άρα ποσότητας OLE και στα δύο εξεταζόμενα pH, καταγράφονται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 1.50% OLE, ενώ στη μελέτη των αναλογιών CS:TPP οι μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης παρατηρούνται στις αναλογίες 4:1 και 5:1. Τόσο στο όξινο pH (pH 5.8) όσο και στο φυσιολογικό pH των κυττάρων (pH 7.4) το πρότυπο απελευθέρωσης παρουσιάζει δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση γίνεται μεγάλη απελευθέρωση του OLE από την 0.5 h και ακολουθεί η δεύτερη φάση όπου για τις επόμενες 24 h καταγράφεται μικρή απελευθέρωση. Η πρώτη φάση της αρχικής έκρηξης απελευθέρωσης ουσίας μπορεί να αποδοθεί στην ενισχυμένη διάλυση της δραστικής ουσίας, ενώ η δεύτερη αποτελεί την επακόλουθη διάχυση και μπορεί να αποδοθεί στην αργή αποικοδόμηση/διάβρωση των νανοσωματιδίων μέσω ενυδάτωσης με υδρόλυση (Agarwal, S & Verma, et al., 2014).

Στην Εικόνα 10.7, παρουσιάζεται η απελευθέρωση του OLE (%) από τα ChNPs της 2^{ης} μεθοδολογίας. Παρομοίως με τα ChNPs της 1^{ης} μεθοδολογίας παρατηρείται τόσο στο όξινο pH (pH 5.8) όσο και στο φυσιολογικό pH των οργανισμών (pH 7.4) ότι το πρότυπο απελευθέρωση παρουσιάζει δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση γίνεται μεγάλη απελευθέρωση του OLE από την 0.5 h και ακολουθεί η δεύτερη φάση όπου για τις επόμενες 24 h καταγράφεται μικρή απελευθέρωση. Όπως φαίνεται από όλα τα παραπάνω γραφήματα, θα έπρεπε μελλοντικά να γίνει εστίαση στο χρονικό διάστημα 0-0.5 h στα ChNPs των 2 μεθόδων σύνθεσης.

Βιβλιογραφικά καταγράφονται παρόμοια αποτελέσματα της αρχικής εκρητικής φάσης με επακόλουθη διάχυση σε δεύτερη φάση. Σε μελέτη παρατήρησαν την κινητική απελευθέρωσης της δοξορουβικίνης (DOX) από ChNPs σε διάφορα pH για να εξακριβωθεί ο μηχανισμός απελευθέρωσής της. Στο φυσιολογικό pH (pH 7.4) το πρότυπο απελευθέρωσης ήταν δυο φάσεων με απελευθέρωση ~20% κατά την πρώτη ώρα, που έφθασε το ~30% στις επόμενες τέσσερις ώρες. Ενώ στη δεύτερη φάση, παρατηρήθηκε ελεγχόμενη απελευθέρωση ~80% έως και 24 ώρες. Στο όξινο pH (pH 5.8) το μοτίβο απελευθέρωσης ήταν και πάλι δύο φάσεων με ~19% απελευθέρωση την πρώτη ώρα και όχι μεγάλη αύξηση (~23%) στις επόμενες τέσσερις ώρες, ενώ στη δεύτερη φάση παρατηρήθηκε ελεγχόμενη απελευθέρωση ~76% έως και 24 ώρες (Agarwal, S & Verma, et al., 2014). Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε η απελευθέρωση της αλενδρονάτης (ALD) από ChNPs. Η απελευθέρωση του φαρμάκου ήταν σαφώς εξαρτώμενη από το pH, με απελευθέρωση της ALD ταχύτερα στο όξινο pH από την απελευθέρωση που επιτεύχθηκε σε PBS (pH 6.8). Σε όξινο pH (0.1N HCl), σχεδόν το 80% του φαρμάκου απελευθερώθηκε εντός 60 min, ενώ σε PBS (pH 6.8) απελευθερώθηκε το μέγιστο 40% του φαρμάκου σε 4 ώρες (Miladi et al., 2015).

10.3. Βιολογικές δράσεις

Ακολουθούν μελέτες της αντιοξειδωτικής δράσης των συντιθέμενων ChNPs μέσω του πρωτοκόλλου ABTS καθώς και της αντιμικροβιακής δράσης μέσω πρωτοκόλλου υπολογισμού της MIC έναντι των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Corynebacterium*. Τα δείγματα που μελετώνται είναι τα ChNPs της 1^{ης} μεθόδου με συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας CS:TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 1.5% και αναλογία μάζας CS:TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 1.5% και αναλογία μάζας CS:TPP 2.5:1, συγκέντρωση OLE 0.25% και αναλογία μάζας CS:TPP 5:1, ώστε να ελεγχθεί πως επηρεάζεται η δράση με διαφορετική συγκέντρωση OLE και αναλογία CS:TPP και τα ChNPs της 2^{ης} μεθόδου, ώστε να ελεγχθεί πως επηρεάζεται η δράση με τη διαφορετική μεθοδολογία σύνθεσης. Τα ChNPs της 1^{ης} μεθόδου επιλέχθηκαν με βάση το % ενθυλακωμένο OLE και την % φόρτωση OLE που παρουσιάστηκαν στην **Ενότητα 10.1.1**. Επίσης σε κάθε περίπτωση γίνεται σύγκριση με τα αντίστοιχα σκέτα ChNPs απουσία OLE.

10.3.1. Αντιοξειδωτική δράση

10.3.1.1. Μέθοδος ABTS

Μελετάται η αντιοξειδωτική δράση των ChNPs, μέσω του πρωτοκόλλου του οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺). Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα γίνονται στους χρόνους επώασης 0, 10, 20, 30 και 40 min και στην **Εικόνα 10.8** φαίνονται τα διαγράμματα της % αντιοξειδωτικής δράσης συναρτήσει του χρόνου επώασης. Για κάθε εξεταζόμενο δείγμα ChNPs με OLE γίνονται οι μελέτες για τα αντίστοιχα σκέτα ChNPs χωρίς ενθυλακωμένο OLE (blank).



Εικόνα 10.8. Αντιοξειδωτική δράση (%) των (α) ChNPs 1^{ης} μεθοδολογίας με 0.25% OLE και CS:TPP 2.5:1, (β) ChNPs 1^{ης} μεθοδολογίας με 1.50% OLE και CS:TPP 2.5:1, (γ) ChNPs 1^{ης} μεθοδολογίας με 0.25% OLE και CS:TPP 5:1 και (δ) ChNPs 2^{ης} μεθοδολογίας με OLE και CS:TPP 0.9:1, συναρτήσει του χρόνου επώασης του κάθε δείγματος με βάση το πρωτόκολλο οζειδωμένου ABTS (ABTS⁺). Σε κάθε περίπτωση απεικονίζεται η % αντιοξειδωτική δράση των αντίστοιχων σκέτων ChNPs (blank) απουσία OLE. Για τα ChNPs με OLE τα δείγματα εκφράζονται ως προς τη συγκέντρωση μg/mL TPC του OLE που περιέχουν.

Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 10.8** είναι εμφανές ότι όλα τα ChNPs με OLE ή χωρίς (blank) εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση με το πρωτόκολλο οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺). Επίσης, φαίνεται σε όλες τις περιπτώσεις ότι υπάρχει εξάρτηση από τη συγκέντρωση των ChNPs. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση, αυξάνει η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων που απελευθερώνονται και βελτιώνεται η αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, όταν υπάρχει ενθυλακωμένο OLE στα ChNPs απελευθερώνεται με περαιτέρω βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης σε σχέση με τα σκέτα ChNPs. Άρα βελτιώνεται η υπάρχουσα δράση της χιτοζάνης. Η εξάλειψη του ABTS μέσω της δράσης της χιτοζάνης και του εκχυλίσματος μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι απομακρύνεται η ρίζα μέσω της δράσης του αζώτου στον απλό δεσμό -NH₂ και μέσω της δράσης του H⁺ στο -NH3⁺. Οι ομάδες -OH της χιτοζάνης και

του εκχυλίσματος μπορούν επίσης να επηρεάσουν την εξάλειψη αυτών των ελεύθερων ριζών μέσω του μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων (Tuesta-chavez et al., 2022).

Συγκεκριμένα για τα ChNPs της 1^{ης} μεθοδολογίας, φαίνεται στις **Εικόνες 10.8α και 10.8β** πως η διαφορετική συγκέντρωση OLE 0.25% και 1.50% επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση. Τα συντιθέμενα ChNPs με 1.50% OLE εμφανίζουν συνολικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στις ίδιες μελετώμενες συγκεντρώσεις νανοϋλικού (mg/mL ChNPs) σε σύγκριση με τα συντιθέμενα από 0.25% OLE. Σημειώνεται έτσι η δράση 93.1% στη συγκέντρωση 2 mg/mL για τα ChNPs με 1.50% ήδη από τα πρώτα 10 min επώασης, η οποία διατηρείται μέχρι τα 40 min, ενώ τα ChNPs με 0.25% στην ίδια ποσότητα φτάνουν το 82.1% στα 40 min. Η διαφορά στη δράση τους μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική συγκέντρωση ενθυλακωμένου εκχυλίσματος στην ίδια μελετώμενη ποσότητα ChNPs. Στα ChNPs με 0.25% OLE μετρήθηκε συγκέντρωση 5.28 μg/mL TPC, ενώ συγκέντρωση 8.60 μg/mL TPC μετρήθηκε στα ChNPs με 1.50% OLE.

Ακόμη για τα ChNPs της $1^{\eta\varsigma}$ μεθοδολογίας, φαίνεται στις **Εικόνες 10.8α και 10.8**γ πως η διαφορετική αναλογία CS:TPP επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση. Τα συντιθέμενα ChNPs με CS:TPP 5:1 εμφανίζουν συνολικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στις ίδιες μελετώμενες συγκεντρώσεις νανοϋλικού (mg/mL ChNPs) σε σύγκριση με τα συντιθέμενα από CS:TPP 2.5:1. Αυτό ισχύει τόσο μεταξύ των ChNPs που περιέχουν OLE, όσο και μεταξύ των σκέτων ChNPs. Ενδεικτικά, για τα ChNPs με ενθυλακωμένο OLE σημειώνεται η δράση 86.9% στη συγκέντρωση 2 mg/mL (5.95 μg/mL TPC) για τα ChNPs με CS:TPP 5:1 στα 30 min επώασης, ενώ τα ChNPs με 2.5:1 στην ίδια συγκέντρωση 2 mg/mL (5.28 μg/mL TPC) φτάνουν το 70.9% στον ίδιο χρόνο. Σε αυτή την περίπτωση η διαφορά στη δράση τους οφείλεται στην διαφορετική αναλογία CS:TPP, καθώς όσον αφορά τη συγκέντρωση TPC περιέχεται παρόμοια συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στα δύο είδη νανοϋλικού.

Για τα ChNPs της 2^{ης} μεθοδολογίας, φαίνεται στην **Εικόνα 10.8δ** πως και σε αυτή τη περίπτωση το ενθυλακωμένο OLE στα ChNPs απελευθερώνεται με εντυπωσιακή βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης σε σχέση με τα σκέτα ChNPs. Συγκεκριμένα, σημειώνεται η δράση 89.0% στη συγκέντρωση 2 mg/mL (0.48 μg/mL TPC) για τα ChNPs με OLE στα 40 min επώασης, ενώ τα σκέτα ChNPs στην ίδια συγκέντρωση φτάνουν το 16.5% στα 40 min. Στην περίπτωση της 2^{ης} μεθοδολογίας υπάρχει μικρότερη συγκέντρωση ενθυλακωμένων φαινολικών ενώσεων εκχυλίσματος σε σχέση με την υπολογισμένη συγκέντρωση στην ίδια ποσότητα NPs στην 1^η μεθοδολογία, ωστόσο εμφανίζεται ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και σε αυτά. Αυτό πιθανά οφείλεται στη διαφορετική μορφολογία των ChNPs και στον διαφορετικό τρόπο ενθυλάκωσης του εκχυλίσματος καθώς στα δυο πρωτόκολλα το εκχύλισμα προστέθηκε σε διαφορετικούς χρόνους και μορφή. Βιβλιογραφικά, έχουν καταγραφεί αποτελέσματα όπου η συγκέντρωση ενθυλακωμένων φαινολικών ενώσεων σε ChNPs επηρεάζουν την αντιοξειδωτική δράση. Σε μελέτη αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρασκευασμένων ChNPs φορτωμένων με υγρό καπνό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο οξειδωμένου ABTS (ABTS^{+†}). Για τα νανοσωματίδια είχαν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές ποσότητες υγρού καπνού στη σύνθεση (F'1, F'2, F'3 και F'4 τύπος). Τα F'1 εμφάνισαν δράση 89.0%, ενώ τα F'2 93.0%. Αναφέρεται ότι όταν πραγματοποιήθηκε η δοκιμή Folin-Ciocalteu, τα F'2 βρέθηκαν να παρουσιάζουν ποσότητα 42 μg/mL φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με 39,35 μg/mL στα F'1. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα F'2 είχαν μεγαλύτερη διάμετρο σωματιδίων σε σύγκριση με το F'1 (204.9 και 186 nm, αντίστοιχα). Η διαφορά αυτή δείχνει ότι υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας σε φορτισμένα φαινολικά συστατικά και της διαμέτρου των νανοσωματιδίων (Tuesta-chavez et al., 2022).

10.3.2. Αντιμικροβιακή δράση

10.3.2.1. Υπολογισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των ChNPs για δυο βακτηριακά στελέχη

Η αντιμικροβιακή δράση των ChNPs εξετάζεται έπειτα από παρακολούθηση της ανάπτυξης των δύο βακτηριακών στελεχών, αφού είχε προηγηθεί η επώασή τους με τα νανοϋλικά, παρουσία θρεπτικού μέσου ανάπτυξης (LB) για τον υπολογισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης-MIC. Τα αποτελέσματα για τη MIC του κάθε δείγματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.3.

Δείγμα	MIC για <i>E.coli</i>	MIC για C.glutamicum
ChNPS 1 ^η μέθοδος,	_	_
CS:TPP 2.5:1, απουσία OLE		
ChNPs 1 ^η μέθοδος,	_	<u>_</u>
CS:TPP 2.5:1, 0.25% OLE		
ChNPs 1 ^η μέθοδος,		3 mg
CS:TPP 2.5:1, 1.50% OLE	-	(12.90 µg/mL TPC)
ChNPs 1 ^η μέθοδος,	2 mg	1.5 mg
CS:TPP 5:1, απουσία OLE	5 mg	1.5 mg
ChNPs 1 ^η μέθοδος,	3 mg ή	3 mg ή
CS:TPP 5:1, 0.25% OLE	(8.92 µg/mL TPC)	(8.92 µg/mL TPC)
ChNPs 2 ^η μέθοδος, απουσία OLE	3 mg	1.5 mg
ChNPs 2 ^η μέθοδος	3 mg ή	3 mg ή
με OLE	(0.72 µg/mL TPC)	(0.72 µg/mL TPC)

Πίνακας 10.3. Τιμές ΜΙC των εξεταζόμενων δειγμάτων ChNPs παρουσία και απουσία ενθυλακωμένου OLE για τα βακτηριακά στελέχη E. coli και C.glutamicum. Για τα ChNPs με OLE τα δείγματα εκφράζονται και ως προς τη συγκέντρωση μg/mL TPC του OLE που περιέχουν.

Οπως φαίνεται από τον Πίνακα 10.3, τα ChNPs της 1^{ης} μεθοδολογίας με CS:TPP 2.5:1 σκέτα ή με 0.25% OLE δεν εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση πιθανά λόγω της χαμηλής συγκέντρωση χιτοζάνης και ενθυλακωμένων φαινολικών ενώσεων εκχυλίσματος. Στην περίπτωση όπου αυξήθηκε η συγκέντρωση OLE 1.50% εμφανίστηκε αντιμικροβιακή δράση με MIC 12.90 μg/mL TPC μόνο έναντι του *C.glutamicum*, καθώς είναι πιο ευαίσθητο σε σχέση με το *E.coli*. Με αύξηση της αναλογίας CS:TPP σε 5:1 τα σκέτα και με OLE ChNPs εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι και των δυο παθογόνων βακτηριακών στελεχών. Η MIC για τα ChNPs με CS:TPP 5:1 και 0.25% OLE είναι 8.92 μg/mL TPC. Επίσης, τα σκέτα και με OLE ChNPs της 2^{ης} μεθοδολογίας εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι και των δυο παθογόνων βακτηριακών στελεχών, με τη MIC για τα ChNPs με OLE να είναι μόλις 0.72 μg/mL TPC. Η διαφορά στις MIC μεταξύ των ChNPs της 1^{ης} και 2^{ης} μεθοδολογίας πιθανά μπορούν να

αποδοθούν στη διαφορετική μορφολογία των νανοϋλικών και στο διαφορετικό τρόπο που δεσμεύονται τα φαινολικά συστατικά σε αυτά. Ο μηχανισμός που αφορά την αντιμικροβιακή δράση των ChNPs σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις που αφορούν την πολυκατιονική δομή της χιτοζάνης και τις ανιονικές ομάδες που βρίσκονται στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου, οι οποίες προκαλούν μεταβολές στο κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις που αφοράτην αντιμικροβιακή διαμήταρου, οι οποίες προκαλούν μεταβολές στο κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων ή στην εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν την πολυκατιονική δομή της χιτοζάνης και τις ανιονικές ομάδες διευκολύνουν τη διαπερατότητα των νανοσωματιδίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, οδηγώντας στην απώλεια βασικών συστατικών όπως ένζυμα, νουκλεοτίδια, ιόντα και στο θάνατο του βακτηριακού κυττάρου. Από την άλλη πλευρά, οι φαινολικές ενώσεις του εκχυλίσματος τείνουν να διεισδύουν στα μικροβιακά κύτταρα, προκαλώντας λύση και θάνατο των μικροοργανισμών (Tuesta-chavez et al., 2022).

Βιβλιογραφικά παρατηρείται ότι η ενθυλάκωση δραστικής ουσίας αυξάνει την αντιμικροβιακή δράση επιτρέποντας στα βακτήρια να έρθουν σε επαφή με μεγαλύτερη επιφάνεια. Σε μελέτη αξιολόγησης της αντιμικροβιακής ικανότητας παρασκευασμένων ChNPs φορτωμένων με υγρό καπνό (LS) προσδιορίστηκαν οι ποσοστιαίες MIC έναντι Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Για τα ChNPs είχαν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές ποσότητες υγρού καπνού στη σύνθεση (F'1, F'2, F'3 και F'4 τύπος). Τα επεξεργασμένα δείγματα F'1, F'2 και F'4 ανέστειλαν την ανάπτυξη του Gram αρνητικού *E coli* στη συγκέντρωση 50%, ενώ το F'3 ανέστειλε την ανάπτυξη στη συγκέντρωση 25%. Επίσης, τα επεξεργασμένα δείγματα F'1, F'2 και F'4 ανέστειλαν την ανάπτυξη του Gram θετικού B.cereus στη συγκέντρωση 6.25%, ενώ το F'3 ανέστειλε την ανάπτυξη του βακτηρίου στη συγκέντρωση 12,5%. Αναφέρουν ότι το κυτταρικό τοίχωμα των Gram θετικών βακτηρίων αποτελείται από ένα παχύ και απλό στρώμα πεπτιδογλυκάνης, το οποίο το καθιστά πιο επιρρεπές στην αντιμικροβιακή δράση του LS και της χιτοζάνης. Αντίθετα, το κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων αποτελείται από πολλά λεπτά και πολύπλοκα στρώματα, συμπεριλαμβανομένης μιας εξωτερικής μεμβράνης με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, η οποία το προστατεύει από τη γιτοζάνη. Για τον λόγο αυτό απαιτείται υψηλότερη ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για την αναστολή των βακτηρίων E.coli (Tuesta-chavez et al., 2022).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε με σκοπό την ανάπτυξη «πράσινων» μεταλλικών νανοσωματιδίων αργύρου (Silver NPs, AgNPs) και οξειδίου του ψευδαργύρου (Zinc oxide NPs, ZnONPs) στο πρώτο μέρος, καθώς και νανοσωματίδια χιτοζάνης (Chitosan NPs, ChNPs) στο δεύτερο μέρος. Αξιοποιούνται τα εκχυλίσματα από τις πρώτες ύλες φύλλα ελιάς και οινολάσπης, τα οποία περιέχουν μακρομόρια και σημαντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που μπορούν να ανάγουν αποτελεσματικά το σθένος των χρησιμοποιούμενων μεταλλικών αλάτων για τη δημιουργία των νανοσωματιδίων. Τα συντιθέμενα νανοσωματίδια χαρακτηρίζονται μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), υπερύθρου (FT-IR) και μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM) και στη συνέχεια μελετώνται στοχευμένες βιολογικές τους δράσεις, αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή.

Πιο συγκεκριμένα στο πρώτο μέρος της εργασίας, χρησιμοποιούνται τα υγρά εκχυλίσματα aq.OLE και et.WL για τη βιολογική σύνθεση ZnONPs χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο Zn(CH₃COOH₂)₂·2H₂O και τα εκχυλίσματα aq.OLE και aq.WL για τη σύνθεση AgNPs χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο AgNO₃. Για να μελετηθούν σημαντικοί παράγοντες (συγκέντρωση άλατος, αναλογία εκχυλίσματος; νερού, pH) που επηρεάζουν τη σύνθεση των AgNPs επιλέγεται σαν μοντέλο το πρωτόκολλο σύνθεσης από το aq. OLE. Τα AgNPs από το aq. OLE και aq. WL που επιλέχθηκαν για μελέτη των δράσεων τους συντέθηκαν με συνθήκες 10 mM συγκέντρωση άλατος, 1:1 αναλογία εκχυλίσματος: νερού και pH 10.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σύνθεση των ZnONPs και AgNPs από τα εκχυλίσματα και να εξεταστούν τα οπτικά χαρακτηριστικά τους πραγματοποιείται φασματοσκοπία UV-Vis. Χαρακτηριστικές κορυφές καταγράφονται, με τη μέγιστη κορυφή απορρόφησης στα 364 nm για τα ZnONPs από aq. OLE, στα 358 nm για τα ZnONPs από et. WL, στα 456 nm για τα AgNPs από aq. OLE και στα 453 nm για τα AgNPs από aq. WL. Η διαφορά στο μήκος κύματος που παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}) οφείλεται στη διαφορά της σύστασης των εκχυλισμάτων και σηματοδοτεί αλλαγές στη μορφολογία, το μέγεθος και την επιφανειακή μικροδομή των σωματιδίων. Επιπλέον, τα μεταλλικά νανοσωματίδια μελετώνται μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου και τα φάσματα FT-IR εμφανίζουν χαρακτηριστικές κορυφές, με τα μόρια των φλαβονοειδών, των γλυκοζιτών, των πρωτεϊνών και των φαινολών να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων, ενώ μέσω της μικροσκοπίας AFM αποκαλύπτεται το μέγεθος τους που κυμαίνεται μεταξύ 5-7 nm.

Ακολουθούν μελέτες της αντιοξειδωτικής δράσης των συντιθέμενων μεταλλικών NPs μέσω του πρωτοκόλλου του οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺) και του φωσφομολυβδαινίου. Τα ZnONPs και AgNPs εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση με τα δυο πρωτόκολλα, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση των NPs. Τα συντιθέμενα ZnONPs από το et. WL εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα συντιθέμενα από aq. OLE, ενώ το αντίστροφο ισχύει για τα AgNPs. Η διαφορά στη δράση τους μπορεί να αποδοθεί στην διαφορετική φύση των NPs, στη διαφορετική επικάλυψη με δραστικές ομάδες που έχουν καθώς προέρχονται από ξεχωριστά εκχυλίσματα και στη μορφολογία και το μέγεθος τους.

Πέραν της αντιοξειδωτικής δράσης μελετάται η αντιμικροβιακή δράση των ZnONPs και AgNPs με τρία πρωτόκολλα και τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται είναι το BL21DE3 από το βακτήριο *Escherichia coli* και το ATCC 21253 από το *Corynebacterium glutamicum*. Στο πρώτο πρωτόκολλο παρατηρούνται οι καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων μετά από προ-επώαση με τον αντιμικροβιακό παράγοντα απουσία θρεπτικού μέσου. Τα ZnONPs και AgNPs έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των βακτηριακών πληθυσμών *E.coli* και *C.glutamicum*, επηρεάζοντας τη βιωσιμότητά τους. Για τα ZnONPs από aq. OLE και et. WL ισχύει ότι στις μεγαλύτερες μελετώμενες συγκεντρώσεις δεν παρατηρείται βακτηριακή ανάπτυξη καθώς οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο. Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ΖnONPs και στα AgNPs από aq. OLE υπάρχει βακτηριακή ανάπτυξη αλλά επηρεάζεται ο ρυθμός ανάπτυξης. Τα καλύτερα αποτελέσματα πλήρους αναστολής φαίνονται στην αλληλεπίδραση με AgNPs από aq. WL. Επίσης, επιβεβαιώνεται ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια (*C.glutamicum*) είναι πιο ευαίσθητα στην αναστολή σε σύγκριση με τα αρνητικά κατά Gram

Στο δεύτερο πρωτόκολλο υπολογίζεται η MIC για τα δυο βακτηριακά στελέχη. Στη περίπτωση των ZnONPs από aq. OLE και et. WL προσδιορίζονται οι τιμές MIC 400 μg/mL για τα *E.coli* και *C.glutamicum*, ενώ στην περίπτωση των AgNPs από aq. OLE και aq. WL οι συγκεντρώσεις MIC ήταν χαμηλότερες και συγκεκριμένα 100 μg/mL για τα δυο στελέχη. Στο τρίτο πρωτόκολλο γίνεται η δοκιμή της ζώνης αναστολής σε τρυβλία ανάπτυξης των βακτηρίων. Τα δείγματα AgNPs δίνουν ζώνη αναστολής (ZOI) γύρω από τους δίσκους που είναι ενσωματωμένα τα AgNPs και η διάμετρος της ζώνης εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας χρησιμοποιείται το εκχύλισμα aq.OLE σε υγρή και λυοφυλιωμένη μορφή για τη σύνθεση ChNPs μέσω δύο πρωτοκόλλων ιονικής πηκτωμάτωσης. Στην πρώτη μεθοδολογία γίνεται προσθήκη της λυοφυλιωμένης μορφής εκχυλίσματος σε διάλυμα χιτοζάνης και έπειτα γίνεται προσθήκη του ανιονικού σταυροδεσμοποιητή TPP, ενώ στη δεύτερη μεθοδολογία το TPP προστίθεται πρώτο σε διάλυμα χιτοζάνης και ακολουθεί το εκχύλισμα στην υγρή του μορφή. Επίσης, στην πρώτη μεθοδολογία αξιολογείται η ικανότητα φόρτωσης των ChNPs με εκχύλισμα με τη διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και της αναλογίας μάζας χιτοζάνης:TPP στη σύνθεση. Για τα ChNPs της 1^{ης} μεθοδολογίας υψηλότερο ποσοστό ενθυλάκωσης OLE (%) παρατηρείται στην περίπτωση των ChNPs με OLE 0.25% και CS:TPP 5:1 με 48.7%, ενώ ακολουθούν τα ChNPs με OLE 0.25% και CS:TPP 2.5:1 με 45.7%. Το υψηλότερο ποσοστό φόρτωσης OLE (%) εμφανίζεται στα ChNPs με OLE 1.50% και CS:TPP 2.5:1. Τα ChNPs της $2^{\eta\varsigma}$ μεθοδολογίας δίνουν χαμηλότερες αποδόσεις με ποσοστό ενθυλάκωσης OLE 14.7% και ποσοστό φόρτωσης OLE μόλις 0.5%. Οι διαφορές μεταξύ των ChNPs $1^{\eta\varsigma}$ και $2^{\eta\varsigma}$ μεθοδολογίας οφείλονται στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες των δυο μεθοδολογιών.

Ακολουθούν χαρακτηρισμοί μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των υπερκειμένων των συνθέσεων. Με την προσθήκη TPP στη διαδικασία ιονικής πηκτωμάτωσης αρχίζει η σύνθεση ChNPs και η συνεπαγόμενη ενθυλάκωση OLE στα ChNPs, συνεπώς παρατηρείται μείωση των κορυφών απορρόφησης των φαινολικών στα 280 και 325 nm που παραμένουν στα υπερκείμενα για τις δυο μεθόδους. Οι μεγαλύτερες μειώσεις απορρόφησης υφίστανται στην περίπτωση των ChNPs 1^{ης} μεθοδολογίας με OLE 0.25% και συγκεκριμένα με αναλογίες CS:TPP 2:1 με 52.2% μείωση στα 280 nm και 51.0 % στα 325 nm, με CS:TPP 2.5:1 με 52.9% μείωση στα 280 nm και 49.9 % στα 325 nm. Επιπλέον, μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR παρατηρείται ότι τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, ανεξάρτητα με τον τρόπο σύνθεσης, παρουσιάζουν τις χαρακτηριστικές κορυφές της χιτοζάνης, ενώ αλλαγές παρατηρούνται σε συγκεκριμένες κορυφές του αρχικού υλικού. Η πιο σημαντική αλλαγή είναι η μετατόπιση της κορυφής της χιτοζάνης από τους 1598 cm⁻¹ στους 1545 cm⁻¹.

Σε επόμενο βήμα μελετάται η απελευθέρωση του OLE από τα ChNPs σε δύο τιμές pH 5.8 και 7.4, ώστε να συσχετιστεί η συμπεριφορά με τις συνθήκες σε βιολογικά συστήματα. Τόσο στο όξινο pH (pH 5.8) όσο και στο φυσιολογικό pH των κυττάρων (pH 7.4) το πρότυπο απελευθέρωση παρουσιάζει δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση γίνεται μεγάλη απελευθέρωση του OLE στην πρώτη 0.5 h και ακολουθεί η δεύτερη φάση όπου για τις επόμενες 24 h καταγράφεται μικρή απελευθέρωση. Συνεπώς, σε μελλοντική μελέτη πρέπει να γίνει εστίαση στο χρονικό διάστημα 0-0.5 h.

Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εφαρμόζεται το πρωτόκολλο του οξειδωμένου ABTS (ABTS⁺⁺). Όλα τα εξεταζόμενα ChNPs με OLE ή χωρίς εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση που εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους, ωστόσο η ενθυλάκωση του OLE στα ChNPs βελτιώνει την υπάρχουσα δράση της χιτοζάνης των σκέτων ChNPs. Τα συντιθέμενα ChNPs με 1.50% OLE εμφανίζουν συνολικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, καθώς σε αυτά καταγράφεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση ενθυλακωμένων φαινολικών ενώσεων 8.60 μg/mL TPC. Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης εφαρμόζεται το πρωτόκολλο υπολογισμού της MIC για τα δυο βακτηριακά στελέχη *E.coli* και *C.glutamicum*,. Τα ChNPs της 1^{ης} μεθοδολογίας με CS:TPP 2.5:1 και συγκέντρωση OLE 1.50% εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση με MIC 12.90 μg/mL TPC μόνο έναντι του *C.glutamicum*, η MIC για

τα ChNPs με CS:TPP 5:1 και 0.25% OLE είναι 8.92 μg/mL TPC και η MIC για τα ChNPs με OLE της 2^{ης} μεθοδολογίας είναι 0.72 μg/mL TPC έναντι και των δυο παθογόνων βακτηριακών στελεχών. Σε μελλοντική μελέτη θα μπορούσε να εξεταστεί η δράση των ChNPs σε διαφορετικά βακτηριακά στελέχη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναδεικνύουν τα φύλλα ελιάς και την οινολάσπη, που αποτελούν παραπροϊόντα της εξαγωγής ελαιόλαδου και της βιομηχανίας οινοποίησης αντίστοιχα, ως κινητήρια δύναμη για το δρόμο της βιολογικής σύνθεσης νανοσωματιδίων. Τα ανόργανα μεταλλικά νανοσωματίδια ZnONPs και AgNPs, όσο και τα οργανικά ChNPs που συντέθηκαν είναι πολλά υποσχόμενα καθώς εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Παρότι οι πρώτες μελέτες φαίνονται ελπιδοφόρες, απαιτείται περαιτέρω βελτιστοποίηση και μελέτη ορισμένων χαρακτηριστικών των νανοσωματιδίων και είναι σημαντικό να ελεγχθούν παράμετροι ασφάλειας τους, ώστε να μπορούν να φανούν χρήσιμα και αποτελεσματικά σε πλήθος μελετώμενων βιοϊατρικών εφαρμογών.

ПАРАРТНМА



Εικόνα 11.1. Πλάκα elisa όπου φαίνεται το χρώμα, μετά την προσθήκη της χρωστικής ρεσαζουρίνης, του κάθε πηγαδιού και έπειτα από επώαση βακτηριακών στελεχών E.coli και ZnONPs παρουσία θρεπτικού μέσου LB, για τον υπολογισμό της MIC οπτικά.



Εικόνα 11.2. Πλάκα elisa όπου φαίνεται το χρώμα, μετά την προσθήκη της χρωστικής ρεσαζουρίνης, του κάθε πηγαδιού και έπειτα από επώαση βακτηριακών στελεχών C.glutamicum και ZnONPs παρουσία θρεπτικού μέσου LB, για τον υπολογισμό της MIC οπτικά.



Εικόνα 11.3. Πλάκα elisa όπου φαίνεται το χρώμα, μετά την προσθήκη της χρωστικής ρεσαζουρίνης, του κάθε πηγαδιού και έπειτα από επώαση βακτηριακών στελεχών E.coli και AgNPs παρουσία θρεπτικού μέσου LB, για τον υπολογισμό της MIC οπτικά.



Εικόνα 11.4. Πλάκα elisa όπου φαίνεται το χρώμα, μετά την προσθήκη της χρωστικής ρεσαζουρίνης, του κάθε πηγαδιού και έπειτα από επώαση βακτηριακών στελεχών C.glutamicum και AgNPs παρουσία θρεπτικού μέσου LB, για τον υπολογισμό της MIC οπτικά.



Εικόνα 11.5. Παρατήρηση ζωνών αναστολής σε ανάπτυξη E.coli και C.glutamicum σε τρυβλία παρουσία AgNPs από aq. OLE και aq. WL σε συγκέντρωση 10 μg/disk και για τα control αμπικιλλίνη (θετικό control) και DMSO (αρνητικό control).



Εικόνα 11.6. Παρατήρηση ζωνών αναστολής σε ανάπτυξη E.coli και C.glutamicum σε τρυβλία παρουσία AgNPs από aq. OLE σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 40 μg/disk και για το αρνητικό control DMSO.



Εικόνα 11.7. Παρατήρηση ζωνών αναστολής σε ανάπτυξη E.coli και C.glutamicum σε τρυβλία παρουσία AgNPs από aq. WL σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 40 μg/disk και για το αρνητικό control DMSO.



Εικόνα 11.8. Φάσματα UV-Vis των υπερκειμένων σύνθεσης ChNPs 1^{ης} μεθοδολογίας στις διαφορετικές εξεταζόμενες συγκεντρώσεις % εκχυλίσματος OLE, όπου απεικονίζονται οι μειώσεις των απορροφήσεων των κορυφών των φαινολικών ενώσεων του OLE στα 280 και 325 nm με την προσθήκη του TPP στη σύνθεση.



Εικόνα 11.9. Φάσματα UV-Vis των υπερκειμένων σύνθεσης ChNPs 1^{ης} μεθοδολογίας στις διαφορετικές εξεταζόμενες αναλογίες CS:TPP, όπου απεικονίζονται οι μειώσεις των απορροφήσεων των κορυφών των φαινολικών ενώσεων του OLE στα 280 και 325 nm με την προσθήκη TPP στη σύνθεση.



Εικόνα 11.10. Φάσματα UV-Vis των υπερκειμένων σύνθεσης ChNPs 2^{ης} μεθοδολογίας, όπου απεικονίζονται οι μειώσεις των απορροφήσεων των κορυφών των φαινολικών ενώσεων του OLE στα 280 και 325 nm με την προσθήκη TPP στη σύνθεση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΑ

Κίντζιος, Σ., (2016), Νανοβιοτεχνολογία και Βιοαισθητήρες. Εκδόσεις Έμβρυο.

Κυριακίδη, Δ.Α., (2000), Βιοτεχνολογία, Β' Έκδοση, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Σταμάτης Χ., (2018), Ενζυμική Βιοτεχνολογία Με Στοιχεία Νανοβιοτεχνολογίας, Ιωάννινα.

Σταμάτης Χ., (2018) Εργαστηριακός Οδηγός για το μάθημα Ενζυμική Βιοτεχνολογία και Νανοβιοτεχνολογία, Ιωάννινα.

Σταμάτης Χ., (2018), Αρχές Βιοτεχνολογίας, Ιωάννινα.

David P. Clark, N. J. P. (2012), Biotechnology, Academic Cell Update.

Gupta V., Sengupta M., Prakash J., Tripathy B. C. (2017), Basic and Applied Aspects of Biotechnology.

Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jacker Parker, (2005), Biology of microorganism.

APOPA

- Abdallah, Y., Liu, M., Ogunyemi, S. O., Ahmed, T., Fouad, H., Abdelazez, A., Yan, C., Yang, Y., Chen, J., & Li, B. (2020). Bioinspired green synthesis of chitosan and zinc oxide nanoparticles with strong antibacterial activity against rice pathogen xanthomonas oryzae pv. oryzae. *Molecules*, 25(20), 1–18. https://doi.org/10.3390/molecules25204795
- Abdelbaky, A. S., Abd El-Mageed, T. A., Babalghith, A. O., Selim, S., & Mohamed, A. M. (2022). Green Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles Using Pelargonium odoratissimum (L.) Aqueous Leaf Extract and Their Antioxidant, Antibacterial and Anti-inflammatory Activities. *Antioxidants*, 11(8), 1–25. https://doi.org/10.3390/antiox11081444
- Agarwal, S & Verma, A. (2014). IN VITRO ANTI-NEOPLASTIC POTENTIAL OF CHITOSAN NANOPARTICLES AGAINST CERVICAL CANCER. International Journal of Phamaceutical Research and Bioscience, 3(4), 444–456. https://doi.org/10.1248/yakushi.20-00123
- Ahmed, O., Sibuyi, N. R. S., Fadaka, A. O., Madiehe, M. A., Maboza, E., Meyer, M., & Geerts, G. (2022). Plant Extract-Synthesized Silver Nanoparticles for Application in Dental Therapy. *Pharmaceutics*, 14(2), 1–26.

https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020380

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102
- Aleixandre-Tudo, Jose Luis, du Toit, W. (2019). The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking. *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*, 1–21. http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79550
- Alsaiari, N. S. (2023). Plant and Microbial Approaches as Green Methods for the Synthesis of Nanomaterials: Synthesis, Applications, and Future Perspectives. *Molecules*, 28(463), 1–38. https://doi.org/10.3390/molecules28010463
- Amarakoon, I. I., Hamilton, C., Mitchell, S. A., Tennant, P. F., & Roye, M. E. (2017). Biotechnology. In *Pharmacognosy*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00028-7
- Amutha, A. (2022). Structural and FTIR Studies of Pure and Zinc Doped SNO₂
 NanoParticles. Advances in Materials Science and Engineering: An International Journal (MSEJ), 9(3), 1–8. https://doi.org/10.5121/msej.2022.9301
- Aswathi, V. P., Meera, S., Maria, C. G. A., & Nidhin, M. (2023). Green synthesis of nanoparticles from biodegradable waste extracts and their applications: a critical review. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 8(2), 377–397. https://doi.org/10.1007/s41204-022-00276-8
- Athanasiou, P. E., Patila, M., Fotiadou, R., Chatzikonstantinou, A. V., & Stamatis, H. (2024). Valorization of Wine Lees: Assessment of Antioxidant, Antimicrobial and Enzyme Inhibitory Activity of Wine Lees Extract and Incorporation in Chitosan Films. *Waste* and Biomass Valorization, 1–16. https://doi.org/10.1007/s12649-024-02524-1
- Barabadi, H., Hosseini, O., Jounaki, K., Sadeghian-abadi, S., Ashouri, F., Mostafa, A.,
 Alrikabi, A., Vahidi, H., Amidi, S., Mojab, F., Mohammadi, N., & Mostafavi, E. (2023).
 Bioinspired green-synthesized silver nanoparticles: in vitro physicochemical,
 antibacterial, biofilm inhibitory, genotoxicity, antidiabetic, antioxidant, and
 anticoagulant performance. *Materials Advances*, 2023(4), 3037–3054.
 https://doi.org/10.1039/d3ma00089c
- Barui, A. K. (2018). Medicinal Applications of Metal Nanoparticles. In *Metal Nanoparticles: Synthesis and Applications in Pharmaceutical Sciences* (pp. 121–168).

https://doi.org/10.1002/9783527807093.ch5

- Basnet, P., Inakhunbi Chanu, T., Samanta, D., & Chatterjee, S. (2018). A review on biosynthesized zinc oxide nanoparticles using plant extracts as reductants and stabilizing agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183, 201–221. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.036
- Beconcini, D., Fabiano, A., Zambito, Y., Berni, R., Santoni, T., Piras, A. M., & Stefano, R.
 Di. (2018). Extract from Prunus avium L. to Improve the Resistance of Endothelial Cells to Oxidative Stress. *Nutrients*, *10*(1598), 1–13. https://doi.org/10.3390/nu10111598
- Bharathi, D., Lee, J., Karthiga, P., Sandhanasamy, R. M. (2023). Kiwi Fruit Peel Biowaste Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles for Enhanced Dye Degradation and Antibacterial Activity. *Waste and Biomass Valorization*, 1–10. https://doi.org/10.1007/s12649-023-02328-9
- Bitwell, C., Sen, S., & Luke, C. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585
- Bosiljkov, T., & Dujmi, F. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction : Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 195–203. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.005
- Carrouel, F., Viennot, S., Ottolenghi, L., Gaillard, C., & Bourgeois, D. (2020). Nanoparticles as anti-microbial, anti-inflammatory, and remineralizing agents in oral care cosmetics: A review of the current situation. In *Nanomaterials 10(1)*. https://doi.org/10.3390/nano10010140
- Chakansin, C., Yostaworakul, J., Warin, C., Kulthong, K., & Boonrungsiman, S. (2022). Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparticles : Potential, limitations and precautions. *Analytical Biochemistry*, 637(July 2021), 114449. https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114449
- Chatzikonstantinou, A. V, Giannakopoulou, A., & Yannis, S. S. (2022). Production of hydroxytyrosol rich extract from Olea europaea leaf with enhanced biological activity using immobilized enzyme reactors. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 29624–29637. https://doi.org/10.1007/s11356-021-17081-6
- Chouhan, S., & Guleria, S. (2020). Green synthesis of AgNPs using Cannabis sativa leaf extract: Characterization, antibacterial, anti-yeast and α-amylase inhibitory activity. *Materials Science for Energy Technologies*, *3*, 536–544.

https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.05.004

- Corciovă, A., Mircea, C., Burlec, A. F., Fifere, A., Moleavin, I. T., Sarghi, A., Tuchiluş, C., Ivănescu, B., & Macovei, I. (2022). Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using a Lythrum salicaria Extract and In Vitro Exploration of Their Biological Activities. *Life*, *12*(10). https://doi.org/10.3390/life12101643
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 7(November), 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831
- Dasaradhudu, Y., & Arunachalam Srinivasan, M. (2020). Synthesis and characterization of silver nano particles using co-precipitation method. *Materials Today: Proceedings*, 33, 720–723. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.029
- de Carvalho, F. G., Magalhães, T. C., Teixeira, N. M., Gondim, B. L. C., Carlo, H. L., dos Santos, R. L., de Oliveira, A. R., & Denadai, Â. M. L. (2019). Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on C. albicans biofilm formation. *Materials Science and Engineering C*, 104(May). https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109885
- De Iseppi, A., Lomolino, G., Marangon, M., & Curioni, A. (2020). Current and future strategies for wine yeast lees valorization. *Food Research International*, 137(February), 109352. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109352
- De Iseppi, A., Marangon, M., Vincenzi, S., Lomolino, G., Curioni, A., & Divol, B. (2021). A novel approach for the valorization of wine lees as a source of compounds able to modify wine properties. *Lwt*, *136*(P1), 110274. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110274
- Detsi, A., Kavetsou, E., Kostopoulou, I., Pitterou, I., Rozaria, A., Pontillo, N., Tzani, A., Christodoulou, P., Siliachli, A., & Zoumpoulakis, P. (2020). Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products : The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix. *Pharmaceutics*, 12(669), 1–48. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070669
- Dhaka, A., Sharma, S., & Trivedi, R. (2023). A review on biological synthesis of silver nanoparticles and their potential applications. *Results in Chemistry*, 6(September), 1–21. https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101108
- El-Seedi, H. R., El-Shabasy, R. M., Khalifa, S. A. M., Saeed, A., Shah, A., Shah, R., Iftikhar,F. J., Abdel-Daim, M. M., Omri, A., Hajrahand, N. H., Sabir, J. S. M., Zou, X., Halabi,M. F., Sarhan, W., & Guo, W. (2019). Metal nanoparticles fabricated by green

chemistry using natural extracts: Biosynthesis, mechanisms, and applications. *RSC Advances*, *9*(42), 24539–24559. https://doi.org/10.1039/c9ra02225b

- Elizabeth, M., Mohan, J. C., Manzoor, K., Nair, S. V, Tamura, H., & Jayakumar, R. (2010). Folate conjugated carboxymethyl chitosan – manganese doped zinc sulphide nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, 80(2), 442–448. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.047
- Fadholly, A., Purnama, R., & Iskandar, D. (2019). In vitro anticancer activity Annona squamosa extract nanoparticle on WiDr cells. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 10(4), 149–154. https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR
- Fakhri, E., Eslami, H., Marou, P., Pakdel, F., Taghizadeh, S., Ganbarov, K., Youse, M., Tanomand, A., Youse, B., Mahmoudi, S., & Samadi, H. (2020). Chitosan biomaterials application in dentistry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 956– 974. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.211
- Feugang, J. M. (2017). Novel agents for sperm purification, sorting, and imaging. Molecular Reproduction Development, December 2016, 832–841. https://doi.org/10.1002/mrd.22831
- Fotiadou, R., Chatzikonstantinou, A. V., Hammami, M. A., Chalmpes, N., Moschovas, D., Spyrou, K., Polydera, A. C., Avgeropoulos, A., Gournis, D., & Stamatis, H. (2021).
 Green synthesized magnetic nanoparticles as effective nanosupport for the immobilization of lipase: Application for the synthesis of lipophenols. *Nanomaterials*, *11*(2), 1–22. https://doi.org/10.3390/nano11020458
- Gabriel, A., Motlhalamme, T., Kgosi, G., & Azizi, S. (2024). Evaluation of the antimicrobial activity and chickpea growth stimulation effects of green synthesized zinc oxide nanoparticles. *Plant Stress*, 12(March), 100442. https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100442
- Ganachari, S. V, Yaradoddi, J. S., Somappa, S. B., Mogre, P., Tapaskar, R. P., Salimath, B., Venkataraman, A., & Viswanath, V. J. (2018). Green Nanotechnology for Biomedical , Food , and Agricultural Applications. *Handbook of Ecomaterials*, https://doi.org/1–18. 10.1007/978-3-319-48281-1_184-1
- Gkantzou, E., Chatzikonstantinou, A. V., Fotiadou, R., Giannakopoulou, A., Patila, M., & Stamatis, H. (2021). Trends in the development of innovative nanobiocatalysts and their application in biocatalytic transformations. *Biotechnology Advances*, 51(October 2020), 107738. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107738

- Gomaa, E. Z. (2022). Microbial Mediated Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles, Characterization and Multifaceted Applications. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 32(11), 4114–4132. https://doi.org/10.1007/s10904-022-02406-w
- Gour, A., & Jain, N. K. (2019). Advances in green synthesis of nanoparticles. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 47(1), 844–851. https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577878
- Guarino, V., Cafiero, C., & Ambrosio, L. (2013). Trapping tetracycline-loaded nanoparticles into polycaprolactone fiber networks for periodontal regeneration therapy. *Journal of Bioactive and Compatible*, 28(3), 258–273. https://doi.org/10.1177/0883911513481133
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. C. (2017). Basic and applied aspects of biotechnology. In *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7
- Hashemi, S., Asrar, Z., Pourseyedi, S., & Nadernejad, N. (2016). Green synthesis of ZnO nanoparticles by Olive (Olea europaea). *IET Nanobiotechnology*, 10(6), 400–404. https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0117
- Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S., & Muchtaridi, M. (2022). Drug release study of the chitosan-based nanoparticles. *Heliyon*, 8(October 2021), 1–16. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08674
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. American Society For Microbiology, December, 1–13. https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro
- Imtiyaz Hussain, N. B. Singh, Ajey Singh, Himani Singh, S. C. S. (2016). Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology Letters*, 38(4), 545–560. https://doi.org/10.1007/s10529-015-2026-7
- International Organization of Vine and Wine. (2022). State of the World Vine and Wine Sector 2022. International Organisation of Vine and Wine Intergovernmental Organisation, April, 1–19. https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_State_of_the_world_Vine_and_ Wine_sector_in_2022_2.pdf
- Jara-Palacios, M. J. (2019). Wine lees as a source of antioxidant compounds. *Antioxidants*, 8(2), 1–10. https://doi.org/10.3390/antiox8020045

- Jha, R., & Mayanovic, R. A. (2023). A Review of the Preparation , Characterization , and Applications of Chitosan Nanoparticles in Nanomedicine. *Nanomaterials*, 13(1302), 1– 20. https://doi.org/10.3390/nano13081302
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(262), 1–29. https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8
- Kafarski Pawel. (2012). Rainbow code of biotechnology. CHEMIC, 66(8), 811-816.
- Kosareva, E. K., Pivkina, A. N., & Muravyev, N. V. (2022). Atomic force microscopy in energetic materials research: A review. *Energetic Materials Frontiers*, 3(4), 290–302. https://doi.org/10.1016/j.enmf.2022.05.004
- Lee, B., Lee, C., Wang, Y., Chen, H., Lai, C., & Hsieh, W. (2016). Controlled-release of tetracycline and lovastatin by poly (d, 1-lactide-co-glycolide acid) -chitosan nanoparticles enhances periodontal regeneration in dogs. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 285–297. https://doi.org/10.2147/IJN.S94270
- Lustriane, C., Dwivany, F. M., Suendo, V., & Reza, M. (2018). Effect of chitosan and chitosan-nanoparticles on post harvest quality of banana fruits. *Journal of Plant Biotechnology*, 45(1), 36–44. https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.1.036
- Ma, Z., Garrido-maestu, A., & Casey, K. (2017). Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents : A review. *Carbohydrate Polymers*, *176*(April), 257–265. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.082
- Maheshwari, R., Joshi, G., Mishra, D. K., & Tekade, R. K. (2019). Bionanotechnology in Pharmaceutical Research. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery* (pp. 449–471). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00012-1
- Mahmoudi, R., Ardakani, M. T., Verdom, B. H., Bagheri, A., Mohammad-beigi, H., Aliakbari, F., Salehpour, Z., Alipour, M., Afrouz, S., & Bardania, H. (2019). Chitosan nanoparticles containing Physalis alkekengi-L extract : preparation , optimization and their antioxidant activity. *Bulletin of Materials Science*, 42(3), 1–6. https://doi.org/10.1007/s12034-019-1815-3
- Makarov, V. V, Love, A. J., Sinitsyna, O. V, Makarova, S. S., & Yaminsky, I. V. (2014). "
 Green "Nanotechnologies : Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. ACTA NATURAE, 6(20), 35–44. https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-1-35-44

- Manimaran, K., Balasubramani, G., Ragavendran, C., & Natarajan, D. (2021). Biological Applications of Synthesized ZnO Nanoparticles Using Pleurotus djamor Against Mosquito Larvicidal, Histopathology, Antibacterial, Antioxidant and Anticancer Effect. *Journal of Cluster Science*, 32(6), 1635–1647. https://doi.org/10.1007/s10876-020-01927-z
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.008
- Matin, T. A. B., Ghasemi, N., Ghodrati, K., & Ramezani, M. (2019). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Scrophularia Striata extract. *Eurasian Chemical Communications*, 1(6), 494–506. https://doi.org/10.33945/SAMI/ECC.2019.6.1
- Mayolo-Deloisa, K., González-González, M., & Rito-Palomares, M. (2020). Laccases in Food Industry: Bioprocessing, Potential Industrial and Biotechnological Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(March), 1–8. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00222
- Microbiologie clinique. (2023). Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) : Définition, Protocol, Interpretation. https://microbiologie-clinique.com/antibiotic-susceptibilitytesting.html
- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H., & Elaissari, A. (2015). Enhancement of alendronate encapsulation in chitosan nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 391–396. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.04.007
- Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M., & Wasan, E. K. (2017). An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 9(53), 1–26. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053
- Munteanu, A. C., & Uivarosi, V. (2021). Ruthenium complexes in the fight against pathogenic microorganisms. An extensive review. *Pharmaceutics*, 13(6), 1–51. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060874
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). https://doi.org/10.3390/ijms22073380
- Murugesan Chandrasekaran, Ki Deok Kim, S. C. C. (2020). Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles : A Review. *Processes*, 8(1173), 1–21.

https://doi.org/10.3390/pr8091173

- Muthukathija, M., Muhideen, M. S., & Rama, V. (2023). Applied Surface Science Advances Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Pisonia Alba leaf extract and its antibacterial activity. *Applied Surface Science Advances*, 15(September 2022), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2023.100400
- Muzzalupo, I., Badolati, G., Chiappetta, A., Picci, N., & Muzzalupo, R. (2020). In vitro Antifungal Activity of Olive (Olea europaea) Leaf Extracts Loaded in Chitosan Nanoparticles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(March), 1–10. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00151
- Özdamar, B., Sürmeli, Y., & Şanlı-Mohamed, G. (2023). Immobilization of Olive Leaf Extract with Chitosan Nanoparticles as an Adjunct to Enhance Cytotoxicity. *ACS Omega*, 8(32), 28994–29002. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01494
- Poojar, B., Ommurugan, B., Adiga, S., Thomas, H., Sori, R. K., Poojar, B., Hodlur, N., Tilak, A., Korde, R., Gandigawad, P., In, M., Sleep, R., Albino, D., Rats, W., Article, O., Schedule, P., Injury, C. C., Sori, R. K., Poojar, B., Gandigawad, P. (2017). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(10), 1–5. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS
- Prabhu, S., & Poulose, E. K. (2012). Silver nanoparticles : mechanism of antimicrobial action , synthesis , medical applications , and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(32), 1–10.
- Queiroz, M. F., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sassaki, G. L., & Rocha, H. A. O. (2015). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? *Marine Drugs*, 13(1), 141–158. https://doi.org/10.3390/md13010141
- Raghavendra, V. B., Shankar, S., Govindappa, M., Pugazhendhi, A., Sharma, M., & Nayaka,
 S. C. (2022). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Effective
 Degradation of Dye, Polyethylene and Antibacterial Performance in Waste Water
 Treatment. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 32(2),
 614–630. https://doi.org/10.1007/s10904-021-02142-7
- Rashed, K. (2022). Phytocontent and Biological Effects of Olea europaea L .: A Review. *Plantae Scientia*, 05(02), 36–44. https://doi.org/10.32439/ps.v5i2.36-44
- Rev, P., Khan, Y., Panchal, S., Vyas, N., Butani, A., & Kumar, V. (2007). Olea europaea: A Phyto-Pharmacological Review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 114–118.

- Romero-Díez, R., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J., Duarte, C. M. M., Matias, A. A., & Bronze, M. R. (2018). Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. *Food Chemistry*, 259, 188–195. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.119
- Rout, A., Jena, P. K., Parida, U. K., & Bindhani, B. K. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using leaves extract of Centella Asiatica L. for studies against human pathogens. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4), 661–674.
- Sadeer, N. B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 1–39. https://doi.org/10.3390/antiox9080709
- Safawo, T., Sandeep, B. V., Pola, S., & Tadesse, A. (2018). Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using tuber extract of anchote (Coccinia abyssinica (Lam.) Cong.) for antimicrobial and antioxidant activity assessment. *OpenNano*, *3*(May), 56–63. https://doi.org/10.1016/j.onano.2018.08.001
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Ahn, S., & Shin, H. S. (2021). Grape pomace extracted tannin for green synthesis of silver nanoparticles: Assessment of their antidiabetic, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Polymers*, 13(24), 1–15. https://doi.org/10.3390/polym13244355
- Sekar, V., Rajendran, K., Vallinayagam, S., Deepak, V., & Mahadevan, S. (2018). Synthesis and characterization of chitosan ascorbate nanoparticles for therapeutic inhibition for cervical cancer and their in silico modeling. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 62, 239–249. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.01.001
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., & Poinern, G. E. J. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. In *Materials* (Vol. 8, Issue 11). https://doi.org/10.3390/ma8115377
- Sharma, D., Kanchi, S., & Bisetty, K. (2019). Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. Arabian Journal of Chemistry, 12(8), 3576–3600. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.002
- Sharma, K., Guleria, S., & Razdan, V. K. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using Ocimum gratissimum leaf extract: characterization, antimicrobial activity and toxicity analysis. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29(2), 213–224. https://doi.org/10.1007/s13562-019-00522-2

- Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P., & Kumar, P. (2018). "Green" synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, *16*(1), 1–24. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588–599. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242. https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x
- Štumpf, S., Hostnik, G., Primožič, M., Leitgeb, M., & Bren, U. (2020). Generation times of e. Coli prolong with increasing tannin concentration while the lag phase extends exponentially. *Plants*, 9(12), 1–11. https://doi.org/10.3390/plants9121680
- Talhaoui, N., Taamalli, A., & Mar, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 1–64. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011
- Tapia-Quirós, P., Montenegro-Landívar, M. F., Reig, M., Vecino, X., Alvarino, T., Cortina, J. L., Saurina, J., & Granados, M. (2020). Olive mill and winery wastes as viable sources of bioactive compounds: A study on polyphenols recovery. *Antioxidants*, 9(11), 1–15. https://doi.org/10.3390/antiox9111074
- Tarannum, N., Divya, & Gautam, Y. K. (2019). Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: A state-of-the-art review. *RSC Advances*, 9(60), 34926–34948. https://doi.org/10.1039/c9ra04164h
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15638– 15678. https://doi.org/10.3390/ijms150915638
- Thirunavoukkarasu, M., Balaji, U., Behera, S., Panda, P. K., & Mishra, B. K. (2013).
 Biosynthesis of silver nanoparticle from leaf extract of Desmodium gangeticum (L.)
 DC. and its biomedical potential. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *116*, 424–427. https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.033

Tuesta-chavez, T., Changanaqui, K., Espinoza, B., Alarcon, H., Osorio, A. M., Sotomayor,

M. D. P. T., & Negr, A. C. V. (2022). Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of prepared liquid smoke-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, *319*(June 2021), 1–13. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110912

- Vijayakumar, S., Vaseeharan, B., & Malaikozhundan, B. (2016). Laurus nobilis leaf extract mediated green synthesis of ZnO nanoparticles : Characterization and biomedical applications. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 84, 1213–1222. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.038
- Vijayalakshmi, U., Chellappa, M., Anjaneyulu, U., Manivasagam, G., & Sethu, S. (2016). Influence of Coating Parameter and Sintering Atmosphere on the Corrosion Resistance Behavior of Electrophoretically Deposited Composite Coatings. *Materials and Manufacturing Processes*, 31(1), 95–106. https://doi.org/10.1080/10426914.2015.1070424
- Yaqoob, A. A., Ahmad, H., Parveen, T., Ahmad, A., & Oves, M. (2020). Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications : A Review. *Frontiers in Chemistry*, 8(May), 1–23. https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00341
- Yasmeen, S., Kabiraz, M., Saha, B., Qadir, M., Gafur, M., & Masum, S. (2016). Chromium (VI) Ions Removal from Tannery Effluent using Chitosan-Microcrystalline Cellulose Composite as Adsorbent. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, 10(4), 1–14. https://doi.org/10.9734/irjpac/2016/23315
- Yazdanian, M., Rostamzadeh, P., Rahbar, M., Alam, M., Abbasi, K., Tahmasebi, E., Tebyaniyan, H., Ranjbar, R., Seifalian, A., & Yazdanian, A. (2022). The Potential Application of Green-Synthesized Metal Nanoparticles in Dentistry: A Comprehensive Review. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2022, 1–27. https://doi.org/10.1155/2022/2311910
- Yedurkar, S., Maurya, C., & Mahanwar, P. (2016). Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Ixora Coccinea Leaf Extract—A Green Approach. *Open Journal of Synthesis Theory and Applications*, 05(01), 1–14. https://doi.org/10.4236/ojsta.2016.51001
- Zahir AA, Chauhan IS, Bagavan A, Kamaraj C, Elango G, Shankar J, Arjaria N, Roopan SM, Rahuman AA, S. N. (2015). Green Synthesis of Silver and Titanium Dioxide Nanoparticles Using Euphorbia prostrata Extract Shows Shift from Apoptosis to G0/G1 Arrest followed by Necrotic Cell Death in Leishmania donovani. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8), 4782–4799. https://doi.org/10.1128/AAC.00098-15

- Zahra J., Mehr R.M., F. M. (2021). Experimental and Computational Studies on the Electrochemical Behavior of Carvacrol and Menthol. *Iran. J. Chem. Chem. Eng*, 40(2), 487–499. https://doi.org/10.30492/IJCCE.2020.37860
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), 1–22. https://doi.org/10.1111/jfbc.13394