



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης υδρογελών με εγκλεισμένα
νανοσωματίδια μετάλλων”**

“Study of antimicrobial activity of hydrogels with encapsulated metal nanoparticles”

Εισηγήτρια : Ανδριάκαινα Μαρία Ελένη (18684009)

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μπατρίνου Ανθιμία

ΑΘΗΝΑ, 2023

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, 2023

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

2. Μέλος επιτροπής

3. Μέλος επιτροπής

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαι η αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή της περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία και τεκμηριώνονται πλήρως μέσα στην εργασία αλλά και στο τέλος της. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Μαρία Ελένη Ανδριάκαινα



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή έγινε σε συνεργασία με την υποψήφια διδάκτωρ κα Ιωάννα Πιττερού, την οποία ευχαριστώ για την παροχή των υδρογελών, στα πλαίσια της εκπόνησης της διδακτορικής της διατριβής με επιβλέπουσα την Δρ. Α. Δέτση, Καθηγήτρια Οργανικής Χημείας, στο τμήμα Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (ΕΜΠ). Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας ερευνητικής μελέτης ανακοινώθηκε στο παρακάτω Διεθνές Συνέδριο:

I.Pitterou, A. Tzavara, A. Tzani, M.Andriakaina, K.Pyroulou, K. Tsiantas, A. Batrinou, S. Konteles, C. Fountzoula, A. Kriebardis, P. Zoumpoulakis, A. Detsi,(2023) *Nanocomposite alginate hydrogels incorporating silver nanoparticles: a green approach towards smart antimicrobial materials*, MedChem 2023, Paul Ehrlich Euro-PhD Network, Dept of Pharmaceutical Chemistry of Aristotle University of Thessaloniki, 16-18 July 2023, Thessaloniki, Greece

Το δημοσιευμένο Poster PC-2-43 παρουσιάζεται στον ακόλουθο σύνδεσμο: <https://medchem2023.com/abstract-book/>.

Επίσης, με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Ανθιμία Μπατρίνου, Βιολόγο MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και Λέκτορας Εφαρμογών Εργαστηρίου Μικροβιολογίας Τροφίμων της Σχολή Επιστημών Τροφίμων, στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Την ευχαριστώ πολύ για όλες τις χρήσιμες πληροφορίες, τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας αλλά και για το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Αικατερίνη Πυροβόλου για την καθοδήγηση και την βοήθεια κατά την διάρκεια της μελέτης αλλά και τον Γιάννη, την Εύα, τον Συμεών και την Ναταλία για την αμέριστη υποστήριξη. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω φυσικά τους γονείς μου και την αδελφή μου για την υπομονή και την συμπαράσταση που έδειξαν μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Επί του παρόντος, η ανάπτυξη αντιμικροβιακών υδρογελών με εγκλεισμένα νανοσωματίδια μετάλλων για την αντιμετώπιση της αυξανόμενης επικράτησης μικροβιακών λοιμώξεων, αποτελεί επίκεντρο της παγκόσμιας βιοϊατρικής έρευνας αλλά και της προκειμένης εργαστηριακής μελέτης. Η παρούσα εργασία ασχολήθηκε με τον έλεγχο αντιμικροβιακής δράσης αλγινικών υδρογελών, εμπλουτισμένων ή μη, με νανοσωματίδια αργύρου και εκχύλισμα φύλλου ελιάς, έναντι παθογόνων βακτηρίων και ζυμών. Ο αντιμικροβιακός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των μεθόδων διάχυσης φρεατίου και δίσκου σε άγαρ καθώς και με την αυτοματοποιημένη φασματοφωτομετρική τεχνολογία Bioscreen C. Ακολούθησε μελέτη και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δράσης με χρήση των προγραμμάτων Microsoft Excel 2010 και του μικροβιολογικού λογισμικού DMFit ComBase. Με βάση τις συνολικές παρατηρήσεις της τεχνικής Bioscreen C, εντοπίστηκαν αξιοσημείωτα αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης και κυρίως βακτηριοστατικής δράσης της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES έναντι των μικροοργανισμών *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* NCTC 12023/ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* NCTC 7973/ATCC 35152, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903/ATCC 27853 και *Yersinia enterocolitica* NCTC 12982/ATCC 9610, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788/ATCC 6538, *Bacillus cereus* NCTC 10320/ATCC 9634, *Saccharomyces cerevisiae* NCPF 3255/ATCC 2091 και *Lachancea*. Οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-CaCl₂, με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES και με αλγινικό οξύ-NADES εμφάνισαν επίσης δράση αναστολής στην ανάπτυξη των παραπάνω μικροβιακών στελεχών, αλλά σε ηπιότερο βαθμό. Αντιθέτως, τα αποτελέσματα της μεθόδου διάχυσης δίσκου σε άγαρ έναντι της *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922, για τα τέσσερα δείγματα υδρογελών που αναφέρθηκαν, δεν αποτύπωσαν επαρκή αντιμικροβιακή δράση.

Λέξεις κλειδιά: υδρογέλες, αλγινικό, νανοσωματίδια μετάλλων, αντιμικροβιακή δράση, εκχύλισμα φύλλου ελιάς, παθογόνοι, Bioscreen C

ABSTRACT

Currently, the development of antimicrobial hydrogels with encapsulated metal nanoparticles, to address the increasing prevalence of microbial infections, is in the center of global biomedical research as well as the present laboratory study. The present work dealt with the control of antimicrobial activity of alginate hydrogels, enriched or not, with silver nanoparticles and olive leaf extract, against pathogenic bacteria and yeasts. Antimicrobial testing was performed using the agar well and disk diffusion methods as well as the automated spectrophotometric technology of Bioscreen C. This was followed by study and statistical analysis of the antimicrobial action results using Microsoft Excel 2010 program and DMFit ComBase microbiological software. Based on the overall observations of the Bioscreen C technique, remarkable antimicrobial activity results and mainly bacteriostatic action of alginate-AgNPs-olive leaf extract-NADES hydrogel were detected against the microorganisms *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* NCTC 12023/ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* NCTC 7973/ATCC 35152, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903/ATCC 27853 and *Yersinia enterocolitica* NCTC 12982/ATCC 9610, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788/ATCC 6538, *Bacillus cereus* NCTC 10320/ATCC 9634, *Saccharomyces cerevisiae* NCPF 3255/ATCC 2091 and *Lachancea*. The hydrogels with alginate-CaCl₂, with alginate-olive leaf extract-NADES and with alginate-NADES also showed an inhibitory effect on the growth of the above microbial strains, but to a lesser extent. In contrast, the results of agar disk diffusion method, for the four hydrogel samples that was reported, did not capture any sufficient antimicrobial activity against *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922.

Key words: hydrogels, alginate, silver nanoparticles, antimicrobial activity, olive leaf extract, pathogens, Bioscreen C

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων	6
1. Εισαγωγή	9
1.1. Υδρογέλη	11
1.2. Κατηγορίες υδρογελών	14
1.3. Λειτουργικός ρόλος και ιδιότητες υδρογελών	15
1.3.1. Μηχανικές ιδιότητες.....	16
1.3.2. Ιδιότητες διόγκωσης και αποδιόγκωσης	18
1.3.3. Βιοσυμβατότητα-Βιοαποικοδόμηση	18
1.3.4. Αντιμικροβιακές ιδιότητες	19
1.4. Εφαρμογές των υδρογελών	20
1.4.1. Γενικές εφαρμογές των υδρογελών	21
1.4.2. Αντιμικροβιακές εφαρμογές υδρογελών	22
1.5. Μέθοδοι αντιμικροβιακής ικανότητας	23
1.5.1. Μέθοδος διάχυσης δίσκου σε άγαρ.....	24
1.5.2. Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ	25
1.5.3. Bioscreen C.....	25
1.6. Μικροοργανισμοί.....	28
1.6.1. Βακτήρια	28
1.6.2. Ζύμες.....	29
1.7. Συστατικά υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124	30
1.7.1. Αλγινικό οξύ	30
1.7.2. Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl ₂).....	32
1.7.3. Φυσιικοί ευτηκτικοί οργανικοί διαλύτες (NADES).....	33
1.7.4. Νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs).....	35
1.7.4.1. Αντιμικροβιακή δράση νανοσωματιδίων αργύρου	36
1.7.4.2. Μέθοδος πράσινης σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου με χρήση εκχυλίσματος φύλλων φυτών.....	38
1.7.4.3. Αντιμικροβιακή δράση νανοσωματιδίων αργύρου που συντέθηκαν με πράσινη εκχύλιση από φύλλα φυτών.....	39
1.7.5. Εκχύλισμα φύλλου ελιάς	40
1.7.5.1. Φαινολικές ενώσεις φύλλων ελιάς	40
1.7.5.2. Αντιμικροβιακή δράση φύλλων ελιάς	41
2. Υλικά και μέθοδοι	42
2.1. Υλικά και εξοπλισμός	42

2.1.1. Υλικά και αντιδραστήρια	42
2.2. Μέθοδοι	46
2.2.1. Μέρος Α' - Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης με χρήση των μεθόδων διάχυσης φρεατίου σε άγαρ και διάχυσης δίσκου σε άγαρ	47
2.2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων	47
2.2.1.1.1. 1 ^η Πειραματική δοκιμή	47
2.2.1.1.2. 2 ^η Πειραματική δοκιμή	49
2.2.1.1.3. 3 ^η Πειραματική δοκιμή	49
2.2.1.1.4. 4 ^η Πειραματική δοκιμή	50
2.2.1.2. Παρασκευή υποστρωμάτων	50
2.2.1.3. Προετοιμασία μικροοργανισμών	50
2.2.1.4. Μεθοδολογία	51
2.2.1.4.1. Μεθοδολογία 1 ^{ης} πειραματικής δοκιμής.....	52
2.2.1.4.2. Μεθοδολογία 2 ^{ης} πειραματικής δοκιμής.....	53
2.2.1.4.3. Μεθοδολογία 3 ^{ης} πειραματικής δοκιμής.....	54
2.2.1.4.4. Μεθοδολογία 4 ^{ης} πειραματικής δοκιμής.....	54
2.2.2. Μέρος Β' - Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης με χρήση της μεθόδου Bioscreen C.....	55
2.2.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων	55
2.2.2.2. Προετοιμασία μικροοργανισμών	55
2.2.2.3. Μεθοδολογία	55
2.2.2.3.1. Μεθοδολογία 1 ^{ης} πειραματικής δοκιμής.....	56
2.2.2.3.2. Μεθοδολογία 2 ^{ης} πειραματικής δοκιμής.....	57
2.2.2.3.3. Μεθοδολογία 3 ^{ης} πειραματικής δοκιμής.....	57
3. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	58
3.1. Αποτελέσματα και συζήτηση πειραματικού μέρους Α' - Μέθοδοι διάχυσης φρεατίου και δίσκου σε άγαρ.....	58
3.1.1. Αποτελέσματα 1 ^{ης} πειραματικής δοκιμής	59
3.1.2. Αποτελέσματα 2 ^{ης} πειραματικής δοκιμής	62
3.1.3. Αποτελέσματα 3 ^{ης} πειραματικής δοκιμής	64
3.1.4. Αποτελέσματα 4 ^{ης} πειραματικής δοκιμής	66
3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση πειραματικού μέρους Β' – Bioscreen C.....	68
3.2.1. Αποτελέσματα 1 ^{ης} πειραματικής δοκιμής - <i>S.aureus</i>	71
3.2.2. Αποτελέσματα 2 ^{ης} πειραματικής δοκιμής	76
3.2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	78
3.2.2.2. <i>Salmonella typhimurium</i>	80

3.2.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	83
3.2.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	85
3.2.2.4. <i>S.cerevisiae</i>	88
3.2.2.5. <i>Lachancea</i>	90
3.2.3. Αποτελέσματα 3 ^{ης} πειραματικής δοκιμής	94
3.2.3.21. <i>Enterococcus faecalis</i>	96
3.2.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97
3.2.3.3. <i>Bacillus cereus</i>	99
3.2.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	101
3.2.3.5. <i>Yersinia enterocolitica</i>	103
3.2.3.6. <i>Listeria monocytogenes</i>	105
4. Συμπεράσματα	109
5. Παράρτημα.....	114
6. Βιβλιογραφία.....	116

1. Εισαγωγή

Η δυναμική της σύγχρονης ζωής συνεπάγεται μια ποικιλία δραστηριοτήτων που περιλαμβάνει μεγάλη ανταλλαγή ιδεών, η οποία αναπόφευκτα οδηγεί στη βελτίωση της διαδικασίας ζωής και στην ανάπτυξη της επιστήμης σε πρωτοφανή επίπεδα. Ως εκ τούτου, τα πεδία της βιοϊατρικής μηχανικής σε συνδυασμό με τις νέες αντιμικροβιακές προσεγγίσεις κάνουν μεγάλα βήματα με την εισαγωγή νέων τεχνολογικών επιτευγμάτων, όπως οι υδρογέλες, στον τομέα των βιοϋλικών για τη βελτίωση της θεραπείας ασθενειών και λοιμώξεων σε διάφορους τομείς της ιατρικής (Ulery κ.ά., 2011), της μηχανικής (I. Alarcon κ.ά., 2015), της γεωργίας (Shariatinia & Jalali, 2018) αλλά και στην τεχνολογία τροφίμων (Mai κ.ά., 2023). Τα πολυμερή υδρογέλης αποτελούν υδρόφιλες ενώσεις με τρισδιάστατες δομές ιστών που είναι σε θέση να απορροφούν, να διαστέλλονται και να συγκρατούν μεγάλες ποσότητες υγρού (Fekete κ.ά., 2017). Οι υδρογέλες περιέχουν υδρόφιλες πολυμερείς ομάδες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση ή την ενσωμάτωση νανοσωματιδίων επειδή έχουν κενά διαστήματα/πόρους μεταξύ των διασταυρούμενων ιστών τους, γεγονός που τις κάνει να δρουν ως νανοσυνθέτες ή/και νανομεταφορείς (El-Sherif κ.ά., 2011).

Ο όρος υδρογέλη εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1894 καθώς χρησιμοποιήθηκε για να εξηγήσει μια κολλοειδή γέλη (Van Bemmelen, 1894) ενώ η πρώτη αναφορά για την εφαρμογή υδρογέλης δόθηκε από τους Wichterle & Lím, 1960, η οποία όπως αναμένεται ήταν στον βιοϊατρικό τομέα. Επί αυτού, η βακτηριακή λοίμωξη παραμένει μια από τις πιο σοβαρές επιπλοκές διαχρονικά για την ανθρώπινη υγεία και μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο σε ορισμένες σοβαρές περιπτώσεις, ενώ πλήθος μυκήτων και ζυμών προκαλεί επίσης παθολογία και προβλήματα στους τομείς που αναφέρθηκαν. Τα αντιμικροβιακά μέσα και τα πεπτίδια που υπάρχουν διαθέσιμα, όπως τα αντιβιοτικά, συνήθως χαρακτηρίζονται από βραχυπρόθεσμη αντιμικροβιακή δράση, σημαντική περιβαλλοντική τοξικότητα αλλά και πρωτεολυτική αστάθεια και αποικοδόμηση. Ενώ, επίσης ως ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιμικροβιακά υλικά, τα βαρέα μέταλλα και τα φυσικά εκχυλίσματα προκαλούν περιορισμούς, αφού καταπολεμούν τόσο τα μικρόβια που προκαλούν βλάβες σε φυσιολογικά όργανα και ιστούς των ασθενών, όσο και τα υγιή κύτταρα. Για να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα, οι αντιμικροβιακές ουσίες συχνά ενσωματώνονται φυσικά ή συζευγνύονται χημικά με βιοσυμβατά πολυμερή, όπως υδρογέλες, για να ενισχύσουν την αντιμικροβιακή τους αποτελεσματικότητα και ειδικότητα, να μειώσουν την κυτταροτοξικότητά τους, να παρατείνουν τη βιοσταθερότητα και τη βιοσυμβατότητά τους και τελικά να προωθήσουν βελτιωμένες βιοχημικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (García-Barrasa κ.ά., 2011; González-Henríquez κ.ά., 2017).

Ορισμένα υλικά υδρογελών έχουν εγγενείς αντιμικροβιακές ιδιότητες και ορισμένα πρέπει να εμπλουτιστούν με αντιμικροβιακούς παράγοντες προκειμένου να επιτευχθεί η τελική επιθυμητή λειτουργία. Οι υδρογέλες αλγινικού οξέος με εγκλεισμένα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) αποτελούν συνδυασμό και των δύο εκδοχών που αναφέρθηκαν, με τον αλγινικό πολυσακχαρίτη να είναι η πρώτη επιλογή πολυμερούς συστατικού για θεραπεία λοιμώξεων, κυρίως του δέρματος. Σφαιρίδια υδρογέλης με αλγινικό (0,5% w/v), με 1,3:2:4-δι(4-ακυλο υδραζίδιο)-βενζυλιδενο σορβιτόλη (0,3% w/v) και νανοσωματίδια αργύρου παρουσίασαν καλές αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι του ανθεκτικού στα φάρμακα βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) και του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη *Enterococcus faecium* (VAR) (Piras κ.ά., 2020). Νανοσωματίδια αργύρου, που ενσωματώθηκαν επίσης σε υδρογέλη που παρασκευάστηκε με χρήση αλγινικού (2% w/v) και κολλαγόνου (τύπου I, 1% w/v) παρουσίασαν χαμηλή κυτταροτοξικότητα, με αξιοσημείωτες αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι του *S.aureus* και της *E.coli*, αναλογικά με την συγκέντρωση των νανοσωματιδίων (H.Zhang κ.ά., 2018). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων αργύρου εξαρτώνται από το επίπεδο συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων στο υδροπήκτωμα, για αυτό τα λειτουργοποιημένα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) με θειοκτικό οξύ που αναφέρονται στην μελέτη των Porter κ.ά., 2021, εμποδίστηκαν να συσσωρευτούν σε μεγάλο βαθμό και οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες βελτιώθηκαν όταν εγκλείστηκαν σε αλγινική υδρογέλη. Επιπλέον, σε άλλη έρευνα η φόρτωση της υδρογέλης με βάση άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου με ιόντα αργύρου αύξησε σημαντικά την ανασταλτική της δράση έναντι μιας ευρείας ποικιλίας παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των στελεχών *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* με ανθεκτικότητα στην μεθικιλίνη (MRSA), *S.aureus*, *E.coli* και *P.aeruginosa* (ATCC®10145 και ATCC®27853 αντίστοιχα), σε σύγκριση με τις συμβατικές υδρογέλες με βάση μόνο το αλγινικό άλας. Η τροποποιημένη δομή του αλγινικού άλατος επέτρεψε την αργή και σταθερή απελευθέρωση ιόντων αργύρου, μειώνοντας αποτελεσματικά την τοξικότητά τους διατηρώντας παράλληλα τα αντιβακτηριακά αποτελέσματα, καθιστώντας το ένα εξαιρετικό υλικό επίδεσης πληγών (Tomić κ.ά., 2023).

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης, αποτέλεσε ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης αλγινικών υδρογελών εμπλουτισμένων ή μη με νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) και εκχύλισμα φύλλου ελιάς, οι οποίες ελήφθησαν και ελέγχθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση σε συνεργασία με το πρόγραμμα διδακτορικής διατριβής της υποψήφιας διδάκτωρ Ιωάννας Πιττερού, υπό την επίβλεψη της επίκουρης καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση. Η αναφερόμενη διδακτορική μελέτη αποτέλεσε έρευνα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Επιπλέον, τα αντιμικροβιακά αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης δημοσιεύτηκαν ως μέρος του Poster PC-2-43.

“Nanocomposite alginate hydrogels incorporating silver nanoparticles: a green approach towards smart antimicrobial materials”, το οποίο παρουσιάστηκε, στο επιστημονικό συνέδριο MedChem 2023 Greece, XII Paul Ehrlich MedChem EuroPhD, Network Symposium. Το συνέδριο πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Φαρμακευτικής Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ), στην Θεσσαλονίκη, 16 με 18 Ιουλίου του 2023 και το δημοσιευμένο Poster παρουσιάζεται στον ακόλουθο σύνδεσμο, στην σελίδα 97: <https://medchem2023.com/abstract-book/>.

Ως εκ τούτου, τα τέσσερα δείγματα υδρογελών με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) αξιολογήθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* και *Yersinia enterocolitica* και των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* και *Lachancea*, με χρήση των αντιμικροβιακών μεθόδων διάχυσης φρεατίου και δίσκου σε άγαρ και της αξιόπιστης τεχνικής Bioscreen C. Ως εκ τούτου, η ανάλυση των αποτελεσμάτων από την τεχνική Bioscreen C πραγματοποιήθηκε με την χρήση του μικροβιολογικού προγράμματος DMFit ComBase, τα συνολικά δεδομένα του οποίου, παρουσιάζονται σε αρχεία Excel 2010, ως μέρος του παραρτήματος της παρούσας μελέτης. Συμπληρωματικά, ως διαλύτης εκχύλισης των φύλλων της ελιάς χρησιμοποιήθηκε ένας Φυσικός Βαθύς Ευτηκτικός Διαλύτης (NADES) με σκοπό να ληφθεί ένα εκχύλισμα με υψηλή αντιοξειδωτική και ίσως αντιμικροβιακή δράση. Ο πολυσακχαρίτης του αλγινικού οξέος και ο διαλύτης NADES αποτελούν βασικά υλικά των υδρογελών ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124, ενώ η υδρογέλη ADIP1121 αποτελείται από αλγινικό και χλωριούχο ασβεστίου (CaCl₂), το οποίο συμβάλλει στην ιοντική διασύνδεση των αλγινικών τμημάτων όπως θα αναλυθεί σε επόμενες ενότητες. Οι υδρογέλες ADIP1122 και ADIP1123, εκτός από το αλγινικό και τον διαλύτη NADES, περιέχουν ορισμένη συγκέντρωση εκχυλίσματος φύλλου ελιάς και νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs), με το εκχύλισμα φύλλου ελιάς πιθανόν να μπορεί να προσδώσει βελτιωμένη αποτελεσματικότητα.

1.1. Υδρογέλη

Ως υδρογέλη ορίζεται ένα καινοτόμο υλικό δύο φάσεων, το οποίο αποτελείται από μία βασική στερεή πορώδη δομή, μέσα στην οποία περιέχεται ένα μεγάλο μέρος υδατικού διαλύτη. Οι υδρογέλες επίσης αναφέρονται ως τζελ νερού, αποτελώντας μια σειρά από μαλακά και υγρά υλικά που έχουν τρισδιάστατα πορώδη δίκτυα μορίων πολυμερούς, ινών ή σωματιδίων χαμηλού κλάσματος όγκου, στα οποία το νερό ή η υδατική φάση δρα ως μέσο διασποράς. Το υλικό της

υδρογέλης αποτελεί ένα σύστημα που ανήκει σε μία μοναδική κατηγορία διογκωμένου μακρομοριακού δικτύου υδρόφιλων ομοπολυμερών ή συμπολυμερών, τα οποία όταν διασυνδέονται δημιουργούν ένα πλήρως ενυδατωμένο και διογκωμένο πλέγμα. Ειδικότερα, κάθε ολιγομερές διαθέτει προοδευτικά περισσότερες λειτουργικές ομάδες ικανές να αντιδρούν, και καθώς συμβαίνει το φαινόμενο «συσσωμάτωσης συσσωματωμάτων», επιτυγχάνεται ένα κρίσιμο σημείο όπου ένα τέτοιο συνολικό συσσωμάτωμα, χωρίς να υφίσταται ενσωμάτωση του πλήρους υλικού, γίνεται ουσιαστικά «άπειρο», σχηματίζοντας το επιθυμητό πήκτωμα (Gordon & Ross-Murphy, 1975; Lowman and Peppas, 1999; J. Li κ.ά., 2021).

Παρόλα αυτά οι υδρογέλες δεν είναι ομοιογενείς επειδή οι ομάδες που τις αποτελούν και συνδέονται με διάφορα είδη δεσμών μπορούν δημιουργούν ανομοιογένειες. Επιπλέον, τα μέρη της αλυσίδας που συμμετέχουν στην συνένωση των πολυμερών και των σχηματισμό της τελικής μορφής του πηκτώματος ή τα ελεύθερα άκρα της αλυσίδας οδηγούν επίσης σε παροδικές ατέλειες κυρίως του εξωτερικού πλαισίου των υδροπηκτωμάτων. Οι υδρογέλες μπορούν να παρασκευαστούν χρησιμοποιώντας πολυλειτουργικά πολυμερή ή μονομερή διαλύτη και το δίκτυο που δημιουργείται μπορεί να απορροφήσει και να διατηρήσει καλή ποσότητα νερού. Επιπλέον, το πλέγμα μπορεί να ενσωματώσει αδιάλυτες μικροσκοπικές οντότητες όπως μικροσωματίδια ή τα νανοϊνίδια, τα οποία αλληλεπιδρούν με το υδρόφιλο πολυμερές για να σχηματίζουν υδρογέλες. Τα αρχικά μονομερή ή τα δομικά στοιχεία που ενώνονται είναι διαλυτά στο νερό αλλά καθώς προστίθενται οι παράγοντες διασταύρωσης, ο βαθμός της διασταύρωσης αυξάνεται και σε κάποιο σημείο, αυτό το μακροσκοπικό υλικό γίνεται αδιάλυτο στο νερό λόγω των φυσικών ή χημικών δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων (Khan κ.ά., 2022).



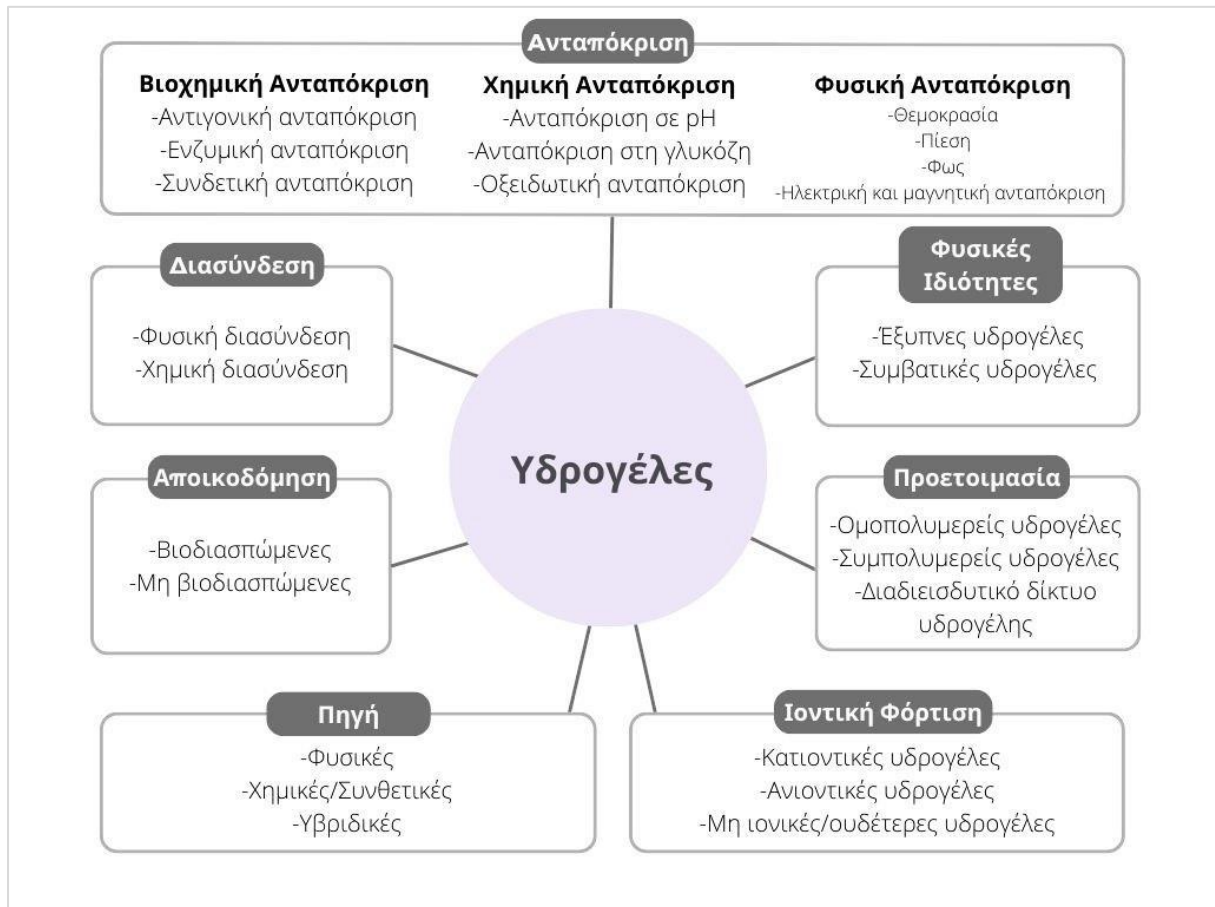
Εικόνα 1.1: Εικόνα ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) από μικροκάψουλες ανθρακικού ασβεστίου και κοίλου αλγινικού αργύρου που συντέθηκαν με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, Πηγή: (Feyzmanesh κ.ά., 2022), Εικόνα 1.2: Υδρογέλη, Πηγή: (Bill Fraser, Product Development Scientist, Scapa Healthcare, 2021), Εικόνα 1.3: SEM υδρογέλης αλγινικού στα 50 μm, Πηγή: (Lengert κ.ά., 2017).

Γενικά, οι υδρογέλες διαθέτουν υδρόφιλα πολυμερικά πλαίσια που μπορούν να απορροφήσουν από 10 έως 20% (υποκειμενικό κατώτερο όριο) μέχρι και τεράστια ποσότητα νερού σε σχέση με το ξηρό τους βάρος. Ορισμένες υδρογέλες μπορεί να είναι χημικά σταθερές

ενώ κάποιες μπορεί καταστραφούν και τελικά καταρρέουν και υγροποιούνται. Οι υδροπηκτές μπορεί να είναι φυσικά πηκτώματα όπου τα πλαίσια συγκρατούνται ενωμένα με μοριακή παγίδευση του νερού και/ή με πρόσθετες δυνάμεις, συμπεριλαμβανομένων ιοντικών δεσμών, δεσμών υδρογόνου ή υδρόφοβες δυνάμεις. Η διασύνδεση των πολυμερών αλυσίδων μπορεί να είναι φυσική, μέσω δεσμών υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή χημική, με την χρήση ομοιοπολικών δεσμών. Άλλοι τύποι δεσμών περιλαμβάνουν ηλεκτροστατικές, ελκυστικές και απωθητικές δυνάμεις, τη διαμοριακή σύνδεση υδρόφοβων κηλίδων και αλληλεπιδράσεις γεφύρωσης ιόντων, ειδικά στην περίπτωση που περιλαμβάνουν πολυσθενή κατιόντα. Τέτοιοι μη ομοιοπολικοί δεσμοί εμπλέκονται, για παράδειγμα, στον σχηματισμό σφαιρικών πρωτεϊνικών πηκτωμάτων, και στον σχηματισμό πολλαπλών ελικοειδών και άλλων τύπων διατεταγμένων ζωνών διασύνδεσης, που εντοπίζονται σε πολυμερή βιολογικής προέλευσης. Ο υδροφιλικός χαρακτήρας του δικτύου, με τη σειρά του, οφείλεται στην παρουσία χαρακτηριστικών χημικών ομάδων όπως τα υδροξύλια (-OH), καρβοξύλια (-COOH), αμίδια (-CONH-), πρωτογενή αμίδια (-CON₂), σουλφονικά (-SO₃H), και άλλα που μπορούν να εντοπιστούν εντός του πολυμερικού σκελετού ή ως μέρος των πλευρικών αλυσίδων (Ross-Murphy & McEnoy, 1986; Khan κ.ά., 2022).

Αν και οι υδρογέλες αποτελούνται κατ' εξοχήν από νερό όπως αναφέρθηκε, είναι αδιάλυτες σε υδατικά διαλύματα λόγω της παρουσίας των χημικών ομοιοπολικών, ιοντικών ή φυσικών διασταυρώσεων που εμφανίζονται με την μορφή συμπλεγμάτων, κρυσταλλίτων ή δομών συνδεδεμένων με δεσμούς υδρογόνου. Η ευρεία χρησιμότητα τους είναι μετενέργεια της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε νερό, της λαστιχένια τους φύσης, η οποία είναι παρόμοια με τους φυσικούς ιστούς, καθώς και της εξαιρετικής βιοσυμβατότητάς που εμφανίζουν. Η υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού είναι το χαρακτηριστικό που τις καθιστά βιοσυμβατές. Παράδειγμα αυτού είναι ότι υπάρχουν φυσικές υδρογέλες, όπως το DNA και οι πρωτεΐνες, καθώς και οι συνθετικές υδρογέλες, όπως το πολυ(2-υδροξυαιθυλομεθακρυλικό), το πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) ή ακόμη και βιοϋβρίδια αυτών (Letchford & Burt, 2007; Peppas, 2019).

1.2. Κατηγορίες υδρογελών



Διάγραμμα 1: Κατηγοριοποίηση υδρογελών, Πηγή: Ullah κ.ά., 2015

Τα πολυμερή των υδρογελών μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες με βάση ξεχωριστές παραμέτρους σύνθεσης, δράσης και αποικοδόμησης. Ανάλογα με τη πηγή προέλευσης του πολυμερούς, οι υδρογέλες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες. Τις φυσικές υδρογέλες, τα χημικά/συνθετικά συνθετικά πολυμερή υδρογελών και τις υβριδικές υδρογέλες, που παρασκευάζονται με συνδυασμό φυσικών πολυμερών με συνθετικά πολυμερή. Τα πολυμερή που προέρχονται από αλγινικό οξύ, πηκτίνη, καραγενάνη, χιτοζάνη, πολυλυσίνη, κολλαγόνο, καρβοξυμεθυλοχίτίνη, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, δεξτράνη, αγαρόζη, πουλλουλάνη κ.λπ. έχουν ταξινομηθεί ως φυσικά πολυμερή, ενώ τα συνθετικά υδροπηκτώματα περιλαμβάνουν πολυμερή από πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και πολυακρυλικό οξύ (PAA). Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι ότι τα συνθετικά πολυμερή είναι ανώτερα καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως λόγω των ανώτερων μηχανικών ιδιοτήτων και ιδιοτήτων αποδόμησης που τα χαρακτηρίζουν. Περαιτέρω, με βάση το φορτίο που υπάρχει στην επιφάνεια των υδρογελών, αυτές μπορούν να ταξινομηθούν ως κατιοντικές, ανιοντικές και μη ιονικές υδρογέλες. Όταν σχηματίζεται υδρογέλη χρησιμοποιώντας ένα πολυμερές που διαθέτει

ανιοντικούς χαρακτήρες όπως υαλουρονικό οξύ ή/και αλγινικό οξύ, τότε η υδρογέλη χαρακτηρίζεται ως ανιοντική, ενώ κατιονικές ορίζονται οι υδρογέλες που παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας ένα πολυμερές που αποκτά κάποιο θετικό φορτίο όπως η χιτοζάνη και η πολυλυσίνη. Αυτά τα φορτία παίζουν καθοριστικό ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων και στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, στις μη ιονικές ή ουδέτερες υδρογέλες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν πολυμερή όπως η δεξτράνη, η αγαρόζη και η πουλλουλάνη. Ακολούθως, με βάση η ανταπόκρισή τους σε ερεθίσματα όπως το pH, η θερμοκρασία, η πίεση, το φως, το ηλεκτρικό, το μαγνητικό πεδίο, η συγκέντρωση της γλυκόζης και το δυναμικό οξειδοαναγωγής, οι υδρογέλες μπορούν να αναφέρονται ως υδρογέλες που ανταποκρίνονται σε φυσικά και χημικά ερεθίσματα. Συμπληρωματικά, οι ευαίσθητες στη γλυκόζη υδρογέλες αποτελούν φορείς ινσουλίνης και μειγμάτων οξειδάσης της γλυκόζης, ενώ από βιοχημική άποψη οι υδρογέλες μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικούς φορείς ενζύμων και αντιγόνων, στο τομέα της βιοϊατρικής. Βάση των μεθόδων προετοιμασίας ή παρασκευής, οι υδρογέλες μπορούν ακόμη να ταξινομηθούν ως ομοπολυμερείς, συμπολυμερείς ή ως αλληλοδιεισδυτικά δίκτυα πολυμερών. Οι υδρογέλες ομοπολυμερών είναι διασυνδεδεμένα δίκτυα ενός τύπου υδρόφιλης μονομερούς μονάδας, ενώ οι συμπολυμερείς υδρογέλες παράγονται με τη διασύνδεση δύο μονάδων συν-μονομερών, τουλάχιστον η μία από τις οποίες πρέπει να είναι υδρόφιλη προκειμένου να προκύψει η επιθυμητή διόγκωση. Τέλος, τα διαδιεισδυτικά δίκτυα υδρογελών (IPN) ορίζονται συμβατικά ως ο συνδυασμός δύο πολυμερών, τουλάχιστον το ένα από τα οποία συντίθεται ή διασταυρώνεται με την άμεση παρουσία του άλλου. Τα κύρια πλεονεκτήματα των δικτύων IPN είναι ότι προσφέρουν καλύτερες μηχανικές ιδιότητες αναφορικά με την σκληρότητα, ελεγχόμενα φυσικά χαρακτηριστικά και πιο αποτελεσματική φόρτωση φαρμάκων σε σύγκριση με τις συμβατικές υδρογέλες. Οι υδρογέλες μπορούν τελικά να χωριστούν και σε δύο ομάδες με βάση τον τρόπο διασύνδεσης των πολυμερών. Τα χημικά διασυνδεδεμένα δίκτυα αποτελούνται από σταθερούς σταυρόδεσμούς, ενώ τα φυσικά δίκτυα διαθέτουν προσωρινές συνδέσεις που προκύπτουν από οποιαδήποτε αλυσίδα πολυμερούς με αλληλοεξαρτώμενες ή φυσικές αλληλεπιδράσεις όπως ιοντικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Hacker & Mikos, 2011; Ullah κ.ά., 2015; Chen, 2019).

1.3. Λειτουργικός ρόλος και ιδιότητες υδρογελών

Από την φύση τους οι υδρογέλες αποτελούν πολυμερή διογκωμένα με νερό, διασταυρωμένα και υδρόφιλα, με μοναδικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες οι οποίες τα κάνουν να πλεονεκτούν έναντι άλλων υλικών. Οι ιδιότητες μιας υδρογέλης είναι εξαιρετικά σημαντικές για την επιλογή της ως υλικό, κατάλληλο για μια δεδομένη εφαρμογή, όπως είναι και η χρήση της ως αντιμικροβιακός παράγοντας. Οι μοναδικές ιδιότητες των πολυμερών υδρογελών όπως η

απορρόφηση και η συμπεριφορά διόγκωσης και αποδιόγκωσης μπορούν να καθορίσουν την υφή και το τελικό σχήμα της υδρογέλης. Ενώ η ελαστικότητα, η θραύση και δύναμη, ως χαρακτηριστικές μηχανικές ιδιότητες των πολυμερών αλλά και η πολλά υποσχόμενη αντιμικροβιακή τους δράση τα καθιστούν κατάλληλα για διάφορες εφαρμογές στη βιοϊατρική μηχανική, τη χορήγηση φαρμάκων, τη μηχανική ιστών, διαφέροντας από πολλά πολυμερή, οι υδρογέλες διακρίνονται από έντονα χαρακτηριστικά υδροφιλίας και βιοσυμβατότητας, τα οποία αποτελούν κύριο λόγο για τις ευρείες εφαρμογές τους (Anseth κ.ά., 1996; Laftah κ.ά., 2011).

1.3.1. Μηχανικές ιδιότητες

Οι υδρογέλες είναι ένας τύπος πολυμερούς υλικού που μπορεί να απορροφήσει και να συγκρατήσει μεγάλες ποσότητες νερού. Έχουν μοναδικές μηχανικές ιδιότητες, όπως υψηλή ελαστικότητα, ευελιξία, δύναμη, σκληρότητα και αντοχή σε θραύση. Οι μηχανικές ιδιότητες των υδρογελών μπορούν να διαμορφωθούν ρυθμίζοντας την πυκνότητα διασύνδεσης, τη συγκέντρωση πολυμερούς και τη χημική σύνθεση του υλικού. Οι ιδιότητες αυτές επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της χημικής δομής και του μοριακού βάρους του πολυμερούς, της κρυστάλλωσης του πολυμερούς, της τοπολογίας του δικτύου, της φύσης της διασύνδεσης και της αντίστοιχης πυκνότητας. Η μηχανική συμπεριφορά των υδρογελών μπορεί να κατανοηθεί καλύτερα, χρησιμοποιώντας τις θεωρίες της ελαστικότητας του καουτσούκ και της ιξωδοελαστικότητας. Ειδικότερα, η γνώση της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς και γενικότερα των μηχανικών ιδιοτήτων των πολυμερών, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους παρακάτω λόγους. Αναφορικά με την διαδικασία παραγωγής του πολυμερούς, είναι δυνατή η ρύθμιση των συνθηκών όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος και η πίεση, προκειμένου να αποφευχθεί η εμφάνιση ελαττωμάτων στο παραγόμενο πολυμερές. Ενώ, κατά την χρησιμοποίησή του, γνωρίζοντας την μηχανική του συμπεριφορά, γίνεται η επιλογή του πλέον κατάλληλου, ώστε να ικανοποιούνται οι απαιτήσεις του υλικού (Anseth κ.ά., 1996; Γιώργος Π. Καραγιαννίδης - Ειρήνη Δ. Σιδερίδου, 2009; Lin κ.ά., 2022).

Γενικότερα, η ελαστική συμπεριφορά των υδρογελών διαφοροποιείται με βάση το είδος πολυμερούς από τα οποία αποτελείται το τρισδιάστατο πλέγμα, καθώς οι περισσότερες υδρογέλες συνθετικών πολυμερών όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), το πολυακρυλαμίδιο (PA) και η πολυβινυλική αλκοόλη εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά με αυτή των υλικών που μοιάζουν με καουτσούκ. Αντίθετα, υδρογέλες που αποτελούνται από βιο-πολυμερή όπως η ακτίνη, το κολλαγόνο και το ινώδες, παρουσιάζουν διαφορετικές ρεολογικές ιδιότητες όπως η ακαμψία της παραμόρφωσης και η αρνητική κανονική καταπόνηση, οι οποίες εκλείπουν από

βιοϋλικά των οποίων η ελαστική συμπεριφορά βασίζεται στην κλασική θεωρία ελαστικότητας του καουτσούκ. Οι υδρογέλες όταν βρίσκονται στην διογκωμένη τους μορφή, ικανοποιούν τα παραπάνω κριτήρια και λειτουργούν ως καουτσούκ, με σημαντικότερη παράμετρο για την ρύθμιση της ελαστικότητας του να αποτελεί η αρχιτεκτονική του τρισδιάστατου δικτύου πολυμερών. Ωστόσο, σε χαμηλές θερμοκρασίες, αυτά τα τζελ μπορεί να χάσουν τις ελαστικές ιδιότητες του καουτσούκ και να παρουσιάσουν ιξωδοελαστική ελαστική συμπεριφορά. Κατά την ιξωδοελαστική συμπεριφορά των πολυμερών, το νερό που περιέχεται στις υδρογέλες τις κάνει μακροσκοπικά ασυμπίεστες και επιτρέπει στα πηκτώματα να «ρέουν» σαν υγρά, ενώ οι δομές του δικτύου πολυμερών παρέχουν μηχανική υποστήριξη στα πηκτώματα, επηρεάζοντας άμεσα τις ελαστικές τους ιδιότητες. Η αυξημένη συγκέντρωση πολυμερούς και η συγκέντρωση διασταυρούμενων δεσμών, για παράδειγμα, μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση ελαστικότητας της γέλης. Ο συντονισμός της ιξωδοελαστικότητας των υδρογελών είναι πολύ σημαντικός για εφαρμογές μηχανικής ιστών, ειδικά στη χρήση τους ως συνθετικές εξωκυτταρικές μήτρες για τρισδιάστατη καλλιέργεια και για τη μίμηση της συμπεριφοράς φυσικών ιστών όπως ο εγκέφαλος, το συκώτι, ο λιπώδης ιστός και οι μύες (Dong & Hoffman, 1991; Anseth κ.ά., 1996; Γιώργος Π. Καραγιαννίδης - Ειρήνη Δ. Σιδερίδου, 2009; Caccavo κ.ά., 2018).

Η ικανότητα των υδρογελών για διατήρηση της μηχανικής καταπόνησης και η αντίσταση τους στη θραύση είναι επίσης ζωτικής σημασίας, κυρίως για τον καθορισμό του ορίου λειτουργίας και της διάρκειας ζωής των συσκευών που χρησιμοποιούν υδρογέλες. Η εκτίμηση της μηχανικής αντοχής των υδρογελών είναι απαραίτητη και σημαντική για την κατάλληλη φυσιολογική λειτουργία σε διάφορες προοπτικές, όπως για βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές, επισκευή τενόντων και συνδέσμων, αντικατάσταση χόνδρου, μηχανική ιστών, χρήση σε επίδεσμο τραύματος και ως μήτρα χορήγησης φαρμάκου. Εξαιρετικά σημαντικό για την υδρογέλη είναι να διατηρεί τη φυσική της υφή κατά την απελευθέρωση των θεραπευτικών παραγόντων, όπως των νανοσωματιδίων μετάλλων, για μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Όπως προαναφέρθηκε, αύξηση του βαθμού διασύνδεσης συνεπάγεται την ανάπτυξη ενός ισχυρού δικτύου υδροπηκτώματα. Ωστόσο, πολύ υψηλός βαθμός διασταύρωσης θα έχει ως αποτέλεσμα χαμηλή επιμήκυνση και ελαστικότητα του πλέγματος, με μεγαλύτερη ευθραυστότητα της γέλης (Bashir κ.ά., 2018, 2020).

Ανάλογα με τη διαδικασία προετοιμασίας και σύνθετα υλικά, υπάρχουν υδρογέλες με μηχανικές αντοχές που κυμαίνονται από λίγα Pa έως μερικές εκατοντάδες MPa. Οι υδρογέλες συνήθως κατηγοριοποιούνται είτε σε στατικές είτε σε δυναμικές, ανάλογα με την ικανότητά τους να ανταποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Οι στατικές υδρογέλες είναι συνήθως διασταυρούμενες μέσω άκαμπτων ομοιοπολικών δεσμών και μπορούν να διατηρήσουν σταθερές φυσικές και χημικές ιδιότητες σε διαφορετικές συνθήκες. Αντίθετα, δυναμικές

ορίζονται οι υδρογέλες έχουν σχεδιαστεί για να ανταποκρίνονται σε μια ποικιλία από εξωτερικά ερεθίσματα όπως η πίεση, η καταπόνηση, η θερμοκρασία, το φως, το pH και τα ιόντα (Yang, 2022).

1.3.2. Ιδιότητες διόγκωσης και αποδιόγκωσης

Οι ιδιότητες διόγκωσης και αποδιόγκωσης αποτελούν μέρος των μηχανικών ιδιοτήτων αλλά αξίζει να αναλυθούν ξεχωριστά, καθώς αποτελούν πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των υδρογελών. Επί αυτού, ο βαθμός διόγκωσης ισορροπίας και ο συντελεστής ελαστικότητας των υδρογελών εξαρτώνται από την μορφή σύνδεσης των διασταυρώσεων και τις πυκνότητες φορτίου του πολυμερούς δικτύου καθώς και από τη συγκέντρωση διασταυρούμενων πολυμερών μετά την παρασκευή της γέλης. Όσο υψηλότερη είναι η αρχική συγκέντρωση μονομερούς, τόσο μεγαλύτερη είναι η αποτελεσματική πυκνότητα διασταύρωσης των υδρογελών και τόσο μικρότερη είναι η ικανότητα διόγκωσής τους. Συμπληρωματικά, ο αυξανόμενος αριθμός ιοντικών ομάδων στις υδρογέλες είναι γνωστό ότι αυξάνει τις ικανότητές τους διόγκωσης. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των αντίθετα φορτισμένων ιόντων μέσα στη γέλη, η οποία παράγει μια πρόσθετη οσμωτική πίεση που διογκώνει το υδροπήκτωμα. Η υπερβολική διόγκωση πάνω από το όριο διόγκωσης των αντίστοιχων μη ιοντικών υδρογελών μπορεί να κατασταλεί με αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος στο εξωτερικό διάλυμα, η οποία μειώνει ακολούθως τη διαφορά συγκέντρωσης των αντίθετων ιόντων μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής φάσης γέλης (Flory, 1953; Okay, 2010).

1.3.3. Βιοσυμβατότητα-Βιοαποικοδόμηση

Τα απορροφητικά πολυμερή ή τα πολυμερή υλικά υδρογέλης έχουν ενισχυμένη ικανότητα συγκράτησης νερού και χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία και την ιατρική. Λόγω της ελεγχόμενης αποικοδόμησής τους, της ικανότητας προστασίας των ασταθών φαρμάκων από την αποικοδόμηση και των εύκαμπτων φυσικών ιδιοτήτων, οι υδρογέλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πλατφόρμα στην οποία μπορούν να μελετηθούν διάφορες χημικές και φυσικές αλληλεπιδράσεις με έγκλειστα φάρμακα για ελεγχόμενη απελευθέρωση στο σύστημα. Οι υδρογέλες έχουν μια τρισδιάστατη δομή δικτύου που αποτελείται από ομάδες υδρόφιλων πολυμερών που μπορούν να συγκρατήσουν μεγάλες ποσότητες νερού. Αυτή η δομή τους δίνει τις πλεονεκτικές ιδιότητες που περιλαμβάνουν βιοσυμβατότητα, υψηλή υδροφιλικότητα και ακόμη υψηλότερη ικανότητα απορρόφησης νερού. Επεξηγηματικά, η αρχική τρισδιάστατη δομή

διασπάται προς μη τοξικές ουσίες, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την εξαιρετική βιοσυμβατότητα του υδροπλήγματος. Ως βιοσυμβατότητα ορίζεται η ικανότητα ενός υλικού να λειτουργεί με κατάλληλη απόκριση σε μια συγκεκριμένη εφαρμογή. Ενώ, η βιοσυμβατότητα αποτελείται βασικά από τα στοιχεία της βιολειτουργικότητας, δηλαδή την ικανότητα του υλικού να εκτελεί τη συγκεκριμένη εργασία για την οποία προορίζεται και την βιοασφάλεια, δηλαδή την πρόληψη της μεγάλης κλίμακας απώλειας βιολογικής ακεραιότητας, που δίνει έμφαση στην παθητική πρόληψη και έλεγχο των ακούσια επαγόμενων βιοτεχνολογικών και μικροβιακών βιολογικών κινδύνων, την απουσία μεταλλαξιγένεσης και κυτταροτοξικότητας.

Ακολούθως, οι υδρογέλες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες με βάση την προέλευσή τους, συμπεριλαμβανομένων των συνθετικών πολυμερών και των φυσικών πολυμερών. Σε σύγκριση με τις συνθετικές υδρογέλες, οι φυσικές υδρογέλες είναι πιο ασφαλείς και διαθέτουν επίσης καλή βιοσυμβατότητα και βιοδιασπασιμότητα. Παραδείγματα φυσικών υδρογελών περιλαμβάνουν τις υδρογέλες με βάση πρωτεΐνες όπως η ζελατίνη και το κολλαγόνο, υδρογέλες με βάση το DNA και υδρογέλες με βάση πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο, το υαλουρονικό οξύ, το αλγινικό οξύ και η χιτοζάνη. Οι υδρογέλες με βάση το αλγινικό άλας εμφανίζουν εξαιρετικές ιδιότητες βιοσυμβατότητας, βιοαποδομησιμότητας και ευελιξίας τροποποίησης, παρουσιάζοντας ευρεία προοπτική εφαρμογής σε βιοϊατρικά πεδία ως φορείς φαρμάκων, σε επιδέσμους τραυμάτων και στην μηχανική ιστών. Σύμφωνα με τις ανάγκες της εφαρμογής, οι ερευνητές προσαρμόζουν συνεχώς και βελτιστοποιούν την απόδοση των υδρογελών με βάση το αλγινικό άλας με χημική τροποποίηση αλγινικού, εισαγωγή αντιδραστικών μονάδων ή διαφορετικές στρατηγικές διασύνδεσης, έτσι ώστε να διευρύνουν συνεχώς το βάθος και το εύρος των εφαρμογών τους (Malpure κ.ά., 2018; Tan κ.ά., 2023).

1.3.4. Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Οι υδρογέλες με αντιμικροβιακές ιδιότητες έχουν ληφθεί χρησιμοποιώντας το σύνολο των παραπάνω ιδιοτήτων που αναφέρθηκαν αλλά και διαφορετικές στρατηγικές μεταφοράς αντιμικροβιακών παραγόντων που μπορούν να συνοψιστούν σε δύο κύριες μεθοδολογίες. Πρώτον, οι υδρογέλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστηρίγματα για τη φόρτωση αντιμικροβιακών μορίων διαφορετικής φύσης, όπως νανοσωματίδια μετάλλων (συνήθως χρυσός ή άργυρος/ασήμι), αντιβιοτικά ή αντιμικροβιακά μέσα. Δεύτερον, οι υδρογέλες μπορούν να σχεδιαστούν με βάση υλικά που παρουσιάζουν εγγενή αντιμικροβιακή δράση. Τα πιο σχετικά παραδείγματα εγγενώς αντιμικροβιακών υλικών που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή υδρογέλης περιλαμβάνουν αντιμικροβιακά πεπτίδια, χιτοζάνη, αλγινικό άλας ή συνθετικά πολυμερή με αντιμικροβιακές λειτουργικές ομάδες (τεταρτοταγές αμμώνιο, N-χαλαμίνες, κ.λπ.) (Hernández-Sierra κ.ά., 2008; Malmsten, 2011).

Τα νανοσωματίδια αργύρου και χρυσού (NPs) είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα νανοσωματίδια για βιοσυσχετιζόμενες εφαρμογές, λόγω των μοναδικών αντιμικροβιακών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. Εκτός από αυτά, τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου έχουν επίσης αποδείξει εξαιρετικές αντιβακτηριακές ιδιότητες. Μια συγκριτική μελέτη έχει αναφερθεί από τους (Hernández-Sierra κ.ά., 2008), κατά την οποία διερευνήθηκαν τόσο οι βακτηριοκτόνες όσο και οι βακτηριοστατικές ιδιότητες του αργύρου, του οξειδίου του ψευδαργύρου και των νανοσωματιδίων χρυσού πάνω από το *Streptococcus mutans*. Παρά τις καλές ιδιότητες των τριών νανοσωματιδίων που μελετήθηκαν, οι συγγραφείς κατέδειξαν υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση κατά του *S.mutans* όταν χρησιμοποίησαν νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs). Τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια απαιτούσαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις για να εμφανίσουν επαρκή αντιμικροβιακή δράση και μειωμένη τοξικότητα συγκριτικά με τα νανοσωματίδια χρυσού ή ψευδαργύρου.

Τα νανοσωματίδια μπορούν να εισαχθούν εντός του ενυδατωμένου υλικού της υδρογέλης κυρίως με τρεις μηχανισμούς. Αναφορικά, για την έγκλειση μεταλλικών νανοσωματιδίων σε υδρογέλες μπορεί να επιτευχθεί φόρτωση των νανοσωματιδίων σε προσχηματισμένη υδρογέλη, σχηματισμός υδρογέλης παρουσία νανοσωματιδίων (NPs) και κατασκευή της υδρογέλης και των νανοσωματιδίων ταυτόχρονα. Τόσο συνθετικές όσο και φυσικές υδρογέλες έχουν χρησιμοποιηθεί με αυτούς του μηχανισμούς ως φορείς για την ενσωμάτωση νανοσωματιδίων, όπως για παράδειγμα, οι συνθετικές υδρογέλες φορτισμένες με μεταλλικά νανοσωματίδια που περιλαμβάνουν πολυ(N-βινυλοπυρρολιδόνη) (PVP), πολυ(βινυλική αλκοόλη) (PVA) ή πολυ(ακρυλαμίδιο-συνακρυλικό οξύ). Φυσικά πολυμερή, όπως η φυσική ζελατίνη και το αλγινικό οξύ, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ενθυλάκωση νανοσωματιδίων αργύρου, όπως παρουσιάζεται και στην δεδομένη μελέτη (González-Henríquez κ.ά., 2017).

1.4. Εφαρμογές των υδρογελών

Οι υδρογέλες αποτελούν ένα σημαντικό σύνολο πόρων με αξιοσημείωτες εφαρμογές στους τομείς της μηχανικής, της βιολογίας, της γεωργίας, της τεχνολογίας τροφίμων και φυσικά στις βιοϊατρικές επιστήμες. Γενικότερα, οι υδρογέλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες διόγκωσης ή ως πλατφόρμα παροχής και μεταφοράς δραστικών ενώσεων, όπως και στην περίπτωση των υδρογελών φορέων αντιμικροβιακών ουσιών. Οι υδρογέλες που χαρακτηρίζονται από διευρυμένη ικανότητα διόγκωσης χρησιμοποιούνται κυρίως σε τομείς της υγιεινής και της γεωργίας αλλά και ως πολυμερή για οικιακή χρήση, όπου αναμένεται η κατακράτηση νερού και

υδατικών διαλυμάτων, όπως ούρων και νερού βρύσης, αντίστοιχα. Για την παροχή φαρμάκων, αντιμικροβιακών ουσιών, φυτοφαρμάκων, πρωτεϊνών και χρωστικών για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται γενικά υδρογέλες με χαμηλότερη ικανότητα διόγκωσης. Ωστόσο, για κάθε εφαρμογή, οι υδρογέλες συνήθως σχεδιάζονται και κατασκευάζονται ειδικά για την κάλυψη μίας συγκεκριμένης ανάγκης.

1.4.1. Γενικές εφαρμογές των υδρογελών

Αναφορικά με την ευρεία οικιακή χρήση από τους καταναλωτές, οι υδρογέλες χρησιμοποιούνται στη παραγωγή υπερ-προσοφνητικών πόνων με την ιδιότητα να στεγνώνουν ακόμα και μετά σημαντική απορρόφηση υγρών. Ακολούθως, υδρογέλες που αποτελούνται από ακατέργαστες σκόνες πολυακρυλαμιδίου ή πολυακρυλική μήτρα καλίου χρησιμοποιούνται για ανάπτυξη φυτών στην κηπουρική μέσω της απελευθέρωσης νερού στα φυτικά συστήματα. Οι εταιρείες καλλυντικών λανσάρουν με την σειρά τους, νέα καλλυντικά προϊόντα με βάση τις υδρογέλες, όπως οι λεγόμενες «μάσκες ομορφιάς» από κολλαγόνο, υαλουρονικό οξύ ή πολυβινυλοπυρρολιδόνη, επιτυγχάνοντας αυξημένη ενυδάτωση, προαγωγή της ελαστικότητας και αντιγήρανση του δέρματος (An κ.ά., 2014; Yahia, 2015).

Επίσης, στον παγκόσμιο τομέα των τροφίμων, αρκετές ερευνητικές ομάδες αλλά και βιομηχανικές εταιρείες, αναπτύσσουν νέες φιλικές προς το περιβάλλον λύσεις συσκευασίας για να εκμεταλλευτούν τα οικολογικά και αντιμικροβιακά πλεονεκτήματα των υδρογελών σε εφαρμογές όπως η συσκευασία τροφίμων. Βιοπολυμερή που εξάγονται απευθείας από βιομάζα (π.χ. πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια) ή από μικροοργανισμούς (π.χ. πολυυδροξυαλκανοϊκά), καθώς και ορισμένα που παράγονται με κλασική χημική σύνθεση (π.χ. πολυγαλακτικό οξύ) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων δομών συσκευασίας αλλά και στον σχεδιασμό αποδοτικών υλικών συσκευασίας βιοπολυμερών με επιθυμητές ιδιότητες. Οι πολλά υποσχόμενες εφαρμογές των υδρογελών στις βιομηχανίες συσκευασίας τροφίμων περιλαμβάνουν βελτιωμένη συσκευασία (φράγματα αερίων και υγρασίας), αντιβακτηριδιακή συσκευασία, δημιουργία μεμβρανών και επικαλύψεων από πολυμερή, παρακολούθηση της κατάστασης του προϊόντος, νανοπρόσθετα, ενισχυμένη διάρκεια ζωής καθώς και προστασία από την οξείδωση (Gorrasí κ.ά., 2012; Ullah κ.ά., 2015).

Οι υδρογέλες χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως στους τομείς της βιοϊατρικής και της βιοτεχνολογίας αντιγράφοντας σχεδόν ολοκληρωτικά την συμπεριφορά των ανθρώπινων οργάνων ως απόκριση σε αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, τη θερμοκρασία, τα ένζυμα και το ηλεκτρικό πεδίο. Με αυτό τον τρόπο βρίσκουν εφαρμογές σε ιατρικά

εμφυτεύματα, προσθετικούς μύες ή όργανα, ρομποτικές λαβές, διαγνωστικές συσκευές σε τεχνητούς μύες, σταθεροποίηση οστών, σε εμφυτεύματα δοντιών και οστών, σε ανοσοθεραπεία με εμβόλια καθώς και στην πλαστική χειρουργική. Για παράδειγμα, οι υδρογέλες που χρησιμοποιούνται στους ουροποιητικούς καθετήρες μπορούν να αποτρέψουν τον αποικισμό βακτηρίων στην επιφάνεια και να παρέχουν μια λεία και ολισθηρή επιφάνεια για τη βελτίωση της βιοσυμβατότητας αυτών. Ενώ, σε άλλη μελέτη γίνεται αναφορά για υδρογέλες που μπορούν να κρατήσουν μέσα στη μήτρα τους έναν σημαντικό αριθμό μικροοργανισμών για τον καθαρισμό του νερού, την παραγωγή βιομορίων, ή και για απλή καλλιέργεια βακτηρίων, αφού το υλικό της υδρογέλης δεν μπορεί να αποικοδομηθεί από αυτούς, συντελώντας στην δημιουργία ενός ιδανικού κλειστού περιβάλλοντος ανάπτυξης (Sokker κ.ά., 2011; Ullah κ.ά., 2015; Yahia, 2015).

1.4.2. Αντιμικροβιακές εφαρμογές υδρογελών

Οι βιοϊατρικές εφαρμογές των υδρογελών μπορούν να διευρυνθούν και ακολούθως να εφαρμοστούν για την χορήγηση φαρμάκων, στηριζόμενες στην αντιμικροβιακή τους δράση. Οι Y. Li κ.ά., 2011 ανέφεραν ότι η χρήση υδρογέλης με βάση οξειδωμένο άμυλο και λυσοζύμη είχε ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του υλικού της υδρογέλης από την α-αμυλάση, όπου η αντιμικροβιακή ουσία της λυσοζύμης απελευθερώθηκε στα περιβάλλοντα μέσα. Επίσης παρασκευάστηκε υδρογέλη για μεταφορά φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για κατάποση, με βάση πολυ(ακρυλικό οξύ), κυσταμίνη και νανοσωματίδια Ag. Τα νανοσωματίδια αργύρου ενσωματώθηκαν στην αποξηραμένη υδρογέλη σε διάλυμα νιτρικού αργύρου και έπειτα από αναγωγή αυτού μέσω της εμβάπτισης της διογκωμένης υδρογέλης σε διάλυμα βοριοϋδριδίου του νατρίου. Ακολούθως ο δεσμός της κυσταμίνης διασπάστηκε από το αναγωγικό περιβάλλον με συνέπεια την απελευθέρωση των νανοσωματιδίων.

Από την άλλη πλευρά, η επούλωση τραυμάτων είναι μια ακόμη σύνθετη βιολογική διαδικασία που επηρεάζεται από το περιβάλλον του τραύματος και τις βακτηριακές μολύνσεις, οι οποίες μπορούν να περιοριστούν με την χρήση πολλά υποσχόμενων αντιμικροβιακών υδρογελών. Τα τελευταία χρόνια έχει παραχθεί μια ποικιλία από υδρογέλες για την επούλωση πληγών. Ειδικότερα, οι υδρογέλες με βάση τη βιομάζα παρέχουν μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση, καθώς εμφανίζουν μειωμένη κυτταροτοξικότητα για τον ιστό του σώματος και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης (Torres κ.ά., 2013). Αναφορικά, δημιουργήθηκε υδρογέλη δεξτράνης-υαλουρονικού οξέος με σαγκουϊναρίνη η οποία έδειξε εξαιρετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*, κατά την επούλωση τραυμάτων (Zhu κ.ά., 2018). Ενώ, αυξημένη

αποτελεσματικότητα σε φωτοθερμική θεραπεία προκύπτει και από την μελέτη των Ταο κ.ά., 2019, οι οποίοι παρασκεύασαν μια υδρογέλη που αποτελείται από ζελατίνη τροποποιημένη με μεθακρυλικό και N, N-δισ(ακρυλοϋλ) κυσταμίνη και ενσωματωμένα νανοσωματίδια χαλκού.

Εκτός από την απευθείας επούλωση τραυμάτων, αντιμικροβιακές υδρογέλες μπορούν να εφαρμοστούν και στην επούλωση τραυμάτων από αντιμικροβιακούς επιδέσμους. Οι συμβατικοί ξηροί επίδεσμοι παρέχουν μόνο τον φραγμό, δεν παρέχουν καθόλου υγρό περιβάλλον και δεν εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες στο τραύμα, γεγονός που μπορεί να αντισταθμίσει η προσθήκη υλικού υδρογέλης. Το νερό διατηρεί το τραύμα υγρό, το οποίο παρέχει ένα κατάλληλο περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και οι αντιμικροβιακές ουσίες σταματούν την ανάπτυξη των μικροβίων στο τραύμα (Wang κ.ά., 2019). Οι (Z. Li κ.ά., 2015) παρασκεύασαν υδρογέλη με βάση πολυσακχαρίτες που ήταν κατάλληλη για επούλωση εγκαυμάτων. Συνέθεσαν την υδρογέλη αναμειγνύοντας καρβοξυμεθυλική χιτοζάνη και οξειδωμένη δεξτράνη και πραγματοποίησαν μελέτη επούλωσης πληγών σε αρουραίους, διαπιστώνοντας ότι αυτή η υδρογέλη ήταν σε θέση να θεραπεύσει το τραύμα του εγκαύματος εντός 21 ημερών.

1.5. Μέθοδοι αντιμικροβιακής ικανότητας

Μια ποικιλία εργαστηριακών μεθόδων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση ή τον έλεγχο της *in vitro* αντιμικροβιακής δράσης ενός εκχυλίσματος, μιας καθαρής ένωσης ή ακόμη και σύνθετων πολυμερών ενώσεων όπως οι υδρογέλες. Οι πιο γνωστές και βασικές μέθοδοι είναι οι μέθοδοι διάχυσης δίσκου και φρεατίου σε άγαρ ή μέθοδοι αραίωσης ζωμού (broth) ή άγαρ. Ωστόσο, για την περαιτέρω μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης ενός παράγοντα σε βάθος, συνιστώνται μέθοδοι δοκιμής χρονικής θανάτωσης και κυτταροφθορισμομετρίας ροής, όπως η τεχνική Bioscreen C, οι οποίες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη φύση της ανασταλτικής δράσης (βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική) προς τον πληθυσμό μικροβιακών κυττάρων των εξεταζόμενων μικροοργανισμών, εξαρτώμενες από τις παραμέτρους του χρόνου και τη συγκέντρωσης (Balouiri κ.ά., 2016).

Λόγω του μεγάλου επιστημονικού ενδιαφέροντος για τις ιδιότητες των νέων αντιμικροβιακών ουσιών, όπως η καταπολέμηση των πολυανθεκτικών παθογόνων βακτηρίων, είναι σημαντική η κατανόηση των αναφερόμενων μεθόδων, που χρησιμοποιήθηκαν στην δεδομένη μελέτη, για τον έλεγχο ή/και τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντιμικροβιακής επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων, των αιθέριων ελαίων και των υδρογελών. Επομένως, σε αυτήν την ενότητα, αναλύονται επαρκώς οι τεχνικές για την αξιολόγηση της *in vitro* αντιμικροβιακής δράσης.

1.5.1. Μέθοδος διάχυσης δίσκου σε άγαρ

Η δοκιμή διάχυσης δίσκου σε άγαρ ή δοκιμή Kirby-Bauer είναι μια μικροβιολογική δοκιμασία βασισμένη σε καλλιέργεια που χρησιμοποιείται σε διαγνωστικά εργαστήρια, εργαστήρια ανακάλυψης φαρμάκων και μικροβιολογικά εργαστήρια. Η ανάλυση χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των βακτηρίων που απομονώνονται σε κλινικά εγκεκριμένα αντιβιοτικά, σε βιολογικά υλικά όπως φυτικά εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια και ζυμοί βακτηριακής ζύμωσης αλλά και σε ουσίες με υποψήφια αντιβακτηριακή δράση, όπως οι υδρογέλες με νανοσωματίδια μετάλλων.

Ο έλεγχος πραγματοποιείται με ενοφθαλμισμό της επιφάνειας ενός τρυβλίου άγαρ με καλλιέργεια μικροβιακού στελέχους. Στη συνέχεια, χάρτινοι δίσκοι που περιέχουν αντιμικροβιακή ή αντιμικροβιακές ουσίες εφαρμόζονται στο άγαρ και ακολουθεί επώαση του τρυβλίου. Εάν ένα αντιβιοτικό ή δείγμα ουσίας σταματήσει την ανάπτυξη των βακτηρίων ή σκοτώσει τα βακτήρια, θα υπάρχει μια περιοχή γύρω από το δίσκο όπου τα βακτήρια δεν έχουν αναπτυχθεί αρκετά ώστε να είναι ορατά. Αυτό ονομάζεται ζώνη αναστολής. Η ευαισθησία του βακτηριακού προϊόντος απομόνωσης σε κάθε αντιβιοτικό μπορεί στη συνέχεια να ημι-ποσοτικοποιηθεί συγκρίνοντας το μέγεθος αυτών των ζωνών αναστολής με βάσεις δεδομένων πληροφοριών για γνωστά ευαίσθητα στα αντιβιοτικά, μετρίως ευαίσθητα και ανθεκτικά βακτήρια, για την θεραπεία της λοίμωξης ενός ασθενούς. Αντιθέτως, η ζώνη αναστολής δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ημι-ποσοτικό μέτρο της αντιβακτηριακής ισχύος, στην περίπτωση αντιμικροβιακών δειγμάτων εκτός των αντιβιοτικών, καθώς διαφορετικά εκχυλίσματα και υλικά περιέχουν μόρια με διαφορετικά χαρακτηριστικά διάχυσης (διαφορετικά μοριακά μεγέθη, υδροφιλικότητα κ.λπ.). Συνεπώς, η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), καθώς είναι αδύνατο να προσδιοριστεί ποσοτικά η ποσότητα του αντιμικροβιακού παράγοντα που διαχέεται στο μέσο άγαρ. Ωστόσο, ένα κατά προσέγγιση MIC μπορεί να υπολογιστεί για ορισμένους μικροοργανισμούς και αντιβιοτικά συγκρίνοντας τις ζώνες αναστολής με αποθηκευμένους αλγόριθμους όπου γενικά, οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής συσχετίζονται με χαμηλότερες ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) αντιβιοτικού ή εκχυλίσματος για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος. (Brown & Kothari, 1975; Nijs κ.ά., 2003; EUCAST, 2021)

Ωστόσο, ο προσδιορισμός διάχυσης δίσκου σε άγαρ προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους όπως η απλότητα, το χαμηλό κόστος, η δυνατότητα δοκιμής τεράστιου αριθμού μικροοργανισμών και αντιμικροβιακών παραγόντων αλλά και ευκολία στην ερμηνεία

των παρεχόμενων αποτελεσμάτων λόγω της καλής συσχέτισης μεταξύ των δεδομένων in vitro και της εξέλιξης in vivo (Balouiri κ.ά., 2016).

1.5.2. Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ

Η μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των φυτικών ή των μικροβιακών εκχυλισμάτων και γενικώς υλικών που μπορούν να γεμίσουν τα φρεάτια. Παρόμοια με τη διαδικασία που χρησιμοποιείται στη μέθοδο διάχυσης δίσκου, η επιφάνεια του τρυβλίου με άγαρ ενοφθαλμίζεται με την εξάπλωση ενός όγκου της μικροβιακής καλλιέργειας σε ολόκληρη την επιφάνεια του άγαρ. Στη συνέχεια, γίνεται μια οπή με διάμετρο 6 έως 8 mm, που αντικαθιστά το δισκίο της μεθόδου διάχυσης δίσκου. Η οπή ανοίγει ασηπτικά με ένα αποστειρωμένο άκρο πιπέτας Pasteur, ή άλλο εξοπλισμό και ένας όγκος (20–100 μL) του αντιμικροβιακού παράγοντα ή του διαλύματος εκχυλίσματος με επιθυμητή συγκέντρωση εισάγεται στο φρεάτιο. Στη συνέχεια, οι πλάκες άγαρ επάζονται υπό κατάλληλες συνθήκες ανάλογα με τον εξεταζόμενο μικροοργανισμό. Ο αντιμικροβιακός παράγοντας διαχέεται στο υπόστρωμα και δημιουργεί επίσης ζώνη αναστολής. Γενικότερα, η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μία φθηνότερη τεχνική σε σχέση με την μέθοδο διάχυσης δίσκου λόγω της μη χρήσης των δισκίων. Επιπλέον, συνίσταται η δημιουργία σχετικά μεγάλου βάθους οπής στο στερεό υπόστρωμα του τρυβλίου, με βάθος 2/3 του συνολικού πάχους του σχετικά ρηχού υποστρώματος. Αξιοσημείωτο είναι ότι η συγκεκριμένη μέθοδος εμφανίζει επίσης μεγαλύτερη ευαισθησία στα αποτελέσματα της σε σχέση με την μέθοδο διάχυσης δίσκου, καθώς η επιφάνεια του δίσκου του διηθητικού χαρτιού εμφανίζει υδροφιλικότητα, προσροφώντας κατιονικές πολικές ενώσεις στην επιφάνεια του δίσκου χωρίς όμως να διαχυθούν στο άγαρ, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να προσδιοριστούν με βάση την αντιμικροβιακή τους ικανότητα. Συμπληρωματικά, η παρουσία αιωρούμενων σωματιδίων στο αντιμικροβιακό δείγμα παρεμποδίζει ευκολότερα τη διάχυση του αντιμικροβιακού παράγοντα στο άγαρ στην μέθοδο χρήσης δίσκου σε σχέση με την μέθοδο πλήρωσης φρεατίων. (Valgas κ.ά., 2007; Balouiri κ.ά., 2016)

1.5.3. Bioscreen C

Στην προκειμένη εργαστηριακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε επίσης το σύστημα Bioscreen C, το οποίο αποτελεί ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα με ευρεία εφαρμογή σε μικροβιολογικές δοκιμές. Το σύστημα αποτελείται από τον Bioscreen C reader, το λογισμικό

BioScreener, την αποστειρωμένη πλακέτα με κυψελίδες (Honeycomb microplates) και έναν υπολογιστή για τις αναλύσεις των αποτελεσμάτων. Όλοι οι μικροοργανισμοί (βακτήρια, ζύμες, μύκητες) αυξάνουν τη θολότητα του υγρού υποστρώματος ανάπτυξης κατά την επώαση συνήθως 48 ωρών και πολλαπλασιάζονται σε αυτό. Το Bioscreen C παρακολουθεί αυτή την ανάπτυξη μετρώντας τη θολότητα του μέσου πλήρωσης στα φρεάτια μιας μικροπλάκας. Αυτές οι μετρήσεις γίνονται κινητικά και καταγράφονται ως μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD). Όλες οι λειτουργίες ελέγχονται από το λογισμικό BioScreener σύμφωνα με τις παραμέτρους που εισάγει ο χρήστης και οι τιμές OD καταγράφονται αυτόματα από το λογισμικό. Οποιοσδήποτε μικροοργανισμός, ζυμός ή χημική ουσία μπορεί να μεταφερθεί με πιπέτα στα φρεάτια είναι υποψήφιος για παρακολούθηση της ανάπτυξης. Το σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας διατηρεί τη θερμοκρασία επώασης από 1°C-60°C, κατ' επιλογή του χειριστή, η οποία ακολουθώντας αποθηκεύεται από το λογισμικό. Επιπλέον, κάθε πλάκα αποτελείται από 100 φρεάτια Honeycomb, γεγονός που δίνει την δυνατότητα ελέγχου πληθώρας δειγμάτων, ενώ κάθε συσκευή Bioscreen C μπορεί να δεχτεί δύο πλάκες των 100 φρεατίων, όπως απεικονίζεται παρακάτω, προσφέροντας μεγιστοποίηση του αριθμού των θέσεων ανάλυσης. Κατά την πλήρωση των φρεατίων, ο μέγιστος όγκος κάθε δείγματος και μέσου ανάπτυξης ανά φρεάτιο δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 400 μl. Το υπερβολικό γέμισμα μπορεί να προκαλέσει υπερχειλίση κατά την ανακίνηση και επιμόλυνση των γειτονικών φρεατίων. Από υπολογιστικής πλευράς, τα αποτελέσματα του Bioscreen C συνήθως λαμβάνονται μετά από επώαση 48 ωρών και με βάση τις τιμές οπτικής πυκνότητας, μπορούν να δημιουργηθούν σε προγράμματα όπως το Excel, καμπύλες ανάπτυξης για κάθε ελεγχόμενο μικροβιακό στέλεχος. (Oy Growth Curves Ab Ltd, 2017)



Εικόνα 2: Πλακέτα κυψελίδων (Honeycomb microplate) Bioscreen C, με υγρό υπόστρωμα BHI broth, δείγματα αντιμικροβιακών υδρογελών και στελέχη μικροοργανισμών από την παρούσα ερευνητική μελέτη.

Η συγκεκριμένη μικροβιολογική τεχνική επιλέγεται επανειλημμένως στις ερευνητικές δοκιμές είτε για επιβεβαίωση των ήδη επιλεγμένων μικροβιολογικών μεθόδων διάχυσης, είτε αντί της χρήσης αυτών, καθώς εξαλείφει την ανάγκη για χρονοβόρες σειριακές αραιώσεις, ενώ παράλληλα μειώνει την ποσότητα των απαιτούμενων υλικών δοκιμής. Επιπλέον, αυτό το σύστημα παρέχει ένα φθινό εργαλείο για την ταυτόχρονη δοκιμή διαφόρων ενώσεων και τη δημιουργία βέλτιστων εφαρμοσμένων περιβαλλοντικών συνθηκών, οι οποίες εκλείπουν από τις υπόλοιπες δοκιμές, οδηγώντας στην ανάπτυξη σημαντικών σφαλμάτων κατά την διενέργεια της διαδικασίας. Συμπληρωματικά, αυτή η μέθοδος έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την αξιολόγηση της ανάπτυξης νηματοειδών οργανισμών μέσω αυτοματοποιημένης παρακολούθησης. Παρόλα αυτά η μέθοδος Bioscreen C μπορεί να υπολογίσει αύξηση του ολικού αριθμού των βακτηρίων έως τον πληθυσμό των 10^6 - 10^7 CFU/mL. Ο μικροβιακός πληθυσμός που προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά είναι αποτέλεσμα της συνύπαρξης τόσο των ζωντανών όσο και νεκρών κυττάρων, λόγω της δράσης των αντιμικροβιακών παραγόντων, γεγονός που συνηγορεί την μειωμένη αξιοπιστία ορισμένων αποτελεσμάτων. Αυτοί οι περιορισμοί ωστόσο, δεν απορρίπτουν την εξαιρετική απόδοση και ευκολία χρήσης της δεδομένης τεχνικής, ενώ επίσης μπορεί να υπολογιστεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), ως η χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης που ανέστειλε πλήρως την ανάπτυξη βακτηρίων μετά από ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. (Olasupo κ.ά., 2003; Tauk-Tornisielo κ.ά., 2007)

1.6. Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί συναντώνται ευρέως στο φυσικό και μη περιβάλλον, ενώ παράλληλα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης φύσης. Οι κυριότερες κατηγορίες μικροοργανισμών, δηλαδή τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ζύμες, εντοπίζονται στις κοιλότητες και τους ιστούς του ανθρώπου, άλλοτε υπό συνθήκες συμβίωσης και άλλοτε δημιουργώντας παθογένεια. Οι μικροβιακές λοιμώξεις, που προκαλούνται από βακτήρια και ορισμένους μύκητες, αποτελούν σοβαρό πρόβλημα υγείας, ειδικά όσον αφορά την επούλωση τραυμάτων, τη βιοϊατρική επιμόλυνση των εμφυτευμάτων αλλά και την ανάπτυξη τροφολοιμώξεων και τροφοτοξινώσεων. Συμπληρωματικά, οι ζύμες που αποτελούνται από ωσειδή ή σφαιρικά κύτταρα, αναπαράγονται με εκβλάστηση και ανήκουν στην κατηγορία των μυκήτων χωρίς να εμφανίζουν μυκήλια, αναφέρονται επίσης ορισμένες μελέτες για την παθογένεια και την δημιουργία μολύνσεων. Ως εκ τούτου, τα περισσότερα τροφιμογενή παθογόνα μικρόβια αναπτύσσονται σε μεσόφιλο και ψυχρόφιλο εύρος θερμοκρασίας και η ανάπτυξή τους συνήθως δεν αλλοιώνει την αισθητική ποιότητα των τροφίμων. Τα τροφιμογενή παθογόνα αποτελούν σοβαρό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία και οι εστίες αποδίδονται στην εμφάνιση νέων παθογόνων και στην επανεμφάνιση ορισμένων παλαιών παθογόνων. Επίσης, οι ανθρώπινοι ιστοί και κυρίως το δέρμα είναι ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη βακτηρίων. Οι κύριες ομάδες βακτηρίων διακρίνονται κυρίως από τη μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας τους και τις αντιδράσεις χρώσης. Η διαδικασία χρώσης κατά Gram, η οποία αντανakλά θεμελιώδεις διαφορές στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος, διαχωρίζει τα περισσότερα βακτήρια σε δύο μεγάλες διαιρέσεις: θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Το δέρμα υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό και των δύο υποομάδων βακτηρίων και η έξαρση της μόλυνσης εξαρτάται από περιβαλλοντικούς και τοπικούς παράγοντες, την ανοσία του ξενιστή, τον βαθμό προσκόλλησης και το αριθμό των μολυσματικών μικροβιακών κυττάρων του βακτηρίου που αναπτύσσονται. Η χρήση αντιβιοτικών για περιορισμό της παθογένειας όπως αναφέρθηκε στις παραπάνω ενότητες παρουσιάζει το βασικό μειονέκτημα, της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών, σε αυτά. Επί αυτού, η χρήση αντιμικροβιακών υδρογελών αποτελεί μια καινοτομία στον τομέα των επιμολύνσεων. (Chiller κ.ά., 2001; Schierholz & Beuth, 2001; Pitt & Barer, 2012; Bhunia, 2018)

1.6.1. Βακτήρια

Επισημαίνεται ότι στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή δράση των υδρογελών έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων *E.coli*, *S.typhimurium*, *L.monocytogenes*, *P.aeruginosa* και *Y.enterocolitica*. Ειδικότερα, στα βακτήρια η χρώση Gram παρέχει ένα

σημαντικό σύστημα ταξινόμησης, καθώς πολλές ιδιότητες των κυττάρων μπορούν να συσχετιστούν με το κυτταρικό περίβλημα. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια διαθέτουν ένα παχύ (20-80 nm) κυτταρικό τοίχωμα ως εξωτερικό κέλυφος του κυττάρου. Αντίθετα, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια έχουν ένα σχετικά λεπτό (<10 nm) στρώμα κυτταρικού τοιχώματος, αλλά διαθέτουν μια επιπλέον εξωτερική μεμβράνη με αρκετούς πόρους και οργανίδια. Αυτές οι διαφορές στο κυτταρικό περίβλημα προσδίδουν διαφορετικές ιδιότητες στο κύτταρο, ιδιαίτερα τις αποκρίσεις σε εξωτερικές πιέσεις, συμπεριλαμβανομένης της θερμότητας, της υπερϊώδους ακτινοβολίας, των αντιβιοτικών και αντιμικροβιακών παραγόντων (Mai-Prochnow κ.ά., 2016). Με βάση ερευνητικές αναφορές, οι αντιμικροβιακές υδρογέλες με βάση τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) απέδωσαν καλύτερα σε Gram-αρνητικά βακτήρια από Gram-θετικά βακτήρια επειδή τα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν χαμηλή αντίσταση των κυτταρικών μεμβρανών σε σύγκριση με τα κυτταρικά τοιχώματα της πεπτιδογλυκάνης των Gram θετικών βακτηρίων. Από την άλλη πλευρά, έχει επίσης υποστηριχθεί ότι τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα από τα Gram-θετικά βακτήρια στο κατιόν αργύρου (Ag^+), επειδή το κατιόν αργύρου δεσμεύεται στον αρνητικά φορτισμένο λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων πιο ισχυρά από το στρώμα πεπτιδογλυκάνης των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Με αυτό το επιχείρημα, το κατιόν αργύρου παγιδεύεται στον λιποπολυσακχαρίτη και είναι λιγότερο πιθανό να εισέλθει σε ένα Gram-αρνητικό από ένα Gram-θετικό κύτταρο (Lara κ.ά., 2010; Taglietti κ.ά., 2012; Pelgrift & Friedman, 2013).

1.6.2. Ζύμες

Στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη επισημαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκαν οι ζύμες *S.cerevisiae* και *Lachancea*, καθώς ορισμένες φορές οι ζύμες εμφανίζουν επίσης παθογένεια. Αναφορικά, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση των κρουσμάτων μυκηταιμίας που προκαλείται από το *S.cerevisiae* και το υποείδος του, *S.bouardii*, και επομένως πρέπει να δίνεται προσοχή όταν χρησιμοποιείται ως προβιοτικό ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα ή βρέφη χαμηλού βάρους. Έτσι, στην μελέτη των Yardimci κ.ά., 2023 χρησιμοποιήθηκαν κρυσταλλικές ή κρυσταλλικές με μεθακρυλικό-2-υδροξυαιθυλεστέρα (HEMA) και διαφορετικές ποσότητες N-βινυλοφορμαμίδης, που συνήθως χρησιμοποιούνται για την επούλωση πληγών, και οι οποίες ακολούθως παρουσίασαν αντιμυκητιακή δράση έναντι του *S.cerevisiae*. Επιπροσθέτως, υδροπηκτές πολυηλεκτρολύτη που έφεραν υπολείμματα Ι-φαινυλαλανίνης (PHE), Ι-βαλίνης (AVA) και Ι-ιστιδίνης (Hist) χρησιμοποιήθηκαν ως ικρίωματα για το σχηματισμό νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) με αναγωγή ιόντων αργύρου Ag^+ με $NaBH_4$, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο

μια αντιμικροβιακή σύνθετη υδρογέλη με ευρεία ανασταλτική δάση έναντι gram+ και gram- βακτηρίων και υψηλότερη αντιμυκητιακή δράση έναντι του *S.cerevisiae* (Casolaro κ.ά., 2018).

1.7. Συστατικά υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124

Οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγική ενότητα αποτελούνται από διαφορετικά συστατικά, τα οποία τους προσδίδουν μοναδικές ιδιότητες τόσο από πλευρά αντιμικροβιακής όσο και από πλευρά μηχανικής και βιοχημικής δράσης. Η συμβολή των παραπάνω συστατικών στην διαμόρφωση και λειτουργία των βιοπολυμερών θα αναλυθεί εκτενώς στις ακόλουθες παραγράφους, προκειμένου να γίνει κατανοητός ο λόγος επιλογής και ύπαρξης αυτών ως καινοτόμα βιοϋλικά των υδρογελών που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη.

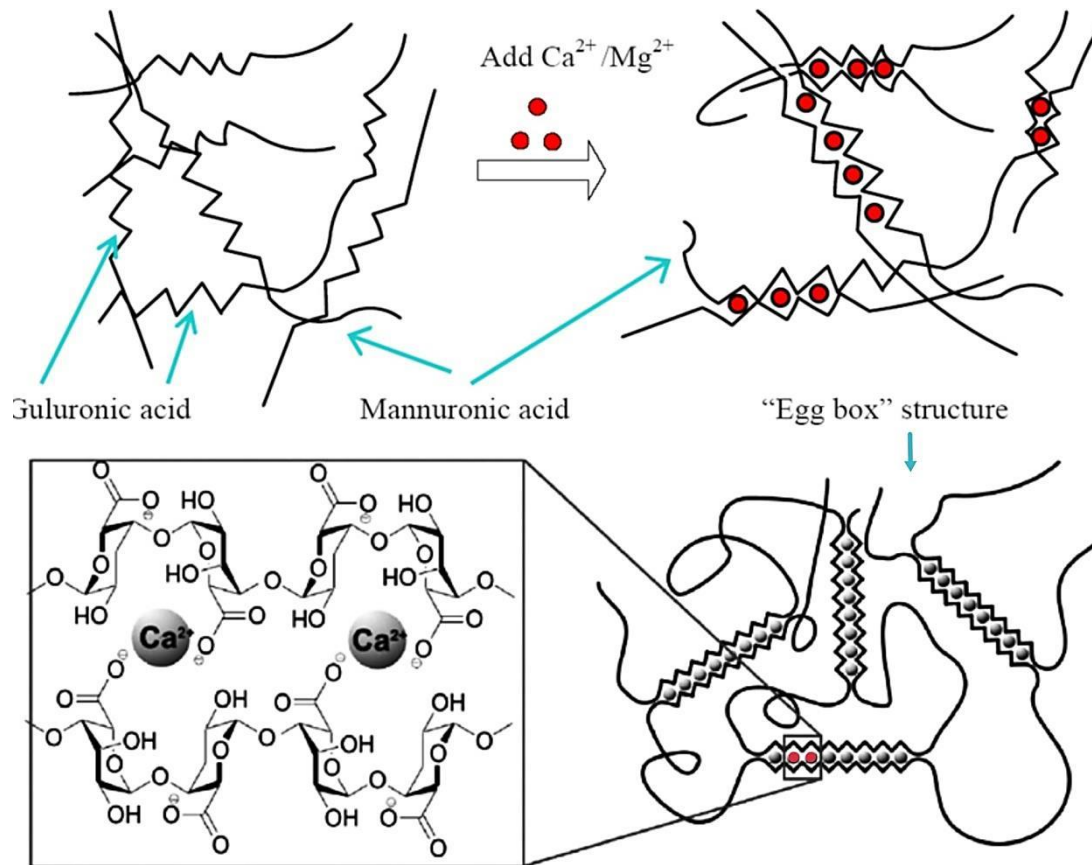
1.7.1. Αλγινικό οξύ

Τα αλγινικά έχουν γίνει μια εξαιρετικά σημαντική οικογένεια πολυσακχαριτών λόγω της χρησιμότητάς τους στην παρασκευή υδρογέλης σε ήπιες συνθήκες pH και θερμοκρασίας, κατάλληλες για ευαίσθητα βιομόρια όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, ακόμη και για ζωντανά κύτταρα. Το αλγινικό οξύ ή και αλγίνη είναι ένα φυσικά ανιονικό πολυμερές (πολυσακχαρίτης), λευκού έως κιτρινωπού-καφέ χρώματος, που λαμβάνεται συνήθως από καφέ φύκια (*Phaeophyceae*), από τα οποία εξαγεται με επεξεργασία με υδατικά αλκαλικά διαλύματα συνήθως με NaOH (Clark & Green, 1936). Το αλγινικό οξύ έχει υδρόφιλη φύση και μετατρέπεται σε παχύρρευστο κόμμα με ενυδάτωση ενώ όταν αντιδρά με μέταλλα όπως το νάτριο και το ασβέστιο, παραλαμβάνονται τα άλατά του που ονομάζονται αλγινικά. Το αλγινικό νάτριο και το αλγινικό οξύ του άλατος νατρίου είναι τα διάσημα ονόματα των αλγινικών αλάτων στην αγορά, στην οποία και διατίθενται με αυτά τα δύο ονόματα. Επιπρόσθετα, πηγή αλγινικού οξέος αποτελεί και η βακτηριακή βιοσύνθεση από βακτήρια του γένους *Azotobacter* και το *Pseudomonas*, τα οποία παρέχουν αλγινικό με πιο καθορισμένες χημικές δομές και φυσικές ιδιότητες.

Ανεξαρτήτως τρόπου παραγωγής, το αλγινικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια για την ανάπτυξη αλγινικών υδροπηκτών με μοναδικές ιδιότητες, λόγω του βιοσυμβατικού του χαρακτήρα, τη χαμηλή τοξικότητα, το σχετικά χαμηλό κόστος καθώς και την ικανότητα ήπιας ζελατινοποίησης του με προσθήκη δισθενών κατιόντων όπως το Ca²⁺ (Gombotz & Wee, 1998; A. Kumar κ.ά., 2023). Γενικότερα, οι αλγινικές υδρογέλες μπορούν να

παρασκευαστούν με διάφορες μεθόδους διασύνδεσης και η δομική τους ομοιότητα με εξωκυτταρικές μήτρες ζωντανών ιστών επιτρέπει ευρείες εφαρμογές στην επούλωση τραυμάτων, την παροχή βιοδραστικών παραγόντων όπως μικρά χημικά φάρμακα και πρωτεΐνες και τη μεταμόσχευση κυττάρων και οργάνων ενώ χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για την τροποποίηση των ιδιοτήτων των τροφίμων όπως η ρεολογία (πάχυνση), η ικανότητα δέσμευσης νερού, την σταθεροποίηση γαλακτώματος και ο σχηματισμός φιλμ (Lee & Mooney, 2012; Ching κ.ά., 2017).

Από δομική άποψη, το αλγινικό πολυμερές αποτελείται από δύο μονομερείς μονάδες, οι οποίες είναι υπολείμματα D-μαννουρονικού οξέος (M) που συνδέονται με β -(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό και υπολείμματα L-γουλουρονικού οξέος (G) με γλυκοζιτικούς δεσμούς α -(1→4). Η πιο κοινή μέθοδος παρασκευής υδροπηκτών από υδατικό διάλυμα αλγινικού είναι ο συνδυασμός του διαλύματος με ιονικούς παράγοντες διασταύρωσης, όπως δισθενή κατιόντα (Ca^{2+} , Sr^{2+} και Ba^{2+}) ή τρισθενή κατιόντα (Fe^{3+} και Al^{3+}), ωστόσο συνήθως γίνεται χρήση κατιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Η σταυροσύνδεση των αλγινικών αλάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μεθόδους. Η πρώτη είναι μια μέθοδος «διάχυσης», όπου τα ιόντα διασύνδεσης διαχέονται στο αλγινικό διάλυμα από μια εξωτερική δεξαμενή. Η δεύτερη είναι η μέθοδος «εσωτερικής ρύθμισης», όπου η πηγή ιόντων βρίσκεται εντός του αλγινικού διαλύματος και μια ελεγχόμενη παράμετρος, συνήθως το pH ή η διαλυτότητα της πηγής ιόντων, ενεργοποιεί την απελευθέρωση ιόντων στο διάλυμα. Η μέθοδος διάχυσης αποδίδει γέλες συγκεντρώσεις ιόντων Ca^{+2} σε όλο το πάχος, ενώ η εσωτερική πήξη δίνει γέλες με ομοιόμορφες συγκεντρώσεις ιόντων σε όλο το μήκος. Ακολουθώντας τα δισθενή κατιόντα πιστεύεται ότι συνδέονται αποκλειστικά με γουλουρονικά συμπλέγματα (G) των αλγινικών αλυσίδων, καθώς η δομή τους γουλουρονικού επιτρέπει υψηλό βαθμό συντονισμού των δισθενών ιόντων. Τα μόρια του αλγινικού στο υδατικό διάλυμα απομακρύνονται το ένα από το άλλο με ηλεκτροστατική απώθηση σχηματίζοντας ένα λείο παχύρρευστο υγρό. Όταν προστίθενται ιόντα ασβεστίου με αρνητικά φορτισμένο αλγινικό, τα μόρια προσελκύουν θετικά φορτισμένα ιόντα ασβεστίου σχηματίζοντας ένα άλας. Τα συμπλέγματα γουλουρονικού ενός πολυμερούς στη συνέχεια σχηματίζουν συνδέσεις με τα συμπλέγματα γουλουρονικών γειτονικών πολυμερών αλυσίδων σε αυτό που ονομάζεται μοντέλο διασταυρούμενης σύνδεσης σε “κουτί αυγών”, αφού η δομή μοιάζει οπτικά με αυγό, με αποτέλεσμα την δημιουργία της δομής γέλης (Skjåk-Bræk κ.ά., 1989; Lee & Mooney, 2012).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της σταυροσύνδεσης αλγινικών συμπλεγμάτων και κατιόντων ασβεστίου στο μοντέλο αυγών, Πηγή: (Wan κ.ά., 2008; K. Kim & Kim, 2016)

Ο σχηματισμός της γέλης αλγινικού επηρεάζεται από παράγοντες, όπως η συγκέντρωση του αντιδρώντος, η θερμοκρασία θέρμανσης, το pH και τα άλατα, τα οποία καθορίζουν την αντοχή και τις ρεολογικές ιδιότητες της γέλης, συμπεριλαμβανομένου του ιζώδους, της αποθήκευσης και των συντελεστών απώλειας της γέλης (Lee & Mooney, 2012; A. Kumar κ.ά., 2023).

1.7.2. Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2)

Το χλωριούχο ασβέστιο αποτελεί έναν από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους παράγοντες για την ιοντική σταυροσύνδεση του αλγινικού αλλά και μία αποτελεσματική μέθοδος για την επέκταση των ιδιοτήτων των υδρογελών, βυθίζοντάς τες στα ιοντικά διαλύματα σαν αυτό για την εισαγωγή ιοντικού δεσμού. Στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων γίνεται ευρεία χρήση του χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2), λόγω των ευεργετικών βιολογικών λειτουργιών του περιεχόμενου Ca^{2+} , το οποίο συμβάλλει στην βελτίωση της υγείας και στην πρόληψη ασθενειών. Σύμφωνα με τον Wu κ.ά., 2021, η προσθήκη Ca^{2+} σε πηκτώματα υδρογελών, συμβάλει στη βελτίωση της απόδοσης ανίχνευσης αερίων της υδρογέλης, οδηγώντας σε υψηλότερη ευαισθησία και πολύ χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (LOD), καθώς επίσης επεκτείνει τις ιδιότητες της, επιτυγχάνοντας

δυναμικά ταχεία αυτοίωση, ισχυρή και αναστρέψιμη πρόσφυση σε μέταλλο, δέρμα, γυαλί και πλαστικό, βελτιωμένη αντιψυκτική ικανότητα και υψηλή αγωγιμότητα του πλέγματος της υδρογέλης. Σε σύγκριση με την υδρογέλη χωρίς CaCl_2 , οι διηθημένες με CaCl_2 υδρογέλες παρουσίασαν ανώτερη ευαισθησία και όριο ανίχνευσης, λόγω της υψηλότερης τάσης ρεύματος που προκαλείται από την αυξημένη συγκέντρωση Cl^- στις υδρογέλες. Η διήθηση με CaCl_2 βελτιώνει την αγωγιμότητα της υδρογέλης, που καταστέλλει την απόκριση που προκαλείται από την υδρόλυση των διαλυμένων αερίων, όπως αυτού της αμμωνίας (NH_3). Ειδικότερα, σε περιπτώσεις χαμηλής θερμοκρασίας συμβάλλει στην προσαρμογή του υλικού αγωγικών υδρογελών και την ευκολότερη ενεργοποίησή τους, ενώ αναφορικά με τα επιπρόσθετα σωματίδια όπως πρωτεΐνες και φάρμακα, βελτιώνει το μέγεθος των σωματιδίων, το πάχος της μεσοεπιφανειακής στρώσης, το φαινομενικό ιξώδες και την ιξωδοελαστική συμπεριφορά του υλικού της γέλης (X. Zhang κ.ά., 2020; Wu κ.ά., 2021; Lu κ.ά., 2021; X. Li κ.ά., 2022).

1.7.3. Φυσιικοί ευτηκτικοί οργανικοί διαλύτες (NADES)

Τα τελευταία χρόνια, βαθείς ευκτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents/DES) που παράγονται χρησιμοποιώντας φυσικά προϊόντα έχουν μελετηθεί και ονομάζονται Φυσιικοί Βαθύς Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents/NADES). Τα NADES αποτελούνται από φυσικούς μεταβολίτες, όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα, σάκχαρα και άλλα μικρά υδρόφιλα μόρια και χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως ως λιγότερο τοξικοί, φθινοί, μη έφλεκτοι και φιλικό προς το περιβάλλον διαλύτες. Επιπλέον, είναι βιοδιασπώμενοι και λιγότερο πτητικοί διαλύτες σε σύγκριση με τους συμβατικούς διαλύτες, όπως τα ιοντικά υγρά και οι οργανικοί διαλύτες (Liu κ.ά., 2018). Οι Φυσιικοί Βαθύς Ευτηκτικοί Διαλύτες έχουν αναπτυχθεί ως εναλλακτική λύση σε άλλους διαλύτες, καθώς τα ιοντικά υγρά δεν επιτρέπονται στην παραγωγή τροφίμων ή συμπληρωμάτων διατροφής λόγω της πιθανής τοξικότητάς τους και γενικά αποφεύγονται λόγω της «μη φυσικής» προέλευσής τους, ενώ τα NADES αναγνωρίζονται ως GRAS (Γενικά Αναγνωρισμένοι ως Ασφαλείς) διαλύτες. Τα συστατικά των NADES θα μπορούσαν να επιλεγθούν όχι μόνο για να τελειοποιήσουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του διαλύτη αλλά και για να ενισχύσουν τη βιολογική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων που παρασκευάζονται σε NADES, ενώ λόγω χαμηλής κυτταροτοξικότητας θεωρούνται κατάλληλα για πράσινη εκχύλιση, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων (Radošević κ.ά., 2016). Οι Φυσιικοί Βαθύς Ευκτηκτικοί Διαλύτες λαμβάνονται με τη συμπλοκοποίηση μίας ένωσης, συνήθως άλατος τεταρτοταγούς αμμωνίου, που δρα ως δέκτης δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor/HBA) και μία ένωσης δότη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond

Dopog/HBD) ή μεταλλικά άλατα, ενώ μερικές φορές χρειάζεται η προσθήκη ενός τρίτου συστατικού, συνήθως νερού για τη μείωση του ιξώδους. Η επιλογή των ενώσεων για την δημιουργία του NADES καθορίζει την πολικότητα, η οποία αποτελεί βασική ιδιότητα για τη διαλυτοποίηση των μεταβολιτών σε μια εκχύλιση στερεού-υγρού ενώ μελέτες αναφέρουν ότι το NADES μπορεί να εκχυλίσει τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες φυτοθεραπευτικές ενώσεις, ανάλογα με τα συστατικά που το αποτελούν (Q. Zhang κ.ά., 2012; Zurub κ.ά., 2020; Hikmawanti κ.ά., 2021; Cannavacciuolo κ.ά., 2023).

Στην παρούσα εργασία, το NADES που επιλέχθηκε, αποτελούμενο από D-(+)-γλυκόζη, D,L-γαλακτικό οξύ και νερό σε αναλογία 1:5:6,2, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης εκχύλισης για την απόκτηση του εκχυλίσματος από φύλλα ελιάς, το οποίο χαρακτηρίστηκε από υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Επιπρόσθετα, το εκχύλισμα NADES χρησιμοποιήθηκε “όπως ελήφθη” και λειτούργησε αποτελεσματικά ως αναγωγικός παράγοντας για το σχηματισμό των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) εντός του πολυμερούς δικτύου της υδρογέλης παρουσία ηλιακού φωτός και ως παράγοντας σταυροσύνδεσης για το σχηματισμό του πλέγματος της υδρογέλης.

Η χρήση του NADES ως πράσινος εκχυλιστής στην βιομηχανία ελαιολάδου είναι ευρεία, καθώς εξάγεται μεγάλη βιομάζα μη βρώσιμων αποβλήτων, όπως τα φύλλα ελιάς. Το μίγμα γαλακτικού οξέος/γλυκόζης επιλέγεται συνήθως ως βελτιστοποιημένος εκχυλιστής βιοδραστικών φαινολικών ενώσεων με τη χρήση τεχνικής υπερήχων, με τον ίδιο τρόπο που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη, για την δημιουργία των υδροπηκτωμάτων ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124. Στην πρόσφατη εργασία των Lanjekar κ.ά., 2022 παρασκευάστηκαν οκτώ διαφορετικά NADES χρησιμοποιώντας συστατικά όπως γλωριούχο χολίνη, καρβοξυλικά οξέα, σάκχαρα και αλκοόλες για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας εκχύλισης από υποπροϊόντα φλούδας μάνγκο. Ενώ, οι Fan & Li, 2022 με την σειρά τους, μελέτησαν διαφορετικά NADES για την βελτιστοποιημένη και πιο αποδοτική εκχύλιση αιθέριων ελαίων από την ρίζα *Angelica sinensis*, ενώ Choi κ.ά., 2011 ανακάλυψαν περισσότερα από 100 NADES φυτών και ανέφεραν ότι η ικανότητά διαλυτοποίησης τους είναι υψηλότερη από αυτή του νερού. Με βάση, την εργασία των Lanjekar κ.ά., 2022 που αναφέρθηκε παραπάνω, το σύστημα γαλακτικού οξέος/γλυκόζης επιβεβαίωσε την παραλαβή εκχυλίσματος με υψηλότερη ολική περιεκτικότητα σε φαινόλες και φλαβονοειδή, που συνεπώς το ορίζει κατάλληλο διαλυτικό σύστημα για την παραλαβή του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς στην προκείμενη μελέτη.

Αναφορικά, η χρήση του εκχυλίσματος NADES “όπως ελήφθη”, ως αναγωγικός παράγοντας για το σχηματισμό των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs), αποτελεί την απλούστερη και η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πράσινη συνθετική μέθοδο, παρουσία ηλιακού φωτός, για την παραγωγή μεταλλικών νανοσωματιδίων μέσω της χημικής μείωσης των

μεταλλικών αλάτων αργύρου. Τα AgNPs παράγονται με οξείδωση Ag^+ σε Ag^0 από διαφορετικά βιομόρια όπως φλαβονοειδή, κετόνες, αλδεΐδες, τανίνες, καρβοξυλικά οξέα, φαινολικά και την πρωτεΐνη των φυτικών εκχυλισμάτων, που δρουν τόσο ως αναγωγικοί όσο και ως σταθεροποιητικοί παράγοντες που παράγουν σταθερά και ελεγχόμενα, αναφορικά με το σχήμα, νανοσωματίδια τα οποία περιέχονται στο εκχύλισμα NADES/φύλλο ελιάς. Όταν ο διαλύτης NADES και το φυτικό εκχύλισμα ενσωματώνονται σε ένα διάλυμα, επιτυγχάνεται η παραγωγή καινοτόμων φυτοθεραπευτικών προϊόντων, βελτιώνεται η απόδοση εκχύλισης βιοενώσεων καθώς και η βιωσιμότητα της μεθόδου εκχύλισης (Rafique κ.ά., 2017; Vanlalveni κ.ά., 2021; Fernandez κ.ά., 2023).

Επιπλέον, οι Φυσικοί Βαθείς Ευκτηκτικοί Διαλύτες έχουν δείξει αντιμικροβιακή δράση απουσία και παρουσία φωτός. Η αντιμικροβιακή δράση είναι παρούσα σε καθαρά NADES, σε NADES που έχουν αραιωθεί με υδατικά διαλύματα σε αναλογία έως 1:200 ή σε συνδυασμό με φωτοευαισθητοποιητές και φως υπό την παραγωγή τοξικών δραστικών ενώσεων οξυγόνου. Τα NADES που περιέχουν οργανικά οξέα, όπως και το γαλακτικό οξύ, έχουν επίσης αναφερθεί ότι παρουσιάζουν αντιμικροβιακά αποτελέσματα, πιθανώς λόγω του χαμηλού pH, το οποίο επηρεάζει την ανάπτυξη βακτηρίων. Ειδικότερα, σύμφωνα με το αποτέλεσμα της έρευνας των Hikmawanti κ.ά., 2021, τα καθαρά NADES που περιείχαν μηλικό οξύ και κιτρικό οξύ, εμφάνισαν υψηλή αντιμικροβιακή δράση έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) και θετικών κατά Gram βακτηρίων (*Staphylococcus aureus*) που χρησιμοποιήθηκαν στην δοκιμή. Αντίθετα, τα καθαρά NADES που περιείχαν σάκχαρα και αλκοόλη ως δότη δεσμού υδρογόνου δεν παρήγαγαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *E.coli* και του *S.aureus*. Συνεπώς, το μίγμα NADES με γλυκόζη/γαλακτικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση στην παρούσα μελέτη, είναι πιθανόν να συμβάλει θετικά στην συνολική αντιμικροβιακή δράση των υδρογελών που ελέγχθηκαν (Wikene κ.ά., 2017; Grønlien κ.ά., 2020; Hikmawanti κ.ά., 2021).

1.7.4. Νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs)

Η νανοτεχνολογία κερδίζει τεράστια προσοχή ως ένας ταχέως αναπτυσσόμενος τομέας λόγω της μοναδικής λειτουργικότητας και του ευρέος φάσματος εφαρμογών της, στο πλαίσιο της νανοϊατρικής, αναφορικά με τη θεραπεία, τη διάγνωση και τον έλεγχο ασθενειών. Τα νανοσωματίδια (NPs) είναι στερεά σωματίδια ατομικής ή μοριακής κλίμακας μεγέθους νανομέτρων (<100 nm) που διαθέτουν ορισμένες εξαιρετικές φυσικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα μόρια μεγαλύτερου όγκου, ανάλογα με το μέγεθος και τη μορφολογία τους. Μεταξύ όλων των

τύπων NPs, τα νανοσωματίδια μετάλλου και οξειδίου μετάλλου έχουν εξεταστεί διεξοδικά και χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω χαρακτηριστικών όπως η υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο και η υψηλή διασπορά στο διάλυμα. Για το λόγο αυτό, τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον για τις αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητοκτόνες και αντικαρκινικές τους δράσεις ενώ έχουν ήδη ενσωματωθεί σε βιοϊατρικές και μη εφαρμογές όπως η μικροβιολογία, η χημεία, η κυτταρική βιολογία, η παρασιτολογία και ειδικότερα στην επούλωση τραυμάτων και οστών, στα οδοντικά και καρδιαγγειακά εμφυτεύματα, στην αποστείρωση, στην υγιεινή και τεχνολογία τροφίμων, στα αντιβακτηριακά υφάσματα και πιο πρόσφατα στη διανομή φαρμάκων. Επιπρόσθετα, είναι εξαιρετικά δημοφιλή σε μια ποικιλία καταναλωτικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων πλαστικών, καλλυντικών, σαπουνιών και παστών τροφίμων αυξάνοντας έτσι την αγοραστική τους αξία (Rauwel κ.ά., 2015; Das Purkayastha & Manhar, 2016; Almatroudi, 2020).

1.7.4.1. Αντιμικροβιακή δράση νανοσωματιδίων αργύρου

Η αντιμικροβιακή δράση των αλάτων αργύρου είναι πολύ γνωστή από το 19^ο αιώνα. Η αντιμικροβιακή ιδιότητα του αργύρου (Ag) σχετίζεται με την ποσότητα του αργύρου και τον ρυθμό που αυτός απελευθερώνεται. Ο άργυρος στη μεταλλική του κατάσταση είναι αδρανής, αλλά αντιδρά με την υγρασία είτε στο δέρμα είτε στο υγρό της πληγής που εφαρμόζεται, με αποτέλεσμα να ιονίζεται. Ο ιονισμένος άργυρος είναι εξαιρετικά αντιδραστικός, καθώς συνδέεται με τις πρωτεΐνες των ιστών και προκαλεί δομικές αλλαγές στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και τη πυρηνική μεμβράνη που οδηγεί σε κυτταρική παραμόρφωση και θάνατο (Castellano κ.ά., 2007). Λόγω της εξαιρετικά μεγάλης επιφάνειας, τα νανοσωματίδια και ιόντα αργύρου έρχονται σε άμεση επαφή με τους μικροοργανισμούς, γεγονός που τους καθιστά εξαιρετικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες. Ειδικότερα, σε μελέτες που έγιναν τα τελευταία χρόνια, το ασήμι ορίστηκε ως «ολιγοδυναμικό» λόγω της ικανότητάς του να παράγει βακτηριοκτόνο αποτέλεσμα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό το χαρακτηριστικό των ιόντων Ag⁺ πηγάζει από την υψηλή τους συγγένεια προς τις πρωτεΐνες, τα ένζυμα, το DNA και το RNA, λόγω των αλληλεπιδράσεων τους με λειτουργικές ομάδες όπως οι θειόλες, τα καρβοξυλικά, τα φωσφορικά, τα υδροξύλια, η ιμιδαζόλη, η ινδόλη ή και οι αμίνες που πιθανόν παρεμβαίνουν στις μικροβιακές διεργασίες (Nair & Laurencin, 2007). Σε μικροβιακές διεργασίες αναφέρθηκε και ο Rai κ.ά., 2009 που τόνισε ότι τα ιόντα Ag⁺ δεσμεύονται στο βακτηριακό DNA και RNA με μετουσίωση, αναστέλλοντας τη βακτηριακή αντιγραφή και μεταγραφή του DNA. Για παράδειγμα, η πιθανή λειτουργία αλληλεπίδρασης μεταξύ νανοσωματιδίων αργύρου και διαφορετικών Gram-αρνητικών βακτηρίων (*P.aeruginosa* και *V.cholera* ήταν πιο ανθεκτικά από *E.coli* and *S.typhus*)

μελετήθηκε διεξοδικά από τον Morones κ.ά., 2005. Με βάση την μελέτη τους, τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) μεγέθους 1–10 nm προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και διατάραξαν δραστικά τη σωστή λειτουργία του κυττάρου, όπως την διαπερατότητα και τις λειτουργίες των ενζύμων που συνδέονται με τη μεμβράνη. Τα νανοσωματίδια προσέβαλαν κατά προτίμηση την αναπνευστική αλυσίδα όπου η κυτταρική διαίρεση οδήγησε τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Επιπρόσθετα, τα νανοσωματίδια αργύρου με μέγεθος από 10 έως 100 nm, έδειξαν σημαντική επίδραση σε μικρόβια όπως *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumonia*, *Puccinia graminis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* και *Candida albicans* με βάση την εκτενή έρευνα των B. Kumar & Smita, 2016. Από τους παραπάνω μικροοργανισμούς που αναστάλθηκαν, ξεχωρίζει η δράση των νανοσωματιδίων αργύρου στο αρνητικό κατά Gram παθογόνο βακτήριο *E.coli*. Ειδικότερα, τα νανοσωματίδια αργύρου αποσταθεροποίησαν την εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη του *E.coli*, καθώς συνέβαλλαν στην κατάρρευση του δυναμικού της πλασματικής μεμβράνης και στην εξάντληση της ενδοκυτταρικής ATP με παρόμοιο τρόπο όπως το ιόντα αργύρου Ag^+ , τα οποία εμφανίζουν βακτηριόνο και βακτηριοστατική δράση σε μικρομοριακές αντί για νανομοριακές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) (Lok κ.ά., 2006).

Πίνακας 1: Μηχανισμός δράσης νανοσωματιδίων αργύρου, Πηγή: (B. Kumar & Smita, 2016)

Νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs)	Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης
	Αναστολή σχηματισμού κυτταρικού τοιχώματος
	Παρεμβολή DNA (εισαγωγή ενός μορίου ή ιόντος σε στρωματοποιημένα υλικά με στρωματοποιημένες δομές)
	Αναστολή κυτταρικής σηματοδότησης
	Διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης
	Σχηματισμός ελεύθερων ριζών
	Αλληλεπίδραση με RNA 30S/ριβοσωμική υπομονάδα
	Ενζυματική Αναστολή
	Πρόληψη σχηματισμού βιοφίλμ

Σε νανομοριακό επίπεδο, η αντιβακτηριακή επίδραση των νανοσωματιδίων αργύρου μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με το μέγεθος των νανοσωματιδίων αργύρου. Για παράδειγμα, η αντιβακτηριακή εφαρμογή του αργύρου νανοσωματίδια διαφορετικών μεγεθών (10, 30-40 και 100 nm) έχει δοκιμαστεί έναντι ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S.aureus* (MRSA). Το μέγεθος των AgNPs μεσολαβεί στην αναστολή του MRSA και στην κυτταροτοξικότητα στα ανθρώπινα κύτταρα. Οι συγγραφείς της μελέτης ανέφεραν ότι η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων αυξάνει την αναστολή των βακτηριακών κυττάρων. Ωστόσο, εκτός του μεγέθους των νανοσωματιδίων αργύρου, επιρροή στην συνολική αντιμικροβιακή δράση ασκεί και το σχήμα

των νανοσωματιδίων. Συγκεκριμένα, καθυστέρηση στην ανάπτυξη της *Escherichia coli* και υψηλή αντιδραστικότητα εμφάνισαν τα τριγωνικά νανοσωματίδια σε σύγκριση τα σφαιρικά ή σωματίδια σε σχήμα ράβδου, που αποδίδεται στην υψηλή επιφάνεια επαφής και την επιφανειακή αντιδραστικότητα (Ayala-Núñez κ.ά., 2009; Rout κ.ά., 2014).

Εκτός από την ευρεία αντιβακτηριδιακή και αντιϊκή δράση, τα νανοσωματίδια αργύρου έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιμυκητιακή δράση έναντι διαφόρων ζυμών και μυκήτων μέσω διατάραξης της δομής της κυτταρικής τους μεμβράνης. Η καταστροφική επίδραση στην ακεραιότητα της μεμβράνης και η αναστολή της διαδικασίας εκβλάστησης έχει προταθεί ως ο βασικός μηχανισμός για την αντιμυκητιακή δράση των νανοσωματιδίων αργύρου έναντι της ζύμης *Candida albicans*. Ερευνητική μελέτη με ανάλυση TEM επιβεβαίωσε ότι η επεξεργασία των κυττάρων *Candida* με νανοσωματίδια αργύρου είχε ως αποτέλεσμα μια ακραία παραμόρφωση των κυττάρων. Επιπλέον, η συστολή των κυττάρων ενισχύθηκε λόγω της αλληλεπίδρασης των νανοσωματιδίων με το κυτταρικό τοίχωμα και τη μεμβράνη του ζυμομύκητα. Περαιτέρω οι αντιμικροβιακές επιδράσεις των νανοσωματιδίων αργύρου που προέρχονται από πράσινη σύνθεση με μαύρο δαμάσκηνο/*Syzygium cumini* έναντι των ειδών *Candida* έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό, τον σχηματισμό βλαστικών μορφών και βιοφίλμ καθώς και την έκκριση υδρολυτικών ενζύμων από τα είδη της ζύμης *Candida* (K.-J. Kim κ.ά., 2009; Jalal κ.ά., 2019).

1.7.4.2. Μέθοδος πράσινης σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου με χρήση εκχυλίσματος φύλλων φυτών

Λόγω του περιβαλλοντικού ζητήματος, η πράσινη, βιογενής σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων (NPs) κερδίζει τεράστια προσοχή τις τελευταίες δεκαετίες. Η σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων χρησιμοποιώντας φυτικά εκχυλίσματα είναι μια από τις πιο απλές, βολικές, οικονομικά αποδοτικές και φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους που μετριάζουν τη συμμετοχή τοξικών χημικών ουσιών και την παραγωγή αποβλήτων, τα οποία χαρακτηρίζουν τις συμβατικές χημικές και φυσικές μεθόδους όπως η χημική αναγωγή και η άλεση. Διάφορα μέρη των φυτών όπως φύλλα, ρίζες, σπόροι, άνθη, καρποί ακόμη και το στέλεχος χρησιμοποιούνται ευρέως για τη παραλαβή εκχυλίσματος που συμβάλλει στην ταχεία βιοσύνθεση των νανοσωματιδίων (NPs). Ειδικότερα, τα διαφορετικά μέρη του φυτού συλλέγονται από διάφορες πηγές, πλένονται σωστά με κανονικό νερό και στη συνέχεια με αποσταγμένο νερό για να απομακρυνθούν ρύποι και τυχόν ανεπιθύμητα υλικά. Μετά από αυτό, τα μέρη ξηραίνονται και αλέθονται για να γίνουν σκόνη ή χρησιμοποιούνται ως φρέσκα για την παρασκευή του εκχυλίσματος. Το εκχύλισμα με την σειρά του δρα ως αναγωγικός και σταθεροποιητικός

παράγοντας για τη σύνθεση, τον έλεγχο του μεγέθους και την πρόληψη της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων (NPs). Ειδικότερα, η σύνθεση των NPs εξαρτάται πλήρως από τα βιοϋλικά ή φυτοχημικά που υπάρχουν στο εκχύλισμα. Στην προκύπτουσα εργασία, η πράσινη σύνθεση περιλαμβάνει τον συνδυασμό ενός εκχυλίσματος φυτού με ένα άλας που περιέχει ασήμι, όπου οι βιοδραστικές ενώσεις που υπάρχουν στα εκχυλίσματα χρησιμεύουν για τη μείωση των ιόντων αργύρου σε στοιχειακό ασήμι. Δηλαδή, τα AgNPs παράγονται με οξείδωση Ag^+ σε Ag^0 από διαφορετικά βιομόρια όπως φλαβονοειδή, κετόνες, αλδεΐδες, τανίνες, καρβοξυλικά οξέα, φαινολικά και πρωτεΐνες των φυτικών εκχυλισμάτων. Οι φυτοχημικές αυτές ουσίες προσδίδουν στις παραγόμενες υδρογέλες, και συγκεκριμένα στα εγκλεισμένα νανοσωματίδια, βελτιωμένη σταθερότητα και απόδοση, αναφορικά με την αντιμικροβιακή τους δράση, έναντι παθογόνων και μη μικροοργανισμών (Raveendran κ.ά., 2003; Vanlalveni κ.ά., 2021; Aldakheel κ.ά., 2023).

1.7.4.3. Αντιμικροβιακή δράση νανοσωματιδίων αργύρου που συντέθηκαν με πράσινη εκχύλιση από φύλλα φυτών

Σύμφωνα με ότι προαναφέρθηκε, οι Banerjee κ.ά., 2014 δήλωσαν ότι τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) που συντέθηκαν από το εκχύλισμα φύλλου/φλοΐδας μπανάνας παρουσίασαν ανασταλτικές και θανατηφόρες επιδράσεις τόσο στα Gram-θετικά όσο και στα gram-αρνητικά βακτηρίδια *E.coli* και *S.aureus*, ενώ με βάση τους Ghaedi κ.ά., 2015, το εκχύλισμα φύλλων δεντρολίβανου έδειξε υψηλότερη δραστηριότητα έναντι Gram-αρνητικών βακτηρίων. Είναι ενδιαφέρον ότι οι *S.flexneri*, *S.typhi*, *B.subtilis*, *M.luteus* και *P.mirabilis* ήταν πιο ευαίσθητοι στα AgNPs από το *E.coli*. Συμπληρωματικά, ένα σφαιρικό σχήμα AgNPs παρασκευάστηκε, χρησιμοποιώντας εκχύλισμα φύλλου αμάρανθου, το οποίο εμφάνισε ανασταλτική δράση προς Gram-θετικά, Gram-αρνητικά βακτήρια καθώς και μύκητες (Kolya κ.ά., 2015). Με την σειρά τους, οι Maghima & Alharbi, 2020 ανέφεραν την βιοσύνθεση των AgNPs χρησιμοποιώντας εκχύλισμα φύλλων κourkouμά σε βαμβακερό ύφασμα επικαλυμμένο με AgNPs, το οποίο έδρασε ως αντιμικροβιακός παράγοντας προς παθογόνους μικροοργανισμούς που εντοπίζονται σε πληγές. Τέλος, τα νανοσωματίδια αργύρου από παραπροϊόντα φύλλα τσαγιού έδειξαν μέγιστη αντιβακτηριακή δράση έναντι της *K.pneumoniae* ακολουθούμενη από το *E.coli* αλλά και σε Gram-θετικά βακτήρια (Rajput κ.ά., 2020).

1.7.5. Εκχύλισμα φύλλου ελιάς

Η ελιά (*Olea europaea L.*) είναι ένα ξυλώδες ελαιόδεντρο και ένα από τα σημαντικότερα οπωροφόρα δέντρα που ευδοκούν στην Μεσόγειο, αντιπροσωπεύοντας σχεδόν το 98% της παγκόσμιας καλλιέργειας δέντρων ελιάς. Η συγκεκριμένη καλλιέργεια χαρακτηρίζεται από μεγάλη οικονομική και κοινωνική σημασία για τον πρωτογενή τομέα παραγωγής και τον τομέα τροφίμων. Συνεπώς, τα πιθανά οφέλη που θα προκύψουν από τη χρήση οποιουδήποτε από τα μη βρώσιμα υποπροϊόντα της, όπως ο ελαιοπυρήνας και τα φύλλα ελιάς, είναι μεγάλα. Τα υποπροϊόντα που παράγονται στις βιομηχανίες τροφίμων και στην συγκεκριμένη περίπτωση στην βιομηχανία ελαιολάδου, αποτελούν πολύτιμη πηγή πληθώρας βιοδραστικών ενώσεων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη και τη θεραπεία αρκετών ασθενειών, ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, ως θρεπτικά συστατικά σε λειτουργικά τρόφιμα αλλά και για την παρασκευή καλλυντικών προϊόντων (Tabera κ.ά., 2004; Pereira κ.ά., 2007).

1.7.5.1. Φαινολικές ενώσεις φύλλων ελιάς

Τα φύλλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εκχυλίσματα ή αφεψήματα, επιτρέποντας σημαντική πρόσληψη βιοδραστικών ενώσεων, ως δευτερογενείς μεταβολίτες τους, όπως οι σεκοϊριδοειδείς ενώσεις, η ελαιασίνη και η ελευρωπαΐνη. Το εκχύλισμα φύλλων ελιάς χαρακτηρίζεται από σκούρο καφέ χρώμα, πικρή γεύση και περιέχει τις παραπάνω πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες συμβάλλουν στην αύξηση των επιπέδων ενέργειας, στην μείωση της αρτηριακής πίεσης και στην υποστήριξη του καρδιαγγειακού και του ανοσοποιητικού συστήματος. Η χρήση του εκχυλίσματος, χωρίς απομόνωση των επιμέρους φαινολικών συστατικών, συνιστάται για την επίτευξη ευρείας αντιμικροβιακής δράσης, λόγω των συνεργιστικών επιδράσεων όλων των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στο εκχύλισμα. Όπως και στην περίπτωση πολλών φυσικών προϊόντων, η σύνθεση του εκχυλίσματος διαφέρει ανάλογα με τις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης του δέντρου, όπως η γεωγραφική θέση και η ποικιλία του είδους (Pereira κ.ά., 2007; Sudjana κ.ά., 2009).

Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι μια από τις πιο ευρέως εμφανιζόμενες ομάδες φυτοχημικών και αντιμικροβιακών παραγόντων. Τα φύλλα ελιάς περιέχουν μεγάλη ποικιλία φαινολικών παραγώγων και αποτελούνται από τις απλές φαινόλες, τα φλαβονοειδή όπως οι φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες και φλαβαν-3-όλες και τα σεκοϊριδοειδή. Μέσα σε αυτές τις ενώσεις, η κύρια ουσία όλων των συστατικών του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς είναι η ελευρωπαΐνη η οποία μοιάζει με την κουμαρίνη και έχει αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Επιπλέον, δρα ως αναστολέας βλάβης των χρωμοσωμάτων, διαθέτει ιδιότητες

δέσμευσης ελεύθερων ριζών και αναστέλλει την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων κυτταρικών όγκων. Υπό τη δράση του φωτός, η ελαιουρωπαϊνή υψηλής θερμοκρασίας, οξέος ή βάσης διασπάται προς υδροξυτυροσόλη και ελενολικό οξύ, που αποτελούν επίσης ενώσεις υψηλού ενδιαφέροντος στη φαρμακευτική βιομηχανία λόγω των αντιμικροβιακής και αντιφλεγμονώδους τους δράσης. Συμπληρωματικά, τα φύλλα ελιάς περιέχουν σημαντικό αριθμό флаβονοειδών, που μπορούν να υπάρχουν σε μορφή αγλυκόνης, όπως οι πολυφαινόλες απιγενίνη, διοσμετίνη, λουτεολίνη και κερκετίνη ή σε γλυκοζυλιωμένη μορφή όπως οι ουσίες λουτεολίνη-7-O-ρουτινοσίδη, λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη, λουτεολίνη-5-O-γλυκοσίδη και κερκετίνη-7-O-ρουτινοσίδη (Jemai κ.ά., 2008; Borjan κ.ά., 2020).

1.7.5.2. Αντιμικροβιακή δράση φύλλων ελιάς

Οι Pereira κ.ά., 2007 έλεγξαν την αντιμικροβιακή δράση υδατικού εκχυλίσματος φύλλου ελιάς που περιείχε καφεϊκό οξύ, βερμπασκοσίδη, ελευρωπαϊνή, λουτεολίνη 7-O-γλυκοσίδη, ρουτίνη, απιγενίνη, 7-O-γλυκοσίδη, λουτεολίνη και 4'-O-γλυκοσίδη. Παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος, το φύλλο ελιάς παρουσίασε αυξημένη αντιμικροβιακή ικανότητα στους παρακάτω μικροοργανισμούς, ακολουθώντας τη συγκεκριμένη σειρά: *B.cereus* ~ *C.albicans* > *E.coli* > *S.aureus* > *C.neoformans* ~ *K.pneumoniae* ~ *P.aeruginosa* > *B.subtilis*. Οι Himour κ.ά., 2017 με την σειρά τους, επιβεβαίωσαν την αποτελεσματική αντιβακτηριδιακή δράση της ελευρωπαϊνης στα είδη *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*. Ενώ, η ελευρωπαϊνή όσο και το καφεϊκό οξύ έδειξαν ανασταλτικά αποτελέσματα κατά της *Salmonella enteritidis* και μέτρια επίδραση αναστολής της ανάπτυξης έναντι των *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* και *Salmonella enteritidis* λόγω του καφεϊκού οξέος (Talhoui κ.ά., 2015). Αναφέρθηκε επίσης, ότι η ελευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη είναι οι καλύτεροι αναστολείς έναντι της ζύμης *Candida albicans* και των παθογόνων βακτηρίων *E.coli*, *S.typhimurium* και *S.aureus* (Bisignano κ.ά., 1999). Συμπληρωματικά, η αντιμικροβιακή δράση της λουτεΐνης έναντι του *S.aureus* και της *L.monocytogenes* κατέστρεψε την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, ανέστειλε δραστικά τον σχηματισμό βιοφίλμ και ενίσχυσε τη διάχυση αντιβιοτικών εντός αυτών των βακτηρίων (Qian κ.ά., 2020).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά και εξοπλισμός

2.1.1. Υλικά και αντιδραστήρια

- Υδρογέλες.

Πίνακας 2: Σύσταση και συγκεντρώσεις των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123, ADIP1124

ΚΩΔΙΚΟΣ AD	ΔΕΙΓΜΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (mg)
ADIP1121	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (13%v/v)	Ποσότητα υδρογέλης:246.7
ADIP1122	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v)	Ποσότητα υδρογέλης: 687.6
ADIP1123	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-AgNPs (AgNO ₃ 5 mM)-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v)	Ποσότητα υδρογέλης: 634.6
		Συγκέντρωση AgNPs που αποδεσμεύτηκαν από την υδρογέλη (1mg/ml, 2d): 1.21e+08 +/- 2.18e+07 particles/ml
ADIP1124	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-NADES (4%v/v)	Ποσότητα υδρογέλης: 683.9
*NADES→ D-(+)-Γλυκόζη/ D,L-Γαλακτικό Οξύ/ Νερό (D-(+)-Glucose/D,L-Lactic acid/Water) (Glu/LA/W) 1:5:6.2		
**AgNPs: Νανοσωματίδια αργύρου		

Πίνακας 3: Σύσταση και συγκεντρώσεις των υδρογελών ADIP992, ADIP993

ΚΩΔΙΚΟΣ AD	ΔΕΙΓΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/ml)
ADIP992	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-εκχύλισμα μέντας	6 mg/ml
ADIP993	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-control	5 mg/ml

- Εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν στην προκειμένη εργαστηριακή μελέτη

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
-	Εκχύλισμα φύλλου ελιάς	100% v/v
-	Εκχύλισμα Vanilla planifolia/αιθανόλη(EtOH)	50% v/v
		75% v/v
		100% v/v
-	Εκχύλισμα Vanilla tahitensis/EtOH	100% v/v
-	Εκχύλισμα Vanilla abs/EtOH	100% v/v
ADIP075	Αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο	100% v/v
ADIP076	Αιθέριο έλαιο περγαμόντο/πορτοκάλι	1,25 % v/v
		2,5 % v/v
		5 % v/v
		10 % v/v

- Πρότυπα στελέχη μικροοργανισμών

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας πρότυπων στελεχών μικροοργανισμών, σε συνάρτηση με τις μικροβιολογικές μεθόδους στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην προκειμένη εργαστηριακή μελέτη

ΕΙΔΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ
ΒΑΚΤΗΡΙΑ		
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12241/ATCC 25922	Μέθοδος διάχυσης δισκίου σε άγαρ, Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, Bioscreen C
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 10788/ATCC 6538	Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, Bioscreen C
<i>Salmonella typhimurium</i>	NCTC 12023/ATCC 14028	Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, Bioscreen C
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 7973/ATCC 35152	Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, Bioscreen C
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 775/ATCC 19433	Bioscreen C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 12903/ATCC 27853	Bioscreen C
<i>Bacillus cereus</i>	NCTC 10320/ATCC 9634	Bioscreen C
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NCTC 12982/ATCC 9610	Bioscreen C
ΖΥΜΕΣ		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCPF 3255/ATCC 2091	Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, Bioscreen C
<i>Lachancea</i>	Εμπορική καλλιέργεια	Bioscreen C

- Λοιπά υλικά και αντιδραστήρια

- Plate Count Agar / PCA (HIMEDIA)
- Brain Heart Infusion Broth / BHI Broth (pronadisa, CONDA)
- Απιονισμένο νερό (dH₂O)
- Διάλυμα γαλακτικού οξέος 2 %
- DMSO 1%
- Αιθανόλη
- Βενζοϊκό νάτριο 0,1% / pH=5
- Δισκία αμπικιλίνης 10 μg
- Δισκία 10 μg για διάχυση διαλυμάτων σε άγαρ

- **Εξοπλισμός**

Παρακάτω παρατίθενται ο τεχνολογικός εξοπλισμός και τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διενέργεια της συγκεκριμένης πειραματικής εργασίας:

- Λύχνος Bunsen
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
- Αναλυτικός ζυγός (KERN-EW)
- Αναλυτικός ζυγός JL-180 (Chgo)
- Ηλεκτρόδιο μέτρησης pH (GLP 21 CRISON)
- Υδατόλουρτο (memmert)
- Επωαστικός κλίβανος (memmert)
- Καμπίνα βιολογικής ασφάλειας BSC-1300IIA2-X) (BIOBASE)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες καλλιέργειας
- Πλαστικά τρυβλία (Laborgeräte GmbH, ISOLAB)
- Bioscreen C
- Στατώ δοκιμαστικών σωλήνων
- Μπουκάλια με φαρδύ λαιμό και βιδωτό καπάκι, 250 ml
- Μπουκάλια με φαρδύ λαιμό και βιδωτό καπάκι, 500 ml
- Ποτήρια ζέσεως 100 ml
- Ποτήρια ζέσεως 250 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος 250 ml
- Μπουκάλια με περιστρεφόμενο πώμα, 30 ml
- Πιπέτες Pasteur, long form 230 mm (Kimble)
- Σωλήνες Eppendorf 2 ml
- Κρίκοι εμβολιασμού Impfschlingen 10 μl
- Πιπέτα ρυθμιζόμενη αυτόματη 20-200 μl (Brand)
- Πιπέτα ρυθμιζόμενη αυτόματη 100-1000 μl (Brand)
- Τις πίπετας 200 μl
- Τις πίπετας 1000 μl
- Μεταλλική λαβίδα
- Γυάλινη ράβδος επίστρωσης
- Parafilm "M" (PECHINEY PLASTIC PACKAGING)

2.2. Μέθοδοι

Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών με νανοσωματίδια μετάλλων και εκχύλισμα φύλλου ελιάς χωρίστηκε σε δύο πειραματικά μέρη.

- Στο πρώτο μέρος (Μέρος Α') μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των υδρογελών και άλλων ουσιών σε παθογόνα μικροβιακά στελέχη, με την χρήση της μεθόδου διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, για τις τρεις πρώτες σειρές πειραμάτων και της μεθόδου διάχυσης δίσκου σε άγαρ για την τελευταία σειρά πειραμάτων. Εκτός από τις υδρογέλες που μελετήθηκαν, έγινε και έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης ουσιών όπως αιθέριων ελαίων, εκχυλισμάτων βανίλιας και δύο επιπλέον αλγινικών υδρογελών, μία μέντας και μίας υδρογέλης control.
 - Ειδικότερα, στην πρώτη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκχύλισμα φύλλου ελιάς 100% v/v, η αλγινική υδρογέλη με εκχύλισμα μέντας (ADIP992) 5 mg/ml και αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο (ADIP075) 100% v/v και ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή τους ικανότητα απέναντι στα βακτήρια *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* και *Listeria monocytogenes*.
 - Ακολούθως, στην δεύτερη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού/περγαμόντο (ADIP076) σε συγκεντρώσεις 1,25% v/v, 2,5% v/v, 5% v/v, 10% v/v και εκχυλίσματα *Vanilla planifolia*/αιθανόλη(EtOH), *Vanilla tahitensis*/αιθανόλη(EtOH) και *Vanilla abs*/αιθανόλη(EtOH) όλα σε συγκεντρώσεις 100% v/v για τους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Saccharomyces cerevisiae*.
 - Στην τρίτη σειρά πειραμάτων έγινε χρήση *Vanilla planifolia*/αιθανόλη(EtOH) σε συγκεντρώσεις 50% v/v και 75% v/v και της αλγινικής υδρογέλης control (ADIP993), πάλι προς τους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*.
 - Τέλος, στην τέταρτη και τελευταία σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν, για έλεγχο της αντιμικροβιακής τους δράσης προς την *Escherichia coli*, οι αλγινικές υδρογέλες ADIP1121 με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (13%v/v), ADIP1122 με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v), ADIP1123 με αλγινικό οξύ-AgNPs (AgNO₃ 5 mM)-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v) και ADIP1124 με αλγινικό οξύ-NADES (4%v/v) στην υγρή τους μορφή και σε συγκεντρώσεις 1 mg/ml, τις οποίες μελετά η προκειμένη ερευνητική εργασία.
- Στο δεύτερο μέρος (Μέρος Β') μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των υδρογελών ADIP1121 με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (13%v/v), ADIP1122 με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v), ADIP1123 με αλγινικό οξύ-AgNPs (AgNO₃ 5 mM)-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES

(4%v/v) και ADIP1124 με αλγινικό οξύ-NADES (4%v/v) στην υγρή τους μορφή και σε συγκεντρώσεις 1 mg/ml, με την χρήση της τεχνικής Bioscreen C, έναντι παθογόνων μικροβιακών στελεχών.

- Ειδικότερα, στην πρώτη σειρά πειραμάτων έγινε μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών απέναντι στον *Staphylococcus aureus*, στην δεύτερη σειρά πειραμάτων στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Lachancea* ενώ στην τρίτη σειρά πειραμάτων στους παθογόνους μικροοργανισμούς *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* και *Yersinia enterocolitica*.

2.2.1. Μέρος Α' - Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης με χρήση των μεθόδων διάχυσης φρεατίου σε άγαρ και διάχυσης δίσκου σε άγαρ

2.2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των δειγμάτων υδρογελών και εκχυλισμάτων που προαναφέρθηκαν, έγινε προετοιμασία αυτών με χρήση κατάλληλων αραιώσεων στα αρχικά δείγματα (άνυδρα ή υγρά), προκειμένου να ληφθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις τελικών δειγμάτων. Ακολούθως, θα γίνει επεξηγηματική ανάλυση των βημάτων παρασκευής και αραιώσης των τελικών δειγμάτων υλικών και αντιδραστηρίων για κάθε επιμέρους σειρά πειραμάτων.

2.2.1.1.1. 1^η Πειραματική δοκιμή

Για την παρασκευή του δείγματος εκχυλίσματος φύλλου ελιάς, χρησιμοποιήθηκαν 40 mg αρχικού συμπυκνωμένου εκχυλίσματος φύλλου ελιάς, τα οποία αραιώθηκαν με 300 μl ή 0,3 ml απεσταγμένου νερού (dH2O) και 600 μl ή 0,6 ml διαλύματος γαλακτικού οξέος 2%. Στην συνέχεια, για την υδρογέλη με αλγινικό οξύ και εκχύλισμα μέντας (ADIP992), χρησιμοποιήθηκαν 60 mg άνυδρης-στερεής υδρογέλης ADIP992, τα οποία αραιώθηκαν με 10 ml απεσταγμένου νερού (dH2O). Ενώ, για την παρασκευή του αιθέριου ελαίου πράσινου περγαμόντο (ADIP075) 100% v/v, έγινε αραιώση 550 μl ή 0,55 ml αρχικού δείγματος αιθέριου ελαίου 100% v/v με 550 μl ή 0,55 ml DMSO 1%.

Συμπληρωματικά, τα χημικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν για τις αραιώσεις των προσδιοριζόμενων δειγμάτων αλλά και ως control, με σκοπό την σύγκριση των πιθανών αντιμικροβιακών ουσιών με αυτά, για την παραλαβή πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Ειδικότερα:

- Γαλακτικό οξύ 2%: Χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης του εκχυλίσματος φύλλου ελιάς, συνδυαστικά με το απεσταγμένο νερό.
- Απεσταγμένο νερό (dH₂O): το pH του ρυθμίστηκε στην τιμή 5, με την βοήθεια συσκευής pHμέτρου, η οποία είχε βαθμονομηθεί με κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα pH. Επίσης, ελέγχθηκε μεμονωμένα για τυχόν επιμολύνσεις που θα αλλοίωναν τα τελικά αποτελέσματα. Αναμένεται η απουσία ζώνης αναστολής, αλλιώς τα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως αραιωτικό διάλυμα, θα έχουν επιμολυνθεί.
- DMSO 1%: Το DMSO (Dimethyl sulfoxide) ή διμεθυλοσουλφοξειδίο είναι ένας πολικός απρωτικός διαλύτης και είναι λιγότερο τοξικός από άλλα μέλη διαλυτών αυτής της κατηγορία. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάλυση δοκιμαστικών ενώσεων σε in vitro προγράμματα σχεδιασμού φαρμάκων αλλά και σε έρευνες ανάπτυξης υδρογελών. Αυτό συμβαίνει καθώς είναι σε θέση να διαλύει τόσο πολικές όσο και μη πολικές ενώσεις, είναι εύκολα αναμίξιμο με νερό και μέσα κυτταροκαλλιέργειας και έχει υψηλό σημείο βρασμού, βελτιώνοντας μέσω αυτής της ιδιότητας, την ακρίβεια των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ένωσης και μειώνοντας την εξάτμιση της σε θερμοκρασία δωματίου. Ωστόσο, ένας περιορισμός του DMSO είναι ότι υψηλές συγκεντρώσεις αυτού, μερικές φορές αναστέλλουν ή σκοτώνουν τα μικροβιακά κύτταρα, λόγω της τοξικότητάς τους. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 2% όταν εφαρμόζεται σε αντιμικροβιακές δοκιμές και στην συγκεκριμένη εργαστηριακή έρευνα χρησιμοποιήθηκε για αραιώσεις υδρογελών σε αναλογία 1:1 (Balakin κ.ά., 2006; Cushnie κ.ά., 2020). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό δείγμα αναφοράς (negative control) αντιμικροβιακής δράσης, γεγονός που ορίζει την αναμενόμενη απουσία ζώνης αναστολής.
- Βενζοϊκό νάτριο 0,1%: αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρητικό, με αντιμικροβιακές ιδιότητες και στο εμπόριο βρίσκεται με τον κωδικό E211. Στην συγκεκριμένη μελέτη, έγινε ρύθμιση pH για το διάλυμα του στην τιμή 5, με την βοήθεια συσκευής pHμέτρου, η οποία είχε βαθμονομηθεί με κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα pH, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως θετικό control, όπου αναμένεται η ανάπτυξη ζώνης αναστολής.
- Δισκίο αμπικιλίνης 10 μg: Η αμπικιλίνη είναι ένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικό με βακτηριοκτόνο δράση εναντίον πολλών θετικών και αρνητικών κατά Gram

μικροοργανισμών. Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα αναφοράς (positive control) για την ανάπτυξη μεγάλης αντιμικροβιακής ζώνης αναστολής, σχετικά με την δράση των παθογόνων μικροοργανισμών που ελέγχθηκαν. Με βάση την αμπικιλίνη, συγκρίνονται και επαληθεύονται τα αντιμικροβιακά αποτελέσματα των ελεγχόμενων δειγμάτων υδρογελών και εκχυλισμάτων.

2.2.1.1.2. 2^η Πειραματική δοκιμή

Για την παρασκευή των τελικών δειγμάτων αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού/περγαμόντο (ADIP076) σε συγκεντρώσεις 1,25% v/v, 2,5% v/v, 5% v/v, 10% v/v, ακολουθήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων από αρχικό δείγμα (stock) του αιθέριου ελαίου ADIP076 με συγκέντρωση 100% v/v. Ειδικότερα, από το αρχικό συμπύκνωμα αιθέριου ελαίου πορτοκαλί/περγαμόντο συγκέντρωσης 100% v/v, δημιουργήθηκε το stock 10% v/v από το οποίο παρήχθη το δείγμα 5% v/v, ακολούθως από το δείγμα 5% v/v, πάλι με διαδοχική αραιώση, το δείγμα 2,5% v/v και τέλος από το δείγμα 2,5% v/v παρήχθη το τελικό δείγμα 1,25% v/v, που ήταν και αυτό με την μικρότερη συγκέντρωση. Για τις παραπάνω αραιώσεις χρησιμοποιήθηκε DMSO 1% σε αναλογία 1:1 με την ποσότητα των αιθέριων ελαίων που απαιτούνταν για κάθε διαδοχική αραιώση. Στην συνέχεια, για τα εκχύλισματα *Vanilla planifolia*/αιθανόλη(EtOH), *Vanilla tahitensis*/αιθανόλη(EtOH) και *Vanilla abs*/αιθανόλη(EtOH) όλα σε συγκεντρώσεις 100% v/v, χρειάστηκε αραιώση σε αναλογία 1:1 με διάλυμα DMSO 1% (0,5 ml εκχύλισμα + 0,5 ml DMSO 1%), για το εκχύλισμα *Vanilla abs*/αιθανόλη(EtOH).

2.2.1.1.3. 3^η Πειραματική δοκιμή

Για την παρασκευή των δειγμάτων του εκχυλίσματος *Vanilla planifolia*/αιθανόλη(EtOH) σε συγκεντρώσεις 50% v/v και 75% v/v, ακολουθήθηκε πάλι η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων. Ειδικότερα, από αρχικό εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/αιθανόλη(EtOH) 100% v/v, δημιουργήθηκε το δείγμα με συγκέντρωση 75% v/v και από το δείγμα αυτό, με αραιώση, το δείγμα με συγκέντρωση 50% v/v. Για την παραπάνω αραιώση χρησιμοποιήθηκε DMSO 1% σε αναλογία 1:1 με την ποσότητα των εκχυλίσματος που απαιτούνταν για την αραιώση από το εκχύλισμα 75% σε αυτό του 50%. Επιπρόσθετα, για την ανάπτυξη της υδρογέλης ADIP993 με αλγινικό οξύ (control) και συγκέντρωση 5 mg/ml, χρησιμοποιήθηκαν 50 mg άνυδρης-στερεής μορφής ADIP993 τα οποία αραιώθηκαν με 10 ml απεσταγμένο νερό (dH₂O).

2.2.1.1.4. 4^η Πειραματική δοκιμή

Στο ακόλουθο πείραμα τα δείγματα των υγρών υδρογελών ADIP1121 με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (13%v/v), ADIP1122 με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v), ADIP1123 με αλγινικό οξύ-AgNPs (AgNO₃ 5 mM)-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v) και ADIP1124 με αλγινικό οξύ-NADES (4%v/v) σε συγκεντρώσεις 1 mg/ml, χρησιμοποιήθηκαν ως έχει, χωρίς να δεχθούν αραιώσεις, προκειμένου να ελεγχθεί η αντιμικροβιακή δράση στα αρχικά δείγματα και ακολούθως σε επόμενα πειράματα να υπάρχει το περιθώριο ώστε να επέλθει συμπύκνωση ή αραίωση αυτών.

2.2.1.2. Παρασκευή υποστρωμάτων

Για την ανάπτυξη των πρότυπων στελεχών χρησιμοποιήθηκε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα PCA (Plate Count Agar), στο οποίο πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των παθογόνων μικροοργανισμών, που προήλθαν από υγρές καλλιέργειες που είχαν παρασκευασθεί.

Το PCA είναι βακτηριολογικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του συνολικού αριθμού ζωντανών, αερόβιων βακτηρίων σε ένα δείγμα και αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα γενικής χρήσης. Η περιεκτικότητά του σε καζεΐνη και πεπτόνη, αλλά και η παρουσία γλυκόζης, βιταμινών, μετάλλων και ιχνοστοιχείων το καθιστά κατάλληλο για την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών.

Αρχικά, για την παρασκευή των υποστρωμάτων, με βάση την αναγραφόμενη αναλογία, έγινε διάλυση της σκόνης του υποστρώματος με νερό σε μία κατσαρόλα και ακολούθησε βρασμός, υπό ήπια ανάδευση με την χρήση γυάλινης ράβδου, έως ότου το διάλυμα να αποκτήσει μία λευκή-διάφανη όψη. Έπειτα, το υγρό υπόστρωμα εισήχθη στους 121,1 °C για 45 λεπτά. Μετά την αποστείρωση, τα υποστρώματα τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο προκειμένου να κρυώσουν και όταν η θερμοκρασία ήταν κατάλληλη, πραγματοποιήθηκε πλήρωση των τρυβλίων Petri, στην καμπίνα βιολογικής ασφάλειας, υπό ασηπτικές συνθήκες (λάμπα UV) ή στο ασηπτικό περιβάλλον του λύχνου Bunsen. Τα τρυβλία πληρώθηκαν σε πάχος 2/3 και αφέθηκαν σε ηρεμία για 20 λεπτά, με σκοπό να σταθεροποιηθούν για να είναι έτοιμα για εμβολιασμό και επίστρωση.

2.2.1.3. Προετοιμασία μικροοργανισμών

Για όλες τις δοκιμασίες, έγινε ανακαλλιέργεια των μικροβιακών στελεχών από έτοιμες υγρές καλλιέργειες του εργαστηρίου μικροβιολογίας, με σκοπό τα στελέχη να βρίσκονται στην

λογαριθμική τους φάση και τα αποτελέσματα των αντιμικροβιακών μεθόδων να είναι αντιπροσωπευτικά της δράσης των υδρογελών και εκχυλισμάτων.

Πρωτίστως, η αρχική εργαστηριακή καλλιέργεια του μικροοργανισμού αναδεύεται σε μηχανήμα Vortex, για να κατανεμηθεί ομοιόμορφα το πλήθος των μικροβιακών κυττάρων. Ακολουθεί, χρήση κρίκου εμβολιασμού 10 μl, ο οποίος εισάγεται στο δοκιμαστικό σωλήνα και η κρική που λαμβάνεται ακολούθως μεταφέρεται σε έναν νέο δοκιμαστικό σωλήνα με πώμα, που περιέχει υγρό θρεπτικό υπόστρωμα/broth BHI (Brain Heart Infusion). Επισημαίνεται ότι όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες, οι οποίες επιτυγχάνονται με την χρήση του εν λειτουργία λύχνου Bunsen. Μετά την ανακαλλιέργεια ακολουθεί επώαση των εμβολιασμένων δοκιμαστικών σωλήνων στους 37°C για 17-18h, σε επωαστικό κλίβανο για όλους τους μικροοργανισμούς, με εξαίρεση την *Listeria monocytogenes*, η οποία για να αναπτυχθεί επαρκώς, απαιτεί επώαση στους 37°C για 48h.

2.2.1.4. Μεθοδολογία

Επισημαίνεται ότι και για τις τέσσερις πειραματικές δοκιμές, τα δείγματα αντιμικροβιακών ουσιών ελέγχθηκαν με την χρήση της μεθόδου διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, για τις τρεις πρώτες σειρές πειραμάτων και με την μέθοδο διάχυσης δίσκου σε άγαρ για την τελευταία πειραματική δοκιμή. Για όλα τα πειράματα ακολουθήθηκε η ίδια βασική πειραματική πορεία, η οποία διαφοροποιήθηκε μόνο αναφορικά με τα δείγματα, τα είδη των μικροοργανισμών που επιλέχθηκαν για κάθε πείραμα και τις διαφορετικές ποσότητες πλήρωσης των φρεατίων.

Για τον σκοπό αυτόν, χρησιμοποιήθηκαν σταθεροποιημένα τρυβλία PCA, στα οποία στην συνέχεια υλοποιήθηκε η διαδικασία της επίστρωσης. Αρχικά, με χρήση αυτόματης πιπέτας 20-200 μl μεταφέρθηκαν 100 μl ή 0,1 ml από την νέα ανακαλλιέργεια του εκάστοτε μικροοργανισμού στην επιφάνεια του υποστρώματος. Ακολούθως, έγινε επίστρωση/άπλωμα του εμβολιασμένου διαλύματος με αποστειρωμένη, με την χρήση αλκοόλης και φλόγας, τριγωνικής, γυάλινης ράβδου επίστρωσης, χρησιμοποιώντας κυκλικές κινήσεις, ώστε να εμβολιαστεί όλη η επιφάνεια του τρυβλίου. Επισημαίνεται ότι, απαιτείται αναμονή για περίπου 10 δευτερόλεπτα πριν την επίστρωση, προκειμένου η ράβδος να μην έχει υψηλή θερμοκρασία, η οποία θα μπορούσε να θανατώσει τους μικροοργανισμούς. Έπειτα δημιουργήθηκαν τα απαιτούμενα φρεάτια σε κάθε τρυβλίο, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη γυάλινη πιπέτα Pasteur ή στην περίπτωση της μεθόδου διάχυσης δίσκου, τα δισκία εμβαπτίζονται στα διαλύματα των δειγμάτων και τοποθετούνται προσεκτικά με την χρήση αποστειρωμένης μεταλλικής λαβίδας στην επιφάνεια του υποστρώματος. Επισημαίνεται, ότι όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε ασηπτικές συνθήκες. Επιπλέον, αξιοσημείωτο είναι ότι τόσο τα φρεάτια όσο και τα δισκία πρέπει

να δημιουργηθούν ή να τοποθετηθούν αντίστοιχα, σε κατάλληλες συμμετρικές θέσεις στο τρυβλίο, ώστε οι αναμενόμενες ζώνες αναστολής της μικροβιακής δράσης για καθένα από αυτά, να μην επικαλύπτουν η μία την άλλη. Στην συνέχεια, με χρήση αυτόματης πιπέτας, τα φρεάτια πληρώνονται με υδρογέλες ή/και εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια αλλά και με ουσίες που δρουν ως θετικό ή αρνητικό control. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 15 έως και 72h, ανάλογα με την πορεία των αποτελεσμάτων.

2.2.1.4.1. Μεθοδολογία 1^{ης} πειραματικής δοκιμής

Συγκεκριμένα στην πρώτη πειραματική δοκιμή, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση έναντι στα βακτήρια *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* και *Listeria monocytogenes*. Έτσι σχηματίστηκαν συνολικά 9 τρυβλία, 3 για την *E.coli* και 2 για κάθε έναν από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς.

Στο πρώτο τρυβλίο της *E.coli* δημιουργήθηκαν 3 φρεάτια (Α,Β,Γ) τα οποία γεμίστηκαν με εκχύλισμα φύλλου ελιάς 100% v/v. Στο δεύτερο τρυβλίο της *E.coli* δημιουργήθηκαν 6 φρεάτια (Α,Β,Γ), εκ των οποίων 3 φρεάτια (Α,Β,Γ) γεμίστηκαν με την αλγινική υδρογέλη με εκχύλισμα μέντας (ADIP992) 5 mg/ml ενώ τα υπόλοιπα 3 φρεάτια (Α,Β,Γ) γεμίστηκαν με αιθέριο έλαιο περγαμόντο (ADIP075) 100% v/v. Ακολούθως, στο τρίτο τρυβλίο της *E.coli* δημιουργήθηκαν 4 φρεάτια (Α), τα οποία πληρώθηκαν με θετικά και αρνητικά δείγματα αναφοράς-control, στα οποία ως συντηρητικό χρησιμοποιήθηκε βενζοϊκό νάτριο, απεσταγμένο νερό, DMSO 1% και ως αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε δισκίο αμπικιλίνης 10 µg.

Στο πρώτο τρυβλίο για τους μικροοργανισμούς *S.aureus*, *S.typhimurium* και *L.monocytogenes* δημιουργήθηκαν 6 φρεάτια (Α,Β,Γ), εκ των οποίων 3 φρεάτια (Α,Β,Γ) γεμίστηκαν με την αλγινική υδρογέλη με εκχύλισμα μέντας (ADIP992) 5 mg/ml ενώ τα υπόλοιπα 3 φρεάτια (Α,Β,Γ) γεμίστηκαν με αιθέριο έλαιο περγαμόντο (ADIP1075) 100% v/v. Στο δεύτερο τρυβλίο της συγκεκριμένης ομάδας βακτηρίων δημιουργήθηκαν 4 φρεάτια (Α), τα οποία πληρώθηκαν με θετικά και αρνητικά δείγματα αναφοράς-control, τα οποία είχαν ως συντηρητικό βενζοϊκό νάτριο, απεσταγμένο νερό, DMSO 1% και ως αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε δισκίο αμπικιλίνης 10 µg.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμής ελήφθησαν μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C/17-18h και για την διεργασία διάχυσης φρεατίου χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα των 100 µl.

2.2.1.4.2. Μεθοδολογία 2^{ης} πειραματικής δοκιμής

Κατά την δεύτερη πειραματική δοκιμή έγινε έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης προς τους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Saccharomyces cerevisiae*. Ακολούθως σχηματίστηκαν συνολικά 18 τρυβλία, 5 τρυβλία για την *Escherichia coli*, 4 τρυβλία για κάθε έναν από τους μικροοργανισμούς *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* και *Listeria monocytogenes*, ενώ για την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* δημιουργήθηκε μόνο 1 τρυβλίο.

Στα πρώτα τρυβλία (4 τρυβλία) των *E.coli*, *S.aureus*, *S.typhimurium* και *L. monocytogenes* δημιουργήθηκαν 6 φρεάτια (A,B), τα οποία γεμίστηκαν με δείγματα αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού/περγαμόντο (ADIP076) σε συγκεντρώσεις 5% v/v και 10% v/v, ενώ στην δεύτερη σειρά τρυβλίων (4 τρυβλία) δημιουργήθηκαν επίσης 6 φρεάτια (A,B), τα οποία γεμίστηκαν με δείγματα αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού/περγαμόντο (ADIP076) σε συγκεντρώσεις 1,25% v/v και 2,5% v/v.

Στην συνέχεια, για τους μικροοργανισμούς *E.coli*, *S.aureus* και *L.monocytogenes* δημιουργήθηκαν άλλα 6 τρυβλία, εκ των οποίων στα πρώτα 3 τρυβλία, ένα για κάθε μικροοργανισμό, έγιναν 6 φρεάτια (A,B), τα οποία πληρώθηκαν με δείγματα αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού/περγαμόντο (ADIP076) σε συγκεντρώσεις 5% v/v και 10% v/v και δείγματα *Vanilla planifolia*/αιθανόλη(EtOH), *Vanilla tahitensis*/αιθανόλη(EtOH) σε συγκέντρωση 100% v/v. Στα υπόλοιπα 3 τρυβλία, επίσης ένα για κάθε μικροοργανισμό, δημιουργήθηκαν 6 φρεάτια (A,B,Γ), τα οποία πληρώθηκαν με δείγματα αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού/περγαμόντο (ADIP076) σε συγκεντρώσεις 1,25% v/v και 2,5% v/v και δείγματα *Vanilla tahitensis*/αιθανόλη(EtOH) και *Vanilla abs*/αιθανόλη(EtOH) σε συγκέντρωση 100% v/v.

Αναφορικά με τα επιπλέον τρυβλία της *L.monocytogenes* (2 τρυβλία), στο πρώτο τρυβλίο δημιουργήθηκαν 6 φρεάτια (A,B,Γ), τα οποία πληρώθηκαν με δείγματα αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού/περγαμόντο (ADIP076) σε συγκεντρώσεις 5% v/v και 10% v/v και δείγματα *Vanilla tahitensis*/αιθανόλη(EtOH) σε συγκέντρωση 100% v/v. Έπειτα στο δεύτερο τρυβλίο δημιουργήθηκαν 6 φρεάτια (A,B,Γ), τα οποία πληρώθηκαν με δείγματα αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού/περγαμόντο (ADIP076) σε συγκεντρώσεις 1,25% v/v και 2,5% v/v και δείγματα *Vanilla tahitensis*/αιθανόλη(EtOH) και *Vanilla abs*/αιθανόλη(EtOH) σε συγκέντρωση 100% v/v.

Τέλος, στο πέμπτο τρυβλίο της *E.coli* και στο μοναδικό τρυβλίο του *Saccharomyces cerevisiae* δημιουργήθηκαν 6 φρεάτια (A,B), που γεμίστηκαν με δείγματα *Vanilla planifolia*/αιθανόλη(EtOH), *Vanilla tahitensis*/αιθανόλη(EtOH) και *Vanilla abs*/αιθανόλη(EtOH) σε συγκέντρωση 100% v/v.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμής ελήφθησαν μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C/72h και για την διεργασία διάχυσης φρεατίου χρησιμοποιήθηκε η

ποσότητα των 100 μl για όλους τους μικροοργανισμούς, με εξαίρεση την *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν 200 μl.

2.2.1.4.3. Μεθοδολογία 3^{ης} πειραματικής δοκιμής

Κατά την τρίτη πειραματική δοκιμή έγινε έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης προς τους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Saccharomyces cerevisiae*. Ακολούθως σχηματίστηκαν συνολικά 10 τρυβλία και συγκεκριμένα 2 τρυβλία για κάθε έναν από τους παραπάνω μικροοργανισμούς.

Στην πρώτη σειρά τρυβλίων για κάθε μικροοργανισμό, δημιουργήθηκαν 6 φρεάτια (Α,Β,Γ,Δ), τα οποία πληρώθηκαν με εκχυλίσματα *Vanilla planifolia*/αιθανόλη(EtOH) σε συγκεντρώσεις 50% v/v και 75% v/v. Στην συνέχεια, στη δεύτερη σειρά τρυβλίων για τους παραπάνω μικροοργανισμούς δημιουργήθηκαν 5 φρεάτια (Α,Β,Γ), τα οποία πληρώθηκαν με δείγμα *Vanilla planifolia*/αιθανόλη(EtOH) σε συγκεντρώσεις 50% v/v και την υδρογέλη ADIP993 με αλγινικό οξύ (control), σε συγκέντρωση 5 mg/ml, ενώ επιπλέον προστέθηκε και ένα δισκίο αμπικιλίνης 10 μg, ως θετικό δείγμα αναφοράς και αντιβιοτικός παράγοντας.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμής ελήφθησαν μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C/48h και για την διεργασία διάχυσης φρεατίου χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα των 100 μl.

2.2.1.4.4. Μεθοδολογία 4^{ης} πειραματικής δοκιμής

Κατά την τέταρτη πειραματική δοκιμή έγινε έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης προς το βακτήριο της *Escherichia coli* και σχηματίστηκαν συνολικά 4 τρυβλία.

Ειδικότερα, σε κάθε τρυβλίο δημιουργήθηκαν 3 φρεάτια (Α,Β,Γ), τα οποία πληρώθηκαν με δείγματα των υδρογελών ADIP1121 με αλγινικό οξύ-CaCl₂, ADIP1122 με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES, ADIP1123 με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES και ADIP1124 με αλγινικό οξύ-NADES σε συγκεντρώσεις 1 mg/ml και ειδικότερα κάθε δείγμα υδρογέλης, ελέγχθηκε σε διαφορετικό τρυβλίο. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν θετικά και αρνητικά δείγματα αναφοράς-control, τα οποία είχαν ως συντηρητικό βενζοϊκό νάτριο, απεσταγμένο νερό και ως αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε δισκίο αμπικιλίνης 10 μg.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμής ελήφθησαν μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C/48h και για την διεργασία διάχυσης δίσκου χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα των 100 μl.

2.2.2. Μέρος Β' - Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης με χρήση της μεθόδου Bioscreen C

2.2.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Στο πειραματικό μέρος Β' έγινε χρήση των αρχικών δειγμάτων υδρογελών ADIP1121 με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (13%v/v), ADIP1122 με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v), ADIP1123 με αλγινικό οξύ-AgNPs (AgNO₃ 5 mM)-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v) και ADIP1124 με αλγινικό οξύ-NADES (4%v/v) στις αρχικές τους συγκεντρώσεις και δεν απαιτήθηκε αραιώση ή συμπύκνωση αυτών.

2.2.2.2. Προετοιμασία μικροοργανισμών

Για όλες τις δοκιμασίες, έγινε ανακαλλιέργεια των μικροβιακών στελεχών από έτοιμες υγρές καλλιέργειες του εργαστηρίου μικροβιολογίας, όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος Α'. Ωστόσο, όσοι μικροοργανισμοί ανακτήθηκαν από καλλιέργειες που βρίσκονταν σε θερμοκρασίες κατάψυξης (frozen), μετά την πρώτη ανακαλλιέργεια και επώαση στους 37°C για 24h, ακολουθήθηκε ένα επιπλέον στάδιο ανακαλλιέργειας την επόμενη μέρα, σε συνθήκες 37°C/14h, για να επιτευχθεί πλήρης ανάπτυξη των μικροβιακών στελεχών, ώστε να βρίσκονται στην λογαριθμική τους φάση κατά την χρήση τους στο Bioscreen C. Τέλος, από την ανακαλλιέργεια 14h, συλλέγονται 100 μl με την χρήση πιπέτας, τα οποία προστίθενται σε 9ml BHI broth, προκειμένου να δημιουργηθεί ένα αραιότερο διάλυμα, το οποίο θα προστεθεί στα φρεάτια της πλακέτας.

2.2.2.3. Μεθοδολογία

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την ετοιμασία της πλακέτας μικροαραιώσης του Bioscreen C περιγράφεται με λεπτομέρειες παρακάτω, ενώ ειδική αναφορά για τις επιμέρους ποσότητες διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την πλήρωση των φρεατίων, θα γίνει ξεχωριστά για κάθε πειραματική δοκιμή.

Αρχικά, στα τρία πειράματα που εκτελέστηκαν, ως υγρό θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το BHI (Brain Heart Infusion) broth και κάθε φρεάτιο/κυψελίδα πληρώθηκε με ποσότητα διαλυμάτων μικρότερη των 400 μL για αποφυγή υπερχειλίσης των φρεατίων, καθώς η μέγιστη ποσότητα που μπορεί να χωρέσει σε κάθε φρεάτιο της πλακέτας είναι 400 μL. Αναφορικά, τα φρεάτια γεμίστηκαν με τεσσάρων ειδών συνδυασμούς διαλυμάτων, τα οποία ήταν:

- BHI broth + στέλεχος μικροοργανισμού (Θετικό Control)
- BHI broth + αντιμικροβιακό δείγμα ουσίας (Αρνητικό Control)
- BHI broth + αντιμικροβιακό δείγμα ουσίας + στέλεχος μικροοργανισμού
- BHI broth

Ακολούθως, για την πλήρωση των φρεατίων χρησιμοποιήθηκαν αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέτες των 20-200 μl και 100-1000 μl με αποστειρωμένα τις πίπετες 200 μl και 1000 μl. Πιο αναλυτικά, κατά την διαδικασία του γεμίσματος απαιτούνταν μεγάλη προσοχή ώστε τα τις να μην αγγίζουν το εσωτερικό των φρεατίων και το υπάρχων σε αυτά διάλυμα, ενώ επιπρόσθετα γινόταν αλλαγή του τις της πιπέτας, κάθε φορά που έπρεπε να προστεθεί διαφορετικό από το χρησιμοποιούμενο αντιμικροβιακό δείγμα ή στέλεχος μικροοργανισμού, με σκοπό την αποφυγή κινδύνου επιμόλυνσης των διαλυμάτων εντός των φρεατίων της πλακέτας. Επιπλέον, κατά την πλήρωση των φρεατίων, προηγήθηκε η πλήρωση με BHI broth, ακολούθως η πλήρωση με το αντιμικροβιακό δείγμα ουσίας και τέλος η προσθήκη του μικροοργανισμού, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης γειτονικών φρεατίων ενώ κρίθηκε απαραίτητη, η ανακίνηση των διαλυμάτων των μικροοργανισμών στο Vortex, ώστε να κατανεμηθεί ομοιόμορφα το πλήθος των μικροοργανισμών πριν τον εμβολιασμό της πλακέτας.

Επισημαίνεται ότι όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες, οι οποίες επιτυγχάνονται με την χρήση καμπίνας βιολογικής ασφάλειας, ενώ μόλις ολοκληρώθηκε η πλήρωση της πλακέτας, αυτή εισήχθη στην συσκευή του Bioscreen, στην οποία ρυθμίστηκαν οι απαιτούμενες παράμετροι. Ειδικότερα, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 37°C, το μήκος κύματος στα 600nm, ενώ η διάρκεια της τεχνικής ορίστηκε στις 2 ημέρες/48h, με λήψη τιμών οπτικής πυκνότητας ανά 30min.

2.2.2.3.1. Μεθοδολογία 1^{ης} πειραματικής δοκιμής

Στην πρώτη πειραματική δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν 27 φρεάτια, τα οποία αξιοποιήθηκαν για την μελέτη της αντιμικροβιακής επίδρασης των υδρογελών στο παθογόνο βακτήριο του *Staphylococcus aureus*. Επισημαίνεται ότι, για κάθε πιθανό συνδυασμό broth-υδρογέλης–*S.aureus* χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια τα οποία πληρώθηκαν αντίστοιχα με 150 μl-50 μl-50 μl, για τον συνδυασμό broth–*S.aureus* (θετικό control) χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια και αντίστοιχα οι ποσότητες 250 μl-50 μl, για τον κάθε πιθανό συνδυασμό broth-υδρογέλη (αρνητικό control) χρησιμοποιήθηκαν 2 φρεάτια που γεμίστηκαν με 200 μl-50 μl ενώ για το BHI broth χρησιμοποιήθηκαν 4 φρεάτια, τα οποία γεμίστηκαν με 250 μl.

2.2.2.3.2. Μεθοδολογία 2^{ης} πειραματικής δοκιμής

Στην δεύτερη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν και τα 100 φρεάτια, για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Lachancea*. Επισημαίνεται ότι, για κάθε πιθανό συνδυασμό broth-υδρογέλης-μικροοργανισμός χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια τα οποία πληρώθηκαν αντίστοιχα με 150 μl - 50 μl - 50 μl, για τον κάθε πιθανό συνδυασμό broth-μικροοργανισμός (θετικό control) χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια και αντίστοιχα οι ποσότητες 250 μl - 50 μl, για τον κάθε πιθανό συνδυασμό broth-υδρογέλη (αρνητικό control) χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια που γεμίστηκαν με 200 μl - 50 μl ενώ για το BHI broth χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια, τα οποία γεμίστηκαν με 250 μl. Εξαιρέση από την παραπάνω ομάδα μικροοργανισμών αποτελεί η ζύμη *Lachancea*, για την οποία χρησιμοποιήθηκαν 2 φρεάτια αντί για 3, για ότι συνδυασμό προαναφέρθηκε.

2.2.2.3.3. Μεθοδολογία 3^{ης} πειραματικής δοκιμής

Στην τρίτη πειραματική δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν και τα 100 φρεάτια, για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών στους μικροοργανισμούς *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* και *Yersinia enterocolitica*. Επισημαίνεται ότι, για κάθε πιθανό συνδυασμό broth-υδρογέλης-μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια τα οποία πληρώθηκαν αντίστοιχα με 150μl - 50μl - 50μl, για τον κάθε πιθανό συνδυασμό broth-μικροοργανισμού (θετικό control) χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια και αντίστοιχα οι ποσότητες 250 μl-50 μl, για τον κάθε πιθανό συνδυασμό broth-υδρογέλης (αρνητικό control) χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια που γεμίστηκαν με 200μl - 50 μl ενώ για το BHI broth χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια, τα οποία γεμίστηκαν με 250 μl. Εξαιρέση από την παραπάνω ομάδα μικροοργανισμών αποτελεί η *Listeria monocytogenes*, για την οποία χρησιμοποιήθηκαν 2 φρεάτια αντί για 3, για ότι συνδυασμό προαναφέρθηκε.

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1. Αποτελέσματα και συζήτηση πειραματικού μέρους Α' - Μέθοδοι διάχυσης φρεατίου και δίσκου σε άγαρ

Οι πρώτοι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής ικανότητας αιθέριων ελαίων, εκχυλισμάτων και υδρογελών, ήταν η μέθοδος διάχυσης φρεατίου και η μέθοδος διάχυσης δίσκου σε άγαρ. Τα αποτελέσματα αυτών των τεχνικών λαμβάνονται μετά την ολοκλήρωση της επώασης των τρυβλίων, μέσω της μέτρησης ζωνών αναστολής για κάθε αντιμικροβιακό δείγμα ουσίας. Ειδικότερα, κάθε τρυβλίο τοποθετείται στην κατεύθυνση του φωτός και γίνεται έλεγχος για παρουσία μίας διαυγούς-φωτεινής ζώνης αναστολής γύρω από κάθε φρεάτιο, η μέτρηση της οποίας πραγματοποιείται με χρήση χάρακα. Αξιοσημείωτο είναι, ότι κάθε φρεάτιο έχει διάμετρο 6mm και παρόλο που η παρουσία ζώνης γύρω από ένα φρεάτιο συνδέεται με αντιμικροβιακή δράση της ουσίας που ελέγχεται, σημαντικά θεωρούνται μόνο τα αποτελέσματα με διάμετρο ζώνης μεγαλύτερη των 10mm. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για κάθε πειραματική δοκιμή παρουσιάζονται και σχολιάζονται λεπτομερώς στην ακόλουθη ενότητα, επισημαίνοντας ότι ο αριθμός "0" αναφέρεται σε αποτέλεσμα με απουσία ζώνης αναστολής, ενώ το σύμβολο "-" αναφέρεται στην απουσία προσθήκης αντιμικροβιακού δείγματος στα συγκεκριμένα φρεάτια. Επιπλέον, οι πίνακες συνοδεύονται από απεικονίσεις τρυβλίων για την κάθε πειραματική δοκιμή, όπου το κάθε δείγμα ορίζεται από έναν αριθμό και τα φρεάτια ή δισκία συμβολίζονται με γράμματα (Α,Β,Γ), ώστε να κατανοηθεί καλύτερα το εύρος της αντιμικροβιακής δράσης των δειγμάτων.

3.1.1. Αποτελέσματα 1^{ης} πειραματικής δοκιμής

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης φρεατίου για τα αντιμικροβιακά δείγματα της πρώτης πειραματικής δοκιμής.

Επάωση 37°C/15-16h			Μικροοργανισμοί											
Δείγματα		Συγκέντρωση	<i>E.coli</i>			<i>S.aureus</i>			<i>S.typhimurium</i>			<i>L.monocytogenes</i>		
			Φρεάτια(mm)											
			A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ
1	Εκχύλισμα φύλλου ελιάς	100% v/v	20	20	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Υδρογέλη μέντας (ADIP992)	5 mg/ml	12	11	8	15	13	12	0	0	0	0	0	0
3	Αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο (ADIP075)	100% v/v	28	19	12	25	30	32	11	10	12	0	0	0
4	Βενζοϊκό νάτριο	0,1% w/v	9	-	-	10	-	-	10	-	-	0	-	-
5	dH2O	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
6	DMSO	1% v/v	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
7	Δισκίο αμπικιλίνης	10 µg	15	-	-	40	-	-	18	-	-	0	-	-

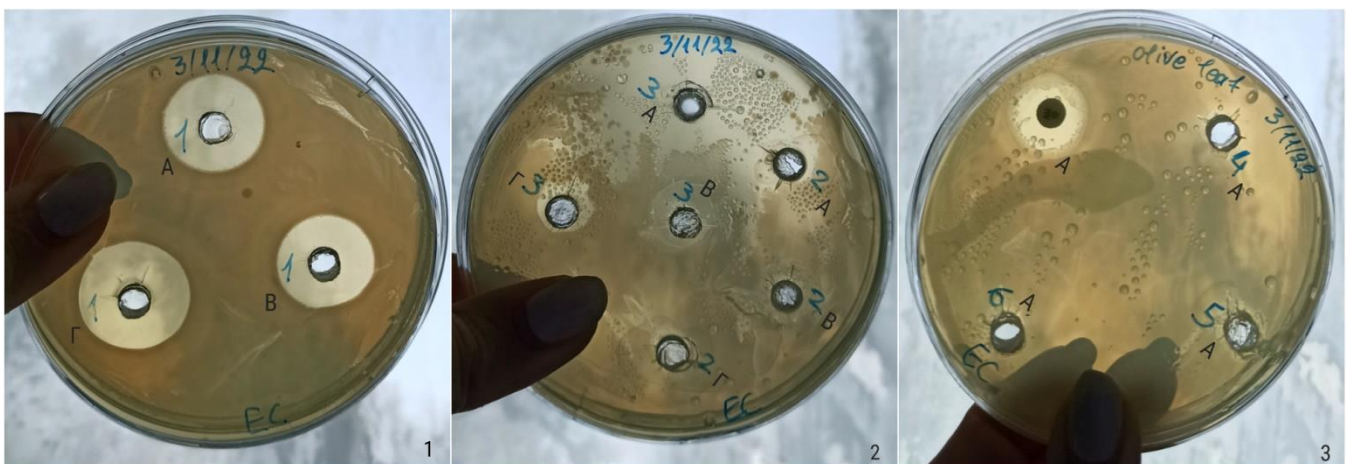
Με βάση τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι το εκχύλισμα φύλλου ελιάς εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση στο αρνητικό κατά Gram βακτήριο της *E.coli* με μέση διάμετρο 21,7 mm, αποτέλεσμα το οποίο καταδεικνύει εξαιρετική αντιμικροβιακή δράση του συγκεκριμένου δείγματος. Ακολούθως, η υδρογέλη με εκχύλισμα μέντας (ADIP992) εμφάνισε επαρκή ανασταλτική αντιμικροβιακή δράση έναντι των *E.coli* και *S.aureus* με μέση ζώνη αναστολής 11 mm και 13,3 mm αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση της *S.typhimurium* δεν εμφανίστηκε ζώνη αναστολής. Τέλος, το αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο (ADIP075), άσκησε αυξημένη αντιμικροβιακή δράση έναντι των βακτηρίων *E.coli* με μέση διάμετρο ζώνης αναστολής 19,7 mm, *S.aureus* με 29 mm και *S.typhimurium* με 11 mm, τιμές που το καθιστούν ως το πιο αποδοτικό, ως προς το πλήθος των βακτηρίων που έδρασε, αντιμικροβιακό δείγμα στην συγκεκριμένη πειραματική δοκιμή.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα, στα τρυβλία της *L.monocytogenes* δεν εντοπίστηκαν ζώνες αναστολής για κανένα από τα παραπάνω αντιμικροβιακά δείγματα. Πρέπει να αναφερθεί ότι λόγοι για την απουσία ζώνης αναστολής μπορεί να είναι ο μη επαρκής χρόνος επώασης των τρυβλίων, η παλαιότητα των αρχικών καλλιιεργειών του εργαστηρίου, από τι οποίες έγινε ανακαλλιέργεια για να ληφθούν τα μικροβιακά δείγματα, ώστε να βρεθούν σε λογαριθμική

φάση, αλλά και η παλαιότητα των υποστρωμάτων που μπορεί να τα καθιστά ανεπαρκή για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Επικρατέστερες αιτίες για την απουσία ζώνης αναστολής στην προκειμένη περίπτωση αποτελούν λοιπόν οι δύο πρώτες αναφορές, καθώς το υπόστρωμα PCA, συνέβαλε στην πλήρη ανάπτυξη των υπόλοιπων επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών της δοκιμής. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το βακτήριο της *L.monocytogenes* απαιτεί δύο στάδια ανακαλλιέργειας σε συνθήκες 37°C/48h, που στην παραπάνω πειραματική δοκιμή δεν επιτεύχθηκαν πλήρως. Συμπερασματικά, η απουσία ζώνης αναστολής σε αυτές τις περιπτώσεις δεν οφείλεται σε έλλειψη αντιμικροβιακής ικανότητας των αντιμικροβιακών ουσιών που μελετήθηκαν αλλά ούτε και σε ανθεκτικότητα των μικροβιακών στελεχών έναντι αυτών.

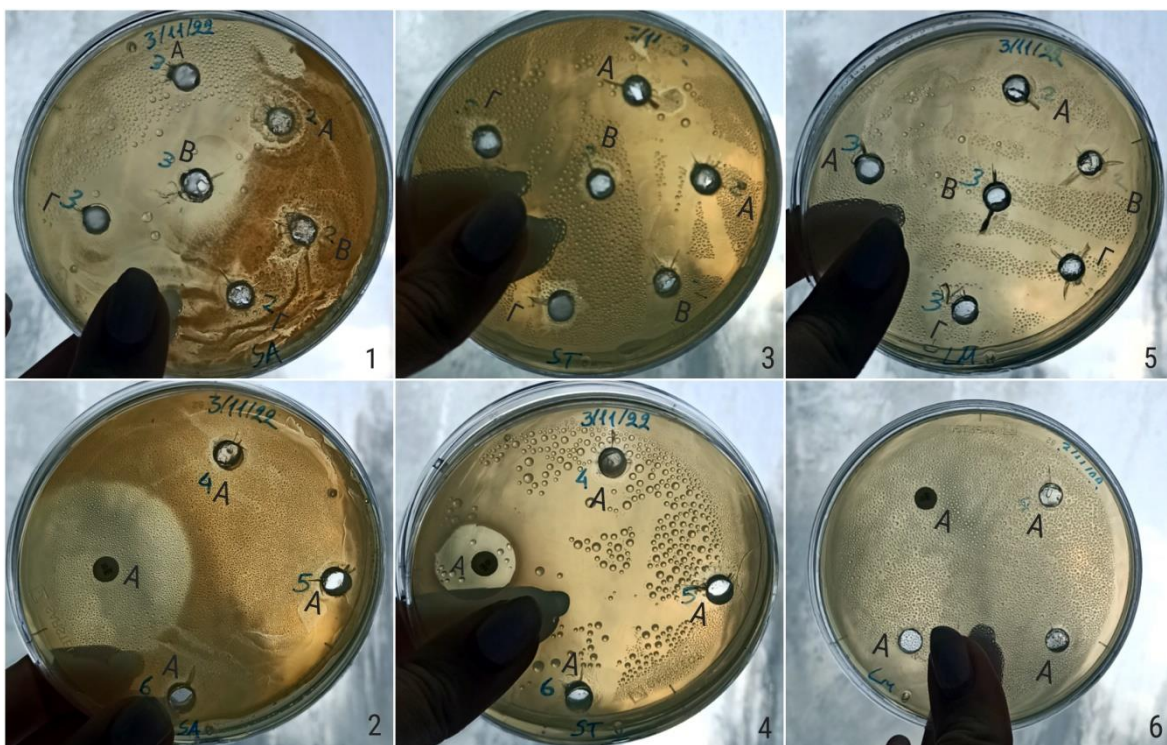
Παρ' όλα αυτά, η απουσία ζώνης αναστολής από την δράση της υδρογέλης με εκχύλισμα μέντας (ADIP992), στο βακτήριο της *S.typhimurium* είναι πιθανόν αποτέλεσμα της ανθεκτικότητας του συγκεκριμένου στελέχους στην συγκεκριμένη συγκέντρωση και ποσότητα υδρογέλης. Το ενδεχόμενο ανεπαρκούς χρόνου επώασης του μικροοργανισμού απορρίπτεται, αφού οι υπόλοιπες αντιμικροβιακές ουσίες έδρασαν αποτελεσματικά έναντι της συγκεκριμένης καλλιέργειας.

Με σκοπό την καλύτερη αντίληψη του εύρους αντιμικροβιακής δράσης της κάθε ουσίας, ακολουθεί λεπτομερής απεικόνιση. Ειδικότερα, η Εικόνα 3 απεικονίζει τα αποτελέσματα της πρώτης πειραματικής δοκιμής έναντι στην *Escherichia coli*. Στην εικόνα 3.1, οι ζώνες αναστολής είναι πλήρως διακριτές λόγω της δράσης του εκχυλίσματος φύλλου ελιάς, καθώς εμφανίζονται ως συμμετρικοί κύκλοι, παρόμοιας διαμέτρου. Το συγκεκριμένο τρυβλίο μπορεί να αποτελέσει τρυβλίο αναφοράς, για τις αναμενόμενες απεικονίσεις αντιμικροβιακής δράσης στα υπόλοιπα τρυβλία της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης. Επιπρόσθετα, στην εικόνα 3.2 διακρίνεται η ισχυρή δράση του αιθέριου ελαίου πράσινου περγαμόντο, όχι ως ξεχωριστοί δακτύλιοι αλλά ως μία ενιαία διαυγής ζώνη που καλύπτει και τα τρία φρεάτια.



Εικόνα 4: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων πρώτης πειραματικής δοκιμής έναντι στην *E.coli*, 4.1: Εκχύλισμα φύλλου ελιάς, 4.2: Υδρογέλη μέντας (ADIP992), αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο (ADIP075), 4.3: Βενζοϊκό νάτριο, dH₂O, DMSO, δισκίο αμπικιλίνης.

Στην συνέχεια απεικονίζονται τα τρυβλία για τους μικροοργανισμούς *S.aureus*, *S.typhimurium* και *L.monocytogenes*, όπου άξια αναφοράς είναι η εξαιρετικά ευρεία ζώνη αναστολής στο τρυβλίο του *S.aureus* (Εικόνα 4.1) από την δράση του αιθέριου ελαίου πράσινου περγαμόντο, η οποία κατακλύζει την μισή επιφάνεια του τρυβλίου.



Εικόνα 5: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων πρώτης πειραματικής δοκιμής έναντι στους μικροοργανισμούς *S.aureus*, *S.typhimurium* και *L.monocytogenes*, 5.1: Υδρογέλη μέντας (ADIP992), αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο (ADIP075) σε *S.aureus*, 5.2: Βενζοϊκό νάτριο, dH₂O,DMSO, δισκίο αμπικιλίνης σε *S.aureus*, 5.3: Υδρογέλη μέντας (ADIP992), αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο (ADIP075) σε *S.typhimurium*, 5.4: Βενζοϊκό νάτριο, dH₂O,DMSO, δισκίο αμπικιλίνης σε *S.typhimurium*, 5.5: Υδρογέλη μέντας (ADIP992), αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο (ADIP075) σε *L.monocytogenes*, 5.6: Βενζοϊκό νάτριο, dH₂O,DMSO, δισκίο αμπικιλίνης σε *L.monocytogenes*.

Σε περιπτώσεις που η αντιμικροβιακή δράση της ουσίας είναι πολύ ισχυρή και δεν υπάρχουν διακριτές, μεμονωμένες ζώνες αναστολής, λαμβάνεται η διάμετρος για όλη την επιφάνεια και κατά προσέγγιση βγαίνει η μέση διάμετρος για κάθε φρεάτιο, στο οποίο προστέθηκε η ουσία. Τέλος, στην περίπτωση της υδρογέλης μέντας (ADIP992) εντοπίζονται μέτριες προς μικρές ζώνες αναστολής, σε όλες τις καλλιέργειες μικροοργανισμών στις οποίες προστέθηκε.

3.1.2. Αποτελέσματα 2^{ης} πειραματικής δοκιμής

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης φρεατίου για τα αντιμικροβιακά δείγματα της δεύτερης πειραματικής δοκιμής.

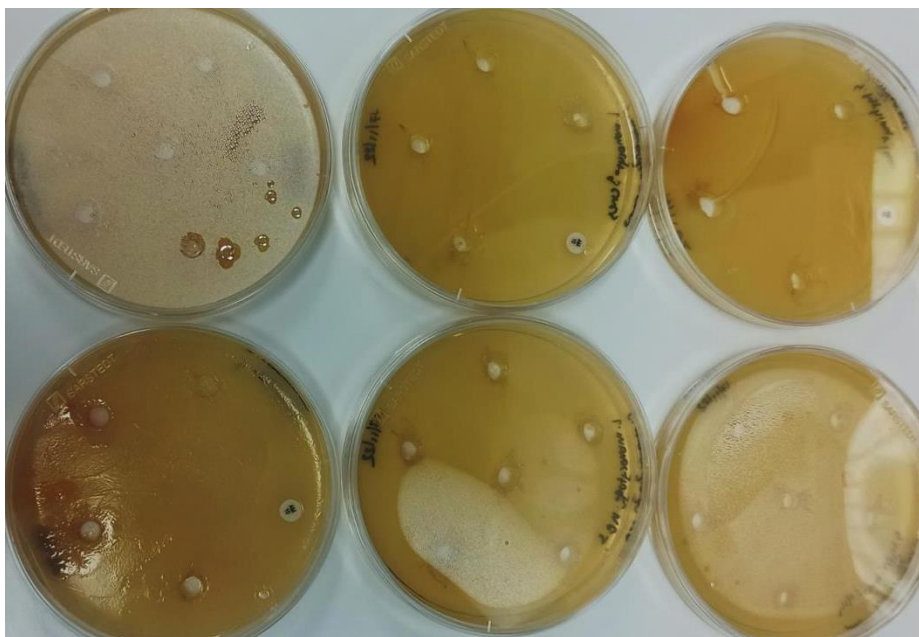
Επώαση 37°C/72h			Μικροοργανισμοί																				
Δείγματα			Συγκέντρωση			<i>E.coli</i> (1+2)			<i>S.aureus</i>			<i>S.typhimurium</i>			<i>L.monocytogenes</i>			<i>E.coli</i> (3)			<i>S.cereviciae</i>		
						Φρεάτια(mm)																	
						A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ
1	Αιθέριο έλαιο πορτοκάλι/περγαμόντο (ADIP076)	10% v/v	0	-	-	10	-	-	0	11	11	0	-	-	-	-	-	-	-	-			
2		5% v/v	0	-	-	8	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-			
3		2,5% v/v	0	-	-	0	-	-	13	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-			
4		1,25% v/v	0	-	-	0	-	-	10	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-			
1'	Εκχύλισμα <i>Vanilla planifolia</i> /EtOH	100 % v/v	25	13	-	0	15	-	-	-	-	30	26	-	10	11	-	0	10	-			
2'	Εκχύλισμα <i>Vanilla tahitensis</i> /EtOH	100 % v/v	10	0	12	0	0	10	11	15	12	12	11	11	20	13	-	8	11	-			
3'	Εκχύλισμα <i>Vanilla abs</i> /EtOH	100 % v/v	0	0	0	14	0	0	15	15	15	11	9	14	0	0	-	0	0	-			

Με βάση τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι το αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού/ περγαμόντο (ADIP076) 10% v/v εμφάνισε ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι στον *S.aureus* με ζώνη αναστολής 10 mm και στην *S.typhimurium* με μέση ζώνη αναστολής στα 7,3 mm αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση της *E.coli* δεν εντοπίστηκε ζώνη αναστολής. Στην συνέχεια, το αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού/ περγαμόντο (ADIP076) 5% v/v, παρουσίασε ακόμη πιο ασθενή δράση και ζώνη αναστολής εντοπίστηκε μόνο στην καλλιέργεια του *S.aureus*, ενώ το ίδιο δείγμα με συγκέντρωση 2,5% v/v έδρασε ανασταλτικά μόνο απέναντι στο βακτήριο της *S.typhimurium*, με ζώνη αναστολής στα 13 mm. Παραδόξως, το ίδιο δείγμα σε συγκέντρωση 1,25% v/v ανέστειλε μερικώς την ανάπτυξη των *S.typhimurium* και *L.monocytogenes*, καθώς στη *L.monocytogenes* δεν είχε επιδράσει καμία άλλη συγκέντρωση του συγκεκριμένου δείγματος.

Αντιθέτως, τα εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH, *Vanilla tahitensis*/EtOH και *Vanilla abs extract*/EtOH παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι σε όλα τα στελέχη που εφαρμόστηκαν. Ειδικότερα, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH παρουσίασε τις ακόλουθες ζώνες αναστολής, για τα στελέχη των *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes* και *S.cereviciae*, με μέση διάμετρο 14,8 mm, 7,5 mm, 28 mm και 5 mm αντίστοιχα, αποτελώντας το πιο δραστικό εκχύλισμα τρία που χρησιμοποιήθηκαν. Κατ' επέκταση το εκχύλισμα *Vanilla tahitensis*/EtOH παρουσίασε ως μέσες ζώνες αναστολής, για τα στελέχη των *E.coli*, *S.aureus*, *S.typhimurium*, *L.monocytogenes* και

S.cerevisiae τις αντίστοιχες τιμές με 11 mm, 3,3 mm, 9,3 mm, 11,3 mm και 9,5 mm. Ενώ στην περίπτωση του εκχυλίσματος *Vanilla abs*/EtOH, για τα βακτήρια *S.aureus*, *S.typhimurium*, *L.monocytogenes* λήφθηκαν ως μέσος όρος των συγκεκριμένων διαμέτρων οι τιμές, 4,7 mm, 15 mm και 11,3 mm. Άξιο αναφοράς είναι ότι για τα στελέχη *E.coli* και *S.cerevisiae*, το συγκεκριμένο εκχύλισμα δεν προσέδωσε καμία αντιμικροβιακή δράση.

Η απουσία ζώνης αναστολής στα φρεάτια που αναφέρθηκαν πιθανόν ευθύνεται στην εμφάνιση ρωγμών και σπασιμάτων στο υπόστρωμα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4, κυρίως αναφορικά με τα τρυβλία του *S.aureus*, καθώς όλα τα τρυβλία επώαστηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Αποτέλεσμα αυτού ήταν να μην είναι εφικτή η μέτρηση της διαμέτρου και συνεπώς της αντιμικροβιακής δράσης στα συγκεκριμένα φρεάτια. Επιπλέον, η απουσία αντιμικροβιακής δράσης από τα δείγματα αιθέριου ελαίου πορτοκάλι/περγαμόντο στα τρυβλία της *L.monocytogenes* και *E.coli* και του εκχυλίσματος *Vanilla abs*/EtOH στις καλλιέργειες της *E.coli* και του *S.cerevisiae*, πιθανόν οφείλεται είτε στην θανάτωση των μικροβιακών κυττάρων, λόγω υψηλής θερμοκρασίας της γυάλινη ράβδου επίστρωσης, κατά τον εμβολιασμό των τρυβλίων, είτε λόγω της προσθήκης ανεπαρκούς ποσότητας αντιμικροβιακής ουσίας στα φρεάτια ή/και εξαιτίας της αντίστασης του στελέχους στο συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο ή εκχύλισμα.



Εικόνα 6: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων δεύτερης πειραματικής δοκιμής, με την χρήση της μεθόδου διάχυσης φρεατίου.

Συμπερασματικά, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH εμφανίζει την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση, τόσο λόγω μεγάλης διαμέτρου των δακτυλίων όσο και δράσης του σε όλους τους μικροοργανισμούς που προστέθηκε, με τα εκχυλίσματα *Vanilla tahitensis*/EtOH και *Vanilla abs*/EtOH, να εμφανίζουν κατά σειρά μειούμενη αντιμικροβιακή ισχύ. Στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου πορτοκάλι/περγαμόντο, οι μετρήσεις δεν εμφάνισαν επαναληψιμότητα, με

συνέπεια τα αποτελέσματα που ελήφθησαν να μην είναι αξιόπιστα και ακριβή. Ωστόσο, υπάρχει πιθανότητα το βακτήριο της *E.coli* να εμφανίζει ανθεκτικότητα στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου.

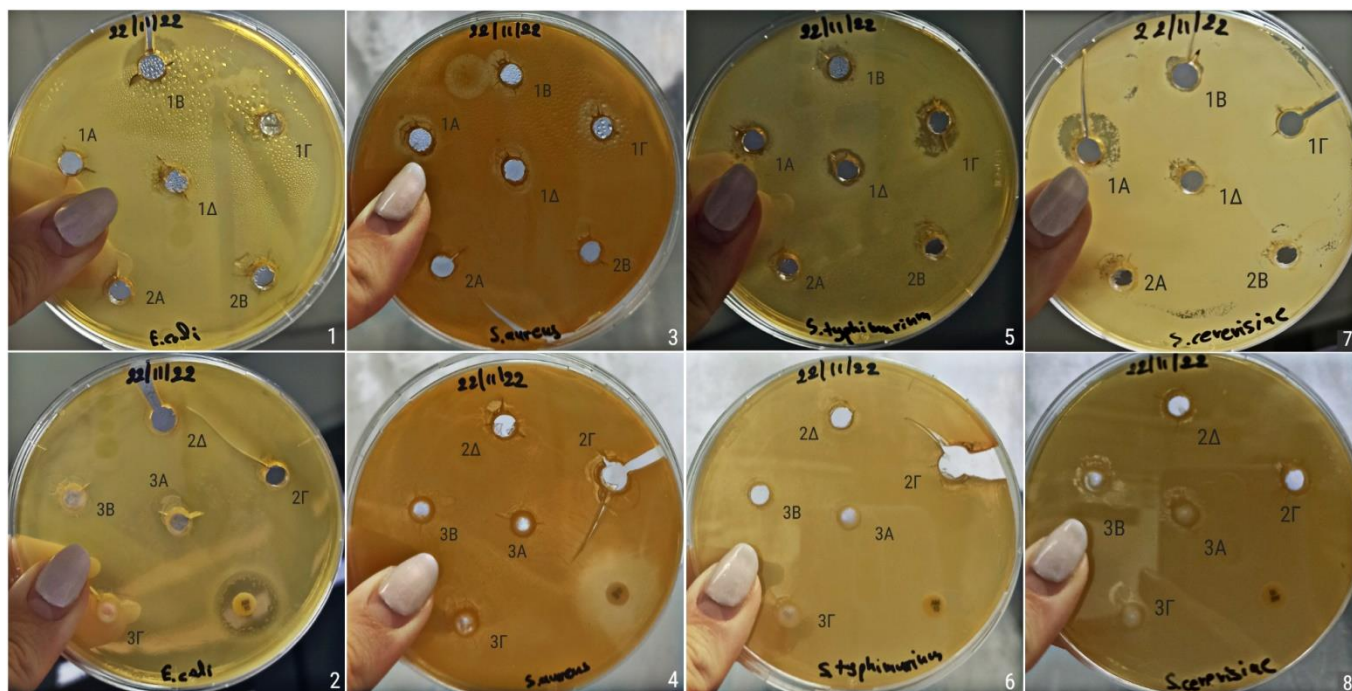
3.1.3. Αποτελέσματα 3^{ης} πειραματικής δοκιμής

Πίνακας 8: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης φρεατίου για τα αντιμικροβιακά δείγματα της τρίτης πειραματικής δοκιμής.

Επώαση 37°C/24h (εξαιρείται η <i>L.monocytogenes</i> με επώαση 37°C/48h)			Μικροοργανισμοί																			
Δείγματα	Συγκέντρωση	<i>E.coli</i>				<i>S.aureus</i>				<i>S.typhimurium</i>				<i>L.monocytogenes</i>				<i>S.cereviciae</i>				
		Φρεάτια(mm)																				
		A	B	Γ	Δ	A	B	Γ	Δ	A	B	Γ	Δ	A	B	Γ	Δ	A	B	Γ	Δ	
1	Εκχύλισμα <i>Vanilla planifolia</i> /EtOH	75% v/v	0	15	16	12	14	22	19	15	12	14	16	11	0	0	0	0	20	9	8	11
2	Εκχύλισμα <i>Vanilla planifolia</i> /EtOH	50% v/v	0	0	0	0	8	15	16	11	0	0	0	0	0	0	0	0	15	13	9	8
3	Υδρογέλη control (ADIP993)	5 mg/ml	0	0	0	-	15	8	20	-	0	0	0	-	0	0	0	-	13	12	10	-
4	Δισκίο αμπικιλίνης	10 µg	20	-	-	-	14	-	-	-	13	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-

Παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 75% v/v έδρασε ανασταλτικά για τους μικροοργανισμούς *E.coli*, *S.aureus*, *S.typhimurium* και *S.cereviciae* με μέσο όρο διαμέτρων ζωνών αναστολής 10,75 mm, 17,5 mm, 13,2 mm και 12 mm, για καθέναν από αυτούς αντίστοιχα. Ακολούθως, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 50% v/v, με μέσες ζώνες αναστολής στα 12,5 mm και 11,25 mm και το δείγμα υδρογέλης control (ADIP993) με μέσο όρο ζωνών αναστολής στα 14,3 mm και 11,7 mm, ανέστειλαν την δράση των μικροοργανισμών *S.aureus* και *S.cereviciae*.

Πρέπει να σημειωθεί ότι το βακτήριο της *L.monocytogenes* δεν εμφάνισε ανάπτυξη παρόλο που στην ανακαλλιέργεια υπήρχε επαρκής μικροβιακή ανάπτυξη, ενώ επιπλέον η αμπικιλίνη δεν έδρασε ως θετικό κοντρόλ στο *S.cerevisiae* καθώς η αναστολή ανάπτυξης της ζύμης απαιτεί την προσθήκη αντιμυκητιακού παράγοντα. Αναφορικά, με την απουσία ζωνών αναστολής, επισημαίνεται ότι το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στην ανθεκτικότητα των στελεχών στην δράση της αντιμικροβιακή ουσία αλλά και στην έλλειψη επαρκούς αριθμού κυττάρων, δηλαδή η καλλιέργεια του μικροοργανισμού δεν βρίσκεται σε λογαριθμική φάση.



Εικόνα 7: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων τρίτης πειραματικής δοκιμής έναντι στους μικροοργανισμούς *E.coli*, *S.aureus*, *S.typhimurium* και *S.cerevisiae*, 7.1: Εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 75% και 50% v/v σε *E.coli*, 7.2: Εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 50% v/v, υδρογέλη control (ADIP993) και δισκίο αμπικιλίνης σε *E.coli*, 7.3: Εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 75% και 50% v/v σε *S.aureus*, 7.4: Εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 50% v/v, υδρογέλη control (ADIP993) και δισκίο αμπικιλίνης σε *S.aureus*, 7.5: Εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 75% και 50% v/v σε *S.typhimurium*, 7.6: Εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 50% v/v, υδρογέλη control (ADIP993) σε *S.typhimurium* και δισκίο αμπικιλίνης, 7.7: Εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 75% και 50% v/v σε *S.cerevisiae*, 7.8: Εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 50% v/v, υδρογέλη control (ADIP993) και δισκίο αμπικιλίνης σε *S.cerevisiae*

Κατ' επέκταση, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 75% εμφανίζει την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε όλους τους μικροοργανισμούς, με αρκετά μεγάλες διαμέτρους ζώνης αναστολή, συγκριτικά με το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 50%, οι οποίες μπορούν να παρατηρηθούν εκτενώς στις παρακάτω εικόνες. Ειδικότερα, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 50% και η υδρογέλη control ADIP993 παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση για τα στελέχη *S.aureus* και *S.cerevisiae* και μηδενική δράση για τα στελέχη *E.coli* και *S.typhimurium*.

3.1.4. Αποτελέσματα 4^{ης} πειραματικής δοκιμής

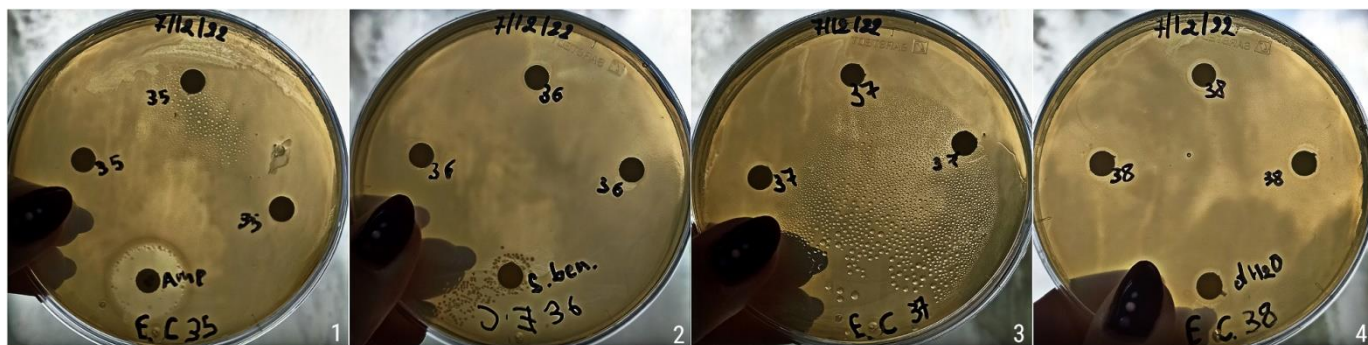
Πίνακας 9: Αποτελέσματα ζωνών αναστολής σε mm με την μεθόδου διάχυσης δίσκου για τα αντιμικροβιακά δείγματα της τέταρτης πειραματικής δοκιμής.

Επώαση 37°C/48h			Μικροοργανισμοί		
Δείγματα		Συγκέντρωση	<i>E.coli</i>		
			Δισκία (10 µg)-Διάμετρος σε mm		
			A	B	Γ
1	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	1 mg/ml	7	7	8
2	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	1 mg/ml	9	0	8
3	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	1 mg/ml	7	0	6
4	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	1 mg/ml	7	8	8
5	dH ₂ O	-	7	-	-
6	Βενζοϊκό νάτριο	0,1% w/v	0	-	-
7	Δισκίο αμπικιλίνης	10 µg	20	-	-

Με βάση τον πίνακα 9, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) εμφάνισε μέση διάμετρο ζωνών αναστολής με 7,3 mm, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) με 5,7 mm, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) με 4,3 mm και τέλος η υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124) με 7,7 mm. Μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση εμφάνισαν κατά σειρά τα δείγματα: υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES, υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂, υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES και υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES.

Είναι εμφανές ότι οι μετρήσεις που λήφθηκαν δεν ήταν οι αναμενόμενες, αφού κανένα δείγμα υδρογέλης δεν εμφάνισε ζώνη αναστολής μεγαλύτερη από 10 mm. Τα δείγματα που ήταν εμπλουτισμένα με εκχύλισμα φύλλου ελιάς και νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) αναμενόταν να εμφανίσουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από αυτήν των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα συστατικά υπάρχει πιθανότητα να δρουν με διαφορετικό τρόπο όταν δεσμεύονται στο πλέγμα της υδρογέλης και συνεπώς να μην έχουν τόσο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Επιπλέον, αξιοσημείωτο είναι ότι η μέθοδος διάχυσης δίσκου σε άγαρ αποτελεί μία μέτριας-ευαισθησίας δοκιμή, με αποτέλεσμα οι ποσότητες υδρογελών που χρησιμοποιήθηκαν, πιθανόν να μην επαρκούν για την ανάπτυξη αντιμικροβιακής ζώνης αναστολής, ενώ όπως αναφέρθηκε και σε άλλη ενότητα, ορισμένες φορές η επιφάνεια των δισκίων εμφανίζει αυξημένη υδροφιλικότητα με αποτέλεσμα την πλήρη απορρόφηση των

υδρογελών και την παρεμπόδιση διάχυσης του δείγματος στο άγαρ, προκειμένου να προσδιοριστεί. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα μπορούν να θεωρηθούν και εσφαλμένα, αφού οι δακτύλιοι που εντοπίστηκαν δεν εμφάνισαν μεγάλη και διακριτή διάμετρο, σε σχέση με το θετικό κοντρόλ της αμπικιλίνης.



Εικόνα 8: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης δειγμάτων τέταρτης πειραματικής δοκιμής έναντι στην *E.coli*, 8.1: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) και δισκίο αμπικιλίνης, 8.2: υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124) και βενζοϊκό νάτριο, 8.3: υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122), 8.4: υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) και dH₂O.

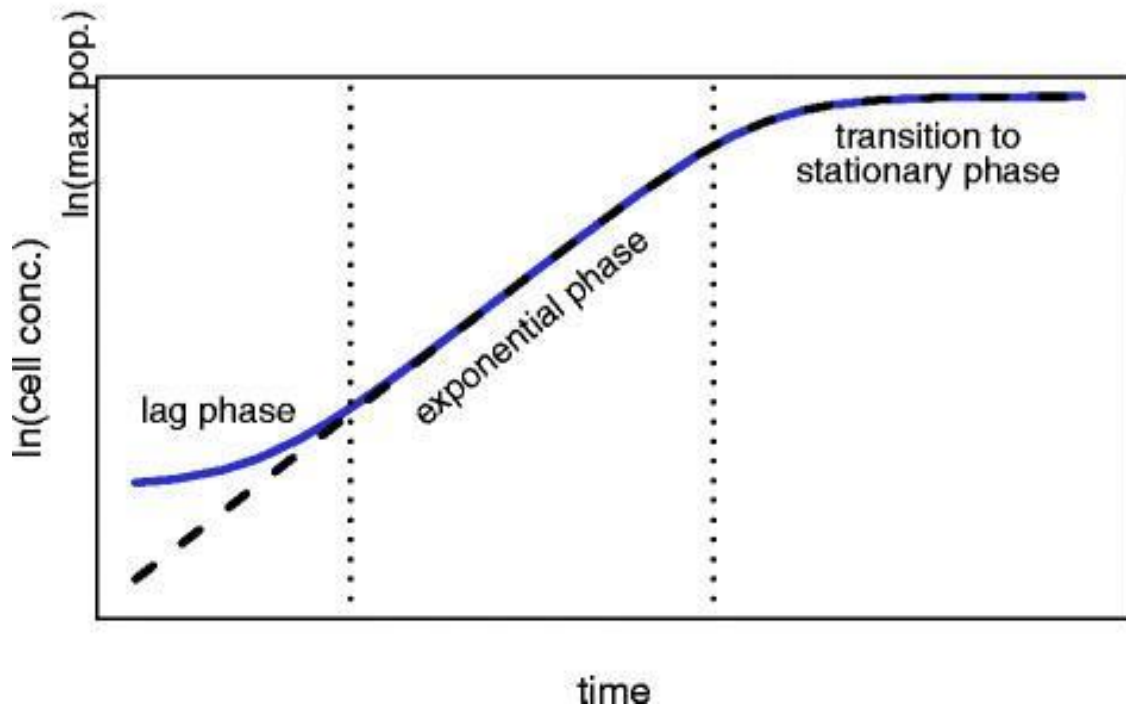
Συνολικά, τα αποτελέσματα και των τεσσάρων πειραματικών δοκιμών μπορούν να χαρακτηριστούν ως επαρκή και αξιόπιστα, αναφορικά πάντα με την μέτρια αντιμικροβιακή ευαισθησία των μεθόδων διάχυσης φρεατίου και δίσκου σε άγαρ. Γενικά, παρατηρείται ότι όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο διάχυσης φρεατίου και δίσκου σε άγαρ συμφωνούν στην έλλειψη ζώνης αναστολής κατά τις δοκιμές των διαλυτών DMSO 1% και dH₂O που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων. Ειδικότερα, το γεγονός αυτό συμβάλει στην αξιοπιστία κατά την απόδοση αντιμικροβιακής δράσης στα δείγματα αιθέριων ελαίων, εκχυλισμάτων και υδρογελών, καθώς τεκμηριώνει ότι η ικανότητα αναστολής οφείλεται στα συστατικά του εκάστοτε δείγματος και όχι στον διαλύτη αραίωσης. Από τα παραπάνω δείγματα, συνολικά, μεγαλύτερη αντιμικροβιακή απόδοση εμφάνισαν το εκχύλισμα φύλλου ελιάς, με χαρακτηριστικές ευρείες ζώνες αναστολής έναντι της *E.coli*, το αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο (ADIP075) έναντι των βακτηριακών στελεχών *E.coli*, *S.aureus* και *L.monocytogenes* σε αντίθεση με το αιθέριο έλαιο πορτοκάλι/περγαμόντο (ADIP076) που εμφάνισε ζώνες αναστολής < 10 mm έναντι μόνο των βακτηρίων *S.aureus* και *S.typhimurium*. Ακολούθως, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia* /EtOH και το εκχύλισμα *Vanilla tahitensis*/EtOH εμφάνισαν και τα δύο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι σε όλους τους μικροοργανισμούς που εφαρμόστηκαν, ενώ το εκχύλισμα *Vanilla abs*/EtOH εμφάνισε περιορισμένη δράση μόνο στα βακτήρια *S.aureus*, *S.typhimurium* και *L.monocytogenes*. Ειδικότερα, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 75% v/v εμφάνισε ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε σχέση με το ίδιο εκχύλισμα σε συγκέντρωση 50% v/v. Τέλος, μεταξύ των δειγμάτων υδρογελών που αξιολογήθηκαν, η υδρογέλη μέντας (ADIP992) παρουσίασε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση στα στελέχη των *E.coli* και *S.aureus*, η υδρογέλη

control (ADIP993) με μικρότερης διαμέτρου ζώνες έδρασε ανασταλτικά για τα στελέχη *S.aureus* και *S.cerevisiae*, ενώ οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122), με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) και με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124) ανέπτυξαν ζώνες αναστολής < 10 mm, στα τρυβλία της *E.coli*, αποτέλεσμα που τις κατέταξε στην κατώτερη θέση ισχύς αντιμικροβιακής δράσης, συγκριτικά με όλα τα δείγματα υδρογελών που ελέγχθηκαν.

3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση πειραματικού μέρους Β' – Bioscreen C

Στην ακόλουθη ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τριών πειραματικών δοκιμών που εκτελέστηκαν με χρήση της τεχνικής Bioscreen C. Επισημαίνεται ότι τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αφορούν σειρές δεδομένων χρόνου συσχετισμένου με τιμές οπτικής πυκνότητας, τα οποία ακολούθως επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Microsoft Excel 2010. Μέσω αυτού του υπολογιστικού προγράμματος λαμβάνονται καμπύλες ανάπτυξης για κάθε στέλεχος μικροοργανισμού, ως γραφικές παραστάσεις, οι οποίες παρουσιάζουν την αντιμικροβιακή επίδραση των δειγμάτων υδρογελών στους μικροοργανισμούς. Ειδικότερα, η ανασταλτική δράση των υδρογελών απεικονίζεται με μείωση της κλίσης της καμπύλης ανάπτυξης και συνεπώς του ρυθμού πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών, που συγκρίνεται με την καμπύλη ανάπτυξης του δείγματος μικροοργανισμού + broth (θετικό control). Επισημαίνεται ότι κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων η οπτική πυκνότητα (OD/Optical Density), θεωρείται ανάλογη της ποσότητας των μικροοργανισμών και συνολικά τα διαγράμματα απεικονίζουν καμπύλες ανάπτυξης. Επιπρόσθετα, τα φρεάτια που περιείχαν μόνο BHI broth ως υγρό θρεπτικό υπόστρωμα δεν παρουσίασαν αύξηση της οπτικής πυκνότητας με την πάροδο του χρόνου, επιβεβαιώνοντας την χρήση τους ως αποστειρωμένα υλικά. Άξιο αναφοράς είναι ότι η τεχνολογία του Bioscreen C, όπως και τα αποτελέσματα του, εμφανίζουν μεγάλη αξιοπιστία και ακρίβεια και παρουσιάζουν καλή επαναληψιμότητα ειδικά όταν τα δείγματα ελέγχονται σε τριάδες φρεατίων. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό σφαλμάτων και συνεπώς μείωση της αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, μπορεί να επιφέρει το γεγονός συνάθροισης των νεκρών μικροβιακών κυττάρων, από την δράση των αντιμικροβιακών δειγμάτων, με τα ζωντανά μικροβιακά κύτταρα, στην τιμή της συνολικής μετρούμενης οπτικής πυκνότητας. Με σκοπό την εκτενέστερη μελέτη των παραπάνω αποτελεσμάτων του Bioscreen C γίνεται χρήση του μικροβιολογικού εργαλείου DMFit από το λογισμικό ComBase, το οποίο εφαρμόζει το μοντέλο των Baranyi και Roberts για την μαθηματική ανάλυση της μικροβιακής ανάπτυξης και αποτελεί πρόσθετο του προγράμματος Excel. Παρακάτω παρουσιάζονται μόνο οι παράμετροι και οι καμπύλες ανάπτυξης για τον

S.aureus, ενώ τα συνολικά δεδομένα για κάθε πειραματική δοκιμή, παρουσιάζονται σε αρχεία Excel 2010, ως μέρος του παραρτήματος της παρούσας μελέτης. Ακολουθως, το μοντέλο Baranyi και Roberts, στο οποίο βασίζεται το πρόγραμμα, είναι σε θέση να περιγράψει και τα τρία στάδια της μικροβιακής ανάπτυξης, δηλαδή την φάση προσαρμογής, την εκθετική και την στατική φάση, όπως παρουσιάζεται παρακάτω.



Εικόνα 9: Απεικόνιση του χαρακτηριστικού σιγμοειδούς σχήματος των τριών σταδίων μικροβιακής ανάπτυξης (φάση προσαρμογής, εκθετική και στατική) που περιγράφονται στο μοντέλο των Baranyi και Roberts, στην γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των λογαριθμικών κυττάρων συναρτήσει με την πάροδο του χρόνου. Πηγή: Rickett κ.ά., 2015

Για αυτό το μοντέλο, ο ευρέως χρησιμοποιούμενος λογάριθμος της συγκέντρωσης βακτηρίων είναι σιγμοειδής, έτσι ώστε μια σχετικά γραμμική φάση να προηγείται και να ακολουθείται από μια φάση μετάβασης που χαρακτηρίζεται από μικρούς ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης, ο μέσος όρος των οποίων αποτελεί τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ). Για την κατασκευή της καμπύλης ανάπτυξης, είναι απαραίτητο να δοθεί προσοχή στην κατανομή των πειραματικών σημείων με την πάροδο του χρόνου, προκειμένου να είναι δυνατό να εκτιμηθεί με ακρίβεια ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, το μέγιστο επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού και ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής. Άξιο αναφοράς είναι ότι, εάν η αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού που παρατηρείται από την καμπύλη ανάπτυξης είναι μικρή ($< 1 \log \text{ cfu/g}$), αυτό δεν επιτρέπει αξιόπιστο προσδιορισμό του μ_{max} . Τέλος, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί η αβεβαιότητα γύρω από τον εκτιμώμενο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{max}) με χρήση του τυπικού σφάλματος ή του διαστήματος εμπιστοσύνης, όπου πρέπει το τυπικό σφάλμα να μην υπερβαίνει το 20% της εκτίμησης του μ_{max} . Αν όχι, αυτό

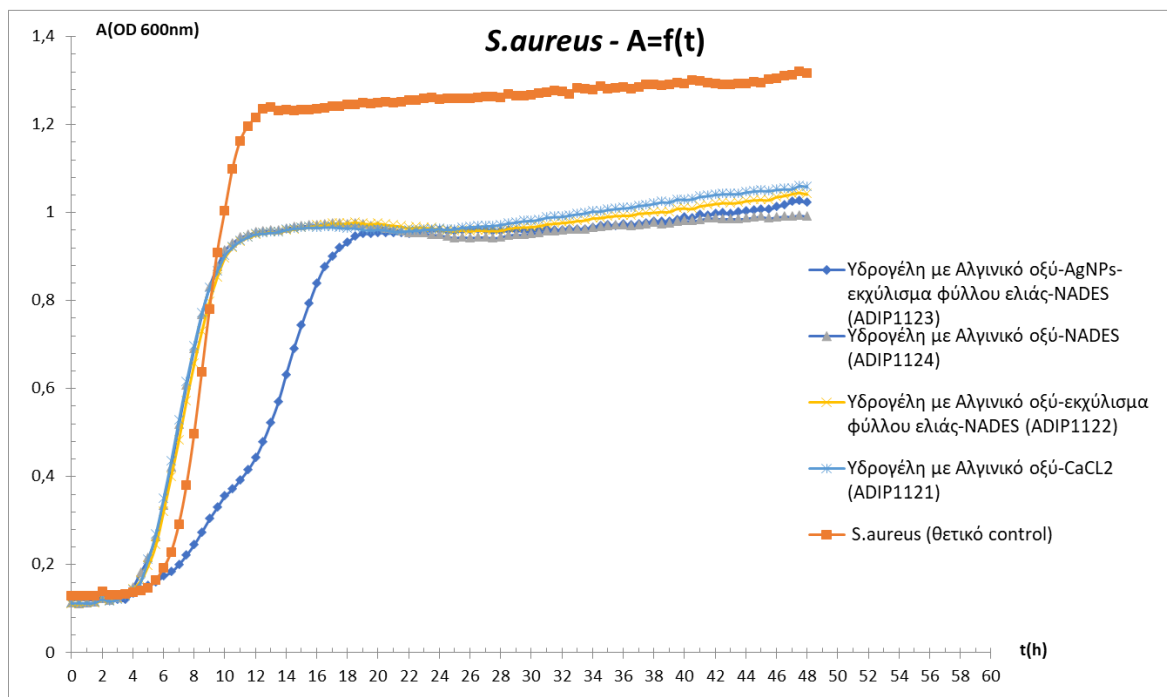
σημαίνει ότι υπάρχει υψηλή αβεβαιότητα που σχετίζεται με το μ_{max} και αυτό το αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή. Τέλος, αναφέρεται ότι κατά την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των τιμών οπτικής πυκνότητας για κάθε ομάδα τριών φρεατίων, που περιείχαν ίδιο συνδυασμό υδρογέλης-μικροοργανισμού-broth και μικροοργανισμού-broth (Baranyi & Roberts, 1994; Rickett κ.ά., 2015).

Ειδικότερα, η αντιμικροβιακή δράση εκτιμάται με βάση τις παρακάτω παραμέτρους:

1. Διάρκεια λανθάνουσας φάσης (lag phase): μεγαλύτερη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης σε δείγμα που περιέχει τον αντιμικροβιακό παράγοντα υποδηλώνει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση
2. Κλίση της καμπύλης κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης (log phase): όσο μικρότερη είναι η κλίση της καμπύλης, τόσο μικρότερος είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ή η μέγιστη ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού (maximum growth rate ή μ_{max})
3. Μέγιστη οπτική πυκνότητα στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ή οποία αντιστοιχεί στην μέγιστη πυκνότητα μικροβιακού πληθυσμού: όσο μικρότερη είναι η μέγιστη οπτική πυκνότητα, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιμικροβιακή δράση.

Όλες οι παράμετροι μίας καμπύλης ανάπτυξης ελέγχονται συγκριτικά με την καμπύλη ανάπτυξης ελέγχου (θετικό control) που αντιστοιχεί στην καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού ελέγχου σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς την παρουσία αντιμικροβιακού παράγοντα.

3.2.1. Αποτελέσματα 1^{ης} πειραματικής δοκιμής - *S.aureus*



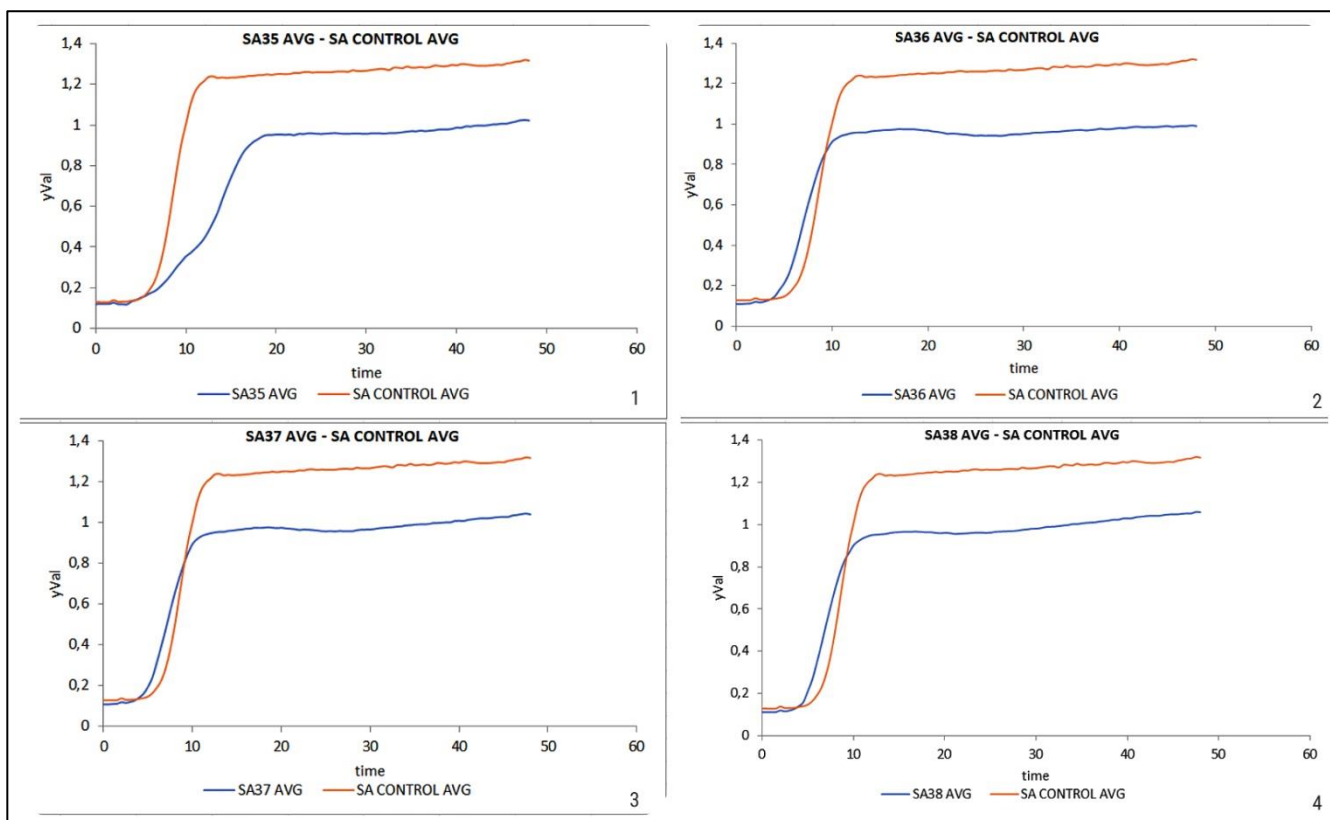
Διάγραμμα 2: Καμπύλη ανάπτυξης του *S.aureus*, ως γραφική παράσταση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm συναρτήσει του χρόνου σε ώρες, με τα δείγματα υδρογελών ADIP1121,ADIP1122,ADIP1123 και ADIP1124.

Με βάση τις τιμές απορρόφησης/οπτικής πυκνότητας κατά την πραγματοποίηση της τεχνικής Bioscreen C στο σύστημα Excel 2010, παρατηρείται αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων των υδρογελών, καθώς ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης για κάθε ένα από αυτά, στο διάστημα 48 ωρών, είναι μικρότερος σε σχέση με την τιμή μέσου όρου του θετικού control, του οποίου η μέγιστη απορρόφηση (ODmax ή Maximum population) ανέρχεται στα 1,31733. Συγκεκριμένα μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση εμφανίζει η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124) με απορρόφηση 0,99, έπειτα το δείγμα υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) με απορρόφηση 1,02267, ακολούθως η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) με απορρόφηση 1,041 και τέλος η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) με απορρόφηση 1,05833.

Ωστόσο, με βάση το διάγραμμα 1 προκύπτει ότι το lag phase (φάση προσαρμογής) είναι παρόμοιο σε όλα τα δείγματα, με εξαίρεση το δείγμα υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), το οποίο παρουσιάζει μεγαλύτερη φάση προσαρμογής και συνεπώς αντιμικροβιακή δράση. Αντιθέτως, παρατηρείται ότι το log phase (λογαριθμική ή εκθετική φάση) εμφανίζει μικρότερη κλίση για την υδρογέλη ADIP1123 και ξεκινάει χαμηλότερα και για τις τέσσερις υδρογέλες, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται και από αυτήν την πλευρά αντιμικροβιακή δράση, σε σύγκριση πάντα με την καμπύλη του *S.aureus* (θετικό control). Κατ' επέκταση η καμπύλη ανάπτυξης συμφωνεί με τις τιμές απορρόφησης που

αναφέρθηκαν, γεγονός που αποδεικνύει την ανασταλτική δράση αυτών έναντι στο βακτήριο *S.aureus*.

Ως παράδειγμα των γραφικών παραστάσεων που προκύπτουν από το πρόγραμμα DMFit για την προκειμένη πειραματική δοκιμή και με σκοπό την καλύτερη αντίληψη των αποτελεσμάτων που προκύπτουν, παρουσιάζονται τα ακόλουθα διαγράμματα.



Διάγραμμα 3: Γραφικές παραστάσεις οπτικής πυκνότητας (OD) συναρτήσει του χρόνου (h) που συνδυάζουν τις καμπύλες από την τεχνική Bioscreen C και το πρόγραμμα DMFit, για τον *S.aureus*. 2.1: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)-Δείγμα 35, 2.2: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)-Δείγμα 36, 2.3: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)-Δείγμα 37, 2.4: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121)-Δείγμα 38.

Στα παραπάνω διαγράμματα απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *S.aureus* σε βάθος 48 ωρών, όπως διακρίνεται με την πορτοκαλί καμπύλη, ενώ με την μπλε καμπύλη σε κάθε διάγραμμα απεικονίζεται ο μικροοργανισμός μαζί με το κάθε δείγμα υδρογέλης. Τα συγκεκριμένα διαγράμματα παρουσιάζονται για την κατανόηση του λογισμικού DMFit και επιβεβαιώνουν τον παραπάνω ισχυρισμό περί ήπιας αντιμικροβιακής δράσης όλων των υδρογελών και κυρίως της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), η ευρεία δράση της οποίας απεικονίζεται στο διάγραμμα 2.1. Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα και το υπολογιστικό σύστημα DMFit, προκύπτουν μερικές αριθμητικές παράμετροι με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, αναφορικά με τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{max}), την διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase), το μέγιστο επίπεδο

πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων αλλά και τον συντελεστή συσχέτισης προσαρμογής (R^2). Τα συγκεκριμένα μεγέθη μας δίνουν πληροφορίες για την μικροβιακή και στην προκειμένη περίπτωση, βακτηριακή ανάπτυξη του *S.aureus*, παρουσία των αντιμικροβιακών δειγμάτων υδρογελών. Με βάση αυτά τα δεδομένα προκύπτουν και διαγράμματα σύγκρισης των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης για κάθε δείγμα και την αναστολή που προσφέρουν σε κάθε μικροβιακό στέλεχος, και με τα οποία θα γίνει η ανάλυση και συζήτηση των αποτελεσμάτων στις υπόλοιπες πειραματικές δοκιμές. Επισημαίνεται ότι η τιμή για κάθε παράμετρο και συνεπώς και ο σχεδιασμός των διαγραμμάτων προκύπτει από τον μέσο όρο των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας για κάθε σειρά τριών φρεατίων, η οποία έχει στρογγυλοποιηθεί και αντιστοιχεί σε έναν συνδυασμό δείγματος-μικροοργανισμού και μικροοργανισμού-broth.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 1^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι του *S.aureus*.

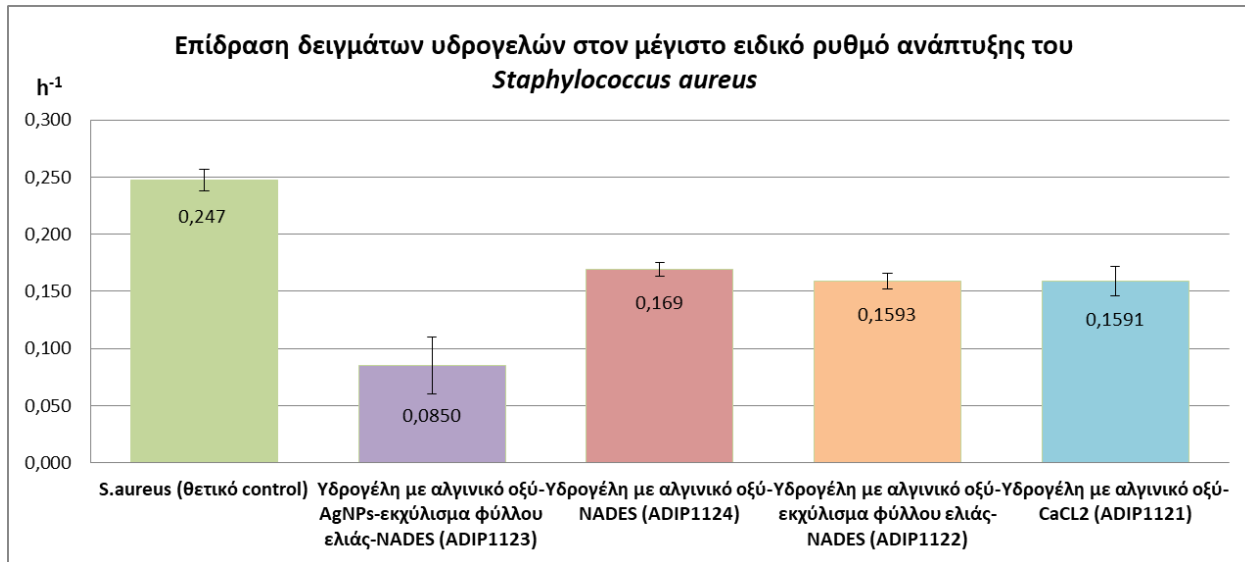
ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max})	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2)
<i>S.aureus</i> (θετικό control)	0,247	6,483	1,320	0,997
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,085	7,951	1,025	0,995
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,169	4,680	0,993	0,998
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,1593	4,699	1,045	0,993
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,1592	4,461	1,060	0,988

Με βάση τον Πίνακα 10, παρατηρείται μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *S.aureus* με την χρήση των όλων των δειγμάτων υδρογελών και ειδικότερα υποτριπλασιασμός της ταχύτητας ανάπτυξης με την χρήση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), η οποία είναι εμπλουτισμένη τόσο με τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) όσο και με εκχύλισμα φύλλου ελιάς, που αναμένονταν να ασκήσουν ανασταλτική δράση. Οι υπόλοιπες υδρογέλες έδρασαν επίσης ανασταλτικά, ωστόσο αξιοσημείωτο είναι ότι η διάρκεια φάσης προσαρμογής τους όχι μόνο δεν ήταν μεγαλύτερη από το θετικό control του *S.aureus* αλλά αρκετά μικρότερη, γεγονός που ορίζει ότι η μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης οφείλεται στην μείωση της μέγιστη πυκνότητα μικροβιακού πληθυσμού ή μείωση του μέγιστου επιπέδου πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων. Η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-

εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP11230) παρουσιάζει αυξημένη τιμή χρόνου φάσης προσαρμογής (lag phase) και μειωμένο αριθμό συνολικών βακτηριακών κυττάρων, σε σχέση με το δείγμα του θετικού control. Επιπλέον, ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2), για όλα τα δείγματα, είναι κοντά στην μονάδα, εκφράζοντας υψηλά ποσοστά αξιοπιστίας.

Πίνακας 11: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 1ης πειραματικής δοκιμής έναντι του *S.aureus*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>S.aureus</i> (θετικό control)	0,247	0,01
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,085	0,03
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,169	0,01
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,159	0,01
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,159	0,01

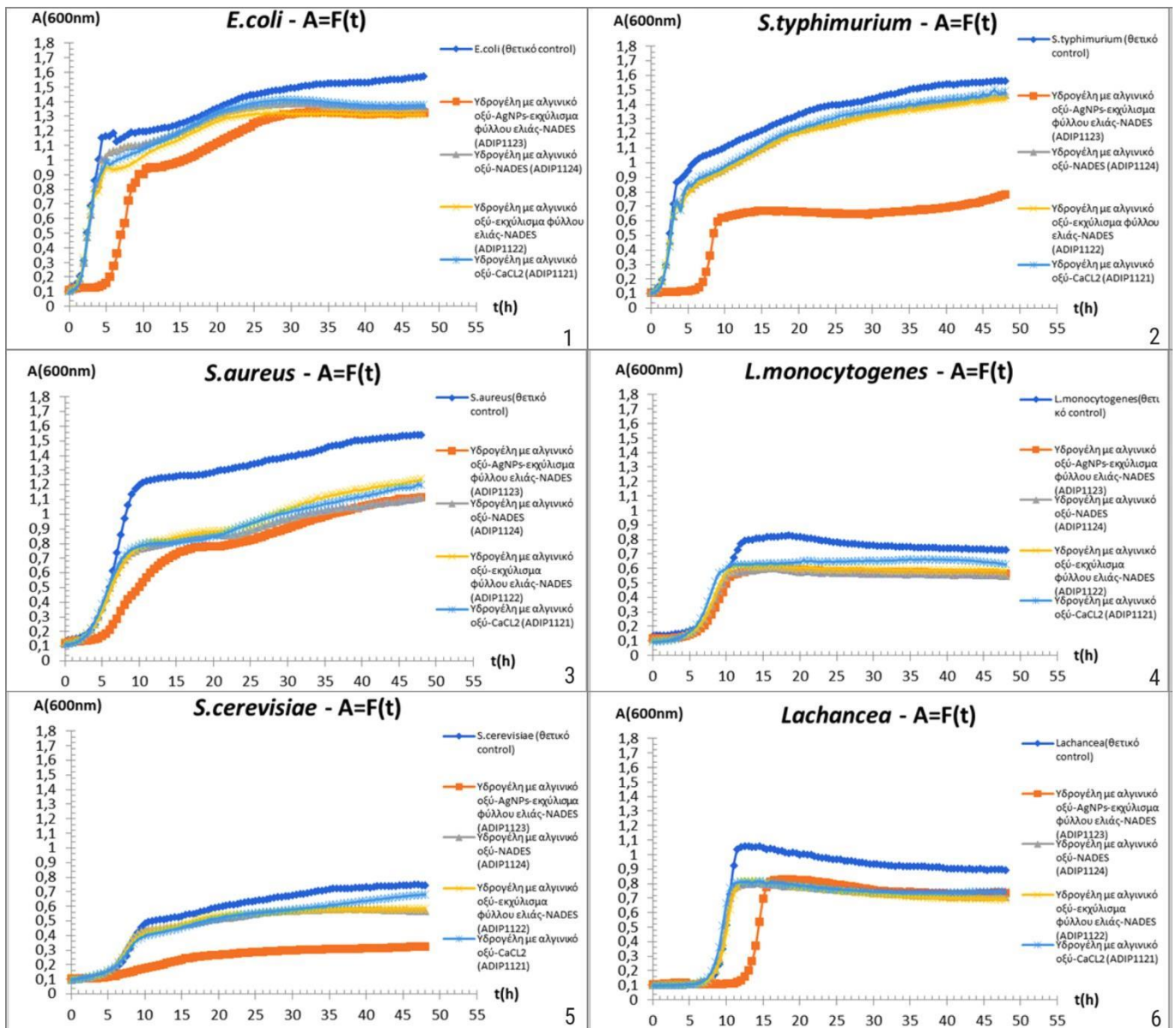


Διάγραμμα 4: Γράφημα στήλων μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h^{-1}) του Πίνακα 10 +/- τυπική απόκλιση για τον *S.aureus*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Τα δεδομένα του Πίνακα 11 χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του διαγράμματος 3, στο οποίο είναι εμφανές ότι η στήλη που αντιστοιχεί στην υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) είναι σαφώς μικρότερη από την στήλη του θετικού control του *S.aureus*. Οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης για τις υπόλοιπες υδρογέλες εμφανίζονται στο διάγραμμα με στήλες χαμηλότερου επίσης ύψους. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων για κάθε

δείγμα, οι οποίες απεικονίζονται ως μαύρες μπάρες σε κάθε στήλη, δεν επικαλύπτουν αλλά ούτε ξεπερνούν τα όρια των κορυφών των στηλών για τα υπόλοιπα δείγματα. Εφόσον δεν υπάρχει επικάλυψη, τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά και δεν χρειάζεται να αφαιρεθούν τιμές που εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση από τις υπόλοιπες λόγω πειραματικών σφαλμάτων. Κατ' επέκταση η αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων υδρογελών εκφράζεται με την ακόλουθη φθίνουσα σειρά, κατά την οποία η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) είναι πιο δραστική από την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), η οποία είναι πιο δραστική από την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122), ενώ μικρότερη ανασταλτική δράση από όλες εμφάνισε η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124),

3.2.2. Αποτελέσματα 2^{ης} πειραματικής δοκιμής



Διάγραμμα 5: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών 2^{ης} πειραματικής δοκιμής, ως γραφική παράσταση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm συναρτήσει του χρόνου σε ώρες, με τα δείγματα υδρογελών ADIP1121,ADIP1122,ADIP1123 και ADIP1124, 4.1: *E.coli*, 4.2: *S.typhimurium*, 4.3: *S.aureus*, 4.4: *L.monocytogenes*, 4.5: *S.cerevisiae*, 4.6: *Lachancea*.

Με βάση το παραπάνω συνολικό διάγραμμα με τιμές απορρόφησης/οπτικής πυκνότητας κατά την πραγματοποίηση της τεχνικής Bioscreen C στο σύστημα Excel 2010, εκ πρώτης όψης παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα υδρογελών επέδρασαν ανασταλτικά στα στελέχη μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν. Ειδικότερα, στο διάγραμμα 4.1 παρατηρείται μείωση της ανάπτυξης της *E.coli*, από όλα τα δείγματα υδρογελών, με την καμπύλη της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) να παρουσιάζει μεγαλύτερη φάση προσαρμογής και εκθετική φάση με μικρότερη κλίση από αυτήν της καμπύλης του θετικού control, γεγονός που συνηγορεί την ύπαρξη ισχυρής αντιμικροβιακής δράσης. Έπειτα, οι καμπύλες για τα τρία δείγματα υδρογελών με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με

αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), εμφανίζουν πιθανή αντιμικροβιακή δράση η οποία αιτιολογείται από την μείωση ανάπτυξης της *E.coli* κατά την εκθετική και στατική φάση, με τις εκθετικές φάσεις ανάπτυξης να εντοπίζονται σε χαμηλότερο σημείο από αυτή της καμπύλης του θετικού control. Ακολούθως, στο διάγραμμα 4.2 απεικονίζεται η εξαιρετικά ισχυρή δράση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) έναντι της *S.typhimurium*, μέσω της μεγάλης αύξησης του χρόνου προσαρμογής και της μειούμενης κλίσης καμπύλης στην εκθετική φάση, συγκριτικά πάντα με την καμπύλη του θετικού control, με μπλε χρώμα. Συμπληρωματικά, οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), ανέστειλαν επίσης την ανάπτυξη του βακτηρίου, αφού εμφανίζουν μικρότερη συγκέντρωση κυττάρων κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης. Συμπληρωματικά στο παραπάνω θετικό αποτέλεσμα, μπορούν να προστεθούν τα εξαιρετικά αποτελέσματα δράσης των τεσσάρων υδρογελών έναντι του *S.aureus*, τα οποία απεικονίζονται στο διάγραμμα 4.3. Αναφορικά, παρατηρείται μειωμένη κλίση και πληθυσμός κυττάρων στην εκθετική φάση για τις καμπύλες και των τεσσάρων δειγμάτων ενώ επιπλέον η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) εμφανίζει για άλλη μία φορά μεγαλύτερη lag phase. Η διαφορά στην αναστολή δράσης μεταξύ του *S.aureus* και της *S.typhimurium* πιθανότατα οφείλεται στην ανθεκτικότητα της *S.typhimurium* στα δείγματα υδρογελών ADIP1121, ADIP1122 και ADIP1124. Τέλος, οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) παρουσίασαν ήπια αντιμικροβιακή δράση για τις ζύμες *S.cerevisiae* και *Lachancea*, σε αντίθεση με την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) η οποία αποδείχθηκε πιο δραστική, ειδικότερα για την *Lachancea* αφού η ανάπτυξη του *S.cerevisiae* ήταν περιορισμένη. Στην περίπτωση της *L.monocytogenes* εντοπίζεται μία ήπια αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων κυρίως λόγω μείωσης του ύψους της καμπύλης των δειγμάτων κατά την εκθετική φάση και ειδικότερα αύξηση του χρόνου της φάσης προσαρμογής για το δείγμα ADIP1123. Η ανασταλτική δράση στο συγκεκριμένο βακτήριο πρέπει να επιβεβαιωθεί παρακάτω, καθώς τόσο αυτή όσο και ο *S.cerevisiae* εμφάνισαν εξαρχής μειωμένη ανάπτυξη, πιθανόν λόγω μη επαρκών συνθηκών επώασης στα στάδια ανακαλλιέργειας.

3.2.2.1. *Escherichia coli*

Πίνακας 12: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 2^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι της *E.coli*.

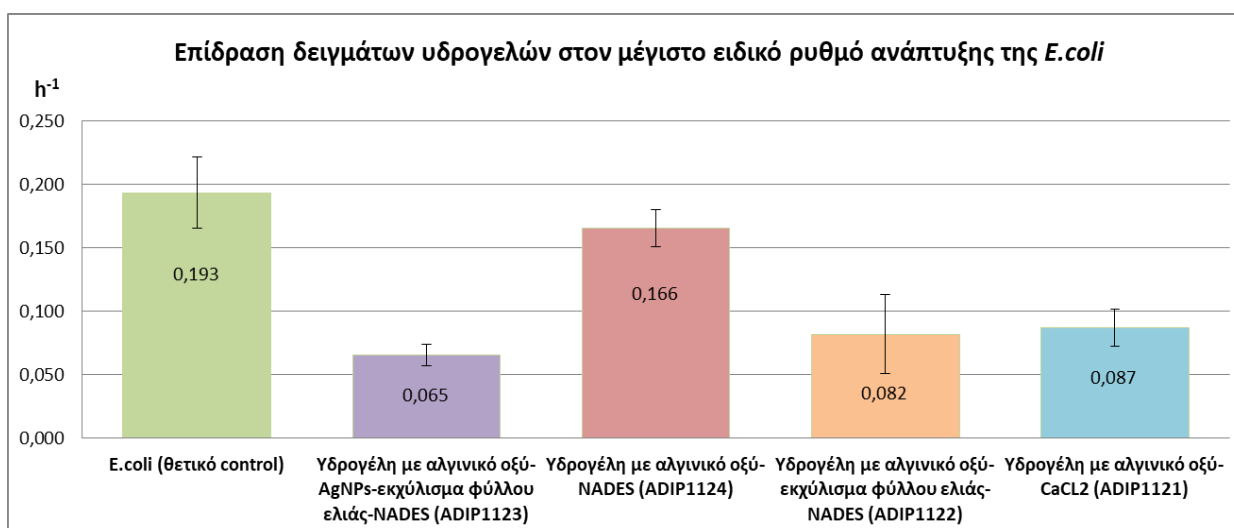
ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μmax)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R ²)
<i>E.coli</i> (θετικό control)	0,193	-	1,572	0,842
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,065	-	1,346	0,942
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,166	-	1,388	0,898
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,082	-	1,325	0,898
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,087	-	1,414	0,886

Με βάση τον παραπάνω πίνακα, παρατηρείται μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *E.coli* με την χρήση των όλων των δειγμάτων υδρογελών και ειδικότερα υποτριπλασιασμός της ταχύτητας ανάπτυξης με την χρήση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123). Οι υπόλοιπες υδρογέλες έδρασαν επίσης ανασταλτικά σε επίπεδο υποδιπλασιασμού του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου, ενώ επίσης μειώθηκε το μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων από τα συγκεκριμένα δείγματα, με μικρότερη μείωση να εμφανίζει η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121). Παρόλα αυτά εμφανής είναι η απουσία τιμών για την φάση προσαρμογής, η οποία προφανώς δεν εντοπίζεται. Επισημαίνεται ότι, τα βακτήρια δεν αναπτύσσονται κατά τη φάση της προσαρμογής, αλλά προσαρμόζονται στο περιβάλλον τους και μεταβολίζονται, παράγοντας βιταμίνες και αμινοξέα απαραίτητα για την ταχεία διαίρεση τους. Αρχίζουν να δημιουργούν αντίγραφα του DNA τους και αν το περιβάλλον τους παρέχει άφθονα θρεπτικά συστατικά, η φάση προσαρμογής μπορεί να είναι πολύ μικρή. Η φάση προσαρμογής μπορεί επίσης να είναι μεγαλύτερη, εάν τα κύτταρα ληφθούν από μια παλιά ή κατεψυγμένη καλλιέργεια, αλλά εάν τα κύτταρα ληφθούν από μια νεαρή, έντονα αναπτυσσόμενη καλλιέργεια και εμβολιαστούν σε φρέσκο υπόστρωμα ίδιας σύνθεσης, η φάση προσαρμογής μπορεί να είναι πολύ σύντομη ή ακόμα και απουσιάζει, όπως και στην περίπτωση της δεδομένης δοκιμής. Η απεικόνιση φάσης προσαρμογής στο διάγραμμα του Excel αντιτίθεται με την απουσία τιμών στον Πίνακα 11 που προέκυψε από την ανάλυση με το λογισμικό DMFit και μπορεί να αιτιολογηθεί από το γεγονός ότι κατά την μέτρηση της απορρόφησης κατά την τεχνική του Bioscreen C, στα φρεάτια

παραμένουν μη ενεργοποιημένα ή/και νεκρά κύτταρα, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τα τελικά αποτελέσματα. Επιπλέον, ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2), για όλα τα δείγματα εκτός της υδρογέλης ADIP1123, είναι χαμηλός, εκφράζοντας αναξιοπιστία για τα τελικά αποτελέσματα ανασταλτικής δράσης.

Πίνακας 13: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 2ης πειραματικής δοκιμής έναντι του *E.coli*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>E.coli</i> (θετικό control)	0,193	0,03
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,065	0,01
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,166	0,01
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,082	0,03
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,087	0,01



Διάγραμμα 6: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h^{-1}) του Πίνακα 12 +/- τυπική απόκλιση για την *E.coli*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Τα δεδομένα του Πίνακα 13 χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του διαγράμματος 5, με βάση το οποίο η στήλη που αντιστοιχεί στην υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) είναι ενδεικτικά αρκετά χαμηλότερη από την στήλη του θετικού control της *E.coli*. Οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης για τις υπόλοιπες υδρογέλες εμφανίζονται στο διάγραμμα με στήλες χαμηλότερου επίσης ύψους, με εξαίρεση την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), η οποία

εμφανίζει την μικρότερη αντιμικροβιακή δράση. Επιπρόσθετα, οι μπάρες των τυπικών αποκλίσεων επικαλύπτουν η μία την άλλη μόνο στην περίπτωση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121). Όταν οι γραμμές σφάλματος τυπικής απόκλισης επικαλύπτονται αρκετά, αποτελεί ένδειξη ότι η διαφορά στην ισχύ αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ των δύο δειγμάτων, δεν είναι στατιστικά σημαντική. Συνιστάται λοιπόν, η επανάληψη της πειραματικής δοκιμής και ακολούθως μίας επιπλέον στατιστικής δοκιμή, για να διεξαχθεί το τελικό συμπέρασμα. Στα υπόλοιπα αποτελέσματα, η έλλειψη επικάλυψης των μπαρών μπορεί να χαρακτηρίσει την μείωση του μ_{max} ως στατιστικά σημαντική, για κάθε περίπτωση δείγματος. Είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι η παρουσία μεγαλύτερης τυπικής απόκλισης δεν καθιστά τα δεδομένα μη έγκυρα, αφού οι βιολογικές μετρήσεις καθορίζονται από μεταβλητότητα. Κατ' επέκταση η αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων υδρογελών εκφράζεται με την ακόλουθη φθίνουσα σειρά, κατά την οποία η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) είναι πιο δραστική από την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), ενώ μικρότερη ανασταλτική δράση από όλες εμφάνισε η υδρογέλη με αλγινικό οξύ- NADES (ADIP1124).

3.2.2.2. *Salmonella typhimurium*

Πίνακας 14: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 2^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι της *S.typhimurium*.

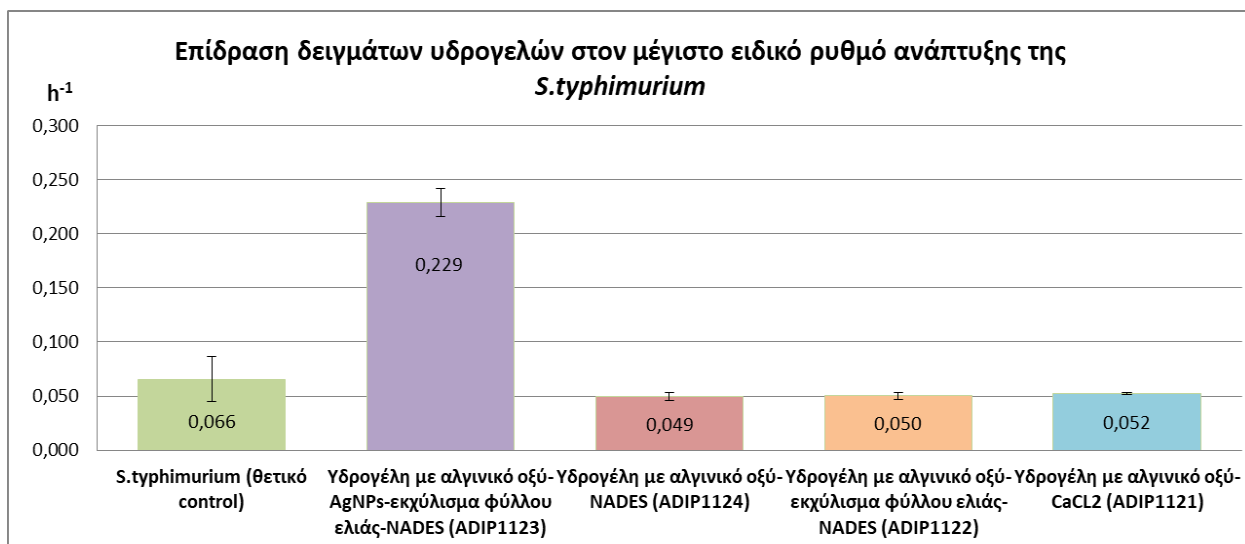
ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max})	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2)
<i>S.typhimurium</i> (θετικό control)	0,066	-	1,560	0,867
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,229	6,879	0,780	0,978
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,049	-	1,462	0,902
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,050	-	1,435	0,908
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,052	-	1,500	0,904

Με βάση τον Πίνακα 14, παρατηρείται μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *S.typhimurium* με την χρήση των όλων των δειγμάτων υδρογελών, εκτός της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123). Στην συγκεκριμένη περίπτωση η καμπύλη που προκύπτει από την αντιμικροβιακή δράση της υδρογέλης ADIP1123,

χαρακτηρίζεται από αυξημένο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, εξαιρετικά μεγάλη φάση προσαρμογής και υποδιπλασιασμό του μέγιστου επίπεδου πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων, ενώ όλες οι υπόλοιπες καμπύλες και κυρίως η καμπύλη της *S.typhimurium* (θετικό control) παρουσιάζει χαμηλότερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, απουσία φάσης προσαρμογής και διπλάσιο μέγιστο πληθυσμό μικροβιακών κυττάρων. Αποτέλεσμα των παραπάνω τιμών είναι η απουσία συσχέτισης του αρχικού Διαγράμματος 4.2 με τους Πίνακες 13,14 και το Διάγραμμα 7. Με βάση τον Hamill κ.ά., 2020 , η φάση προσαρμογής μικήτων και διαφόρων βακτηριακών στελεχών, μπορεί μερικές φορές να ποικίλλει σε σχέση με τους μέγιστους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης, όπως συνέβη και στην συγκεκριμένη πειραματική δοκιμή. Αυτή η ασυνέπεια δείχνει ότι η φάση προσαρμογής δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη των ρυθμών ανάπτυξης και συνεπώς το αποτέλεσμα είναι αναξιόπιστο και πρέπει να επιβεβαιωθεί. Τέλος, ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2), για όλα τα δείγματα είναι αρκετά υψηλός, εκφράζοντας αξιοπιστία για τα τελικά αποτελέσματα ανασταλτικής δράσης, τα οποία όμως δεν συμβαδίζουν με την παραπάνω λογική θέση.

Πίνακας 15: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 2^{ns} πειραματικής δοκιμής έναντι του *S.typhimurium*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>S.typhimurium</i> (θετικό control)	0,066	0,02
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,066	0,02
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,049	0,003
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,050	0,003
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,052	0,001



Διάγραμμα 7: Γράφημα στήλων μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h⁻¹) του Πίνακα 14 +/- τυπική απόκλιση για την *S.typhimurium*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Οι τιμές που παρουσιάζονται ανωτέρω χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του Διαγράμματος 6. Από το διάγραμμα παρατηρείται αναμφισβήτη η ασυνέπεια της τιμής lag phase με τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης για την ανασταλτική δράση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), ενώ τα υπόλοιπα αντιμικροβιακά δείγματα ορίζονται από χαμηλότερες στήλες ρυθμού ανάπτυξης οι οποίες ερμηνεύουν την ήπια αντιμικροβιακή δράση αυτών προς το βακτήριο, το οποίο είναι πιθανόν να εμφανίζει ανθεκτικότητα απέναντι τους. Αν και το αποτέλεσμα είναι αναξιόπιστο και πρέπει να επιβεβαιωθεί, καλό θα ήταν να μην παρερμηνευθεί η αντιμικροβιακή και έντονα ανασταλτική ικανότητα της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) έναντι της *S.typhimurium*, η οποία παρουσιάστηκε στο Διάγραμμα 4. Εξάλλου, τα συγκεκριμένα δείγματα υδρογελών παρουσιάζουν επαρκή, μερικές φορές και εξαιρετική δράση έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων όπως παρουσιάζεται στην δεδομένη πειραματική μελέτη. Οι μπάρες των τυπικών αποκλίσεων επίσης δεν επικαλύπτουν η μία την άλλη. Έτσι αυξάνεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και μπορεί να αποδοθεί στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης. Συνολικά, οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) άσκησαν υψηλή και αντίστοιχα ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηρίου *S.typhimurium*, με τα ισχυρά αντιμικροβιακά αποτελέσματα της υδρογέλης ADIP1123 να απαιτούν επιβεβαίωση.

3.2.2.3. *Staphylococcus aureus*

Πίνακας 16: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 2^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι του *S.aureus*.

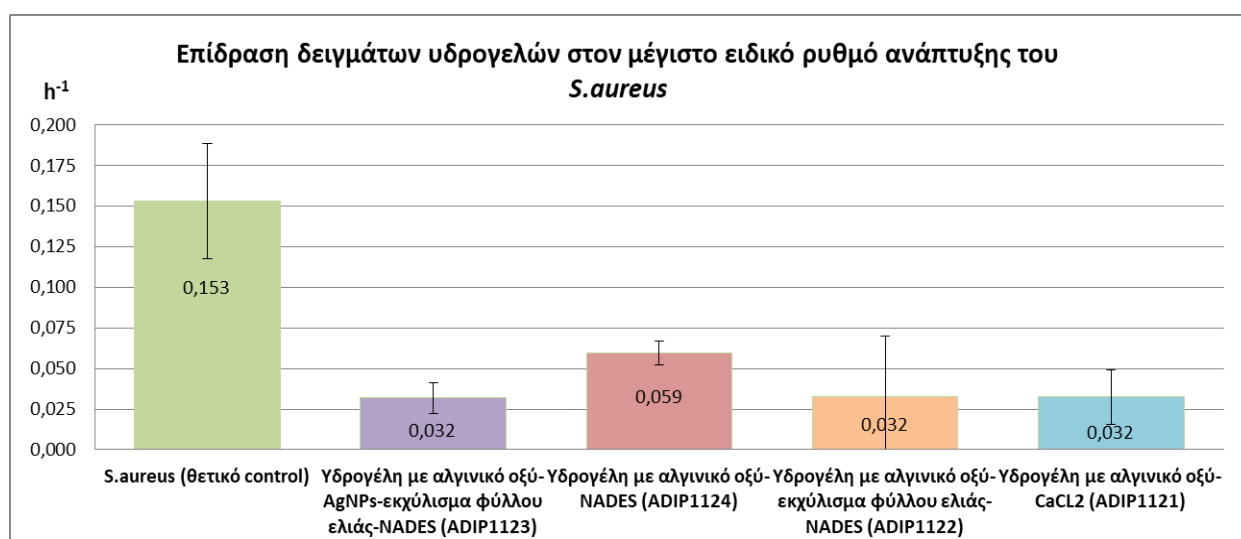
ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μmax)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R ²)
<i>S.aureus</i> (θετικό control)	0,153	2,075	1,536	0,945
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,032	-	1,117	0,942
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,059	-	1,111	0,902
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,032	-	1,239	0,892
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,032	-	1,202	0,877

Οι παραπάνω παράμετροι παρουσιάζουν αναλυτικά την θετική επίδραση των τεσσάρων υδρογελών στο βακτήριο του *S.aureus*. Ρητά, παρατηρείται ευρεία μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του στελέχους με την χρήση όλων των δειγμάτων υδρογελών. Η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) προκάλεσε υποπενταπλασιασμό του μmax και οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) υποτριπλασιασμό αυτού. Για άλλη μια φορά lag phase παρουσιάζεται μόνο για την καμπύλη του θετικού control του *S.aureus*, ενώ απουσιάζει από τις καμπύλες των αντιμικροβιακών δειγμάτων, γεγονός που αντιτίθεται κυρίως με την καμπύλη του Διαγράμματος 4.3 για την υδρογέλη ADIP1123. Η παρουσία φάσης προσαρμογής για την συγκεκριμένη καμπύλη είναι ξεκάθαρα απεικονισμένη στο διάγραμμα που αναφέρθηκε, συνεπώς εντοπίζεται διαφορά στην ανάλυση των δεδομένων μεταξύ του υπολογιστικού προγράμματος Excel 2010 και του λογισμικού DMFit. Η μη επακριβής συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τα δύο προγράμματα εκθέτει την ανάγκη σύγκρισης και επανελέγχου των τελικών τιμών που προκύπτουν από αυτά. Η συγκεκριμένη ασάφεια ωστόσο δεν αλλοιώνει ούτε ακυρώνει το έγκυρο αντιμικροβιακό αποτέλεσμα δράσης της υδρογέλης ADIP1123 προς τον *S.aureus*, αφού οι υπόλοιπες παράμετροι του Πίνακα 15 συμφωνούν με το Διάγραμμα 4.3. Συμπληρωματικά, το μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων ή αλλιώς η μέγιστη οπτική πυκνότητα στο τέλος της λογαριθμικής φάσης μειώνεται με την χρήση και των τεσσάρων υδρογελών, ενώ ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R²) είναι υψηλός και αξιόπιστος για τον *S.aureus* (θετικό control), την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα

φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) και την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), αλλά χαμηλότερος για την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), εκφράζοντας αναξιοπιστία για τα τελικά αντιμικροβιακά αποτελέσματα αυτών.

Πίνακας 17: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 2^{ns} πειραματικής δοκιμής έναντι του *S.aureus*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>S.aureus</i> (θετικό control)	0,153	0,04
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,032	0,01
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,059	0,01
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,032	0,04
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,032	0,02



Διάγραμμα 8: Γράφημα στήλων μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h⁻¹) του Πίνακα 16 +/- τυπική απόκλιση για τον *S.aureus*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Τα δεδομένα του Πίνακα 17 χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του διαγράμματος 8, με βάση το οποίο η στήλη που αντιστοιχεί στην υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) εμφανίζει πολύ μικρότερο ύψος από την στήλη θετικού control του μικροοργανισμού. Οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης για τις υπόλοιπες υδρογέλες εμφανίζονται στο διάγραμμα με στήλες χαμηλότερου επίσης ύψους, αλλά ηπιότερη αντιμικροβιακή δράση από την υδρογέλη ADIP1123. Επακριβώς, η πρόσθεση της τιμής τυπικής απόκλισης στην περίπτωση της υδρογέλης ADIP1122 επικαλύπτει τις στήλες των υπολοίπων

υδρογελών. Όταν οι γραμμές σφάλματος τυπικής απόκλισης επικαλύπτονται αρκετά, αποτελεί ένδειξη ότι η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική μεταξύ των δειγμάτων. Ωστόσο, η αντιμικροβιακή δράση της υδρογέλης παραμένει στατιστικά σημαντική, αφού με πρόσθεση ή αφαίρεση της τυπικής απόκλισης, ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει αρκετά μειωμένος από το θετικό control. Επίσης, στην περίπτωση της στήλης του θετικού control εντοπίζεται μεγάλη τυπική απόκλιση η οποία όμως δεν μεταβάλλει την στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων, αφού οι μέσοι όροι των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης του *S.aureus* με επίδραση των υδρογελών, παραμένουν εξαιρετικά χαμηλοί. Συμπερασματικά, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) είναι πιο δραστική από την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), ενώ μικρότερη ανασταλτική δράση και από τις δύο εμφάνισε η υδρογέλη με αλγινικό οξύ- NADES (ADIP1124). Η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) κατατάσσεται ως αυτή με την μικρότερη αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S.aureus*, λόγω της αυξημένης τυπικής απόκλισης που παρουσίασε και γενικά συνίσταται η επανάληψη της δοκιμής για την παραλαβή πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων για το συγκεκριμένο δείγμα. Ενώ, πρέπει να σημειωθεί ότι η 2^η πειραματική δοκιμή του *S.aureus* έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με την 1^η πειραματική δοκιμή, γεγονός που καταδεικνύει σημαντική επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

3.2.2.3. *Listeria monocytogenes*

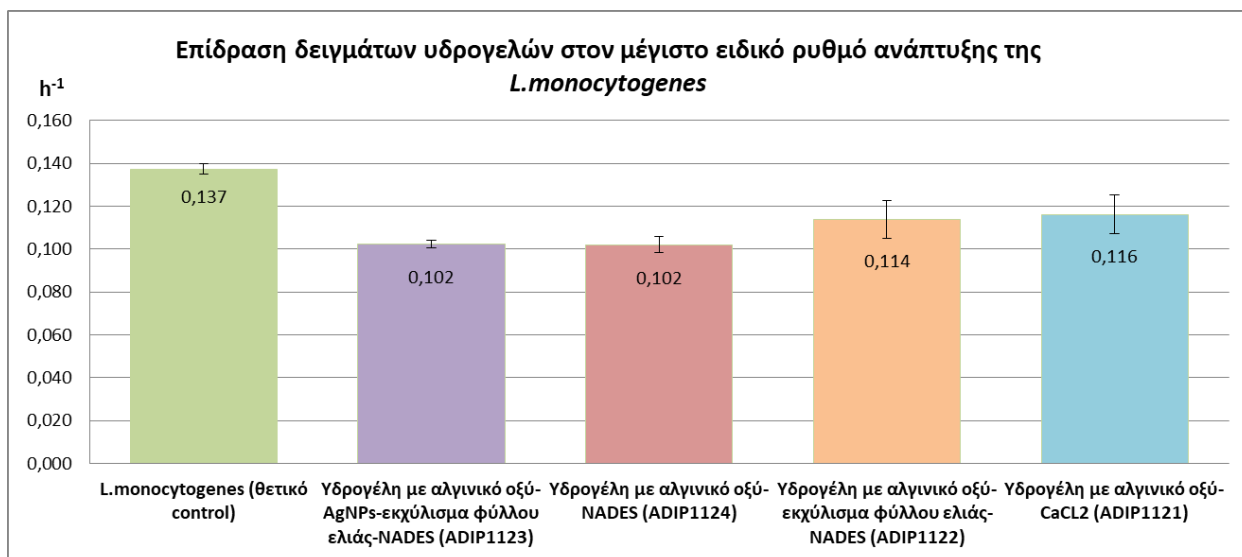
Πίνακας 18: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 2^{ης} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι της *L.monocytogenes*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μmax)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R ²)
<i>L.monocytogenes</i> (θετικό control)	0,137	7,131	0,827	0,984
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,102	6,401	0,609	0,995
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,102	5,796	0,602	0,993
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,114	5,731	0,622	0,996
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,116	5,150	0,664	0,996

Στον παραπάνω πίνακα διακρίνονται οι τιμές του προγράμματος DMFit, με βάση τις οποίες εξάγεται το γενικό συμπέρασμα ότι και οι τέσσερις υδρογέλες ανέστειλαν ήπια την ανάπτυξη της *L.monocytogenes*. Αναφορικά, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *L.monocytogenes* μειώθηκε διακριτά από την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) και την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124). Οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) δεν προκάλεσαν ιδιαίτερα μεγάλη αναστολή στο βακτήριο. Στην συνέχεια μπορούν να ερμηνευθούν οι τιμές της φάσης προσαρμογής για κάθε δείγμα. Ειδικότερα, τα αντιμικροβιακά δείγματα εμφάνισαν μικρότερη φάση προσαρμογής σε σχέση με το control, γεγονός που αντιτίθεται με την μείωση του *max*, αλλά όπως αναφέρθηκε και για άλλο μικροοργανισμό, πολλές φορές τα δύο μεγέθη δεν συμφωνούν μεταξύ τους. Η αντιμικροβιακή ικανότητα των τεσσάρων δειγμάτων υδρογελών μπορεί να παρατηρηθεί ωστόσο από την μείωση του μέγιστου επίπεδου πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων, που προκάλεσε κάθε μία από αυτές στην *L.monocytogenes*. Η μείωση των μεγεθών δεν είναι αρκετά ικανοποιητική για να χαρακτηριστούν τα δείγματα ως ισχυρά αντιμικροβιακά, παρόλο που ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2) είναι υψηλός και καταδεικνύει ότι τα δείγματα είναι αξιόπιστα.

Πίνακας 19: : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 2^{ης} πειραματικής δοκιμής έναντι της *L.monocytogenes*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>L.monocytogenes</i> (θετικό control)	0,137	0,002
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,102	0,002
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,102	0,004
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,114	0,009
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,116	0,009



Διάγραμμα 9: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h^{-1}) του Πίνακα 18 +/- τυπική απόκλιση για τον *L.monocytogenes*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Τα δεδομένα του Πίνακα 19 χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του διαγράμματος 8, με βάση το οποίο παρατηρείται χαμηλότερο ύψος στηλών και για τις τέσσερις υδρογέλες, συγκριτικά με την στήλη μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του θετικού control. Μεγαλύτερη μείωση στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης προσδίδουν οι υδρογέλες ADIP1123 και ADIP1124. Αξιόλογο κρίνεται επίσης ότι για όλες τις περιπτώσεις που μελετώνται στο συγκεκριμένο διάγραμμα, η τυπική απόκλιση των δειγμάτων δεν προκαλεί επικάλυψη με τις τιμές μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του αντίστοιχου control και συνεπώς κρίνεται στατιστικά σημαντική η διαφορά μεταξύ αυτών. Ωστόσο, οι τυπικές αποκλίσεις της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) αλλά και της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) επικαλύπτουν την στήλη της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124). Αυτή η παρατήρηση ωστόσο δεν μπορεί να αναιρέσει την αντιμικροβιακή ικανότητα των δειγμάτων, απλά είναι πιθανόν η στατιστική διαφορά που αναπτύσσεται μεταξύ τους να είναι λιγότερο σημαντική από ότι παρουσιάζεται. Αυτή η υπόθεση μπορεί να εξακριβωθεί μόνο με επανάληψη του πειράματος, η οποία και συνίσταται. Συνολικά, εντοπίζεται στατιστικά σημαντική ανασταλτική δράση όλων των υδρογελών προς το βακτήριο αλλά ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *L.monocytogenes* δεν εμφάνισε την μείωση που αναμενόταν. Όπως είναι γνωστό η *L.monocytogenes* απαιτεί δύο στάδια ανακαλλιέργειας σε συνθήκες 37°C/48h για την πλήρη ανάπτυξή της. Ορισμένες φορές όμως, ακόμη και αυτό το διάστημα δεν επαρκεί για πλήρη ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ επιπλέον υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η αρχική καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε να αποτελούνταν από χαμηλό ποσοστό υγιών μικροοργανισμών. Πέρα από αυτή την υπόθεση, η χαμηλή αντιμικροβιακή δράση των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124 μπορεί να είναι αποτέλεσμα

ανθεκτικότητας του βακτηρίου στα συγκεκριμένα δείγματα και με βάση όλα τα παραπάνω η δοκιμή συνίσταται να επαναληφθεί για την σύγκριση των αποτελεσμάτων.

3.2.2.4. *S.cerevisiae*

Πίνακας 20: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 2^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι του *S.cerevisiae*.

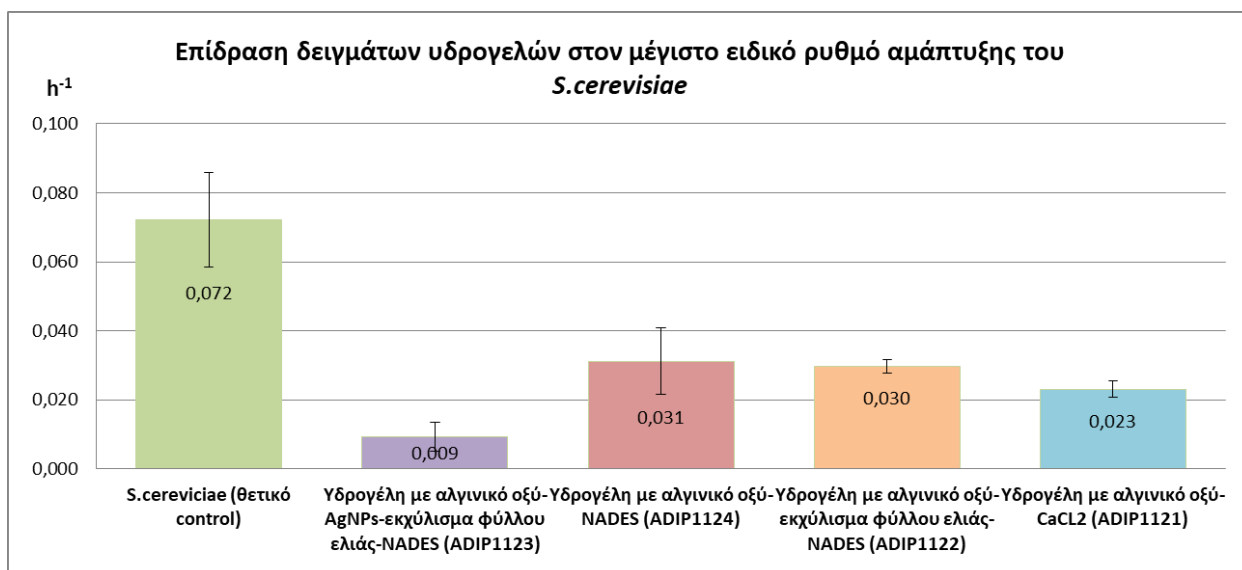
ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max})	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2)
<i>S.cerevisiae</i> (θετικό control)	0,072	-	0,748	0,947
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,009	-	0,327	0,985
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,031	-	0,584	0,958
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,030	-	0,586	0,974
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,023	-	0,682	0,950

Στον πίνακα 19 διακρίνονται οι τιμές του προγράμματος DMFit, με βάση τις οποίες η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) μείωσε σε μεγάλο βαθμό τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *S.cerevisiae*, ενώ κατά σειρά αύξουσας ισχύς οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) εμφάνισαν υποδιπλασιασμένες τιμές μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης. Αξιοσημείωτο είναι ότι η φάση προσαρμογής απουσιάζει από όλα τα δείγματα τόσο αριθμητικά όσο και από πλευρά απεικόνισης στο Διάγραμμα 4.5, στο οποίο η καμπύλη της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) χαρακτηρίζεται επίσης από πλήρη απουσία εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Επιπλέον, το μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων μειώνεται διακριτά από τα δείγματα και υποδιπλασιάζεται από το δείγμα ADIP1123. Η μείωση των αριθμητικών παραμέτρων μπορεί να επιβεβαιωθεί από την αξιοπιστία που προσδίδει ο υψηλός συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2), για κάθε δείγμα. Τέλος, είναι επιτακτικό να αναφερθεί ότι μία τιμή μέγιστη οπτική πυκνότητα ή μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για το θετικό control του *S.cerevisiae* απορρίφθηκε και συνεπώς χρησιμοποιήθηκαν δύο αντί για τρεις πειραματικές τιμές για να οριστεί τόσο ο μέσος όρος μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η τυπική απόκλιση των

συγκεκριμένων τιμών. Αυτή η επιλογή ακολουθήθηκε καθώς η αρχική τυπική απόκλιση για τα αποτελέσματα των τριών φρεατίων ήταν ιδιαίτερα υψηλή, λόγω μειωμένης ανάπτυξης του ζυμομύκητα στο ένα φρεάτιο. Η μειωμένη ανάπτυξη μπορεί να είναι αποτέλεσμα αναστολής της δράσης του μικροοργανισμού από ουσίες με τις οποίες πληρώθηκαν τα γειτονικά φρεάτια. Η τεχνική του Bioscreen C πρέπει να διενεργείται με ιδιαίτερη προσοχή και ακρίβεια ώστε να μην γίνει επιμόλυνση των φρεατίων από σταγονίδια άλλων αντιδραστηρίων ή δειγμάτων, όπως πιθανόν συνέβη στην δεδομένη περίπτωση. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη του *S.cerevisiae* θα μπορούσε να είναι μεγαλύτερη σε όλα τα δείγματα, για αυτό και προτείνεται η επανάληψη της δοκιμής με την χρήση ειδικού θρεπτικού υποστρώματος για ζύμες αντί του γενικού στερεού θρεπτικού υποστρώματος PCA, προκειμένου να επιτευχθεί υψηλότερο ενεργό ποσοστό κυττάρων.

Πίνακας 21: : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 2^{ης} πειραματικής δοκιμής έναντι του *S.cerevisiae*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>S.cerevisiae</i> (θετικό control)	0,072	0,014
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,009	0,004
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,031	0,010
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,030	0,002
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,023	0,002



Διάγραμμα 10: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h⁻¹) του Πίνακα 20 +/- τυπική απόκλιση για τον *S.cerevisiae*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Σε συμφωνία με τις παραμέτρους του προγράμματος DMFit, προέκυψε το παραπάνω διάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται διακριτά η μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του ζυμομύκητα *S.cerevisiae* και από τα τέσσερα δείγματα υδρογελών. Η στήλη που αντιστοιχεί στην υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) εμφανίζει έξι φορές μικρότερο ύψος από την στήλη θετικού control του μικροοργανισμού, αναλογικά πάντα με τις τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης που προέκυψαν από την αναστολή δράσης του μικροοργανισμού. Οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης για τις υπόλοιπες υδρογέλες εμφανίζονται στο διάγραμμα με στήλες χαμηλότερου επίσης ύψους από την υδρογέλη ADIP1123 και χαρακτηρίζονται από επάρκεια αντιμικροβιακής δράσης. Στην συνέχεια πρέπει να αναφερθεί η επίδραση των τυπικών αποκλίσεων στα τελικά αποτελέσματα, όπου επικάλυψη εντοπίζεται μόνο στο αποτέλεσμα δράσης της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), η μπάρα της οποίας επικαλύπτει μερικώς της στήλες των υδρογελών με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) και με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122). Αν και η επικάλυψη είναι εμφανής, το αποτέλεσμα αντιμικροβιακής δράσης των δειγμάτων δεν αμφισβητείται, αλλά η διαφορά τους δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η επανάληψη του πειράματος συνίσταται για εγκυρότερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) αποτελεί κατά σειρά πειραμάτων την πιο δραστική από τις τέσσερες υδρογέλες, έναντι του *S.cerevisiae* και ακολουθούν με μειούμενη σειρά ισχύς οι υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124).

3.2.2.5. *Lachancea*

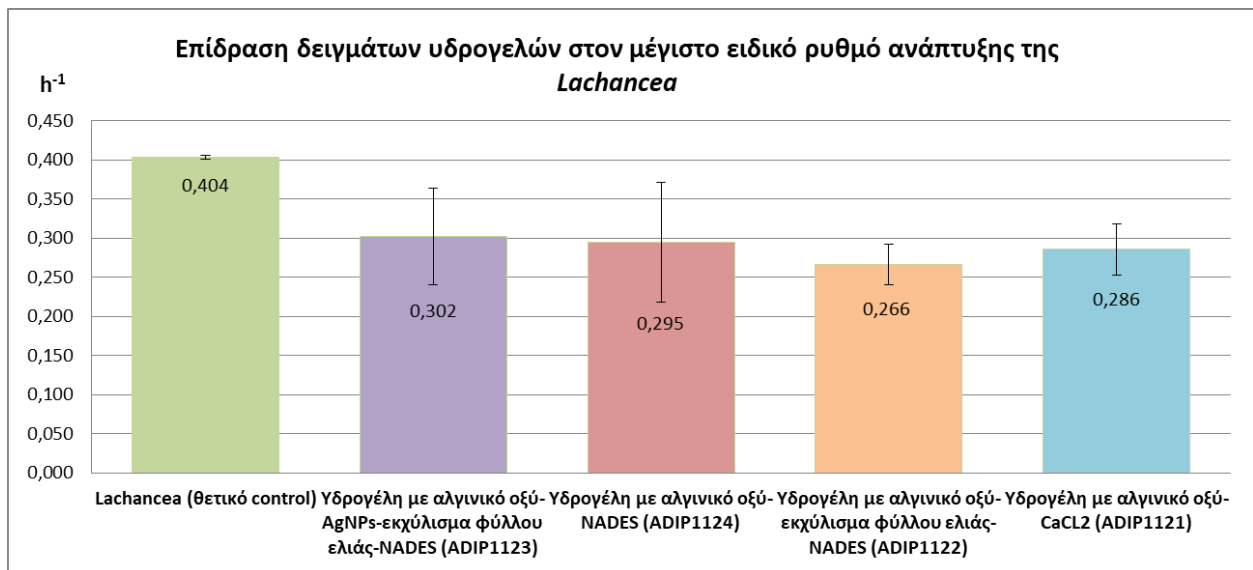
Πίνακας 22: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 2^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι της *Lachancea*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μmax)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R ²)
<i>Lachancea</i> (θετικό control)	0,404	8,934	1,060	0,980
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,302	13,052	0,828	0,988
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,295	8,430	0,802	0,986
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,266	8,589	0,822	0,976
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,286	8,039	0,817	0,990

Με βάση τον παραπάνω πίνακα, παρατηρείται μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της ζύμης *Lachancea* με την χρήση όλων των δειγμάτων υδρογελών. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός της υψηλότερης μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης από τις υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), παρά από την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), η οποία εμφανίστηκε ως η πιο δραστική, στις δοκιμές αναλύθηκαν ανωτέρω. Ωστόσο, η υδρογέλη ADIP1123 οδήγησε στην ανάπτυξη μεγαλύτερης φάσης προσαρμογής, η οποία δικαιολογεί την έντονη ανασταλτική δράση του δείγματος προς τον μικροοργανισμό που απεικονίζεται στην καμπύλη του Διαγράμματος 4.6. Αντιθέτως, τα υπόλοιπα δείγματα εμφάνισαν παρόμοιες τιμές χρόνου φάσης προσαρμογής με το θετικό control αλλά μειωμένο μέγιστο πληθυσμό μικροβιακών κυττάρων, ο οποίος κυμάνθηκε στις ίδιες τιμές και για τις τέσσερις υδρογέλες. Ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R²) εμφάνισε επίσης υψηλές τιμές για όλα τα δείγματα, εκφράζοντας αξιοπιστία και εγκυρότητα για τις παραμέτρους που σχολιάστηκαν.

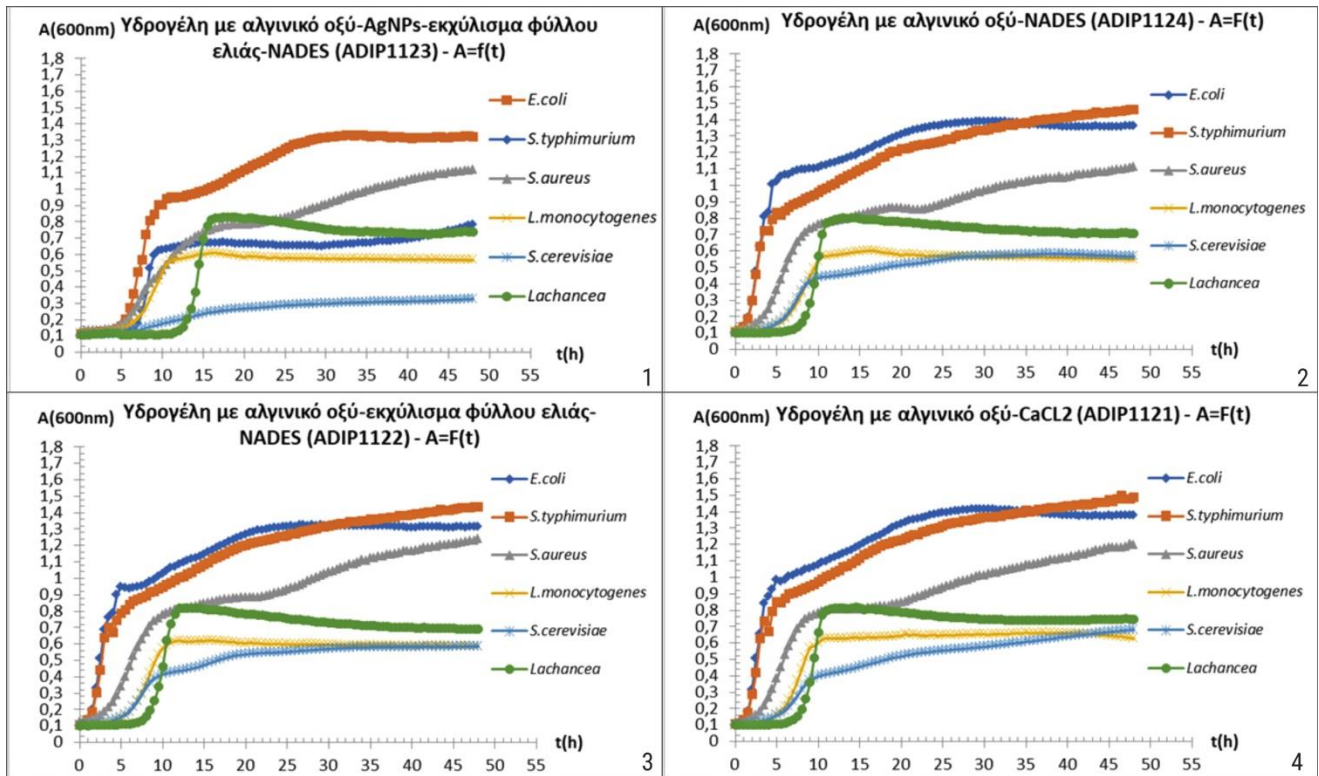
Πίνακας 23: : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 2^{ns} πειραματικής δοκιμής έναντι της *Lachancea*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>Lachancea</i> (θετικό control)	0,404	0,002
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,302	0,062
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,295	0,077
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,266	0,026
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,286	0,033



Διάγραμμα 11: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h^{-1}) του Πίνακα 22 +/- τυπική απόκλιση για την *Lachancea*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

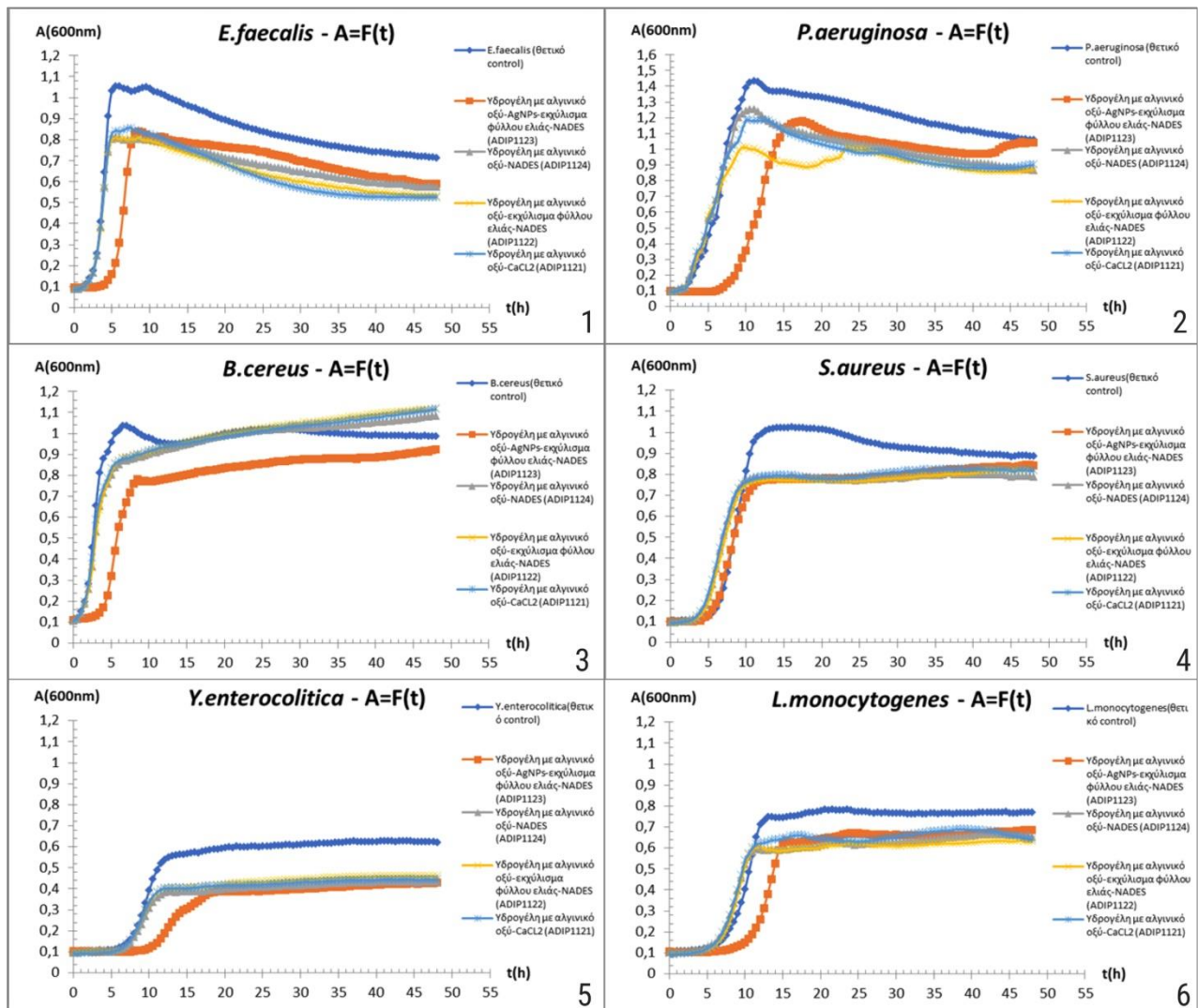
Οι παράμετροι που αναλύθηκαν εκτενώς στην προηγούμενη ενότητα, διαμόρφωσαν το Διάγραμμα 10 στο οποίο απεικονίζεται η μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Lachancea* από όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν. Η στήλη που αντιστοιχεί στην υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) εμφανίζει το χαμηλότερο ύψος και ακολουθεί με μειούμενη αντιμικροβιακή δράση η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124) και τέλος η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123). Επισημαίνεται ότι τα διαγράμματα της δεδομένης πειραματικής μελέτης προέκυψαν από διαφορετικά υπολογιστικά προγράμματα. Κατ' επέκταση η απεικόνιση της αντιμικροβιακής δράσης κατά την σύγκριση αυτών μπορεί να μην επαληθεύεται διαγραμματικά, αλλά να υφίσταται λόγω της αυξομείωσης πληθώρας παραμέτρων. Με βάση αυτό, στην προκειμένη ενότητα σχολιάζονται οι μεταβολές στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και όχι οι καμπύλες ανάπτυξης, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται οι παραπάνω στήλες, δικαιολογώντας έτσι την παρουσιαζόμενη μειωμένη δράση της υδρογέλης ADIP1123. Προβληματισμό επίσης, δημιουργεί και η μεγάλη τυπική απόκλιση στην περίπτωση των δειγμάτων ADIP1123 και ADIP1124. Αν και εντοπίζεται αυξημένη τυπική απόκλιση η μείωση των ρυθμών ανάπτυξης παραμένει στατιστικά σημαντική. Μεταβλητή ωστόσο ορίζεται η διαφορά σημαντικότητας για την αντιμικροβιακή δράση των συγκρινόμενων μεταξύ τους υδρογελών. Συνολικά, και τα τέσσερα δείγματα εμφάνισαν επαρκή ανασταλτική δράση έναντι της *Lachancea* αλλά η σύγκριση τους και κατ' επέκταση η κατάταξη τους με βάση την αντιμικροβιακή ισχύ, πρέπει να γίνει με επιφύλαξη, λόγω των αυξημένων τυπικών αποκλίσεων.



Διάγραμμα 12: Καμπύλες αντιμικροβιακής/ανασταλτικής δράσης των δειγμάτων υδρογελών για τους μικροοργανισμούς της 2^{ης} πειραματικής δοκιμής, ως γραφική παράσταση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm συναρτήσεως του χρόνου σε ώρες που δημιουργήθηκε μέσω του προγράμματος Excel 2010. 11.1: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), 11.2: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), 11.3: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122), 11.4: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121).

Συγκεφαλαιώνοντας, στο Διάγραμμα 11 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης για κάθε δείγμα υδρογέλης που χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη πειρατική δοκιμή, συναρτήσεως όλων των μικροοργανισμών στους οποίους το κάθε δείγμα έδρασε ανασταλτικά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει στο Διάγραμμα 11.1, όπου συγκριτικά με τα υπόλοιπα διαγράμματα, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) φαίνεται να προκαλεί την μεγαλύτερη συνολική αναστολή σε όλους τους μικροοργανισμούς που εφαρμόστηκε, παρουσιάζοντας αρκετά χαμηλές τιμές ανάπτυξης. Επίσης, άξιο παρατήρησης είναι το γεγονός της σταθερής μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης του *S.aureus* και από τα τέσσερα δείγματα υδρογέλης. Ενώ επισημαίνεται ότι, οι χαμηλοί ρυθμοί ανάπτυξης της *L.monocytogenes* και του *S.cerevisiae* είναι αποτέλεσμα τόσο της αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών όσο και της γενικότερης μειωμένης ανάπτυξης που εμφάνισαν τα συγκεκριμένα στελέχη λόγω ανεπαρκών συνθηκών καλλιέργειας και επώασης. Τέλος, αναφορικά με το βακτήριο της *E.coli*, πρέπει να σημειωθεί ότι παρόλο που φαίνεται να είναι το βακτήριο με την μικρότερη αναστολή ρυθμού ανάπτυξης, αυτό δεν ισχύει και μπορεί να επαληθευτεί με σύγκριση με τα αποτελέσματα του λογισμικού DMFit. Οι τιμές μειούμενης ανάπτυξης του κάθε στελέχους εξαρτώνται άμεσα από την αρχική ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

3.2.3. Αποτελέσματα 3^{ης} πειραματικής δοκιμής



Διάγραμμα 13: Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών 3^{ης} πειραματικής δοκιμής, ως γραφική παράσταση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm συναρτήσει του χρόνου σε ώρες, με τα δείγματα υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124, 12.1: *E. faecalis*, 12.2: *P. aeruginosa*, 12.3: *B. cereus*, 12.4: *S. aureus*, 12.5: *Y. enterocolitica*, 12.6: *L. monocytogenes*.

Με βάση το παραπάνω συνολικό διάγραμμα με τιμές απορρόφησης/οπτικής πυκνότητας κατά την πραγματοποίηση της τεχνικής Bioscreen C στο σύστημα Excel 2010, εκ πρώτης όψης παρατηρείται ότι τα περισσότερα δείγματα υδρογελών άσκησαν αντιμικροβιακή δράση στη συγκεκριμένη ομάδα βακτηρίων που επιλέχθηκε. Αναλυτικότερα, στο διάγραμμα 12.1 παρατηρείται μείωση της ανάπτυξης του *E. faecalis* και από τα τέσσερα δείγματα υδρογελών, με την καμπύλη της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) να παρουσιάζει μεγαλύτερη φάση προσαρμογής και εκθετική φάση με μικρότερη κλίση από αυτήν της καμπύλης του θετικού control. Καμπύλες με χαμηλότερο ύψος εκθετικής φάσης ανάπτυξης εμφανίζουν επίσης οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), γεγονός που

συνηγορεί την πιθανή ανασταλτική δράση αυτών προς το βακτήριο. Στην συνέχεια, στο διάγραμμα 12.2 απεικονίζεται η ισχυρή δράση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) έναντι του στελέχους *P.aeruginosa*, μέσω της μεγάλης αύξησης του χρόνου προσαρμογής και της μειούμενης κλίσης καμπύλης στην λογαριθμική/εκθετική φάση ανάπτυξης, σε σχέση με την καμπύλη του θετικού control. Επιπλέον, οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), ανέστειλαν επίσης την ανάπτυξη του βακτηρίου, αφού παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση μικροβιακού πληθυσμού εκφρασμένου σε CFU (Colony Forming Units) και τις τρεις καμπύλες ανάπτυξης. Θετικό αποτέλεσμα αντιμικροβιακής δράσης επίσης δημιουργήθηκε και από τις τέσσερις υδρογέλες έναντι του σπορογόνου στελέχους *B.cereus*. Στο διάγραμμα 12.3 παρατηρείται μειωμένη κλίση της εκθετικής φάσης για τις καμπύλες και των τεσσάρων δειγμάτων ενώ επιπλέον η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) εμφανίζει ξανά μεγαλύτερη lag phase από το θετικό control του μικροοργανισμού. Ακολούθως, αυξημένη αντιμικροβιακή ικανότητα των υδρογελών παρουσιάζεται και στο διάγραμμα 12.4 αναφορικά με τον *S.aureus*. Η αναστολή δράσης εντοπίζεται πιο έντονα από την υδρογέλη ADIP1123, η οποία οδήγησε στην δημιουργία μεγαλύτερης φάσης προσαρμογής και μικρότερης κλίσης λογαριθμικής φάσης. Οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) παρουσίασαν ηπιότερη αντιμικροβιακή δράση για το βακτήριο, εμφανίζοντας καμπύλες με εκθετικές φάσεις μικρότερης κλίσης από αυτή της καμπύλης του θετικού control. Στην περίπτωση της *Y.enterocolitica* και της *L.monocytogenes* εντοπίζεται αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων αλλά και μειωμένη ανάπτυξη του συνολικού πληθυσμού, γεγονός που εκθέτει την πιθανότητα καλλιέργειας των μικροοργανισμών υπό μη επαρκείς συνθήκες επώασης. Η μείωση της ανάπτυξης στα διαγράμματα 12.5 και 12.6 οφείλεται στην αύξηση του χρόνου της lag phase στην περίπτωση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123). Στην περίπτωση των υπόλοιπων υδρογελών η μειούμενη ανάπτυξη είναι αποτέλεσμα έναρξης και λήξης της εκθετικής φάσης σε χαμηλότερο σημείο, ενώ και για τα τέσσερα δείγματα παρουσιάζονται χαμηλότερες πληθυσμιακά στατικές φάσεις.

3.2.3.21. *Enterococcus faecalis*

Πίνακας 24: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι του *E.faecalis*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μmax)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R ²)
<i>E.faecalis</i> (θετικό control)	0,0003	-	1,057	-
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,279	4,738	0,838	0,866
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,000	-	0,813	-
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	-0,001	-	0,810	-
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	-0,002	-	0,856	0,013

Με βάση τον παραπάνω πίνακα το βακτηριακό στέλεχος του *E.faecalis* αναπτύχθηκε με μη αναμενόμενο τρόπο, που συνιστά επανάληψη της δοκιμής. Επακριβώς, παρατηρούνται τιμές μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης κοντά στο μηδέν, με ορισμένες από αυτές να είναι ακόμη και αρνητικές. Η καμπύλη του θετικού control εμφάνισε σχεδόν μηδενικό ρυθμό ανάπτυξης ο οποίος σαφώς προέκυψε λόγω πειραματικού σφάλματος. Η δράση του *E.faecalis* αναστάληκε πιθανόν λόγω σταγονιδίων αντιμικροβιακών δειγμάτων υδρογελών, τα οποία μεταφέρθηκαν στο φρεάτιο κατά την πλήρωση των κυψελίδων του Bioscreen C. Μία άλλη εκδοχή θα μπορούσε να είναι η μη επίτευξη λογαριθμικού πληθυσμού του μικροβίου, κατά την διενέργεια των φάσεων ανακαλλιέργειας, λόγω δυσμενών συνθηκών επώασης. Γενικότερα, οι αρνητικές τιμές μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης συναντώνται συχνά σε πειραματικά αποτελέσματα και είναι συνέπεια της διαταραχής ανάπτυξης των βακτηρίων. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν τα βακτήρια αλληλεπιδρούν με αντιβιοτικά ή οι αντιμικροβιακές ουσίες που προκαλούν θάνατο ή μείωση των βακτηρίων με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο αυτό δεν ισχύει στη δεδομένη περίπτωση, αφού και μέσω του λογισμικού DMFit, πολλοί παράμετροι που υπολογίστηκαν εμφάνισαν τυπικό σφάλμα > 200 %. Το γεγονός αυτό εξηγεί και την απουσία τιμών συντελεστή συσχέτισης προσαρμογής (R²), ο οποίος δεν μπορεί να οριστεί καθόλου για ορισμένα δείγματα, λόγω του αυξημένου τυπικού σφάλματος. Στο διάγραμμα 12.1 που προέκυψε από το υπολογιστικό σύστημα Excel 2010 η αντιμικροβιακή δράση και ανάπτυξη των καμπυλών είναι ξεκάθαρη, αλλά τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν με αυτά του προγράμματος DMFit και λόγω της αυξημένης

αναξιοπιστίας δεν θα παρουσιαστεί το αντίστοιχο γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης του βακτηρίου.

3.2.3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Πίνακας 25: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι της *P.aeruginosa*.

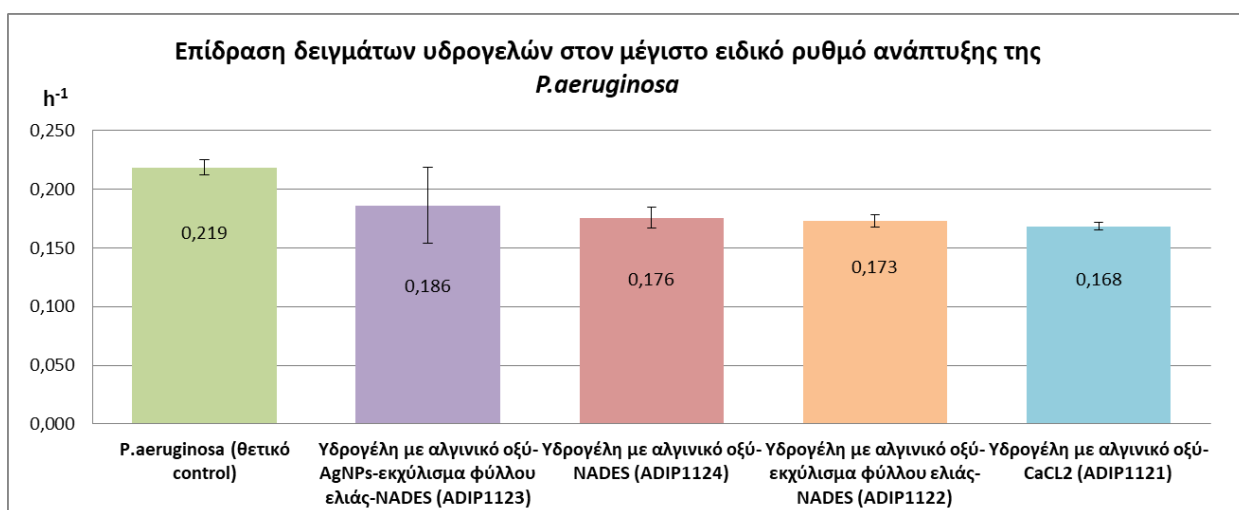
ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μmax)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R ²)
<i>P.aeruginosa</i> (θετικό control)	0,219	2,603	1,430	0,902
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,186	8,690	1,178	0,981
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,176	1,591	1,253	0,858
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,173	1,459	1,011	0,955
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,168	1,502	1,185	0,872

Οι παραπάνω παράμετροι παρουσιάζουν αναλυτικά την θετική επίδραση των τεσσάρων υδρογελών στο βακτήριο της *P.aeruginosa*. Ειδικότερα, παρατηρείται ήπια μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του στελέχους με την χρήση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) αλλά τετραπλασιασμός της διάρκειας της φάσης εφαρμογής, με αποτέλεσμα να αιτιολογείται η διακριτή αναστολής δράσης από το συγκεκριμένο δείγμα, η οποία επίσης παρουσιάζεται χαρακτηριστικά στο Διάγραμμα 12.2. Οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) έδρασαν επίσης ανασταλτικά έναντι του μικροοργανισμού, εμφανίζοντας μικρότερους μέγιστους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης από την υδρογέλη ADIP1123. Αναφορικά με τα lag phase των καμπυλών, στα δείγματα ADIP1121, ADIP1122 και ADIP114 δεν εντοπίζεται αύξηση διάρκειας της φάσης προσαρμογής. Συμπληρωματικά, η μέγιστη πυκνότητα μικροβιακού πληθυσμού μειώνεται σημαντικά με την χρήση και των τεσσάρων υδρογελών, ενώ ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R²) είναι υψηλός και αξιόπιστος για την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) και την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) Στην περίπτωση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124) και της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), ο συντελεστής έλαβε χαμηλότερες τιμές εκφράζοντας ακολούθως αναξιοπιστία για τα αντιμικροβιακά αποτελέσματα

της δοκιμής. Τέλος, επισημαίνεται ότι μία τιμή μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *P.aeruginosa*, που είναι αποτέλεσμα δράσης της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) απορρίφθηκε. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο αντί για τρεις πειραματικές τιμές για να οριστεί ο μέσος όρος μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης αλλά και η τυπική απόκλιση των συγκεκριμένων μέσων όρων. Πρέπει να αναφερθεί ότι η αρχική τυπική απόκλιση για τα αποτελέσματα των τριών φρεατίων ήταν ιδιαίτερα υψηλή, λόγω μειωμένης ανάπτυξης του βακτηρίου στο ένα φρεάτιο, ως αποτέλεσμα αναστολής της δράσης του μικροοργανισμού από ουσίες με τις οποίες πληρώθηκαν τα γειτονικά φρεατία. Η επιλογή αυτή ακολουθήθηκε προκειμένου να γίνει πιο εξειδικευμένο το αποτέλεσμα αντιμικροβιακής δράσης του δείγματος υδρογέλης ADIP1122.

Πίνακας 26: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής έναντι της *P.aeruginosa*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>P.aeruginosa</i> (θετικό control)	0,219	0,006
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,186	0,032
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,176	0,009
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,173	0,005
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,168	0,003



Διάγραμμα 14: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h⁻¹) του Πίνακα 26 +/- τυπική απόκλιση για την *P.aeruginosa*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Τα δεδομένα του Πίνακα 26 χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του διαγράμματος 14, με βάση το οποίο και οι τέσσερις υδρογέλες, διαμόρφωσαν χαμηλότερους μέγιστους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης συγκριτικά με την στήλη μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του θετικού control. Μεγαλύτερη μείωση στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης προσέδωσαν κατά σειρά οι υδρογέλες ADIP1121, ADIP1122, ADIP1124 και ADIP1123. Η δεδομένη σειρά ανασταλτική δράσης μπορεί παρόλα αυτά να διαμορφωθεί διαφορετικά καθώς αυξημένη τιμή τυπικής απόκλισης παρουσιάζεται στην περίπτωση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), μειώνοντας την διαφορά σημαντικότητας για το συγκεκριμένο δείγμα. Σε αυτή την περίπτωση προτείνεται επανάληψη της δοκιμής για την λήψη πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Συνολικά, οι υδρογέλες ADIP1121, ADIP1122, ADIP1124 και ADIP1123 έδρασαν αποτελεσματικά έναντι της *P.aeruginosa*, με την ισχύ τους να μειώνεται από την πρώτη προς την τελευταία, αντίστοιχα.

3.2.3.3. *Bacillus cereus*

Πίνακας 27: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι του *B.cereus*.

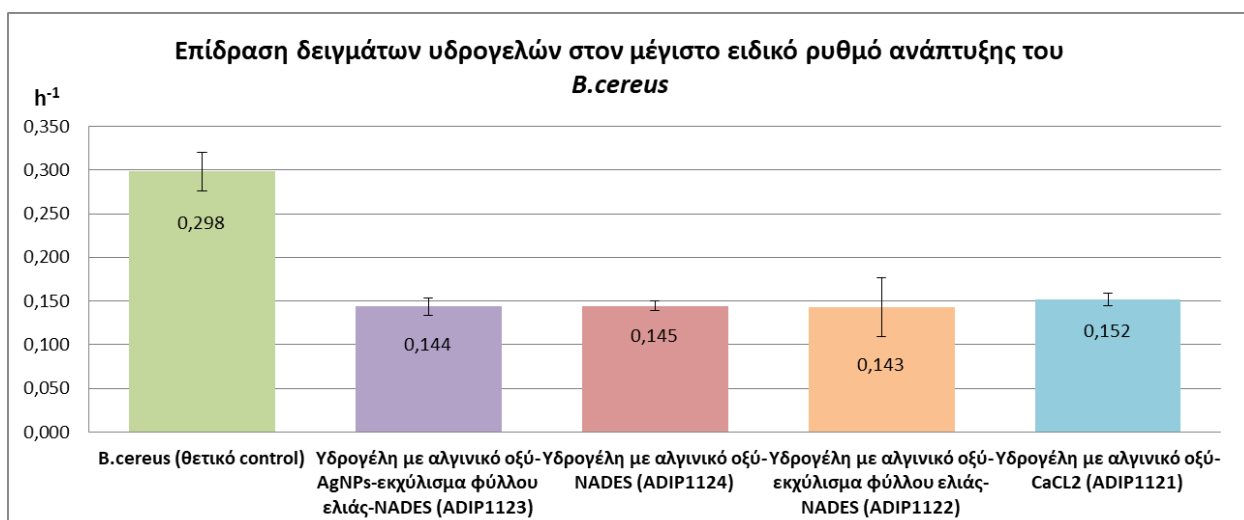
ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max})	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2)
<i>B.cereus</i> (θετικό control)	0,298	0,924	1,035	0,980
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,144	2,672	0,923	0,963
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,145	-	1,079	0,930
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,143	-	1,115	0,916
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,152	-	1,114	0,913

Με βάση τον παραπάνω πίνακα εντοπίζεται ανασταλτική δράση από τα τέσσερα δείγματα υδρογελών προς το βακτήριο *B.cereus*. Αναλυτικότερα, σε γενικές γραμμές παρουσιάζεται υποδιπλασιασμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού με την εφαρμογή των δειγμάτων ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124, τα οποία εμφάνισαν παρόμοια ισχύ δράσης. Στην περίπτωση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) παρατηρείται ανάπτυξη μεγαλύτερης διάρκειας φάσης

προσαρμογής συγκριτικά με την καμπύλη του θετικού control, η οποία εκλείπει από τα υπόλοιπα αντιμικροβιακά δείγματα. Επιπρόσθετα, το μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων εμφάνισε επίσης μεγαλύτερη μείωση για την υδρογέλη ADIP1123 σε σχέση με τις υπόλοιπες. Οι παράμετροι που σχολιάστηκαν μπορούν να χαρακτηριστούν από υψηλή αξιοπιστία και εγκυρότητα, καθώς ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2) έλαβε τιμές που πλησιάζουν την μονάδα.

Πίνακας 28: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 3^{ης} πειραματικής δοκιμής έναντι του *B.cereus*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>B.cereus</i> (θετικό control)	0,298	0,02
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,144	0,01
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,145	0,01
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,143	0,03
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,152	0,01



Διάγραμμα 15: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h⁻¹) του Πίνακα 28 +/- τυπική απόκλιση για τον *B.cereus*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 28 δημιουργήθηκε το παραπάνω διάγραμμα, το οποίο απεικονίζει την ανασταλτική δράση των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124 προς τον *B.cereus*. Όλες οι απεικονιζόμενες στήλες βρίσκονται σε χαμηλότερο ύψος από την στήλη του θετικού control, μειώνοντας κατ' επέκταση τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου σε ίδιο βαθμό. Αξιόλογο κρίνεται επίσης ότι σε όλες τις περιπτώσεις που μελετώνται σε αυτό το διάγραμμα, η τυπική απόκλιση των δειγμάτων δεν προκαλεί επικάλυψη με τις τιμές μέγιστου

ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του αντίστοιχου θετικού control και συνεπώς η μείωση είναι στατιστικά σημαντική. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι η τυπική απόκλιση του μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης εμφανίζεται μεγάλη στην περίπτωση της υδρογέλης ADIP1122. Αυτή η επισήμανση δεν μπορεί ωστόσο να αμφισβητήσει την αντιμικροβιακή δράση που εμφανίζει το δείγμα, αλλά μόνο να μειώσει την διαφορά σημαντικότητας μεταξύ αυτού και των υπόλοιπων δειγμάτων που ελέγχθηκαν, αναφορικά με την ισχύ ανασταλτικής δράσης. Συμπερασματικά, οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση παρεμφερούς ισχύς έναντι του *B.cereus*.

3.2.3.4. *Staphylococcus aureus*

Πίνακας 29: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι του *S.aureus*.

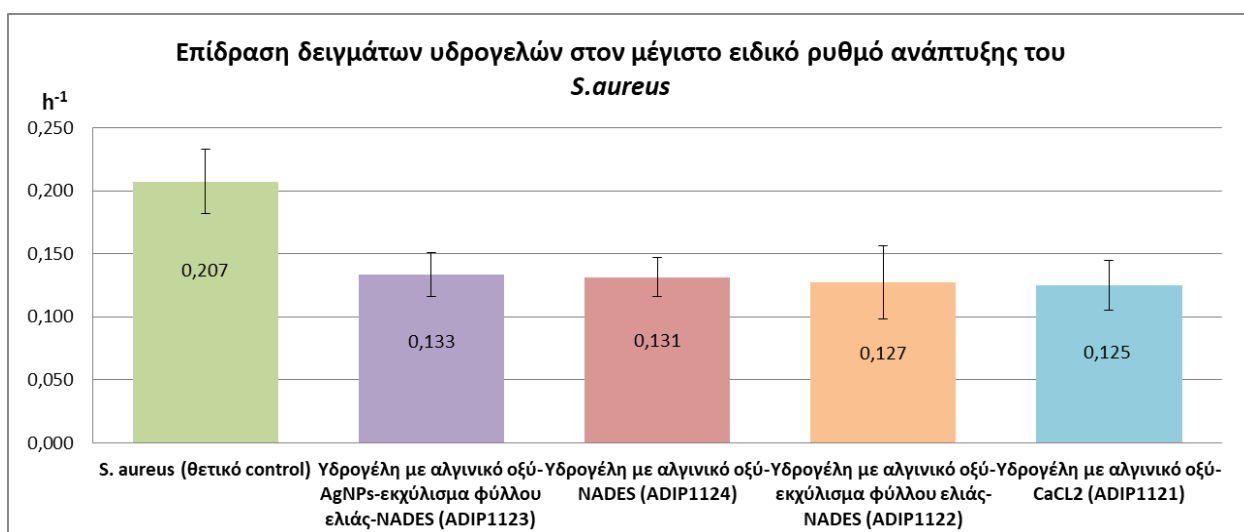
ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ _{max})	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R ²)
<i>S.aureus</i> (θετικό control)	0,207	6,454	1,022	0,979
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,133	5,458	0,846	0,992
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,131	3,277	0,803	0,989
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,127	3,388	0,821	0,984
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,125	2,988	0,827	0,986

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι παράμετροι με βάση τις οποίες εξαγεται το συμπέρασμα ότι και τα τέσσερα δείγματα υδρογελών εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S.aureus*. Αναφορικά, παρατηρείται μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού με την εφαρμογή των δειγμάτων υδρογελών ADIP1123, ADIP1124, ADIP1122 και ADIP1121, τα οποία εμφάνισαν αυξανόμενη ισχύ με βάση την σειρά που αναφέρονται. Επιπλέον, όλες οι καμπύλες παρουσίασαν ευρεία φάση προσαρμογής η οποία όμως ήταν μικρότερης διάρκειας από αυτή του θετικού control, με αποτέλεσμα η αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων να μην εξαρτάται από την lag phase. Η δράση αναστολής που αναφέρθηκε,

οφείλεται στην μερική μείωση του μέγιστου επίπεδου πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων για όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη το γεγονός ότι ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R^2) είναι υψηλός για όλες τα πειραματικά αποτελέσματα, εκφράζοντας εγκυρότητα και αξιοπιστία.

Πίνακας 30: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής έναντι του *S. aureus*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>S. aureus</i> (θετικό control)	0,207	0,03
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,133	0,02
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,131	0,02
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,127	0,03
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,125	0,02



Διάγραμμα 16: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h^{-1}) του Πίνακα 30 +/- τυπική απόκλιση για τον *S. aureus*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Με βάση το Διάγραμμα 16, επιβεβαιώνεται διαγραμματικά η αντιμικροβιακή δράση των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124 προς τον *S. aureus*. Κάθε στήλη που αντιστοιχεί σε ελεγχόμενο δείγμα υδρογέλης έχει χαμηλότερο ύψος από την στήλη του θετικού control. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του θετικού control και όλων των υπόλοιπων δειγμάτων, γεγονός που υποδηλώνει αντιμικροβιακή δράση των υδρογελών έναντι του *S. aureus*. Παρά το χαμηλό ύψος των στηλών, παρατηρούνται επικαλύψεις των στηλών των δειγμάτων, συνηγορώντας μη σημαντική στατιστική διαφορά στην

μεταξύ τους ανασταλτική ισχύ. Συγκεφαλαιώνοντας, οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) παρουσίασαν επαρκή αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S.aureus*.

3.2.3.5. *Yersinia enterocolitica*

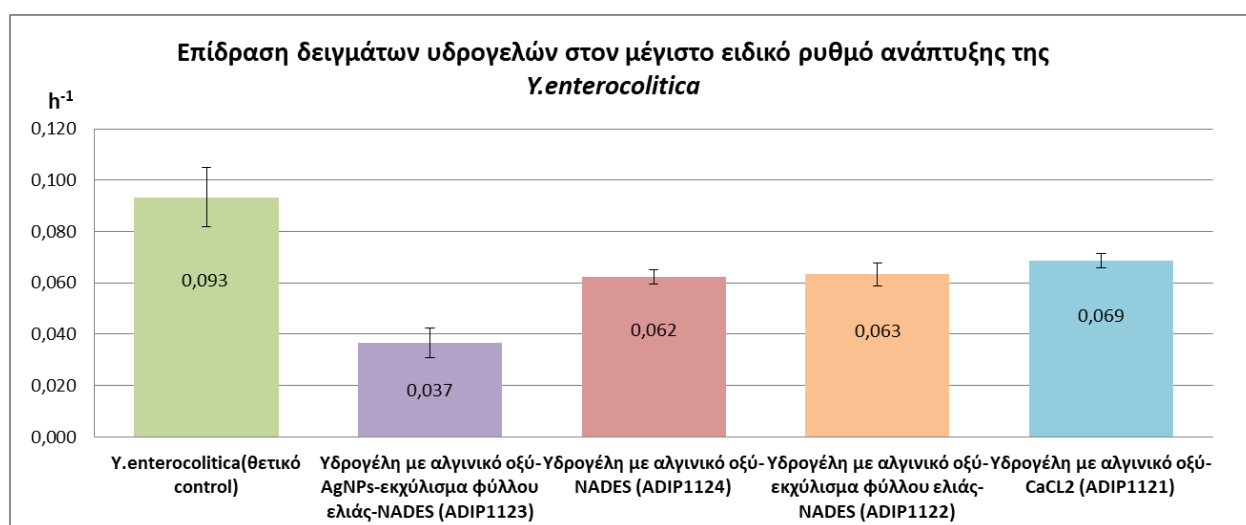
Πίνακας 31: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι της *Y.enterocolitica*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μmax)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R ²)
<i>Y.enterocolitica</i> (θετικό control)	0,093	7,109	0,625	0,992
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,037	9,502	0,428	0,991
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,062	6,896	0,431	0,985
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,063	6,538	0,460	0,982
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,069	6,651	0,447	0,989

Με βάση τις παραμέτρους του ανωτέρω πίνακα εντοπίζεται επαρκής αντιμικροβιακή δράση των τεσσάρων δειγμάτων υδρογελών έναντι της *Y.enterocolitica*. Επακριβώς, παρατηρείται μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μικροβιακού στελέχους κυρίως με την εφαρμογή της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), η οποία επίσης παρουσιάζει αυξημένη lag phase, συγκριτικά πάντα με το θετικό control. Οι υδρογέλες ADIP1124, ADIP1122 και ADIP1121 ανέστειλαν επίσης την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, εμφανίζοντας μειωμένο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης αλλά όχι αυξημένη διάρκεια φάσης προσαρμογής. Ακόμη, μείωση παρατηρείται στις τιμές του μέγιστου επιπέδου πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων για όλες τις υδρογέλες που ελέγχθηκαν. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η συσχέτιση προσαρμογής ήταν εξαιρετική για όλα τα αποτελέσματα, με τον συντελεστή συσχέτισης προσαρμογής (R²) να λαμβάνει υψηλές τιμές.

Πίνακας 32: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής έναντι της *Y. enterocolitica*

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>Y. enterocolitica</i> (θετικό control)	0,093	0,012
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,037	0,006
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,062	0,003
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,063	0,005
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,069	0,003



Διάγραμμα 17: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h⁻¹) του Πίνακα 32 +/- τυπική απόκλιση για την *Y. enterocolitica*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Στο Διάγραμμα 17, γίνεται ακριβής απεικόνιση της ανασταλτικής δράσης των δειγμάτων προς την *Y. enterocolitica*. Όλες οι στήλες των δειγμάτων υδρογελών που ελέγχθηκαν έχουν χαμηλότερο ύψος από την στήλη του θετικού control. Οι επικαλύψεις που προκύπτουν από τις μπάρες τυπικών αποκλίσεων, είναι σημαντικές μόνο στην περίπτωση επικάλυψης της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124) και της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122). Η συγκεκριμένη τιμή τυπικής απόκλισης μειώνει την διαφορά σημαντικότητας ισχύς των συγκρινόμενων δειγμάτων και συνεπώς προτείνεται επανάληψη της δοκιμής για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Συνολικά η μείωση των ρυθμών ανάπτυξης χαρακτηρίζεται στατιστικά σημαντική, με υψηλότερη ανασταλτική δράση να παρουσιάζει η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) και να ακολουθούν κατά σειρά μειούμενης ισχύς οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121).

3.2.3.6. *Listeria monocytogenes*

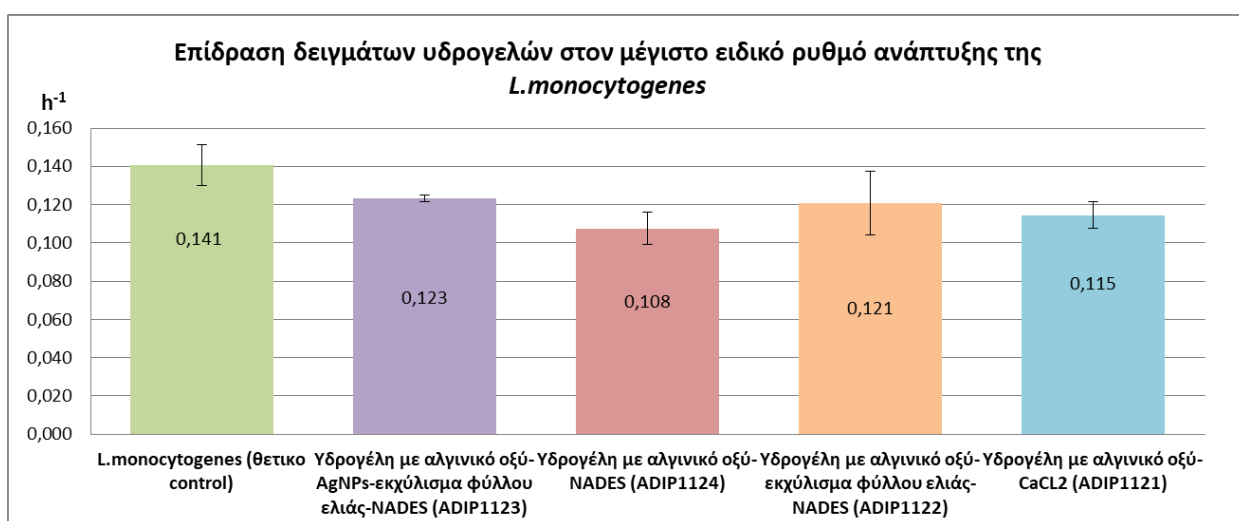
Πίνακας 33: Αποτελέσματα μεθόδου DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής, για τις δοκιμές αντιμικροβιακής ικανότητας έναντι της *L.monocytogenes*.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ			
	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μmax)	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (lag phase)	Μέγιστο επίπεδο πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων	Συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R ²)
<i>L.monocytogenes</i> (θετικό control)	0,141	7,803	0,781	0,998
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,123	10,706	0,686	0,997
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,108	6,295	0,663	0,988
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,127	6,836	0,636	0,995
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,115	6,359	0,690	0,992

Ο Πίνακας 33 παρουσιάζει τις αριθμητικές παραμέτρους που δικαιολογούν την αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων υδρογελών προς την ανάπτυξη της *L.monocytogenes*. Αναφορικά με αυτό, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) συνέβαλε στην μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μικροβίου, στην δημιουργία εκτενέστερης φάσης προσαρμογής αλλά και στην μείωση του μέγιστου επιπέδου πληθυσμού μικροβίων. Αντίστοιχα, οι υδρογέλες ADIP1124, ADIP1122 και ADIP1121 ανέστειλαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, εμφανίζοντας χαμηλότερη τιμή μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και μέγιστου πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων αλλά όχι μεγαλύτερη διάρκεια φάσης προσαρμογής συγκριτικά με το θετικό control. Επισημαίνεται, ότι μεγαλύτερη μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *L.monocytogenes* επέφερε η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124). Ενώ, σημαντικές θεωρούνται οι υψηλές τιμές που λαμβάνει ο συντελεστής συσχέτισης προσαρμογής (R²), εκφράζοντας αξιοπιστία για τα τελικά αποτελέσματα.

Πίνακας 34: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα DMFit 3^{ns} πειραματικής δοκιμής έναντι της *L.monocytogenes*.

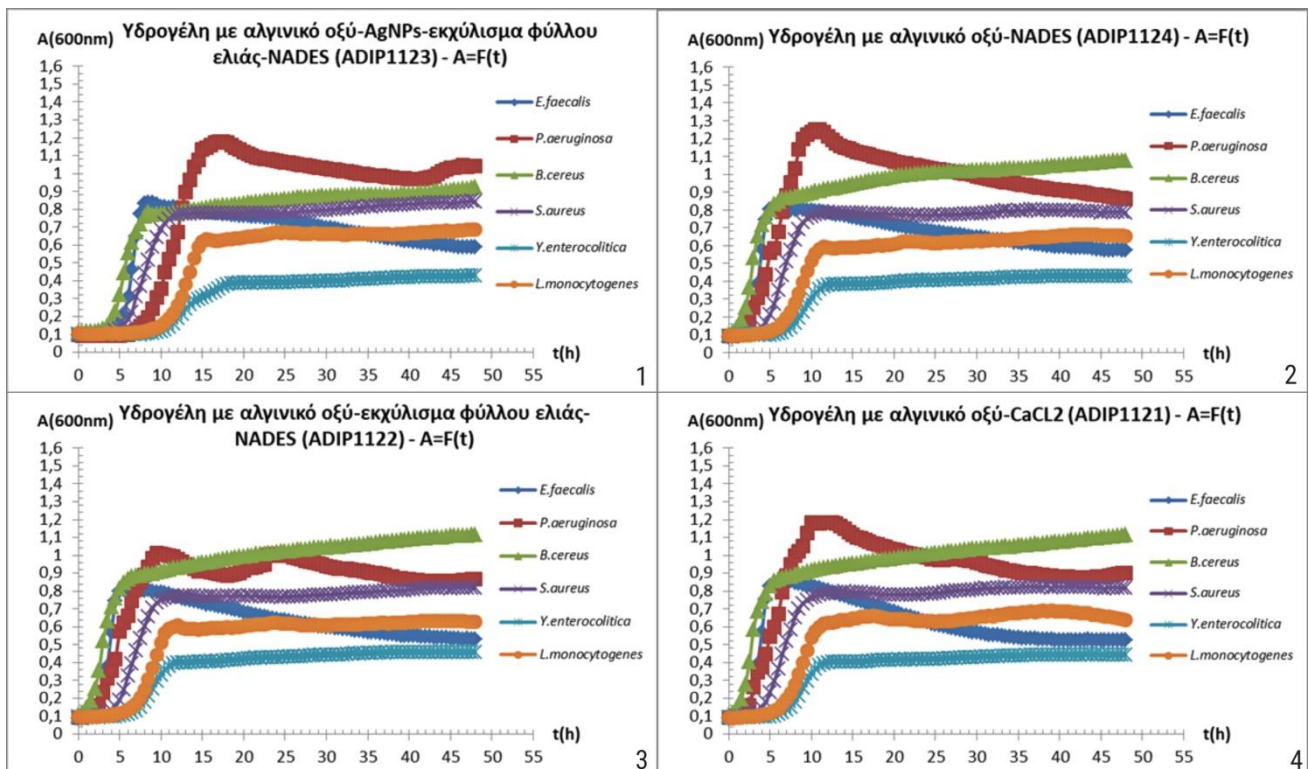
ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
<i>L.monocytogenes</i> (θετικό control)	0,141	0,011
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123)	0,123	0,002
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124)	0,108	0,009
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122)	0,121	0,017
Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (ADIP1121)	0,115	0,007



Διάγραμμα 18: Γράφημα στηλών μέσου όρου των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης (h⁻¹) του Πίνακα 34 +/- τυπική απόκλιση για την *L.monocytogenes*, αναφορικά με την μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η ανασταλτική δράση των δειγμάτων υδρογέλης έναντι του ρυθμού ανάπτυξης της *L.monocytogenes*. Είναι εμφανές ότι οι ρυθμοί ανάπτυξης των δειγμάτων απεικονίζονται με στήλες χαμηλότερου ύψους από την στήλη του θετικού control, με την υδρογέλη ADIP1124 να παρουσιάζει την μεγαλύτερη αναστολή δράσης. Στην συνέχεια ότι στην περίπτωση της στήλης της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, καθώς υφίσταται επικάλυψη της με την στήλη του θετικού control. Οι μειώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα υδρογελών χαρακτηρίζονται στατιστικά σημαντικές. Συμπερασματικά, υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση προς την *L.monocytogenes* παρουσίασε η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), έπειτα η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) και η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123). Η δράση της υδρογέλης με

αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) αμφισβητείται και επί αυτού προτείνεται η επανάληψη της πειραματικής δοκιμής, για λήψη πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων.



Διάγραμμα 19: Καμπύλες αντιμικροβιακής/ανασταλτικής δράσης των δειγμάτων υδρογελών για τους μικροοργανισμούς της 3^{ης} πειραματικής δοκιμής, ως γραφική παράσταση της οπτικής πυκνότητας στα 600nm συναρτήσει του χρόνου σε ώρες που δημιουργήθηκε μέσω του προγράμματος Excel 2010. 19.1: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), 19.2: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), 19.3: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122), 19.4: Υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121).

Το Διάγραμμα 19 αποτελεί μία συνολική απεικόνιση της επίδρασης των τεσσάρων υδρογελών στους ρυθμούς ανάπτυξης των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην δεδομένη πειραματική δοκιμή. Άξιο αναφοράς είναι το αποτέλεσμα δράσης της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) έναντι του *B.cereus*, δημιουργώντας αυξημένη μείωση ρυθμού ανάπτυξης αυτού σε σχέση πάντα με την εφαρμογή των υπόλοιπων υδρογελών. Επίσης για μία ακόμη φορά, εντοπίζεται σταθερή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του *S.aureus* αλλά και της *Y.enterocolitica* και από τα τέσσερα δείγματα υδρογέλης. Ενώ, η ανάπτυξη του στελέχους της *P.aeruginosa* αναστάληκε καλύτερα από την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122). Τέλος, υπενθυμίζεται ότι οι τιμές ρυθμού ανάπτυξης και επομένως οι καμπύλες ανάπτυξης του *E.faecalis* δεν είναι αξιόπιστες, για αυτό και δεν μπορεί να σχολιαστεί η δράση των δειγμάτων υδρογελών προς το συγκεκριμένο μικροβιακό στέλεχος.

Συγκεφαλαιώνοντας, κατά την πραγματοποίηση των επιμέρους πειραματικών δοκιμών που αναλύθηκαν στην δεδομένη ενότητα προέκυψαν ορισμένες παρατηρήσεις. Υπό αυτό το πρίσμα, στις αντιμικροβιακές δοκιμές διάχυσης φρεατίου σε άγαρ και διάχυσης δίσκου σε άγαρ δημιουργήθηκαν προβλήματα τόσο με το θρεπτικό υπόστρωμα PCA αλλά και με τους διαλύτες αραίωσης των αιθέριων ελαίων και εκχυλισμάτων. Ειδικότερα, στην 2^η πειραματική δοκιμή, το υπόστρωμα των τρυβλίων (PCA) αφυδατώθηκε, εμφάνισε ρωγμές και έσπασε σε ορισμένα σημεία, καθώς αυτά παρέμειναν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε συνθήκες επώασης 37°C. Αποτέλεσμα αυτού ήταν να μην είναι εφικτή η μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης στα πηγάδια που εμφάνισαν ρωγμές, κυρίως στα τρυβλία του *S.aureus*. Επιπλέον, μέρος των υγρών δειγμάτων των αιθέριων ελαίων πορτοκαλιού περγαμόντο που αραιώθηκαν με προσθήκη οργανικού διαλύτη DMSO 1%, εξατμίστηκε κατά την συντήρηση των Eppendorf στην ψύξη. Για αυτό τον λόγο συνίσταται η χρήση Parafilm σε όλα τα δοχεία συντήρησης και αποθήκευσης διαλυμάτων με οργανικούς διαλύτες. Επιπρόσθετα, για τα δείγματα υδρογελών που χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεκριμένες αντιμικροβιακές μεθόδους απαιτούνταν πολύ καλή ανάδευση και ομογενοποίηση αυτών, προκειμένου να αντιμετωπιστεί η δημιουργία πηκτωμάτων. Η παρουσία πηκτωμάτων έκανε εξαιρετικά δύσκολη την πλήρωση των φρεατίων με τα υλικά της υδρογέλης, αφού αυτά δεν μπορούσαν να εισέλθουν και να εξέλθουν από τα τσιπς των πιπετών.

Ακολούθως, στην περίπτωση εφαρμογής της αντιμικροβιακής τεχνικής του Bioscreen C, πρέπει να γίνουν επίσης κάποιες παρατηρήσεις. Με βάση αυτό, κατά την διεξαγωγή της τεχνικής πρέπει να διενεργείται με ιδιαίτερη προσοχή και ακρίβεια η πλήρωση των φρεατίων, προκειμένου να μην γίνει επιμόλυνση των γειτονικών φρεατίων από σταγονίδια άλλων αντιδραστηρίων ή δειγμάτων, τα οποία μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των μικροβιακών στελεχών, όπως συνέβη και σε ορισμένα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επιπλέον, υπενθυμίζεται η ανάγκη διεξαγωγής δύο σταδίων ανακαλλιέργειας για το βακτήριο της *L.monocytogenes*, το οποίο εμφάνισε μειωμένη ανάπτυξη σχεδόν σε όλες τις δοκιμές.

4. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα που συζητήθηκαν εκτενώς στην ανωτέρω ενότητα, απέδειξαν την αντιμικροβιακή ικανότητα των υπό μελέτη δειγμάτων και οδήγησαν σε κάποια αξιοσημείωτα συμπεράσματα που παρουσιάζονται ακολούθως. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των δοκιμών αντιμικροβιακής ικανότητας, από τις αντιμικροβιακές δοκιμές διάχυσης φρεατίου σε άγαρ και διάχυσης δίσκου σε άγαρ, προέκυψαν αποτελέσματα που αξίζει να σχολιαστούν. Συνολικά, μεγαλύτερη αντιμικροβιακή απόδοση εμφάνισαν το εκχύλισμα φύλλου ελιάς, με χαρακτηριστικές ευρείες ζώνες αναστολής έναντι της *E.coli*, το αιθέριο έλαιο πράσινου περγαμόντο (ADIP075) έναντι των βακτηριακών στελεχών *E.coli*, *S.aureus* και *L.monocytogenes* σε αντίθεση με το αιθέριο έλαιο πορτοκάλι/περγαμόντο (ADIP076) που εμφάνισε ζώνες αναστολής < 10 mm έναντι μόνο των βακτηρίων *S.aureus* και *S.typhimurium*. Ακολούθως, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH και το εκχύλισμα *Vanilla tahitensis*/EtOH εμφάνισαν και τα δύο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι σε όλους τους μικροοργανισμούς που εφαρμόστηκαν, ενώ το εκχύλισμα *Vanilla abs*/EtOH εμφάνισε περιορισμένη δράση μόνο στα βακτήρια *S.aureus*, *S.typhimurium* και *L.monocytogenes*. Ειδικότερα, το εκχύλισμα *Vanilla planifolia*/EtOH 75% v/v εμφάνισε ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε σχέση με το ίδιο εκχύλισμα σε συγκέντρωση 50% v/v. Τέλος, μεταξύ των δειγμάτων υδρογελών που αξιολογήθηκαν, η υδρογέλη μέντας (ADIP992) παρουσίασε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση στα στελέχη των *E.coli* και *S.aureus*, η υδρογέλη control (ADIP993) με μικρότερης διαμέτρου ζώνες έδρασε ανασταλτικά για τα στελέχη *S.aureus* και *S.cerevisiae*, ενώ οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122), με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) και με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124) ανέπτυξαν ζώνες αναστολής < 10 mm, στα τρυβλία της *E.coli*, αποτέλεσμα που τις κατέταξε στην κατώτερη θέση ισχύς αντιμικροβιακής δράσης, συγκριτικά με όλα τα δείγματα υδρογελών που ελέγχθηκαν με την συγκεκριμένη αντιμικροβιακή τεχνική.

Αναφορικά με την διεξαγωγή των τριών πειραματικών δοκιμών του Bioscreen C, προέκυψαν σημαντικά στοιχεία, στα οποία απαιτείται περαιτέρω εμβάθυνση. Στην περίπτωση της ομάδας Gram- βακτηρίων και ειδικότερα στην δοκιμή της *E.coli*, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) είναι πιο δραστική από την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και την υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), ενώ μικρότερη ανασταλτική δράση από όλες εμφάνισε η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124). Ακολούθως για το βακτηριακό στέλεχος της *S.typhimurium*, οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-

CaCl₂ (ADIP1121) άσκησαν υψηλή και αντίστοιχα ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηρίου *S.typhimurium*, με τα ισχυρά αντιμικροβιακά αποτελέσματα της υδρογέλης ADIP1123 να απαιτούν επιβεβαίωση με επανάληψη της δοκιμής. Αντίστοιχα, μεγαλύτερη μείωση στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης της *L.monocytogenes* προσέδωσαν οι υδρογέλες ADIP1123 και ADIP1124, ενώ οι υδρογέλες ADIP1121 και ADIP1122 άσκησαν αντιμικροβιακή αλλά ηπιότερη δράση. Επιπρόσθετα, κατά την δεύτερη πειραματική δοκιμή, υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση προς την *L.monocytogenes* παρουσίασε η υδρογέλη ADIP1124, έπειτα ADIP1121 και η υδρογέλη ADIP1123, με την δράση της υδρογέλης με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) να αμφισβητείται και επί αυτού προτείνεται η επανάληψη της πειραματικής δοκιμής, για λήψη πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Στην συνέχεια, οι υδρογέλες ADIP1121, ADIP1122, ADIP1124 και ADIP1123 έδρασαν εξίσου αποτελεσματικά έναντι της *P.aeruginosa*, με την ισχύ τους να μειώνεται από την πρώτη προς την τελευταία, αντίστοιχα. Συγκεφαλαιώνοντας, στην περίπτωση του στελέχους της *Y.enterocolitica* υψηλότερη ανασταλτική δράση παρουσίασε η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) και ακολουθούν κατά σειρά μειούμενης ισχύς οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121).

Στο παραπάνω πλαίσιο παρατηρήσεων, πρέπει να αναφερθεί η επαναληψιμότητα των θετικών αντιμικροβιακών δοκιμών των δειγμάτων που μελετήθηκαν, έναντι των Gram+ βακτηρίων του *S.aureus*, ο οποίος σε όλες τις δοκιμές αναπτύχθηκε επαρκώς και για αυτό τα αποτελέσματα του κρίθηκαν αξιόπιστα και ακριβή αλλά και έναντι του *B.cereus* και *E.faecalis*. Επακριβώς, κατά την αντιμικροβιακή δοκιμή του Bioscreen C, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) φάνηκε να είναι η πιο δραστική από όλες, στις δύο από τις τρεις πειραματικές δοκιμές που ελέγχθηκε. Ενώ, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) δεν παρουσίασε την ίδια επαναληψιμότητα και ευρεία δράση. Κατ' επέκταση διαφαίνεται η πλεονεκτική διαφορά, στην ανασταλτική δράση, που προσδίδουν τα εμπλουτισμένα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) στην υδρογέλη ADIP1123. Οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124) και με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121) παρουσίασαν επίσης επαρκή μείωση της ανάπτυξης του βακτηρίου, με μικρότερη ισχύ. Ακολουθως, στην περίπτωση του *B.cereus*, και οι τέσσερες υδρογέλες ADIP1123, ADIP1124, ADIP1122 και ADIP1121 παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση παρεμφερούς ισχύς έναντι αυτού, ενώ η ανασταλτική δράση των δειγμάτων υδρογελών έναντι του *E.faecalis* δεν μπορεί να σχολιαστεί λόγω ύπαρξης σφαλμάτων και υψηλής αναξιοπιστίας στα τελικά αποτελέσματα της δοκιμής, που αναλύθηκαν με το πρόγραμμα DMFit.

Στην ομάδα των ζυμών τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι επίσης αξιοσημείωτα. Η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) αποτελεί κατά

σειρά πειραμάτων την πιο δραστική από τις τέσσερις υδρογέλες, έναντι του *S.cerevisiae* και ακολουθούν με μειούμενη σειρά ισχύς οι υδρογέλη με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124). Ενώ στην περίπτωση της *Lachancea*, και τα τέσσερα δείγματα εμφάνισαν επαρκή αντιμικροβιακή δράση αλλά η σύγκριση τους και κατ' επέκταση η κατάταξη τους με βάση την αντιμικροβιακή ισχύ, πρέπει να γίνει με επιφύλαξη, λόγω απουσίας στατιστικής σημαντικότητας στις μειώσεις που καταγράφηκαν.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των συνολικών δοκιμών αντιμικροβιακής ικανότητας, προσοχή αξίζει να δοθεί στο εκχύλισμα φύλλου ελιάς, το οποίο εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση κατά την δοκιμή διάχυσης φρεατίου σε άγαρ προς το Gram- βακτήριο της *E.coli*. Η μέση διάμετρος της ζώνης αναστολής ανήλθε στα 21,7 mm, αποτέλεσμα το οποίο καταδεικνύει εξαιρετική αντιμικροβιακή δράση του συγκεκριμένου δείγματος. Συμπληρωματικά, οι υδρογέλες με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) επίσης παρουσίασαν εξαιρετικά αποτελέσματα τόσο προς την *E.coli* όσο και προς άλλα μικροβιακά στελέχη, δημιουργώντας υποτριπλασιασμό και υποδιπλασιασμό αντίστοιχα, του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *E.coli* κατά την διενέργεια της αντιμικροβιακής δοκιμής Bioscreen C. Σε αυτό το σημείο επισημαίνεται ότι αιθέρια έλαια και εκχυλίσματα, όπως αυτό του φύλλου ελιάς, συμπεριλήφθηκαν στην συγκεκριμένη αντιμικροβιακή μελέτη, προκειμένου να αποδειχθεί η αντιμικροβιακή τους ικανότητα ως μεμονωμένα αντιμικροβιακά δείγματα αφού αποτελούν και συστατικά των υπό μελέτη υδρογελών ADIP1123 και ADIP1122. Την συγκεκριμένη θέση επιβεβαιώνει και το δείγμα υδρογέλης με μέντα (ADIP992) που παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των στελεχών *E.coli* και *S.aureus*.

Έτσι λοιπόν, οι υδρογέλες αλγινικού οξέος με εγκλεισμένα νανοσωματίδια μετάλλων και ειδικότερα νανοσωματίδια αργύρου επαληθεύουν την πρόβλεψη εμφάνισης ισχυρής αντιμικροβιακής δράσης έναντι ενός ευρέος φάσματος παθογόνων και μη μικροοργανισμών. Επί αυτού, με την διενέργεια της τεχνικής Bioscreen C, βασίμες ενδείξεις μικροβιακής αναστολής και ειδικότερα βακτηριοστατικής δράσης προέκυψαν έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* NCTC 12023/ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* NCTC 7973/ATCC 35152, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903/ATCC 27853 και *Yersinia enterocolitica* NCTC 12982/ATCC 9610, των θετικών κατά Gram βακτηρίων *Staphylococcus aureus* NCTC 10788/ATCC 6538, *Bacillus cereus* NCTC 10320/ATCC 9634 και των στελεχών ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* NCPF 3255/ATCC 2091 και *Lachancea*, από το εξαιρετικής σημαντικότητας, δείγμα υδρογέλης με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123). Εκτός από την επιβεβαίωση αντιμικροβιακής δράσης της υδρογέλης

ADIP1123, ηπιότερη αλλά επίσης σημαντική ανασταλτική δράση εμφάνισαν τα δείγματα υδρογελών με αλγινικό οξύ-CaCl₂ (ADIP1121), με αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1122) και με αλγινικό οξύ-NADES (ADIP1124). Άξιο αναφοράς είναι ότι, η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123) και η υδρογέλη με αλγινικό οξύ-AgNPs-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (ADIP1123), προκάλεσαν αντίστοιχα υποτριπλασιασμό και υποδιπλασιασμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του παθογόνου στελέχους *Escherichia coli*. Ωστόσο, κατά την εφαρμογή της μεθόδου διάχυσης δίσκου σε άγαρ έναντι της *Escherichia coli* NCTC 12241/ATCC 25922, για τα ίδια τέσσερα δείγματα υδρογελών, δεν προέκυψε αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση.

Βάση των ανωτέρω, αξίζει να γίνουν κάποιες συμπληρωματικές εισηγήσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να δράσουν βοηθητικά σε παρόμοιες μελλοντικές πειραματικές μελέτες. Καταρχήν, επισημαίνεται ότι ο σκοπός της προκειμένης μελέτης ήταν ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης υδρογελών έναντι μίας πληθώρας μικροοργανισμών, προκειμένου να υπάρξει μία αρχική εικόνα αναφορικά με την δραστικότητα των δειγμάτων σε Gram+ και Gram- βακτήρια αλλά και ζυμομύκητες. Επομένως, ο πληθυσμός των δειγμάτων και των αντίστοιχων φρεατίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρκετά περιορισμένος, δυσκολεύοντας την επίτευξη επαναληψιμότητας άρα και αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Η ανάγκη, λοιπόν, για αύξηση του πληθυσμού των δειγμάτων κρίνεται επιτακτική. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την αύξηση του αριθμού φρεατίων ανά δείγμα τόσο στις δοκιμές διάχυσης σε άγαρ όσο και στην πλακέτα του Bioscreen C, αλλά και με πειραματικές δοκιμές που να εξειδικεύονται σε έναν έως και τρεις μικροοργανισμούς, ώστε να συλλέγονται πιο εξειδικευμένα και συγκεντρωτικά αποτελέσματα. Αναφορικά με την επιλογή μικροβιακών στελεχών για έλεγχο και την διεύρυνση αποτελεσμάτων, προτείνεται επίσης η εφαρμογή των συγκεκριμένων υδρογελών σε παθογόνα στελέχη μυκήτων και ζυμών, όπως τα γένη *Aspergillus* και *Candida*. Επιπρόσθετα, για την λήψη καλύτερων δεδομένων θα μπορούσαν να παρασκευαστούν νέα συμπυκνωμένα δείγματα από τις υδρογέλες ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124, με σκοπό την επίτευξη μεγαλύτερης απελευθέρωσης νανοσωματιδίων αργύρου και συγκέντρωσης εκχυλίσματος φύλλου ελιάς σε ίδια ποσότητα υδρογέλης. Η συγκεκριμένη διεργασία θα μπορούσε να διεξαχθεί με την χρήση των αντίστοιχων ξηρών γελών των δειγμάτων, οι οποίες ακολούθως συνίσταται να αραιωθούν με νερό και να τεθούν υπό ανάδευση σε σύστημα υπερήχων για διάστημα 48h έως και μίας εβδομάδας. Η χρήση υπερήχων προτείνεται καθώς, με τον ίδιο τρόπο δημιουργήθηκαν και τα ελεγχόμενα δείγματα από τους χημικούς μηχανικούς του Μετσόβιου Πολυτεχνείου, ενώ η διάρκεια παραμονής στο σύστημα υπερήχων εξαρτάται από τον βαθμό απελευθέρωσης νανοσωματιδίων που απαιτείται. Αύξηση των ημερών συνεπάγεται και αύξηση της απελευθέρωσης χωρίς όμως να εντοπίζεται αναλογική σχέση των δύο παραμέτρων. Στην συνέχεια, για την παραλάβη βελτιστοποιημένων

αποτελεσμάτων συνίσταται η καλύτερη συσχέτιση των επιμέρους τιμών από τα υπολογιστικά συστήματα Excel 2010 και DMFit και ίσως η χρήση ενός τρίτου λογισμικού που θα μπορεί να συνδέσει τα συνολικά στοιχεία και να μειώσει της τυπικές αποκλίσεις τιμών μεταξύ των δύο προγραμμάτων. Αντικειμενικά, το πρόγραμμα DMFit είναι πιο αξιόπιστο αλλά λιγότερο γρήγορο από το Excel 2010 στον υπολογισμό των τελικών ρυθμών ανάπτυξης. Ωστόσο, το πρόγραμμα DMFit παρέχει πληθώρα δυνατοτήτων αναφορικά με τις τελικές παραμέτρους μικροβιακής ανάπτυξης, τις οποίες το Excel 2010 δεν μπορεί να υπολογίσει. Συνολικά λοιπόν αναφέρθηκαν τέσσερις κύριες προτάσεις που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε σημαντική βελτίωση των μελλοντικών δοκιμών, καθώς όπως αποδείχθηκε σε όλη την πειραματική μελέτη, η αντιμικροβιακή δράση των υδρογελών αλγινικού οξέος, εμπλουτισμένων με νανοσωματίδια αργύρου, προκάλεσε εξαιρετικό ερευνητικό ενδιαφέρον.

5. Παράρτημα

Στην παρούσα ενότητα περιέχονται τα συνολικά αποτελέσματα ανάλυσης των τιμών οπτικής πυκνότητας του Bioscreen C από το σύστημα DMFit. Το λογισμικό DMFit χρησιμοποιείται ως πρόσθετο του Excel 2010 και τα δείγματα των υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123 και ADIP1124 αλλά και τα στελέχη μικροοργανισμών που ελέγχθηκαν, δεν αναγράφονται με τις πλήρεις ονομασίες τους αλλά με κωδικοποιημένες λέξεις, προκειμένου να μειωθεί ο όγκος πληροφοριών. Ο σύνδεσμος που περιέχει τα αρχεία αναγράφεται ακολούθως:

https://uniwagr-my.sharepoint.com/:f/g/personal/fst18684009_uniwa_gr/Ei3nuU_QCLtlvohU9mtbA_UBBiLOSenM9-b3FuoxQORkPw?e=suKZU8

Ενώ η κωδικοποίηση ορίστηκε ως εξής:

Πίνακας 35: Κωδικοποίηση υδρογελών ADIP1121, ADIP1122, ADIP1123, ADIP1124

ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ AD
35	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-AgNPs (AgNO ₃ 5 mM)- εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v)	ADIP1123
36	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-NADES (4%v/v)	ADIP1124
37	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-εκχύλισμα φύλλου ελιάς-NADES (4%v/v)	ADIP1122
38	Υδρογέλη με Αλγινικό οξύ-CaCl ₂ (13%v/v)	ADIP1121

Πίνακας 36: Κωδικοποίηση μικροβιακών στελεχών

ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ
EC	<i>Escherichia coli</i>
ST	<i>Salmonella typhimurium</i>
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
YE	<i>Yersinia enterocolitica</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
BC	<i>Bacillus cereus</i>
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
L	<i>Lachancea</i>

Πίνακας 37: Παραδείγματα κωδικοποίησης

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ
EC35(1)	<i>Escherichia coli</i> + ADIP1123 (τιμές από φρεάτιο 1)
SA38(3)	<i>Staphylococcus aureus</i> + ADIP1121 (τιμές από φρεάτιο 3)
BC36(2)	<i>Bacillus cereus</i> + ADIP1124 (τιμές από φρεάτιο 2)
AVG	Average = Μέσος όρος τιμών 3ων φρεατίων
CONTROL	Μικροοργανισμός + broth BHI
YE CONTROL AVG	Μέσος όρος τιμών του control της <i>Yersinia enterocolitica</i>
LM37 AVG	Μέσος όρος τιμών του δείγματος (<i>Listeria monocytogenes</i> + ADIP1122)

6. Βιβλιογραφία

- Γιώργος Π. Καραγιαννίδης - Ειρήνη Δ. Σιδερίδου. (2009). *Τεχνολογία Πολυμερών*. Εκδόσεις Ζήτη.
- Aldakheel, F. M., Sayed, M. M. E., Mohsen, D., Fagir, M. H., & El Dein, D. K. (2023). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Loaded Hydrogel for Wound Healing; Systematic Review. *Gels*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/gels9070530>
- Almatroudi, A. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sciences*, 15(1), 819–839. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0094>
- An, S. M., Ham, H., Choi, E. J., Shin, M. K., An, S. S., Kim, H. O., & Koh, J. S. (2014). Primary irritation index and safety zone of cosmetics: Retrospective analysis of skin patch tests in 7440 Korean women during 12 years. *International Journal of Cosmetic Science*, 36(1), 62–67. <https://doi.org/10.1111/ics.12095>
- Anseth, K. S., Bowman, C. N., & Brannon-Peppas, L. (1996). Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*, 17(17), 1647–1657. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87644-7](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87644-7)
- Ayala-Núñez, N. V., Lara Villegas, H. H., del Carmen Ixtepan Turrent, L., & Rodríguez Padilla, C. (2009). Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Nanoscale Does Matter. *NanoBiotechnology*, 5(1), 2–9. <https://doi.org/10.1007/s12030-009-9029-1>
- Balakin, K. V., Savchuk, N. P., & Tetko, I. V. (2006). In Silico Approaches to Prediction of Aqueous and DMSO Solubility of Drug-Like Compounds: Trends, Problems and Solutions. *Current Medicinal Chemistry*, 13(2), 223–241.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jppha.2015.11.005>
- Banerjee, P., Satapathy, M., Mukhopahayay, A., & Das, P. (2014). Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: Synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40643-014-0003-y>
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3), 277–294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A. H., Mujtaba, M. A., Alghamdi, N. A., Wageh, S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2020). Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers*, 12(11), 2702. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>
- Bashir, S., Teo, Y. Y., Ramesh, S., Ramesh, K., & Mushtaq, M. W. (2018). Rheological behavior of biodegradable N-succinyl chitosan-g-poly (acrylic acid) hydrogels and their applications as drug carrier and in vitro theophylline release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 454–466. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.182>
- Bhunia, A. K. (2018). Introduction to Foodborne Pathogens. Στο A. K. Bhunia (Επιμ.), *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis* (σσ. 1–23). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1_1

- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–974. <https://doi.org/10.1211/0022357991773258>
- Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., & Hrnčič, M. K. (2020). Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules*, 25(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/molecules25245946>
- Brown, D. F., & Kothari, D. (1975). Comparison of antibiotic discs from different sources. *Journal of Clinical Pathology*, 28(10), 779–783.
- Caccavo, D., Cascone, S., Lamberti, G., & Barba, A. A. (2018). Hydrogels: Experimental characterization and mathematical modelling of their mechanical and diffusive behaviour. *Chemical Society Reviews*, 47(7), 2357–2373. <https://doi.org/10.1039/C7CS00638A>
- Cannavacciuolo, C., Pagliari, S., Frigerio, J., Giustra, C. M., Labra, M., & Campone, L. (2023). Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) Combined with Sustainable Extraction Techniques: A Review of the Green Chemistry Approach in Food Analysis. *Foods*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/foods12010056>
- Casolaro, M., Casolaro, I., Akimoto, J., Ueda, M., Ueki, M., & Ito, Y. (2018). Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles Embedded on Polyelectrolyte Hydrogels Based on α -Amino Acid Residues. *Gels*, 4(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/gels4020042>
- Castellano, J. J., Shafii, S. M., Ko, F., Donate, G., Wright, T. E., Mannari, R. J., Payne, W. G., Smith, D. J., & Robson, M. C. (2007). Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International Wound Journal*, 4(2), 114–122. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00316.x>
- Chen, Y. (2019). *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Elsevier.
- Chiller, K., Selkin, B. A., & Murakawa, G. J. (2001). Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6(3), 170–174. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x>
- Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1133–1152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
- Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Witkamp, G.-J., & Verpoorte, R. (2011). Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiology*, 156(4), 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>
- Clark, D. E., & Green, H. C. (1936). *Alginic acid and process of making same* (United States Patent US2036922A). <https://patents.google.com/patent/US2036922A/en>
- Cushnie, T. P. T., Cushnie, B., Echeverría, J., Fowsantear, W., Thammawat, S., Dodgson, J. L. A., Law, S., & Clow, S. M. (2020). Bioprospecting for antibacterial drugs: A multidisciplinary perspective on natural product source material, bioassay selection and avoidable pitfalls. *Pharmaceutical Research*, 37(7), Article 125. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02849-1>
- Das Purkayastha, M., & Manhar, A. K. (2016). Nanotechnological Applications in Food Packaging, Sensors and Bioactive Delivery Systems. Στο S. Ranjan, N. Dasgupta, & E. Lichtfouse (Επιμ.), *Nanoscience in Food and Agriculture 2* (σσ. 59–128). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319->

- Dong, L., & Hoffman, A. S. (1991). A novel approach for preparation of pH-sensitive hydrogels for enteric drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 15(2), 141–152. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90072-L](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90072-L)
- El-Sherif, H., El-Masry, M., & Kansoh, A. (2011). Hydrogels as template nanoreactors for silver nanoparticles formation and their antimicrobial activities. *Macromolecular Research*, 19(11), 1157–1165. <https://doi.org/10.1007/s13233-011-1109-0>
- EUCAST. (2021). *EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing*. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2021_manuals/Manual_v_9.0_EUCAST_Disk_Test_2021.pdf.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2021_manuals/Manual_v_9.0_EUCAST_Disk_Test_2021.pdf
- Fan, Y., & Li, Q. (2022). An efficient extraction method for essential oil from angelica sinensis radix by natural deep eutectic solvents-assisted microwave hydrodistillation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29, 100792. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100792>
- Fekete, T., Borsa, J., Takács, E., & Wojnárovits, L. (2017). Synthesis and characterization of superabsorbent hydrogels based on hydroxyethylcellulose and acrylic acid. *Carbohydrate Polymers*, 166, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.108>
- Fernandez, M. de los A., Boiteux, J., Santiano, F., Lopez Fontana, C., Silva, M. F., & Espino, M. (2023). Therapeutic product based on yerba mate extract and eutectic system by one step ultrasound approach. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 32, 101008. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101008>
- Flory, P. J. (1953). *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press.
- García-Barrasa, J., López-de-Luzuriaga, J. M., & Monge, M. (2011). Silver nanoparticles: Synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. *Central European Journal of Chemistry*, 9(1), 7–19. <https://doi.org/10.2478/s11532-010-0124-x>
- Ghaedi, M., Yousefinejad, M., Safarpour, M., Khafri, H. Z., & Purkait, M. K. (2015). Rosmarinus officinalis leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles and investigation of its antimicrobial properties. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.06.020>
- Gombotz, W. R., & Wee, S. (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31(3), 267–285. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00124-5)
- González-Henríquez, C. M., Sarabia-Vallejos, M. A., & Rodríguez-Hernández, J. (2017). Advances in the Fabrication of Antimicrobial Hydrogels for Biomedical Applications. *Materials*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ma10030232>
- Gordon, M., & Ross-Murphy, S. B. (1975). The structure and properties of molecular trees and networks. *Pure and Applied Chemistry*, 43(1–2), 1–26. <https://doi.org/10.1351/pac197543010001>
- Gorrasi, G., Bugatti, V., & Vittoria, V. (2012). Pectins filled with LDH-antimicrobial molecules: Preparation, characterization and physical properties. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.061>

- Grønlien, K. G., Pedersen, M. E., & Tønnesen, H. H. (2020). A natural deep eutectic solvent (NADES) as potential excipient in collagen-based products. *International Journal of Biological Macromolecules*, *156*, 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.026>
- Hacker, M. C., & Mikos, A. G. (2011). Synthetic Polymers. Στο *Principles of Regenerative Medicine* (σσ. 587–622). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381422-7.10033-1>
- Hamill, P. G., Stevenson, A., McMullan, P. E., Williams, J. P., Lewis, A. D. R., S, S., Stevenson, K. E., Farnsworth, K. D., Khroustalyova, G., Takemoto, J. Y., Quinn, J. P., Rapoport, A., & Hallsworth, J. E. (2020). Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>
- Hernández-Sierra, J. F., Ruiz, F., Cruz Pena, D. C., Martínez-Gutiérrez, F., Martínez, A. E., De Jesús Pozos Guillén, A., Tapia-Pérez, H., & Martínez Castañón, G. (2008). The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *4*(3), 237–240. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.04.005>
- Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development. *Plants*, *10*(10), 2091. <https://doi.org/10.3390/plants10102091>
- Himour, S., Yahia, A., & Belattar, H. (2017). Oleuropein and Antibacterial Activities of *Olea europaea* L. Leaf Extract. *European Scientific Journal, ESJ*, *13*(6), 342. <https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n6p342>
- I. Alarcon, E., I. Udekwu, K., W. Noel, C., B.-P. Gagnon, L., K. Taylor, P., Vulesevic, B., J. Simpson, M., Gkotzis, S., Mirazul Islam, M., Lee, C.-J., Richter-Dahlfors, A., Mah, T.-F., J. Suuronen, E., C. Scaiano, J., & Griffith, M. (2015). Safety and efficacy of composite collagen–silver nanoparticle hydrogels as tissue engineering scaffolds. *Nanoscale*, *7*(44), 18789–18798. <https://doi.org/10.1039/C5NR03826J>
- Jalal, M., Ansari, M. A., Alzohairy, M. A., Ali, S. G., Khan, H. M., Almatroudi, A., & Siddiqui, M. I. (2019). Anticandidal activity of biosynthesized silver nanoparticles: Effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 4667–4679. <https://doi.org/10.2147/IJN.S210449>
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, *176*(2), 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.08.014>
- Khan, F., Atif, Mohd., Haseen, M., Kamal, S., Khan, M. S., Shahid, S., & Nami, S. A. A. (2022). Synthesis, classification and properties of hydrogels: Their applications in drug delivery and agriculture. *Journal of Materials Chemistry B*, *10*(2), 170–203. <https://doi.org/10.1039/D1TB01345A>
- Kim, K., & Kim, H. (2016). Reconstruction of the Inferior Orbital Wall with Simplified Simulation Technique in Case of the Fracture Extending to the Posterior Orbital Floor. *Journal of International Society for Simulation Surgery*, *3*, 80–83. <https://doi.org/10.18204/JISSIS.2016.3.2.080>
- Kim, K.-J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S.-K., Choi, J.-S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *BioMetals*, *22*(2), 235–242. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9159-2>
- Kolya, H., Maiti, P., Pandey, A., & Tripathy, T. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial and azo dye (Congo red) degradation properties using *Amaranthus gangeticus* Linn leaf

extract. *Journal of Analytical Science and Technology*, 6(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40543-015-0074-1>

- Kumar, A., Kothari, A., Kumar, P., Singh, A., Tripathi, K., Gairolla, J., Pai, M., Omar, B. J., Kumar, A., Kothari, A., Kumar, P., Singh, A., Tripathi, K., Gairolla, J., & Pai, M. (2023). *Introduction to Alginate: Biocompatible, Biodegradable, Antimicrobial Nature and Various Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110650>
- Kumar, B., & Smita, K. (2016). Phytochemically Functionalized Silver and Gold Nanoparticles to Treat Microbes, Viruses and Cancer. Στο S. Ranjan, N. Dasgupta, & E. Lichtfouse (Επιμ.), *Nanoscience in Food and Agriculture 2* (σσ. 235–252). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39306-3_7
- Laftah, W., Hashim, S., & Akos, N. (2011). Polymer Hydrogels: A Review. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 50, 1475–1486. <https://doi.org/10.1080/03602559.2011.593082>
- Lanjekar, K. J., Gokhale, S., & Rathod, V. K. (2022). Utilization of waste mango peels for extraction of polyphenolic antioxidants by ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent. *Bioresource Technology Reports*, 18, 101074. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101074>
- Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtepan Turrent, L. del C., & Rodríguez Padilla, C. (2010). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 615–621. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3>
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: Micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(3), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.009>
- Li, J., Jia, X., & Yin, L. (2021). Hydrogel: Diversity of Structures and Applications in Food Science. *Food Reviews International*, 37(3), 313–372. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1858313>
- Li, X., Cao, C., Yuan, D., Liu, Q., & Zhao, J. (2022). Effects of the Incorporation of Calcium Chloride on the Physical and Oxidative Stability of Filled Hydrogel Particles. *Foods*, 11(3), 278. <https://doi.org/10.3390/foods11030278>
- Li, Y., Zhang, Z., Leeuwen, H. P. van, Stuart, M. A. C., Norde, W., & Kleijn, J. M. (2011). Uptake and release kinetics of lysozyme in and from an oxidized starch polymer microgel. *Soft Matter*, 7(21), 10377–10385. <https://doi.org/10.1039/C1SM06072D>
- Li, Z., Yuan, B., Dong, X., Duan, L., Tian, H., He, C., & Chen, X. (2015). Injectable polysaccharide hybrid hydrogels as scaffolds for burn wound healing. *RSC Advances*, 5(114), 94248–94256. <https://doi.org/10.1039/C5RA16912G>
- Lin, X., Zhao, X., Xu, C., Wang, L., & Xia, Y. (2022). Progress in the mechanical enhancement of hydrogels: Fabrication strategies and underlying mechanisms. *Journal of Polymer Science*, 60(17), 2525–2542. <https://doi.org/10.1002/pol.20220154>

- Liu, Y., Zhang, H., Sun, J., Liu, J., Shen, X., Zhan, J., Zhang, A., Ognier, S., Cavadias, S., & Li, P. (2018). Degradation of aniline in aqueous solution using non-thermal plasma generated in microbubbles. *Chemical Engineering Journal*, 345, 679–687. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.057>
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P. K.-H., Chiu, J.-F., & Che, C.-M. (2006). Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916–924. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>
- Lowman and Peppas. (1999). *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 10.
- Lu, C., Qiu, J., Zhao, W., Sakai, E., Zhang, G., Nobe, R., Kudo, M., & Komiyama, T. (2021). Low-temperature adaptive conductive hydrogel based on ice structuring proteins/CaCl₂ anti-freeze system as wearable strain and temperature sensor. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 534–541. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.060>
- Maghimaa, M., & Alharbi, S. A. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles from *Curcuma longa* L. and coating on the cotton fabrics for antimicrobial applications and wound healing activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 204, 111806. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111806>
- Mai, X., Zhang, X., Wang, W., Zheng, Y., Wang, D., Xu, W., Liu, F., & Sun, Z. (2023). Novel PVA/carboxylated cellulose antimicrobial hydrogel grafted with curcumin and ε-polylysine for chilled chicken preservation. *Food Chemistry*, 424, 136345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136345>
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., & Murphy, A. B. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, 6, 38610. <https://doi.org/10.1038/srep38610>
- Malmsten, M. (2011). Antimicrobial and antiviral hydrogels. *Soft Matter*, 7(19), 8725–8736. <https://doi.org/10.1039/C1SM05809F>
- Malpure, P., Patil, S., More, Y., & Nikam, P. (2018). A Review On- Hydrogel. *American Journal of PharmTech Research*, 8, 41–61. <https://doi.org/10.46624/ajptr.2018.v8.i3.005>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Silver Nanoparticles: Synthesis and Therapeutic Applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(4), 301–316. <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.041>
- Nijs, A., Cartuyvels, R., Mewis, A., Peeters, V., Rummens, J. L., & Magerman, K. (2003). Comparison and Evaluation of Osiris and Sirscan 2000 Antimicrobial Susceptibility Systems in the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3627–3630. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3627-3630.2003>
- Okay, O. (2010). General Properties of Hydrogels. Στο G. Gerlach & K.-F. Arndt (Επιμ.), *Hydrogel Sensors and Actuators: Engineering and Technology* (σσ. 1–14). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75645-3_1
- Olasupo, N. A., Fitzgerald, D. J., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 37(6), 448–451. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01427.x>

- Oy Growth Curves Ab Ltd. (2017). *GROWTH CURVES BIOSCREEN C USER MANUAL*. Manualslib. <https://www.manualslib.com/manual/1395808/Growth-Curves-Bioscreen-C.html>
- Pelgrift, R. Y., & Friedman, A. J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13), 1803–1815. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>
- Peppas, N. A. (2019). *Hydrogels in Medicine and Pharmacy. Volume I, Fundamentals* (First edition). CRC Press.
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., & Pereira, J. A. (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/12051153>
- Piras, C. C., Mahon, C. S., & Smith, D. K. (2020). Self-Assembled Supramolecular Hybrid Hydrogel Beads Loaded with Silver Nanoparticles for Antimicrobial Applications. *Chemistry – A European Journal*, 26(38), 8452–8457. <https://doi.org/10.1002/chem.202001349>
- Pitt, T. L., & Barer, M. R. (2012). Classification, identification and typing of micro-organisms. *Medical Microbiology*, 24–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4089-4.00018-4>
- Porter, G. C., Schwass, D. R., Tompkins, G. R., Bobbala, S. K. R., Medicott, N. J., & Meledandri, C. J. (2021). AgNP/Alginate Nanocomposite hydrogel for antimicrobial and antibiofilm applications. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117017>
- Qian, W., Liu, M., Fu, Y., Zhang, J., Liu, W., Li, J., Li, X., Li, Y., & Wang, T. (2020). Antimicrobial mechanism of luteolin against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and its antibiofilm properties. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104056. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104056>
- Radošević, K., Čurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT*, 73, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>
- Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S., & Tahir, M. B. (2017). A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7), 1272–1291. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Rajput, D., Paul, S., & Gupta, A. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Waste Tea Leaves. *Advanced Nano Research*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.21467/anr.3.1.1-14>
- Rauwel, P., Rauwel, E., Ferdov, S., & Singh, M. (2015). *Silver Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications*.
- Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2003). Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940–13941. <https://doi.org/10.1021/ja029267j>
- Rickett, L., Pullen, N., Hartley, M., Zipfel, C., Kamoun, S., Baranyi, J., & Morris, R. (2015). Incorporating prior knowledge improves detection of differences in bacterial growth rate. *BMC Systems Biology*, 9. <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0204-9>

- Ross-Murphy, S. B., & McEvoy, H. (1986). Fundamentals of Hydrogels and Gelation. *British Polymer Journal*, 18(1), 2–7. <https://doi.org/10.1002/pi.4980180103>
- Rout, A., Jena, P. K., Sahoo, D., & Bindhani, B. K. (2014). *Green Synthesis of Silver Nanoparticles of different Shapes and its Antibacterial Activity against Escherichia coli*.
- Schierholz, J. M., & Beuth, J. (2001). Implant infections: A haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection*, 49(2), 87–93. <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1052>
- Shariatinia, Z., & Jalali, A. M. (2018). Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 194–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.034>
- Skjåk-Bræk, G., Grasdalen, H., & Smidsrød, O. (1989). Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydrate Polymers*, 10(1), 31–54. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(89\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(89)90030-1)
- Sokker, H. H., El-Sawy, N. M., Hassan, M. A., & El-Anadouli, B. E. (2011). Adsorption of crude oil from aqueous solution by hydrogel of chitosan based polyacrylamide prepared by radiation induced graft polymerization. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1–3), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.055>
- Sudjana, A. N., D’Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T. V., & Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(5), 461–463. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026>
- Tabera, J., Guinda, Á., Ruiz-Rodríguez, A., Señoráns, F. J., Ibáñez, E., Albi, T., & Reglero, G. (2004). Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4774–4779. <https://doi.org/10.1021/jf049881+>
- Taglietti, A., Diaz Fernandez, Y. A., Amato, E., Cucca, L., Dacarro, G., Grisoli, P., Necchi, V., Pallavicini, P., Pasotti, L., & Patrini, M. (2012). Antibacterial Activity of Glutathione-Coated Silver Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Langmuir*, 28(21), 8140–8148. <https://doi.org/10.1021/la3003838>
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011>
- Tan, J., Luo, Y., Guo, Y., Zhou, Y., Liao, X., Li, D., Lai, X., & Liu, Y. (2023). Development of alginate-based hydrogels: Crosslinking strategies and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 239, 124275. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124275>
- Tao, B., Lin, C., Deng, Y., Yuan, Z., Shen, X., Chen, M., He, Y., Peng, Z., Hu, Y., & Cai, K. (2019). Copper-nanoparticle-embedded hydrogel for killing bacteria and promoting wound healing with photothermal therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(15), 2534–2548. <https://doi.org/10.1039/C8TB03272F>
- Tauk-Tornisielo, S., Vieira, J., & Govone, J. (2007). Use of Bioscreen C for growth of *Mucor hiemalis* in different carbon and nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology - BRAZ J MICROBIOL*, 38. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100024>

- Tomić, S. L., Babić Radić, M. M., Vuković, J. S., Filipović, V. V., Nikodinovic-Runic, J., & Vukomanović, M. (2023). Alginate-Based Hydrogels and Scaffolds for Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 21(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/md21030177>
- Torres, F. G., Commeaux, S., & Troncoso, O. P. (2013). Starch-based biomaterials for wound-dressing applications. *Starch - Stärke*, 65(7–8), 543–551. <https://doi.org/10.1002/star.201200259>
- Ulery, B. D., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 49(12), 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. Md. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 414–433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>
- Valgas, C., Souza, S. M. de, Smânia, E. F. A., & Smânia Jr., A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369–380. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>
- Van Bemmelen, J. M. (1894). Das Hydrogel und das krystallinische Hydrat des Kupferoxyds. *Zeitschrift für anorganische Chemie*, 5(1), 466–483. <https://doi.org/10.1002/zaac.18940050156>
- Vanlalveni, C., Lallianrawna, S., Biswas, A., Selvaraj, M., Changmai, B., & Lalthazuala Rokhum, S. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: A review of recent literature. *RSC Advances*, 11(5), 2804–2837. <https://doi.org/10.1039/D0RA09941D>
- Wan, L., Jiang, J., Arnold, D., Guo, X. E., Lu, H., & Mow, V. (2008). Calcium Concentration Effects on the Mechanical and Biochemical Properties of Chondrocyte-Alginate Constructs. *Cellular and molecular bioengineering*, 1, 93–102. <https://doi.org/10.1007/s12195-008-0014-x>
- Wang, T., Wang, J., Wang, R., Yuan, P., Fan, Z., & Yang, S. (2019). Preparation and properties of ZnO/sodium alginate bi-layered hydrogel films as novel wound dressings. *New Journal of Chemistry*, 43(22), 8684–8693. <https://doi.org/10.1039/C9NJ00402E>
- Wichterle, O., & Lím, D. (1960). Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*, 185(4706), Article 4706. <https://doi.org/10.1038/185117a0>
- Wikene, K. O., Rukke, H. V., Bruzell, E., & Tønnesen, H. H. (2017). Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 171, 27–33. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.030>
- Wu, Z., Rong, L., Yang, J., Wei, Y., Tao, K., Zhou, Y., Yang, B.-R., Xie, X., & Wu, J. (2021). Ion-Conductive Hydrogel-Based Stretchable, Self-Healing, and Transparent NO₂ Sensor with High Sensitivity and Selectivity at Room Temperature. *Small*, 17(52), 2104997. <https://doi.org/10.1002/smll.202104997>
- Yahia, Lh. (2015). History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences*, 04(02). <https://doi.org/10.4172/2254-609X.100013>
- Yang, D. (2022). Recent Advances in Hydrogels. *Chemistry of Materials*, 34(5), 1987–1989. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.2c00188>

- Yardımcı, B. K., Güler, A., & Şarkaya, K. (2023). Investigation of the cryogels' antifungal activities for potential use as wound dressing materials. *Eurasian Journal of Medical and Biological Sciences*, 3(1), Article 1.
- Zhang, H., Peng, M., Cheng, T., Zhao, P., Qiu, L., Zhou, J., Lu, G., & Chen, J. (2018). Silver nanoparticles-doped collagen–alginate antimicrobial biocomposite as potential wound dressing. *Journal of Materials Science*, 53(21), 14944–14952. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2710-9>
- Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>
- Zhang, X., Wang, K., Hu, J., Zhang, Y., Dai, Y., & Xia, F. (2020). Role of a high calcium ion content in extending the properties of alginate dual-crosslinked hydrogels. *Journal of Materials Chemistry A*, 8(47), 25390–25401. <https://doi.org/10.1039/D0TA09315G>
- Zhu, Q., Jiang, M., Liu, Q., Yan, S., Feng, L., Lan, Y., Shan, G., Xue, W., & Guo, R. (2018). Enhanced healing activity of burn wound infection by a dextran-HA hydrogel enriched with sanguinarine. *Biomaterials Science*, 6(9), 2472–2486. <https://doi.org/10.1039/C8BM00478A>
- Zurob, E., Cabezas, R., Villarroel, E., Rosas, N., Merlet, G., Quijada-Maldonado, E., Romero, J., & Plaza, A. (2020). Design of natural deep eutectic solvents for the ultrasound-assisted extraction of hydroxytyrosol from olive leaves supported by COSMO-RS. *Separation and Purification Technology*, 248, 117054. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117054>