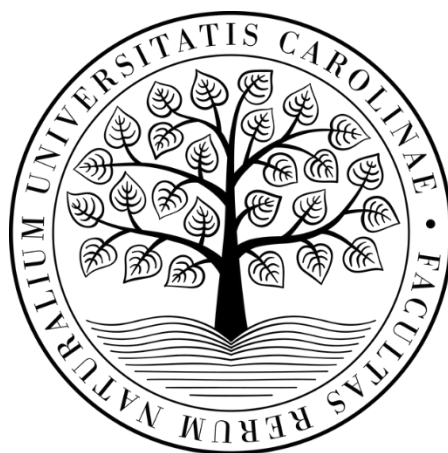


UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Daniel Nentvich

Fotoaktivní nafionová membrána generující reaktivní kyslíkové  
částice

Photoactive Nafion membrane photogenerate reactive oxygen  
species

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Jiří Mosinger, Ph.D.

Praha 2022



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 26. srpna 2022.

---

Daniel Nentvich

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli panu prof. Jiřímu Mosingerovi, Ph.D. za cenné rady, které mi v průběhu vedení bakalářské práce poskytoval. Rád bych zde poděkoval také panu RNDr. Pavlu Kubátovi, CSc. za změření spekter singletového kyslíku metodou časově rozlišené spektroskopie.

## Abstrakt

V této práci bylo zjištěno, že transparentní nafionová membrána může sloužit jako vhodný nosič pro kationtové fotosensitizery fotogenerující reaktivní  $O_2(^1\Delta_g)$ . Navíc bylo zjištěno že samotná nafionová membrána bez fotosensitizeru, ale v přítomnosti trojmocného železa, je efektivním zdrojem reaktivních kyslíkových částic po aktivaci UV ale i viditelným světlem.

## Klíčová slova

Reaktivní kyslíkové částice; singletový kyslík; Nafion; fotosensitizer

## Abstract

Herein you found that transparent Nafion membrane can serve as a matrix for cationic photosensitizers photogenerating reactive  $O_2(^1\Delta_g)$ . Moreover, was found that Nafion itself without photosensitizer in a presence  $Fe^{3+}$  is an effective source of reactive oxygen species upon activation by UV and or visible light.

## Keywords

Reactive oxygen species; singlet oxygen; Nafion; photosensitizer



# Obsah

<b>1</b>	<b>Teoretický úvod</b> .....	<b>10</b>
1.1	Reaktivní kyslíkové částice.....	10
1.1.1	Superoxidový anion radikál .....	11
1.1.2	Hydroxylový radikál .....	11
1.1.3	Peroxid vodíku .....	12
1.1.4	Fentonova reakce .....	12
1.1.4.1	Mechanismus Fentonovy reakce .....	12
1.1.4.2	Foto-Fentonova reakce.....	13
1.1.5	Singletový kyslík.....	14
1.2	Detekce reaktivních kyslíkových částic .....	14
1.2.1	Fyzikální metody detekce singletového kyslíku .....	15
1.2.2	Chemické způsoby detekce singletového kyslíku.....	15
1.3	Fotosensitizovaná reakce .....	16
1.3.1	Fotosensitizery .....	17
1.4	Nafion.....	18
1.4.1	Struktura a vlastnosti.....	19
1.4.1.1	Modely iontových kanálů.....	19
1.4.2	Využití Nafionu.....	20
1.4.3	Materiál pro fotosensitizované reakce.....	20
1.4.4	Degradace nafionové membrány.....	21
1.5	Dosavadní poznatky .....	23
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>27</b>
3.1	Chemikálie .....	27
3.2	Bakterie .....	27
3.3	Roztoky .....	27
3.3.1	Jodidové činidlo pro detekci singletového kyslíku .....	27
3.3.2	Agarový substrát .....	27
3.4	Přístroje a metody .....	28
3.4.1	Příprava Nafionu k měření .....	28
3.4.2	Absorpční spektra v UV/VIS oblasti.....	28
3.4.3	Fluorescenční spektra.....	28
3.4.4	Měření pH .....	28
3.4.5	Měření iontové výměnné kapacity .....	29
3.4.6	Ozařovací experimenty .....	29

3.4.7	Detekce fotogenerovaného singletového kyslíku .....	29
3.4.7.1	Časově rozlišná luminiscence.....	29
3.4.7.2	Jodidová metoda.....	30
3.4.7.3	Fotodegradace kyseliny močové .....	30
3.4.8	Detekce dalších reaktivních kyslíkových částic .....	30
3.4.8.1	Jodidové činidlo .....	30
3.4.8.2	Detekce hydroxylových radikálů kyselinou tereftalovou .....	31
3.4.8.3	Nepřímá detekce peroxidu vodíku post-iradiačním efektem.....	31
3.5	Foto-antibakteriální testy.....	31
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>33</b>
4.1	Iontová kapacita Nafionu .....	33
4.2	Spektrální vlastnosti TMPyPu.....	33
4.2.1	Kinetika adsorpce TMPyPu na Nafion.....	35
4.3	Detekce singletového kyslíku.....	37
4.3.1	Časově rozlišenou spektroskopií .....	37
4.3.2	Chemickými metodami .....	38
4.4	Fotogenerace ROS na povrchu nafionové membrány .....	41
4.4.1	Identifikace fotogenerovaných ROS .....	46
4.5	Foto-antibakteriální testy.....	47
	<b>Závěr.....</b>	<b>51</b>
	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>53</b>

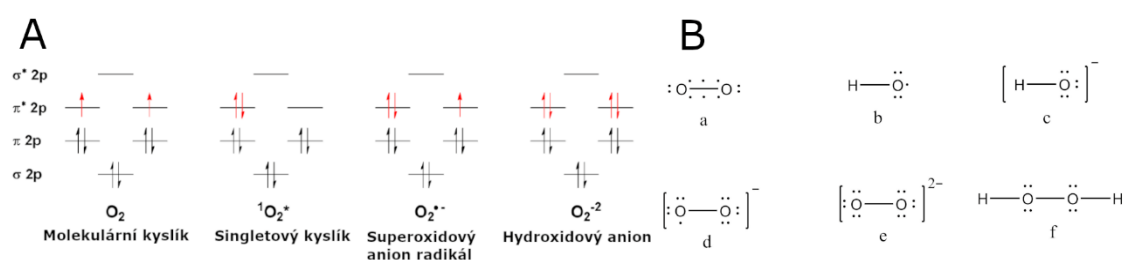
# Seznam zkratek a symbolů

<b>CFU</b>	Jednotky tvořící kolonie („colony-forming unit“)
<b>CT</b>	Přenos náboje („charge transfer“)
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Těžká voda
<b><math>\varepsilon</math></b>	Absorpční koeficient
<b><math>E^0</math></b>	Standardní redoxní potenciál
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraoctová kyselina („ethylenediaminetetraacetic acid“)
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ESR</b>	Elektronová spinová resonance („electron spin resonance“)
<b>EW</b>	Ekvivalentní hmotnost („equivalent weight“)
<b>H<sup>•</sup></b>	Vodíkový radikál
<b><i>h<math>\nu</math></i></b>	Světelné kvantum
<b><i>I</i></b>	Intenzita záření
<b><i>I</i><sub>0</sub></b>	Počáteční intenzita záření
<b>IEC</b>	Iontově výměnná kapacita („ionic exchange capacity“)
<b><math>\lambda</math></b>	Vlnová délka
<b>LMCT</b>	Přenos náboje z ligandu na kov („ligand metal charge transfer“)
<b>O<sub>2</sub>(<sup>1</sup><math>\Delta_g</math>)</b>	Molekulární kyslík v prvním singletovém stavu
<b>O<sub>2</sub>(<sup>1</sup><math>\Sigma_g^+</math>)</b>	Molekulární kyslík ve vyšším singletovém stavu
<b>O<sub>2</sub>(<sup>3</sup><math>\Sigma_g^-</math>)</b>	Molekulární kyslík v základním tripletovém stavu
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Superoxidový anion radikál
<b>O<sub>2</sub><sup>2-</sup></b>	Peroxidový radikál
<b>OH<sup>•</sup></b>	Hydroxylový radikál
<b>PBS</b>	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok („phosphate-buffered saline“)
<b>ROS</b>	Reaktivní formy kyslíku („Reactive Oxygen Species“)
<b>S<sub>0</sub></b>	Základní singletový stav fotosensitizeru
<b>S<sub>1</sub></b>	Nejnižší excitovaný stav fotosensitizeru
<b><i>t</i></b>	Čas
<b><math>\tau_\Delta</math></b>	Doba života O <sub>2</sub> ( <sup>1</sup> $\Delta_g$ )
<b>T<sub>1</sub></b>	Nejnižší excitovaný tripletový stav fotosensitizeru
<b>TMPyP</b>	5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium)porfyrin tetra(p-toluensulfonát)
<b>TMPyPH<sub>2</sub><sup>2+</sup></b>	Diprotonovaná forma 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium)porfyrin tetra(p-toluensulfonátu)

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 Reaktivní kyslíkové částice

Molekulární kyslík má v základním stavu ve valenční vrstvě dva nepárové elektrony (**Obr. 1.1\_A**). Nachází se tak oproti většině látek v tripletovém stavu ( $O_2(^3\Sigma_g^-)$ ). Podle zákona o zachování spinu platí pro reakce mezi látkami v singletovém a tripletovém stavu spinový zákaz. Z toho důvodu mají reakce  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  se všemi látkami v singletovém stavu vysokou aktivační energii a uskuteční se pouze za experimentálních podmínek, při kterých se podaří spinový zákaz obejít. Z pohledu termodynamiky jsou však tyto reakce možné, protože mají zápornou Gibbsovu energii a jsou silně exotermní.<sup>1</sup>



**Obr. 1.1:** Diagramy molekulových orbitalů molekulárního kyslíku v základním stavu; singletového kyslíku; superoxidového anion radikálu a hydroxidového aniontu představující deprotonizovaný peroxid vodíku (převzato a upraveno z cit.<sup>1</sup>) (**Panel A**). Lewisovy struktury (**Panel B**). **a** – hydroxylový radikál ( $OH^\bullet$ ); **b** – hydroxidový anion ( $OH^-$ ); **c** – molekulární kyslík v tripletovém stavu ( $O_2(^3\Sigma_g^-)$ ); **d** – superoxidový anion radikál ( $O_2^{\bullet-}$ ); **e** – peroxidový anion ( $O_2^{2-}$ ); **f** – peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ).

Mezi reaktivní kyslíkové částice (ROS „reactive oxygen species“) patří široké spektrum nabitých i neutrálních částic vzniklých např. neúplnou redukcí  $O_2(^3\Sigma_g^-)$ . Jejich struktury jsou znázorněny na **Obr. 1.1\_B**. Řadíme mezi ně superoxidový anion radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a molekulární kyslík v prvním singletovém stavu. Diagramy molekulových orbitalů některých z nich jsou zobrazeny na **Obr. 1.1\_A**. (cit.<sup>1</sup>)

V živých organismech, u kterých je kyslík konečným akceptorem elektronů v dýchacím řetězci, vznikají ROS jako vedlejší produkt celkového metabolismu. Pokud je daný organismus zatížen stresem, dochází k nadprodukci ROS a následnému oxidačnímu poškození zásadních biomolekul a buněčných struktur.<sup>1</sup>

Molekula kyslíku kvůli spinově zakázaným přechodům upřednostňuje současné přijetí pouze jednoho elektronu. Díky tomu  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  rychle reaguje s jinými kyslíkovými radikály nebo molekulami obsahující nepárové elektrony, např. přechodnými kovy<sup>1</sup>. Z přechodných kovů reaguje  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  nejčastěji s ionty železa a mědi, které se účastní tzv. Fentonovy reakce<sup>2</sup>.

### 1.1.1 Superoxidový anion radikál

Superoxidový anion radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ) vzniká z  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  po přijetí elektronu (**Rov.(1.1)**). Přijatý elektron se páruje s jedním nepárovým elektronem  $O_2(^3\Sigma_g^-)$ . (cit.<sup>3</sup>)



V organismu může  $O_2^{\cdot-}$  vzniknout např. v dýchacím řetězci nebo ve fagocytyjících buňkách, ve kterých slouží k odstranění patogenů. V přítomnosti enzymu superoxidodismutasy dochází k přímé přeměně  $O_2^{\cdot-}$  na peroxid vodíku (**Rov. (1.2)**).<sup>1,4,5</sup>



### 1.1.2 Hydroxylový radikál

Po fluoru je hydroxylový radikál ( $OH^{\cdot}$ ) druhým nejsilnějším oxidačním činidlem s velmi vysokým oxidačně-redukčním potenciálem  $E^0 = 2,80$  V (cit.<sup>6,7</sup>). V závislosti na struktuře organické molekuly s níž přijde do kontaktu, může  $OH^{\cdot}$  vyvolat několik typů reakcí: odtržení atomu vodíku (**Rov. (1.3)**), elektrofilní adice na dvojnou vazbu nebo aromatický kruh (**Rov. (1.4)**), přenos elektronu (**Rov. (1.5)**) nebo reakce typu radikál-radikál (**Rov. (1.6)**). Při vysokých koncentracích  $OH^{\cdot}$  může dojít k rekombinaci a produkci peroxidu vodíku. Vzniklý peroxid vodíku může interagovat s dalšími radikály což vede k jejich vychytávání, a tedy ke snížení oxidační schopnosti systému. Důležitým zdrojem  $OH^{\cdot}$  je Fentonova reakce detailněji popsána v **kap. 1.1.4**. (cit.<sup>8</sup>)



Detekce  $OH^{\cdot}$  může být provedena přímým nebo nepřímým způsobem. Přímou lze detekovat  $OH^{\cdot}$  měřením laserem-indukované fluorescence<sup>9</sup>, přímou elektronovou spinovou (paramagnetickou) rezonancí (ESR „electron spin resonance”)<sup>10</sup> a ESR s použitím spinových pastí<sup>11</sup>. Nepřímou možností detekce  $OH^{\cdot}$  jsou fluorescenční sondy, např. kyselina tereftalová<sup>12</sup> nebo kumarin<sup>13</sup>. Tyto molekuly sami o sobě fluorescenci neposkytují, avšak po reakci s  $OH^{\cdot}$  vzniká fluorescenční produkt (2-hydroxytereftalová kyselina nebo 7-hydroxykumarin).

### 1.1.3 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je jedinou déle žijící molekulou ze všech ROS. Může vznikat např. rekombinací  $\text{OH}^\cdot$  při jeho vysoké koncentraci v systému. Generovaný peroxid vodíku podléhá disproportionaci za současné dvou-elektronové redukce (**Rov. (1.7)**). Jelikož je peroxid vodíku stabilní meziproduct redukce kyslíku na vodu, podléhá také jedno-elektronové redukci na ROS, kterou popisuje **Rov. (1.8)**. S kovovými ionty, zejména ionty železa a mědi, reaguje peroxid vodíku Fentonovou reakcí na velmi reaktivní  $\text{OH}^\cdot$  (viz **kap. 1.1.4**).<sup>8,14</sup>



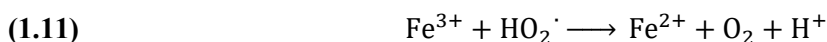
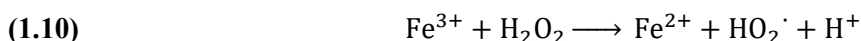
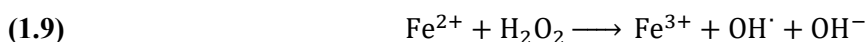
Existuje řada metod detekce peroxidu vodíku zahrnující často používané fluorescenční sondy založené např. na zhášení fluorescence scopoletinu účinkem peroxidu vodíku za katalýzy křenovou peroxidasou. Peroxid vodíku lze detekovat také amperometricky na platinové elektrodě.<sup>15,16</sup>

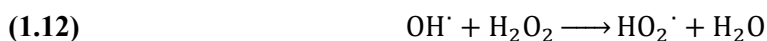
### 1.1.4 Fentonova reakce

Kyslíkové radikály, především  $\text{OH}^\cdot$ , jsou v kyselém prostředí generovány rozkladem peroxidu vodíku v přítomnosti dvojmocného železa tzv. Fentonovou reakcí (**Rov. (1.9)**). Fentonova reakce probíhá nezávisle na substrátu nejlépe v rozsahu  $\text{pH} = 2,5-3$ . Při  $\text{pH} < 2,5$  dochází i přes přítomnost iontů železa v rozpustném stavu ke snížení generace  $\text{OH}^\cdot$ , protože při nízkém  $\text{pH}$  je v roztoku vysoká koncentrace  $\text{H}^+$  tvořících adukty s  $\text{OH}^\cdot$ . Ionty železa ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) se ve vodném roztoku v kyselém prostředí vyskytují nejčastěji ve formě aqua-komplexů. Tyto komplexy však nevykazují účinnou absorpci záření, která je zásadní pro foto-Fentonovu reakci (viz **kap. 1.1.4.2**). Při  $\text{pH} > 5$  dochází k vysrážení iontů železa ve formě hydroxidů zásadně snižující generaci  $\text{OH}^\cdot$ .<sup>8,17,18</sup>

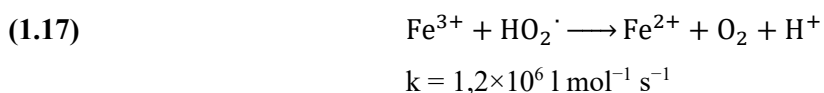
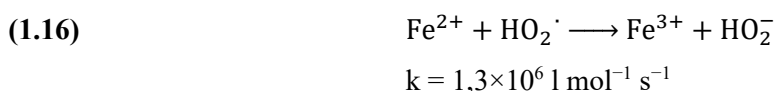
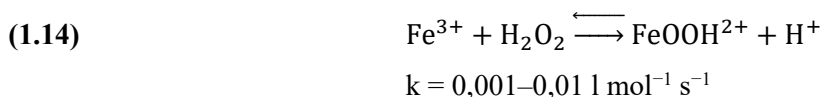
#### 1.1.4.1 Mechanismus Fentonovy reakce

K popisu Fentonovy reakce bylo navrženo několik mechanismů. Dobře přijímaný Haber-Weissův mechanismus zahrnuje účast volných radikálů (zejména  $\text{OH}^\cdot$ ), jehož přibližný průběh popisují **Rov. (1.6), (1.9), (1.14)**. Jiný přístup uvažuje generaci intermediátu  $\text{FeO}^{2+}$  vyhýbající se intermediátu  $\text{OH}^\cdot$ .<sup>7,18</sup>





Ionty železa zastávají ve Fentonově reakci roli katalyzátoru. Jejich regeneraci lze uskutečnit peroxidem vodíku (**Rov. (1.14)(1.17)**). Reakce popsaná **Rov. (1.14)** však neprobíhá příliš rychle a celou reakční kaskádu výrazně zpomaluje. Daleko efektivnější možností regenerace dvojmocného železa je fotoredukce vznikajícího trojmocného železa (**Rov. (1.18)** a **(1.19)**).<sup>8</sup>



Praktickou aplikací Fentonovy reakce je např. čištění odpadních vod. Vznikající  $\text{OH}^\cdot$  totiž dokáže díky svým oxidačním vlastnostem efektivně odbourávat řadu organických látek<sup>19–21</sup>. Nevýhodou je nutnost úpravy pH odpadních vod do kyselé oblasti. Z ekologického hlediska je pro čištění odpadních vod Fentonova reakce přesto výhodná, protože používá netoxické sloučeniny a průběh reakce je energeticky nenáročný.<sup>2</sup>

#### 1.1.4.2 Foto-Fentonova reakce

Fentonovu reakci lze významně zefektivnit rychlejší regenerací dvojmocného železa. Té lze dosáhnout fotoredukcí Fentonovou reakcí vznikajícího trojmocného železa. Vznikající trojmocné železo je fotoredukováno na dvojmocné železo nejen UV, ale i viditelným zářením ( $\lambda < 580 \text{ nm}$ ). Fotoredukce je spojena s generací další molekuly  $\text{OH}^\cdot$ .<sup>6,17</sup> Ve viditelné oblasti je fotoregenerace  $\text{Fe}^{2+}$  možná díky posunu absorpčního pásu komplexů  $\text{Fe}^{3+}$ . Míra tohoto posunu je závislá nejen na pH ale i na ligandech koordinujících ionty železa.<sup>8</sup> Po ozáření komplexů trojmocného železa ( $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ ) dochází k vybuzení a přenosu elektronu z orbitalu ligandu do orbitalu centrálního kovu tzv. přenosem náboje z ligandu na kov (LMCT „ligand metal charge transfer“). Tento děj je

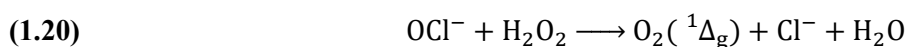
spojen s fotoredukcí trojmocného železa na dvojmocné. Ozářením komplexu trojmocného železa dochází také k fotooxidaci hydroxidového ligandu na OH<sup>•</sup> dle **Rov. (1.19)**<sup>8,17</sup>.

### 1.1.5 Singletový kyslík

Mezi ROS je zařazen také singletový kyslík. Dvouatomová molekula kyslíku se z energetického hlediska vyskytuje ve třech různých stavech a to v základním tripletovém ( $O_2(^3\Sigma_g^-)$ ) a dvou singletových excitovaných stavech. Stabilnějším excitovaným stavem je molekulární kyslík v prvním singletovém stavu ( $O_2(^1\Delta_g)$ ). Ten má nižší energii oproti molekulárnímu kyslíku ve vyšším singletovém stavu ( $O_2(^1\Sigma_g^+)$ ). I když je  $O_2(^1\Sigma_g^+)$  energeticky bohatší, vzhledem ke kratší době života se obvykle na fotooxidačních reakcích nepodílí a je spíše prekurzorem déležijícího  $O_2(^1\Delta_g)$ . (cit.<sup>22</sup>)

Doba života  $O_2(^1\Delta_g)$  je významně ovlivněna rozdílem elektronické a vibrační energie mezi  $O_2(^1\Delta_g)$  a molekulami rozpouštědla. Čím více se energie vibrací rozpouštědla blíží energii přechodu mezi  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  a  $O_2(^1\Delta_g)$ , tím kratší je doba života excitovaných stavů  $O_2(^1\Delta_g)$ . Zhášení singletových stavů kyslíku v rozpouštědlech s vazbami O–H je významnější, než v prostředí obsahující vazby C–H a C–F. Z tohoto důvodu se doba života  $O_2(^1\Delta_g)$  ve vodných roztocích pohybuje řádově v mikrosekundách, zatímco v deuterovaných a zvláště pak v halogenovaných rozpouštědlech může doba života této částice dosáhnout až nižších stovek milisekund.<sup>22,23</sup>

Singletový kyslík je možné získat několika různými přístupy. Ke generaci  $O_2(^1\Delta_g)$  mohou být použity biologické, chemické, fyzikální nebo fotochemické reakce. V živých organismech mohou k produkci  $O_2(^1\Delta_g)$  vést reakce některých peroxidas<sup>23</sup>. Fyzikální cestou přípravy  $O_2(^1\Delta_g)$  pak může být např. mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře. Redukcí iontu chlornanu peroxidem vodíku (**Rov. (1.20)**) nebo tepelným rozkladem endoperoxidů je možné generovat  $O_2(^1\Delta_g)$  chemickou cestou<sup>24</sup>.



Fotofyzikální cestou lze  $O_2(^1\Delta_g)$  generovat fotolýzou ozonu v zemské atmosféře pomocí UV záření, fotoexcitací  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  nebo fotolýzou komplexů, u nichž dochází k přenosu náboje (CT „charge transfer“) mezi kyslíkem a organickou molekulou.<sup>25</sup>

## 1.2 Detekce reaktivních kyslíkových částic

Existuje řada metod pro detekci  $O_2(^1\Delta_g)$ . Existují fyzikální (přímé) a chemické (nepřímé) metody.

### 1.2.1 Fyzikální metody detekce singletového kyslíku

Často používanými fyzikálními metodami jsou časově rozlišené techniky založené na detekci luminiscence  $O_2(^1\Delta_g)$  při  $\lambda = 1270$  nm (cit.<sup>23</sup>) popsané **Rov. (1.21)**.

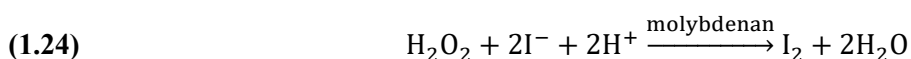
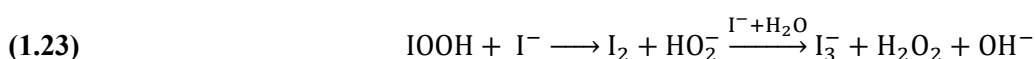
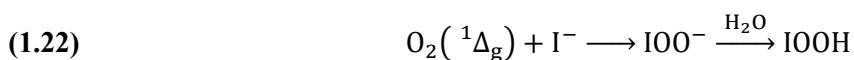


Luminiscenci  $O_2(^1\Delta_g)$  je touto metodou možné detekovat nejen v homogenním prostředí, ale také v pevných maticích, buňkách nebo tkáních. Metoda časově rozlišené spektroskopie má velký význam, protože poskytuje informace o kinetice generace, difúze, reaktivitě a rozpadu  $O_2(^1\Delta_g)$ . (cit.<sup>26</sup>)

### 1.2.2 Chemické způsoby detekce singletového kyslíku

Nepřímé chemické metody jsou často využívány pro nenáročnost provedení. Jsou často založené na sledování absorpce či emise substrátu specificky reagující s  $O_2(^1\Delta_g)$  nebo sledováním vzniku specifického produktu<sup>23</sup>.

Např. jodidová metoda detekce  $O_2(^1\Delta_g)$  je založená na generaci trijodidu po interakci  $O_2(^1\Delta_g)$  s jodidem v přítomnosti molybdenanového katalyzátoru (**Rov. (1.22)(1.25)**). Přestože tato metoda poskytuje pouze nízkou specifitu pro detekci  $O_2(^1\Delta_g)$ , může být využita pro svoji vysokou citlivost<sup>24</sup>.



Jodidová metoda umožňuje detekovat dva absorpční pásy trijodidu při  $\lambda = 287$  a  $351$  nm spektroskopii v UV/VIS oblasti. Vznikající trijodid je přímo úměrný fotogenerovanému  $O_2(^1\Delta_g)$ . Nízkou specifitu této reakce je nutné kompenzovat diagnostickými činidly. Často používaným diagnostickým činidlem je těžká voda ( $D_2O$ ), ve kterém má  $O_2(^1\Delta_g)$  16× delší dobu života. Dalším používaným diagnostickým činidlem je azid sodný, který působí jako zhášec excitovaných stavů singletového kyslíku. Chemické metody nejsou specifické pouze pro zhášení excitovaných stavů  $O_2(^1\Delta_g)$  ale také dalších ROS, např.  $O_2^{\cdot-}$ . (cit.<sup>24</sup>)

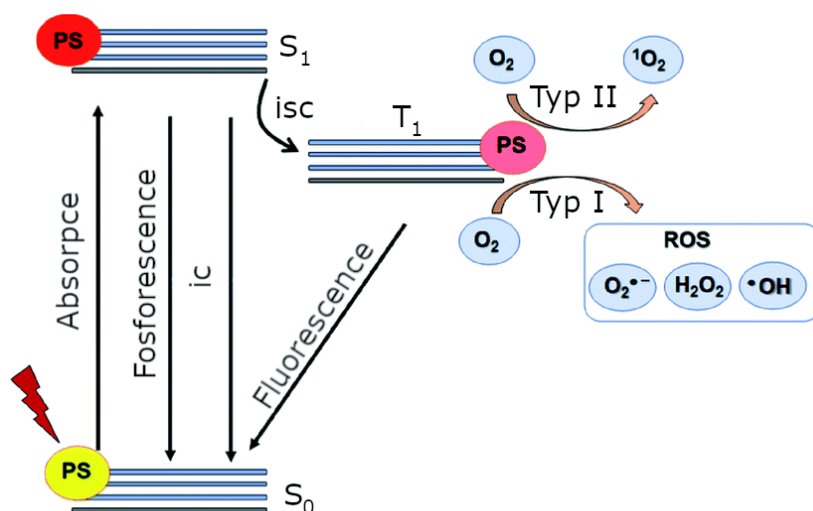
Další používanou chemickou metodou detekce  $O_2(^1\Delta_g)$  pro vodné prostředí je fotodegradace kyseliny močové s absorpčním pásem v UV oblasti ( $\lambda = 292$  nm). Její fotodegradace je sledována absorpčně. Tato metoda je často používána pro svou jednoduchost a nenáročnost provedení. Nevýhodou je omezená stálost kyseliny močové v čase a zejména reakce s dalšími ROS snižující její selektivitu vůči  $O_2(^1\Delta_g)$ . (cit.<sup>27</sup>)

### 1.3 Fotosensitizovaná reakce

Největší význam pro generaci  $O_2(^1\Delta_g)$  mají fotosensitizované reakce. K fotochemické změně dochází pouze po absorpci světla. Přímá excitace tripletového kyslíku je možná, avšak pouze při použití velice silného laseru o specifické vlnové délce ( $\lambda = 1270$  nm). Tento způsob tvorby  $O_2(^1\Delta_g)$  je sice selektivní s minoritním podílem postranních reakcí, ale velmi neefektivní, jelikož přechod  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  na  $O_2(^1\Delta_g)$  je spojen s velmi výrazným spinovým zákazem a velice nízkým kvantovým výtěžkem ( $10^{-4}$ – $10^{-7}$ ). (cit.<sup>26,28</sup>)

Překážku v podobě spinového zákazu výše zmíněného spinového přechodu a fakt, že kyslík nemá v UV/VIS oblasti významnou absorpci lze obejít přes excitované stavy jiné molekuly, tzv. fotosensitizeru. Zjednodušený mechanismus fotosensitizované reakce<sup>23</sup> je znázorněn na **Obr. 1.2**.

Molekuly fotosensitizeru v základním singletovém stavu ( $S_0$ ) jsou po absorpci viditelného záření excitovány přenosem fotonu do vyšších excitovaných singletových stavů ( $S_n$ ). Fotosensitizer díky rychlé relaxaci (řádově nanosekundy) přechází do prvního excitovaného stavu ( $S_1$ ). Singletový stav fotosensitizeru je zhašen vnitřní konverzí (ic „internal conversion“) a zářivým přechodem ve formě fluorescence do stavu  $S_0$  a/nebo mezisystémovým přechodem (isc „intersystem crossing“) do tripletového stavu ( $T_1$ ). Tripletový stav fotosensitizeru má delší dobu života (řádově mikrosekundy), protože jeho deaktivace stavu fosforescencí nebo dalším isc jsou spinově zakázané procesy.<sup>23,28,29</sup>



**Obr. 1.2:** Jablonského diagram energetických hladin fotosenzitizeru a reakce s molekulárním kyslíkem. Vodorovné čáry označují energetické hladiny fotosenzitizeru (PS) v základním singletovém stavu ( $S_0$ ), prvním excitovaném singletovém stavu ( $S_1$ ) a excitovaném tripletovém stavu ( $T_1$ ). Stav  $S_1$  je deexcitován fluorescencí nebo interní konverzí (ic). Do stavu  $T_1$  se fotosenzitizer dostává mezisystémovým přechodem (isc). Tripletový stav fotosenzitizeru vede k reakci typu I (generace ROS) nebo k reakci typu II (generace  $O_2(^1\Delta_g)$ ). Zhášení excitovaných tripletových stavů je možné fosforescencí nebo dalším mezisystémovým přechodem (ic). Převzato a upraveno z cit.<sup>30</sup>.

Pokud není tripletový stav fotosenzitizeru zhašeno fosforescencí nebo ic, nastává bimolekulární reakce s  $O_2(^3\Sigma_g^-)$ . Tato reakce probíhá v závislosti na povaze zhašeče dvěma mechanismy označované jako reakce typu I a typu II.<sup>28,29</sup>

Reakce typu I je založena na přenosu elektronu z excitovaného tripletového stavu fotosenzitizeru na okolní molekuly substrátu nebo rozpouštědla za vzniku jejich radikálů. Tyto radikály mohou po reakci s molekulami kyslíku generovat  $O_2^{\bullet-}$  a další ROS.<sup>28,29</sup>

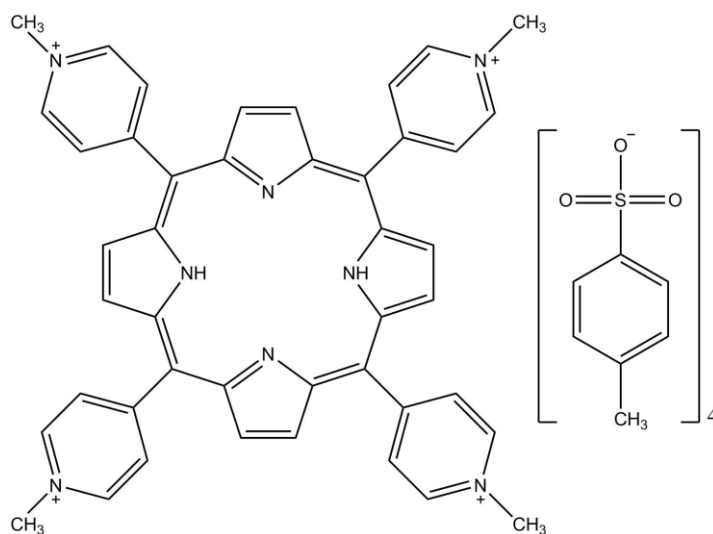
Při reakcích typu II dochází k přenosu energie z excitovaných molekul fotosenzitizeru přímo na molekuly kyslíku. Tímto typem reakce je generován  $O_2(^1\Delta_g)$  a to především z tripletových stavů fotosenzitizeru z důvodu jejich výrazně delší doby života.<sup>28,29</sup>

Míra, respektive účinnost fotogenerace  $O_2(^1\Delta_g)$  je popsána kvantovým výtěžkem použitého fotosenzitizeru. Kvantový výtěžek je definován jako podíl počtu molekul  $O_2(^1\Delta_g)$  vztažený na počet světelných kvant absorbovaných fotosenzitizerem.<sup>23</sup>

### 1.3.1 Fotosenzitizery

Fotosenzitizery hrají zásadní roli při fotogeneraci  $O_2(^1\Delta_g)$ . Po absorpci záření z viditelné části spektra umožňují excitaci  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  na  $O_2(^1\Delta_g)$ . Mezi fotosenzitizery jsou strukturně řazeny látky tvořené aromatickým nebo heterocyklickým jádrem obsahující konjugovaný systém dvojných vazeb. Jedná se např. porfyriny, ftalocyaniny, jejich metalokomplexy, fluoresceinová a thiazolová barviva a mnoho dalších.<sup>23,29</sup>

Mezi porfyrinové fotosensitizery se řadí i 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium)porfyrin tetra(p-toluensulfonát) (TMPyP), tetrakationtový fotosensitizer používaný při řešení této práce<sup>31</sup>. Jeho struktura je znázorněna na **Obr. 1.3**.



**Obr. 1.3:** Strukturální vzorec porfyrinoidního fotosensitizeru 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium)porfyrin tetra(p-toluensulfonátu).

TMPyP ve vodném prostředí disponuje několika absorpčními pásy ve viditelné části spektra. Nejvíce intenzivní, Soretův pás v modré oblasti, má absorpční maximum při  $\lambda = 424$  nm. Absorpční spektrum v zelené a červené oblasti je tvořeno čtyřmi Q-pásky při  $\lambda = 518, 554, 585, 630$  nm. (cit.<sup>31</sup>)

Je velkým trendem vázat fotosensitizery na pevné nosiče, protože to přináší řadu výhod. Po adsorpci na pevný nosič je obvykle výrazně omezena agregace fotosensitizeru<sup>32</sup>. Pevná matrice zároveň poskytuje fotosensitizeru ochranu před zhášeči přítomnými v roztoku vedoucí k prodloužení doby života excitovaných stavů fotosensitizeru i  $O_2(^1\Delta_g)$ . (cit.<sup>33</sup>)

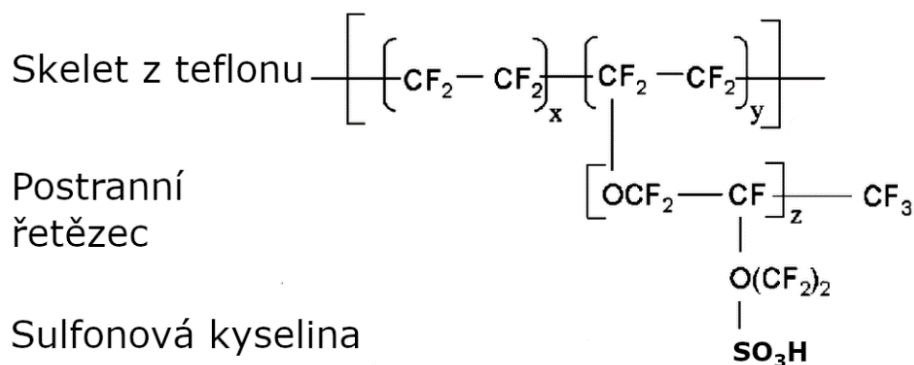
Na pevný nosič jsou také kladeny určité požadavky, aby byl vhodný pro použití ve fotosensitizované reakci. V ideálním případě by pevný nosič měl být transparentní a maximálně permeabilní pro kyslík a stabilní v čase. Zároveň by matrice neměla uvolňovat adsorbovaný fotosensitizer do roztoku a zhášet excitované stavy jak fotosensitizeru, tak i  $O_2(^1\Delta_g)$ , aby měl v/ná dané matrici co nejdelší dobu života.<sup>34</sup> Tyto požadavky splňuje v této práci používaná nafionová membrána (viz **kap. 1.4.3**).

## 1.4 Nafion

Nafion je označení pro první komerčně vyráběnou sulfonovanou membránu fluorokopolymeru od společnosti Du Pont<sup>35-37</sup>. Od jeho objevení v 60. letech 20. století se intenzivně zkoumá jeho struktura, vlastnosti a možnosti dalšího použití<sup>36</sup>.

### 1.4.1 Struktura a vlastnosti

Struktura Nafionu znázorněna na **Obr. 1.4** je tvořena náhodně polymerovaným tetrafluorethylenem (Teflonem) a perfluorovaným-vinyl-polyetherem s terminální sulfo-skupinou, která je náhodně distribuována po polymeru<sup>35,37,38</sup>.



**Obr. 1.4:** Struktura Nafionu, převzato a upraveno z cit.<sup>39</sup>; ( $x = 5-13,5$ ;  $y = 1000$ ;  $z \geq 1$ ) (cit.<sup>40</sup>)

Základní struktura Nafionu se ve vodném prostředí skládá do uskupení<sup>41,42</sup> zobrazeném na **Obr. 1.5**. Vlivem iontové agregace<sup>38</sup>, která je způsobena rozdílným rozložením náboje ve struktuře polymeru<sup>43</sup>, se v Nafionu tvoří dva morfologicky oddělené segmenty<sup>38</sup>.

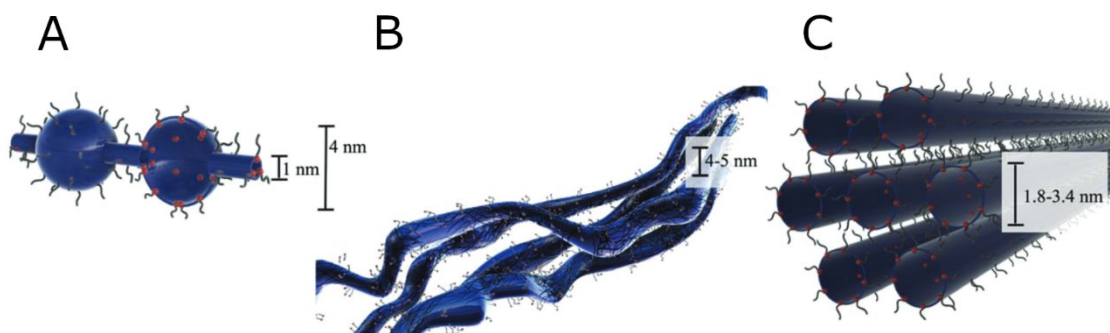
Teflonový skelet je hydrofobní, částečně krystalický a poskytuje nafionové membráně její mechanickou stabilitu a stálost, nikoli však její vodivost<sup>38,41,42</sup>. Postranní řetězce zakončené polárními sulfo-skupinami jsou hydrofilní, iontově agregované a zodpovídají za transportní vlastnosti dané jejich vodivostí a selektivitou pro kationty<sup>38</sup>. Hydrofilní sulfo-skupiny postranního řetězce tvoří styčnou plochu klastrů ve struktuře Nafionu s rozpouštědlem. Díky těmto klastrům, blíže popsaným v **kap. 1.4.1.1**, je chráněn hydrofobní teflonový skelet membrány.<sup>41,44</sup>

Jelikož má nafionová membrána nízkou hodnotu  $\text{pK}_a$  ( $-5,5$  až  $-6$ ), dochází snadno k hydrolyze protonu ze sulfo-skupin postranního řetězce. Záporný náboj disociovaných sulfo-skupin je kompenzován elektron-akceptorními C-F skupinami postranního řetězce. Síť vodíkových vazeb mezi molekulami vody a iontové kanály propojující iontové klastry v hydratované nafionové membráně jsou příčinou vysoké mobility protonů poskytující Nafionu značnou protonovou vodivost.<sup>38,45</sup> V palivových člácích je tok protonů usměrněn ve směru od anody ke katodě<sup>40</sup>.

#### 1.4.1.1 Modely iontových kanálů

Prvotní modely, viz **Obr. 1.5\_A**, uvažují vznik 4nm iontových klastrů propojené sítí iontových kanálů o vnitřním průměru 1 nm. Iontové kanály vznikají po částečném nasycení polymeru vodou a zásadně usnadňují transport kationtů a molekul vody mezi klastry<sup>41,42</sup>.

V solvatované nafionové membráně je předpokládán vznik agregovaných struktur Teflonu obklopené polárními skupinami formující vláknité klastry s vnitřním průměrem 4–5 nm, viz **Obr. 1.5\_B**. Novější model, zobrazený na **Obr. 1.5\_C**, uvažuje klastry agregované do paralelních válcovitých struktur s vnitřním průměrem 1,8–3,4 nm<sup>38,42</sup>.



**Obr. 1.5:** Modely iontových kanálů v Nafionu, červené puntíky představují sulfo-skupiny a černé čáry postranní řetězce; **Panel\_A** – Klastrový model; **Panel\_B** – Vlákenný model; **(c)** Model válcovitých iontových kanálů, převzato a upraveno z cit.<sup>38</sup>

## 1.4.2 Využití Nafionu

Nafion se stal klíčovou součástí membránových elektrolyzérů např. při průmyslové výrobě hydroxidu sodného chloru, nebo elektrolyze vody produkující molekulární vodík a kyslík. Díky membránové technologii bylo možné nahradit neekologické diafragmové a amalgámové elektrolyzéry využívající toxický azbest a rtuť<sup>36</sup>.

Další významnou aplikací nafionové membrány jsou biosenzory detekující např. kyselinu askorbovou a kyselinu močovou v komplikované matici biologických vzorků<sup>46</sup>. Ve fázi výzkumu se nachází i implantované biosenzory glukosy, u kterých je nutné eliminovat faktor náhodné adsorpce proteinů vedoucí ke ztrátě signálu analytu v čase<sup>47,48</sup>. Nejedná se o jediné uplatnění Nafionu. Svě využití nachází též jako sušidlo plynů a kyselý katalyzátor v řadě organických výrob<sup>36</sup>, ale především jako membrána s protonovou vodivostí v palivových článcích.<sup>40</sup>

## 1.4.3 Materiál pro fotosensitizované reakce

Nafion se díky svým vlastnostem zdá být vhodným nosičem pro fotosensitizer generující singletový kyslík. Pro tuto aplikaci je zásadní: transparentnost, permeabilita pro kyslík, chemická inertnost<sup>49</sup> a vysoká afinita pro velké hydrofobní kationtové molekuly<sup>38</sup>. Transparentnost Nafionu je dána absencí absorpce záření nad  $\lambda = 250$  nm (cit.<sup>49</sup>). Hodnota permeability pro kyslík při 30 °C má pro suchý Nafion hodnotu  $0,27 \times 10^{-10}$  mol cm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> a  $9,7 \times 10^{-10}$  mol cm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> pro hydratovaný Nafion měřený v 1M kyselině sírové. Permeabilita kyslíku v hydratovaném Nafionu je vyšší, protože v Nafionu jsou vlivem akumulované vody vytvořeny iontové kanály, popsané v **kap. 1.4.1.1**, usnadňující transport membránou. Zároveň je permeabilita vody v hydratovaném

Nafionu 10× vyšší oproti Nafionu v suchém stavu, což ovlivňuje celkovou permeabilitu kyslíku<sup>50</sup>. Vlivem záporně nabitého povrchu má Nafion dobrou afinitu pro kationtové fotosensitizery a zejména pak pro kationtové fotosensitizery na bázi komplexů s kovy. Tyto koordinační sloučeniny bývají tvořeny velkými organickými ligandy s hydrofobním charakterem a jsou na Nafionu dobře imobilizovány<sup>38</sup>.

Imobilizace fotosensitizerů v Nafionu může zvýšit fotoindukovaný elektronový přechod, vzhledem k tomu že po imobilizaci dochází k omezení mezimolekulárního zhášení a vibrační relaxace fotoexcitovaných molekul fotosensitizeru<sup>38</sup>.

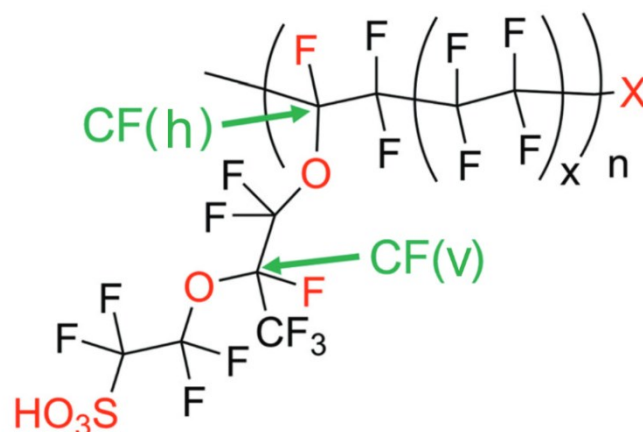
#### 1.4.4 Degradace nafionové membrány

Vzhledem k rozsáhlému použití nafionových membrán především v palivových článcích se někteří autoři zabývali i otázkou stability těchto membrán. Překvapivě bylo zjištěno, že nafionová membrána je v přítomnosti kationtů železa jen omezeně stabilní a generuje radikálové částice. Mechanismus generace těchto radikálů není zcela objasněn a je v současné době předmětem studia. Někteří autoři uvažují o tvorbě radikálových částic na základě Fentonovy reakce zakládající se na reakci peroxidu vodíku s kationty železa (viz **kap. 1.1.4**). (cit.<sup>7,51</sup>). Mechanismus ale bude zřejmě složitější. Pro degradační reakci je zřejmě podstatná přítomnost trojmocného železa. Nutná naopak není přítomnost peroxidu vodíku.<sup>52</sup> Publikované výsledky se však shodují na zásadní roli kationtů na aktivaci disociace vazby C–S na počátku kaskády radikálových reakcí, vedoucích ke vzniku radikálových částic<sup>7,51</sup>. Jedna z publikací také upozornila na značný vliv UV záření na disociaci vazeb v nafionové membráně<sup>52</sup>.

Z teoretických modelů, které však nezahrnovaly vliv hydratace sulfo-skupin, bylo zjištěno, že pouze OH<sup>·</sup> je schopen štěpit koncové skupiny. A to jak na hlavním tak i vedlejším řetězci nafionové membrány.<sup>53</sup> K tomu dochází díky schopnosti OH<sup>·</sup> odebrat z polymerní struktury vodík za současného vzniku radikálu (**Rov. (1.3)**), který může započít degradační kaskádu.<sup>52</sup> Kromě využití teoretických modelů bylo ke zkoumání degradačních procesů nafionové membrány použito rovněž techniky ESR (přímá a využívající spinové pasti). Studie touto metodou identifikovaly několik membránových radikálů, a to také jak z hlavního, tak postranního řetězce Nafionu.<sup>52</sup>

Již prokázanými produkty a meziproducty z procesu degradace nafionové membrány jsou např. fragmenty  $(\text{H}_2\text{O})_n\text{HO}_3\text{S}-\text{CF}_2-\text{CF}_2-\text{O}-\text{O}-\text{H}$ , který je štěpen na dva pravděpodobné produkty:  $\text{CF}_3-\text{CFO}^- - \text{O}-\text{OH}$  a  $(\text{H}_2\text{O})_n\text{HO}_3\text{S}-\text{CF}_3$ . Experimentálně byla rovněž zaznamenána přítomnost  $\text{SO}_2$ ,  $\text{CO}_2$  a HF uvolňujících se jako produkt následných degradačních reakcí v nafionové membráně. Dalšími potvrzenými štěpnými radikály byly fragmenty končící HF- a  $\text{CF}_2$ -skupinou. Jedná se např.  $\text{R}-\text{CF}_2-\text{CF}_2^{\cdot}$  vzniklý štěpením vazby C–S.<sup>53</sup>

Ucelený přehled o degradaci nafionové membrány navrhla studie od Frühwirth a kol., která shrnuje předešlé studie provedené za různých podmínek (palivový článek, Fentonova reakce). Tato studie přibližuje degradační kaskády a poukazuje na slabá místa ve struktuře membrány (viz **Obr. 1.6**). Nafionová membrána má dle této studie čtyři slabá místa: COOH skupinu v teftonovém skeletu vzniklou při výrobě membrány; vazbu uhlíku na sulfo-skupinu na postranním řetězci; etherovou vazbu a terciární uhlíky nacházející se ve skeletu i postranních řetězcích membrány. Každá z uvedených degradačních cest probíhá vlastním mechanismem.<sup>51</sup>



**Obr. 1.6:** Degradací ohrožená místa ve struktuře nafionové membrány znázorněny červeně; X představuje koncovou COOH skupinu na hlavním řetězci; CF (h) představuje CF skupinu na hlavním řetězci a CF (v) na vedlejším řetězci. Převzato a upraveno z cit.<sup>51</sup>.

Degradace hlavního řetězce je silně ovlivněna přítomností COOH skupin. Navrhovaná degradační kaskáda je iniciována  $\text{OH}^\cdot$ , který COOH skupině odtrhne atom vodíku. Dochází k odštěpení  $\text{CO}_2$  a vzniku membránového radikálu. Vzniklý radikál, jehož koncový uhlík obsahuje dvě fluoridové skupiny reaguje s další molekulou  $\text{OH}^\cdot$ . Vzniklý primární alkohol je postupně eliminován za vzniku dvou molekul HF a dochází k regeneraci karboxylové kyseliny kratší o jeden uhlík. Této degradační kaskádě je možné zamezit přeměnou COOH skupiny na skupinu  $\text{CF}_3$ .<sup>51</sup>

Druhým kritickým místem sulfo-skupina postranního řetězce. Degradace nafionové membrány byla analyzována za podmínek foto-Fentonovy reakce je. Fentonovou reakcí vzniklý  $\text{OH}^\cdot$  interaguje s vazbou OH v sulfo-skupině postranního řetězce Nafionu. Ta je v tomto kroku disociována za vzniku membránového radikálu ( $\text{O}-\text{CF}_2-\text{CF}_2-\text{SO}_3^\cdot$ ), který reaguje s dalším  $\text{OH}^\cdot$ . Reakce dále běží stejným mechanismem jako výše uvedená reakce, dokud nedojde k odštěpení celého postranního řetězce a štěpení hlavního řetězce na menší fragmenty. Radikál obsahující sulfo-skupinu vzniklý v prvním kroku je možné generovat i peroxidem vodíku ze dvou koncových sulfo-skupin. Tato reakce vede ke stejným produktům.<sup>51</sup>

Etherová vazba je dalším místem ve struktuře nafionové membrány, které je náchylné k disociaci zprostředkované oxidačním účinkem radikálů. Navrhovaný mechanismus je iniciován

radikálem štěpící etherovou vazbu. Kvůli nespecifickému působení radikálů je disociace vazby možná z obou stran. Z toho důvodu její disociaci vede k tvorbě odlišných membránových fragmentů.<sup>51</sup>

První tři zmíněné degradační mechanismy jsou závislé na iniciaci ROS. V palivových člancích (H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>) dochází generaci vodíkových radikálů (H<sup>•</sup>) po reakci plynného vodíku s OH<sup>•</sup> (**Rov. (1.26)**). (cit.<sup>51</sup>)



Pro důkaz degradačních účinků byl H<sup>•</sup> generován z vodného roztoku kyseliny sírové po jejím ozařování proudem elektronů. Tím byl eliminován vliv ROS přítomných při reakcích v palivových člancích.<sup>51</sup>

Generovaný H<sup>•</sup> cílí na terciární uhlík ve vazbě C–F. v hlavním i postranním řetězci nafionové membrány. Účinky H<sup>•</sup> vedou ke štěpení C–F vazeb a vzniku fragmentů postranního řetězce Nafionu. V reálných podmínkách palivových článků lze očekávat, že mechanismus degradace bude výrazně komplikovanější, kvůli synergickému působení ROS i H<sup>•</sup>.<sup>51</sup> V podmínkách fotosensitizované reakce nemá tento mechanismus zásadní význam.

## 1.5 Dosavadní poznatky

V naší laboratoři se zabýváme enkapsulací fotosensitizerů do různých typů pevných nosičů, především nanočástic<sup>54,55</sup> a nanovlákněných membrán<sup>33,56</sup>. K enkapsulaci jsou využívány fotosensitizery silně absorbující ve viditelném spektru (porfyriny a ftalocyaniny) fotogenerující cytotoxický O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>). Schopnost fotoprodukce O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) byla prokázána časově rozlišenou spektroskopii<sup>57</sup>. Foto-antibakteriální účinky O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) byly u těchto materiálů prokázány nejen u Gram-negativních a Gram-pozitivních bakterií ale také u virů<sup>58,59</sup>. Singletový kyslík má oproti běžně používaným antibiotikům zásadní výhodu. Bakterie si na něj netvoří rezistenci.

Jako jedním z vhodných kandidátů jako pevný nosič se jeví Nafion, protože je to membrána transparentní, komerčně dostupná, záporně nabitá, což umožňuje navázat kationtové fotosensitizery na svém povrchu<sup>38,60</sup>. U nafionových membrán je známo, že aniontová povaha sulfo-skupin je schopná vázat ionty železa a je více selektivní pro více valentní kationty, např. Fe<sup>3+</sup> (cit.<sup>51</sup>). Zároveň i samotný Nafion pouze s navázanými ionty trojmocného železa po ozáření fotogeneruje ROS<sup>61</sup>. Dá se tedy předpokládat, že tyto materiály budou mít foto-antibakteriální vlastnosti. Baktericidní vlastnosti lze předpokládat i u samotné nafionové membrány, protože je její povrch silně kyselý<sup>45</sup>.

Nafion svým záporně nabitým povrchem odpuzuje stejně nabité bakterie<sup>62,63</sup>. To je zajímavé především pro aplikace využívající antibakteriální povrchy zabraňující tvorbě biofilmu.

## 2 CÍL PRÁCE

Cíl bakalářské práce byla imobilizace tetrakationtového 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium)porfyrin tetra(p-toluensulfonátu) na záporně nabitou membránu Nafion, charakterizace této membrány spektrálními metodami, ověření fotogenerace  $O_2(^1\Delta_g)$  a studium foto-antibakteriálních vlastností tohoto materiálu. Dílčím cílem bylo popsat i reaktivní částice fotogenerující se na povrchu nafionové membrány bez přítomnosti fotosensitizeru.



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

**5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium)porfyrin tetra(p-toluensulfonát) (TMPyP);**  
Sigma--Aldrich

**Ampicilin sodná sůl**  $\geq 99$  %; Carl Roth

**CaCl<sub>2</sub>** bezvodý p.a.; Penta

**(COOH)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O** p.a.; Lachema

**D<sub>2</sub>O** 99%; VWR Chemicals

**EDTA disodná sůl** p.a.; Sigma-Aldrich

**Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O** p.a.; Penta

**FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O** p.a.; Lachner

**Fosfátový pufr**, pH = 7,0; Carl Roth

**Fosfátový pufr**, pH = 7,4; Carl Roth

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** p.a.; Sigma-Aldrich

**KI** p.a.; Penta

**Kyselina močová sodná sůl**  $\geq 99$  %; Sigma-Aldrich

**Kyselina tereftalová** p.a.; Sigma-Aldrich

**LB-Agar**; Carl Roth

**LB-Medium**; Carl Roth

**NaCl** p.a.; Lachner

**Nafion 117**, tloušťka 0,1778 mm; Sigma-Aldrich

**NaOH** p.a.; Penta

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>** p.a.; Sigma-Aldrich

**Roti Cell PBS pufr**, pH = 7,4; sterilní; Carl-Roth

### 3.2 Roztoky

#### 3.2.1 Jodidové činidlo pro detekci singletového kyslíku

Detekční jodidové činidlo pro singletový kyslík O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) o objemu 1 l bylo připraveno rozpuštěním 0,02 mol dihydrogenfosforečnanu draselného (2,7241 g) v 1 l deionizované vody. Poté bylo 0,1M hydroxidem sodným upraveno pH na hodnotu 6,2. V takto připraveném roztoku pufru bylo rozpuštěno 0,12 mol jodidu draselného (19,92 g) a 10 μmol molybdenanu amonného (0,0020 g).

### 3.2.2 Agarový substrát

Agarový substrát pro kultivaci bakterií *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  byl připravován v kádince disperzí 17,5 g agaru v 500 ml deionizované vody. Následně byla kádinka přikryta alobalem a vložena do sterilizátoru (126 °C, 30 minut). Po sterilizaci se za míchání nechal roztok agaru volně zchladnout na 55 °C, kdy k němu bylo přidáno 50 mg sodné soli ampicilinu. Po důkladném rozmíchání byl horký roztok rozlit do sterilních Petriho misek a nechal se zchladnout.

## 3.3 Přístroje a metody

### 3.3.1 Příprava Nafionu k měření

Standardizovaný vzorek Nafionu o rozměrech 0,75×3,0 cm byl vyjmut z lázně fosfátového pufru (pH = 7,0) nebo deionizované vody po nejméně 48 hodinách. Vzorky byly opláchnuty po dobu 2 minut v deionizované vodě. Do plastových nádobek byly připraveny 2 roztoky (TMPyP a oplachový roztok deionizované vody). Nafion byl vložen do roztoku TMPyPu, po dobu vhodnou pro daný experiment. Následně byl po dobu 2 minut opět vložen do oplachového roztoku deionizované vody. Při delším skladování byl Nafion s navázaným TMPyPem vložen do nového uchovávacího roztoku (fosfátový pufr; pH = 7,0 nebo deionizovaná voda).

### 3.3.2 Absorpční spektra v UV/VIS oblasti

Na přístroji Cary 4000 UV-VIS (Agilent Technologies, USA) byla měřena absorpční spektra TMPyPu v UV/VIS oblasti v rozsahu  $\lambda = 350\text{--}800$  nm. Vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě v deionizované vodě.

Absorpční spektra trijodidu a sodné soli kyseliny močové byla měřena v UV/VIS oblasti na spektrofotometru UV-300 (Unicam, UK). Vzorky Nafionu byly parafilmem upevněny na křemenném sklíčku diagonálně umístěném v křemenné kyvetě. Měřeno bylo samotné jodidové činidlo v rozsahu  $\lambda = 250\text{--}500$  nm, respektive kyselina močová ve stejném rozsahu vlnových délek.

### 3.3.3 Fluorescenční spektra

Emisní a excitační spektra TMPyPu byla naměřena spektrofluorimetrem FLS980 (Edinburgh Instruments, UK). Vzorky Nafionu upevněné parafilmem na křemenném sklíčku byly měřeny v držáku suchých vzorků umístěném diagonálně ke směru světelného toku. Excitace byla sledována v rozsahu  $\lambda = 350\text{--}500$  nm a emise v rozsahu  $\lambda = 600\text{--}800$  nm.

### 3.3.4 Měření pH

Pro měření pH byl použit pH-metr pH 526 (WTW, Německo) opatřený skleněnou kombinovanou elektrodou s gelovým elektrolytem kalibrovanou třemi standardními pufrů. Měřený roztok byl míchán na magnetické míchače.

### 3.3.5 Měření iontové výměnné kapacity

Vzorek Nafionu byl zvážen v suchém stavu s přesností na 4 desetinná místa a byl vložen do roztoku chloridu sodného (1 M). Dále byl míchán na třepače po dobu 48 hodin při 110 RPM. Tím došlo k výměně  $H^+$  iontů za  $Na^+$  ionty. Po této době byly uvolněné  $H^+$  ionty ztitrovány odměrným roztokem hydroxidu sodného (0,09853 M) standardizovaným na kyselinu šŕavelovou. Bod ekvivalence byl stanoven potenciometricky s kalibrovaným pH-metrem. Iontová kapacita byla vypočtena dle vztahu **Rov. (3.1)** (cit.<sup>64</sup>).

$$(3.1) \quad IEC = (c \times V)_{NaOH} / m_{Nafion}$$

kde  $IEC$  je iontová kapacita Nafionu [mol/g],  $c(NaOH)$  molární koncentrace hydroxidu sodného [mol/l],  $V(NaOH)$  objem hydroxidu sodného potřebný k neutralizaci uvolněných  $H^+$  iontů [l] a  $m(Nafion)$  hmotnost suché nafionové membrány [g].

### 3.3.6 Ozařovací experimenty

Vzorky Nafionu byly ozařovány na optické lavici rozlišnými světelnými zdroji. Vzorky byly ozařovány ze vzdálenosti 27 cm monochromatickými 18W LED světelnými zdroji (RubyLux, USA): modré světlo ( $\lambda = 413$  nm), zelené světlo ( $\lambda = 515$  nm), žluté světlo ( $\lambda = 595$  nm) a červené světlo ( $\lambda = 658$  nm). Při této vzdálenosti nedocházelo k výraznému tepelnému ohřevu měřených vzorků. Dalším použitým světelným zdrojem byl polychromatický 450W solární simulátor Oriol Sol1A (Newport, USA), kterým byl vzorek Nafionu ozařovaný ze vzdálenosti 33 cm. Spektrální charakteristiky použitých světelných zdrojů byly zjištěny pomocí spektrometru ILT960 (International Light Technologies, USA) a jsou uvedeny v **Obr. 4.7**.

### 3.3.7 Detekce fotogenerovaného singletového kyslíku

#### 3.3.7.1 Časově rozlišná luminiscence

Přímá detekce  $O_2(^1\Delta_g)$  byla sledována pomocí časově rozlišené spektroskopie při  $\lambda = 1270$  nm, jejíž princip je popsán v **kap. 1.2.1**. K excitaci byl použit Nd:YAG laser Quantel Q-Smart 450 ( $\lambda = 355$  nm, délka pulsu 5 ~ ns, energie ~ 1mJ/puls). Luminiscence  $O_2(^1\Delta_g)$  byla sledována kolmo od laserového excitačního zdroje. Záření procházelo skrz pásmový filtr ( $\lambda > 1000$  nm) a interferenční filtr ( $\lambda = 1270$  nm). K detekci byla použita jednotka složená z germaniové diody J16-8SP-R05M-HS (Judson, USA) a násobiče signálu. Výsledný signál fosforescence byl

zprůměrován z 500 měření, aby došlo ke zvýraznění signálu vůči šumu. Ke zjištění doby života  $O_2(^1\Delta_g)$  byla křivka fosforescence proložena monoexponenciální funkcí popsanou vztahem

$$(3.2) \quad I = I_0 \times \exp(-t/\tau_\Delta)$$

kde  $I$  označuje intenzitu,  $I_0$  počáteční intenzitu,  $t$  čas [ $\mu\text{s}$ ] a  $\tau_\Delta$  dobu života  $O_2(^1\Delta_g)$  [ $\mu\text{s}$ ]. Zmíněná funkce nebyla proložena experimentálními daty ihned po excitaci, protože by experimentálně stanovená hodnota doby života byla ovlivněna dohasínající fluorescencí a rozptylem světla.

### 3.3.7.2 Jodidová metoda

Pro detekci fotogenerovaného  $O_2(^1\Delta_g)$  byla použita jodidová metoda<sup>34</sup>. Princip metody je uveden v **kap.1.2.2**. V křemenné kyvetě obsahující 1,25 ml jodidového činidla (příprava viz **kap. 3.2.1**) a 1,25 ml deionizované případně těžké vody byl ozařován vzorek Nafionu (0,75×3 cm) po 30s intervalech. Po každém ozáření bylo zaznamenáno absorpční spektrum trijodidu s absorpčními maximy při  $\lambda = 287$  nm a  $\lambda = 351$  nm. Kinetika tvorby trijodidu při  $\lambda = 351$  nm byla sledována pro různé experimentální podmínky:  $D_2O$ , s a bez fotosensitizeru, bez ozařování. K ozařování byl použit modrý monochromatický 18W LED zdroj ( $\lambda = 413$  nm; RubyLux, USA).

### 3.3.7.3 Fotodegradace kyseliny močové

Princip fotodegradace kyseliny močové je uveden v **kap.1.2.2**. Tento substrát ( $10^{-3}$  M) byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru (pH 7,4) a před měřením byl 10× zředěn deionizovanou vodou. Vzorek Nafionu (0,75×3 cm) připevněný parafilmem na křemenném sklíčku byl umístěn do kyvety se sodnou solí kyseliny močové (2,5 ml,  $10^{-4}$  M,) a byl ozařován po 2minutových intervalech. Po každém ozáření bylo zaznamenáno absorpční spektrum kyseliny močové ( $\lambda = 292$  nm). Byla sledována kinetika fotodegradace substrátu kyseliny močové za různých podmínek: v přítomnosti nebo nepřítomnosti fotosensitizeru TMPyPu,  $D_2O$ , bez ozáření. K ozařování bylo použit modrý monochromatický 18W LED zdroj ( $\lambda = 413$  nm; RubyLux, USA).

## 3.3.8 Detekce dalších reaktivních kyslíkových částic

### 3.3.8.1 Nespecifická detekce jodidovou metodou

Pro orientační detekci fotogenerovaných ROS byla použita jodidová metoda detekce. Měření probíhalo obdobným způsobem popsaným v **kap. 3.3.7.2**. Rozdíl spočíval v tom, že bylo změřeno absorpční spektrum trijodidu pouze před a po 5minutovém ozařování modrým monochromatickým 18W LED zdrojem ( $\lambda = 413$ nm; RubyLux, USA).

Vzorky Nafionu (0,75×1,5 cm) z deionizované vody, bez navázaného TMPyPu byly před ozařováním modifikovány různým způsobem. Tyto způsoby modifikace zahrnovaly adsorpci v roztocích  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  a EDTA (5 ml,  $10^{-3}$  M, 30 minut) a neutralizaci ve fosfátovém pufru

(pH = 7,0). Vzorky s adsorbovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty byly použity při měření jodidového činidla s 50% podílem těžké vody a při měření v atmosféře dusíku zajištěné probubláváním jodidového činidla dusíkem po dobu 20 minut před i během ozařování vzorku.

Při ozařování jodidového činidla různými světelnými zdroji popsaných v **kap. 3.3.6**, byl použit Nafion s adsorbovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty (5 ml,  $10^{-3}$  M, 30 min adsorpce). Postup je shodný s detekcí  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  (viz **kap. 3.3.7.2**).

### **3.3.8.2 Detekce hydroxylových radikálů kyselinou tereftalovou**

Vzorek Nafionu (0,75×3 cm) z deionizované vody, s adsorbovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty (5 ml,  $10^{-3}$  M, 30 minut) byl vložen do křemenné kyvety s kyselinou tereftalovou (3 ml, 10 mM, pH = 7,4). Jako kontrolní vzorek byl zvolen Nafion důkladně omytý roztokem EDTA (5 ml,  $10^{-3}$  M, 30 minut). Před a po 30minutovém ozařování modrým monochromatickým 18W LED zdrojem ( $\lambda = 413\text{nm}$ ; RubyLux, USA), byl u obou vzorků po excitaci ( $\lambda = 312\text{ nm}$ ) měřen nárůst fluorescence 2-hydroxytereftalové kyseliny ( $\lambda = 426\text{ nm}$ ).

Princip detekce  $\text{OH}^\cdot$  kyselinou tereftalovou je popsán v **kap. 1.1.2**.

### **3.3.8.3 Nepřímá detekce peroxidu vodíku post-iradiačním efektem**

K detekci peroxidu vodíku byla použita nepřímá metoda založená na předpokladu, že peroxid vodíku je déle žijící částicí formující se i po ozařování<sup>65</sup> nafionové membrány (0,75×3 cm) v jodidovém činidle (2,5 ml, zředěno deionizovanou vodou 1 : 1). U vzorku Nafionu s a bez navázaných iontů  $\text{Fe}^{3+}$  byl měřen nárůst absorpčních pásů trijodidu při  $\lambda = 287\text{ nm}$  a  $\lambda = 351\text{ nm}$  před, ihned a 60 minut po ozáření LED zdrojem ( $\lambda = 413\text{ nm}$ ).

## **3.4 Foto-antibakteriální testy**

Pro měření foto-antibakteriálních vlastností nafionových membrán byla použita kultura bakteriálního kmene *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5a (Invitrogen, USA) odolná vůči antibiotiku ampicilinu (sodná sůl) s plazmidem pGME11Z (Promega, USA).

Ze zásobního roztoku bakteriální suspenze byl odebrán 1 ml bakteriálního kmene *E. coli*, smíchan s 10 ml LB-média (20 g/l; 100 mg ampicilinu) a kultivován na orbitální třepačce (120 RPM, 37 °C, cca 15 h). Z přes noc inkubované bakteriální kultury bylo odebráno 300  $\mu\text{l}$  suspenze, která byla přidána k 10 ml LB-média (20 g/l; 100 mg sodné soli ampicilinu) pro přípravu lépe definované bakteriální kultury kultivované ve vyhřívané třepačce (37 °C, 120 RPM). V třepačce byla kultura ponechána, dokud absorbance při  $\lambda = 600\text{ nm}$  nedosáhla hodnoty cca 1,0 (po cca 3 h).

Připravená bakteriální kultura byla 350× zředěna ve sterilním komerčně připraveném fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS „Phosphate-Buffered Saline“).

Nafionová membrána (0,75×1,5 cm) v deionizované vodě s i bez navázaného TMPyPu nebo Fe<sup>3+</sup> iontů byla neutralizována ve fosfátovém pufru (pH = 7,0). Neutrální nafionové membrány byly lehce osušeny a z obou stran smočeny na buničině navlhčené roztokem PBS (pH = 7,4) umístěné v Petriho misce. Následně bylo na Nafion po 0,5 μl kapičkách napipetováno 5 μl 350× zředěné bakteriální suspenze a byla ponechána ve tmě 5 minut inkubovat. Poté byla nafionová membrána na Petriho misce s buničinou napuštěnou PBS (pH = 7,4) buď ponechána ve tmě nebo ozařována (5, 10, 15 nebo 30 minut) modrým monochromatickým LED světelným zdrojem ( $\lambda = 413$  nm) s 400 nm pásmovým UV-filtrem (viz **kap. 3.3.6**).

Po ozařování/inkubaci ve tmě byla bakteriální suspenze z nafionové membrány 30 s intenzivně vytřepávána na vortexu do 495 μl sterilního PBS (pH = 7,4). Membrána byla z roztoku odstraněna a na agarovou plotnu (příprava viz **kap.3.2.2**) bylo z každého vzorku nanášeno 150 μl bakteriální suspenze v PBS (pH = 7,4). Po rozetření byly agarové plotny 18 hodin inkubovány ve tmě při 37 °C. Vzorky byly nanášeny na 2 agarové plotny ve 3 nezávislých stanoveních. Agarové plotny byly vyfoceny a v programu OpenCFU byl vyhodnocen počet kolonií (CFU „Colony Forming Unit“).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Iontová kapacita Nafionu

Jak je uvedeno v **kap. 2**, hlavním cílem práce bylo ověřit možnost vázat kationtové fotosensitizery na záporně nabitou transparentní membránu Nafion. Komerčně dostupná nafionová membrána (Chemours company) má tloušťku 0,1778 mm. Její tloušťka byla ověřena tloušťkoměrem (MituToyo). Naměřená tloušťka 0,18 mm se shoduje s tloušťkou udávanou výrobcem. Výrobce uvádí iontovou kapacitu sulfo-skupin popsanou jako ekvivalentní hmotnost (*EW*) Nafionu na mol sulfo-skupin mající hodnotu 1100 g *EW*/mol sulfo-skupin<sup>61</sup>. Při přepočtu na iontovou kapacitu sulfo-skupin dle **Rov. (4.1)**,

$$(4.1) \quad IEC = 1000/EW$$

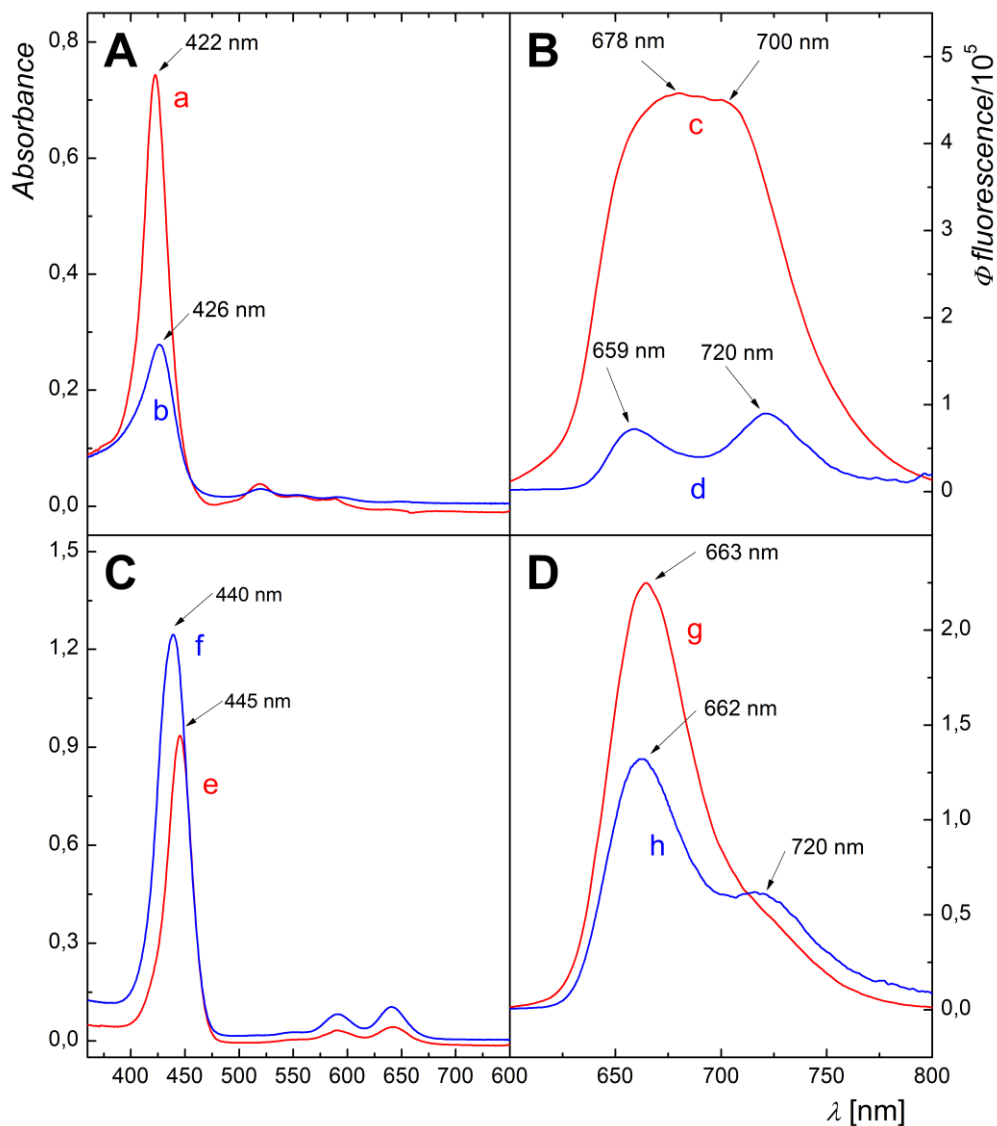
kde *IEC* představuje iontovou kapacitu nafionové membrány [mmol/g] a *EW* ekvivalentní hmotnost [g/mol], dostaneme hodnotu 0,909 mmol/g membrány. Iontová kapacita této iontové membrány o rozměrech 0,75×3 cm s hmotností 0,0424 g byla stanovena titrační metodou viz **kap. 3.3.5**. Iontová kapacita této standardizované nafionové membrány byla dle **Rov. (3.1)**

$IEC = (c \times V)_{\text{NaOH}}/m_{\text{Nafion}}$  stanovena na 0,883 mmol/g. Na základě toho lze konstatovat, že zjištěná iontová kapacita přibližně odpovídá počtu výrobcem uvedených sulfo-skupin.

### 4.2 Spektrální vlastnosti TMPyPu

Důkladně opláchnutá membrána o velikosti 0,75×3 cm byla vložena na 3,5 minut do roztoku TMPyPu (5 ml, 10<sup>-4</sup> M), vyjmuta, znovu opláchnuta a spektrálně charakterizována. Absorpční a fluorescenční spektra TMPyPu navázaného na membránu Nafion byly porovnány s vlastnostmi samotného TMPyPu v jeho neutrální a kyselé formě ve vodném roztoku. Jak je vidět z **Obr. 4.1\_C** absorpční pásy vázané formy TMPyPu na Nafionu odpovídají protonizované formě volného TMPyPu. V kyselém prostředí dochází k protonaci atomů dusíku v pyrolovém kruhu TMPyPu poskytující diprotonovanou formu TMPyPH<sub>2</sub><sup>2+</sup> (cit.<sup>32</sup>). Část atomů dusíku však zůstává v důsledku tzv. „stacking effect“ neprotonovaná<sup>66</sup> a na spektru je vidět mírný hypsochromní efekt. Tato forma poskytuje charakteristický Soretův pás okolo  $\lambda = 442$  nm. Kyselá forma TMPyPu je rovněž charakterizovaná redukcí původně 4 Q-pásů okolo ( $\lambda = 518, 556, 583, 638$  nm) na 2 Q-pásy ( $\lambda = 589, 638$  nm)<sup>67</sup> v souladu s vyšší symetrií molekuly<sup>68</sup>. Při porovnání kyselé formy TMPyPu a vázaného na kyselou formu Nafionu je vidět mírný bathochromní posun u vázané formy, což může být dáno menší polaritou prostředí v blízkosti povrchu nafionového polymeru<sup>57</sup>. U TMPyPu je známo, že má velmi nízkou hodnotu pK<sub>a</sub> = 1,3 (cit.<sup>69</sup>), a proto se velmi obtížně protonizuje. Z toho vyplývá velmi kyselý charakter povrchu Nafionu

tvořený sulfo-skupinami. Jak je vidět na **Obr. 4.1\_A**, je-li nafionová membrána předem neutralizovaná fosfátovým pufrům (pH = 7,0), spektrum vázaného TMPyPu, tj. Soretův pás v oblasti  $\lambda = 422$  nm a 4 méně intenzivní Q-pásky (oblast  $\lambda = 518$ – $638$  nm), odpovídá neutrální formě TMPyPu ve vodném roztoku<sup>67</sup>.



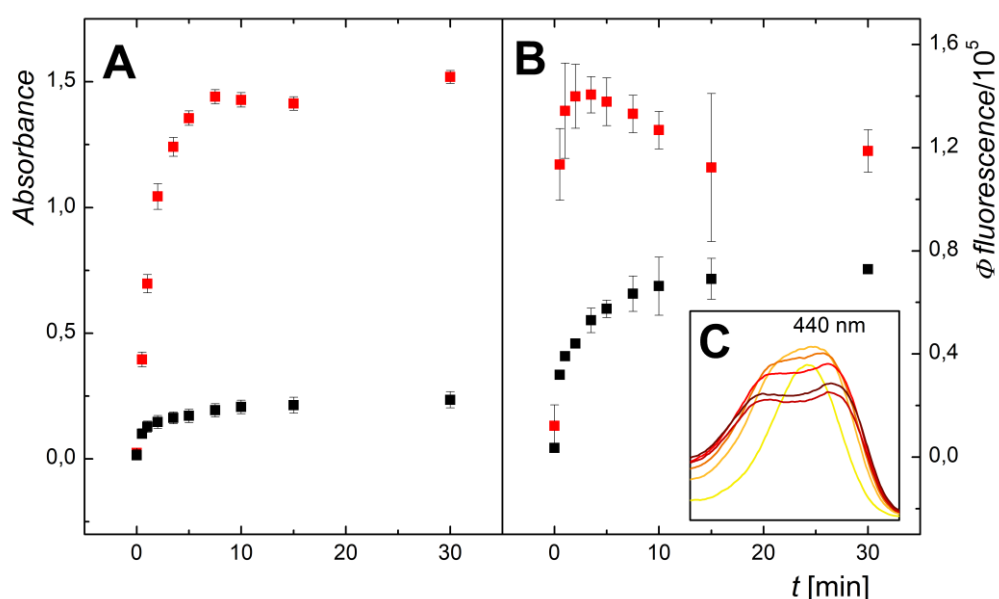
**Obr. 4.1:** Absorpční (a, b, e, f) a emisní (c, d, g, h) spektra volného (červeně) a vázaného (modře) TMPyPu na nafionové membráně. **Panel\_A:** absorpční spektrum TMPyPu v neutrální formě; **Panel\_B:** emisní spektrum TMPyPu v neutrální formě; **Panel\_C:** absorpční spektrum TMPyPu v protonizované formě; **Panel\_D:** emisní spektrum TMPyPu v protonizované formě. Šipky značí absorpční, resp. emisní maxima TMPyPu.

Navázáním tetrakationového TMPyPu na nafionovou membránu došlo k výrazné změně charakteru emisního pásu jak u neutrálního, tak protonizovaného TMPyPu (**Obr. 4.1\_D**). Volná forma TMPyPu v neutrální formě (**Obr. 4.1\_B**) poskytuje 1 široký emisní pás, který je způsoben spojením signálů prvního excitovaného singletového stavu s blízkým signálem přenosu náboje (CT, „charge transfer“) způsobeném volnou rotací elektron-akceptorové N-methylpyridylové skupiny na TMPyPu<sup>70</sup>. Po navázání TMPyPu na membránu Nafion došlo k výrazné separaci obou signálů na dva emisní pásy ( $\lambda = 660$ ,  $720$  nm), protože došlo k omezení zmíněné

N-methylpyridylové skupiny. Podobné rozlišení emisních spekter TMPyPu bylo pozorováno i u jiných systémů<sup>32,71</sup>

### 4.2.1 Kinetika adsorpce TMPyPu na Nafion

Vzhledem k cíli práce nebylo snahou zjistit maximální možnou adsorpci na kyselý i neutrální povrch nafionové membrány, ale zjistit ideální koncentraci vázaného TMPyPu v jeho maximální fotoaktivní formě, kdy nedochází ke zhášení excitovaných stavů fotosensitizeru<sup>57</sup>. Z tohoto důvodu byla sledována kinetika adsorpce TMPyPu na povrch kyselého, respektive neutrálního Nafionu měřením absorpce ale i emise navázaného TMPyPu v maximu jeho emisního pásu ( $\lambda = 660$  nm).



**Obr. 4.2:** Kinetika adsorpce TMPyPu na Nafion v deionizované vodě (červeně) a na Nafion ve fosfátovém pufru (pH = 7,0) (černě) sledována v absorpčních maximech ( $\lambda = 422$  nm neutrální forma a  $\lambda = 440$  nm protonizovaná forma, **Panel\_A**), emisních maximech ( $\lambda = 660$  nm, **Panel\_B**). Vložený obrázek (**Panel\_C**) ilustruje kinetiku adsorpce TMPyPu na kyselý Nafion v excitačních spektrech ( $\lambda_{em} = 660$  nm) Průběh adsorpce ukazuje šipka. K měření absorpce i emise byl použit stejný vzorek Nafionu. Experimentální podmínky: 25 °C, zásobní roztok 5 ml,  $10^{-5}$  M TMPyP v H<sub>2</sub>O, 0,75×3 cm Nafionu (0,0452 g).

Jak vyplývá z **Obr. 4.2\_A** ionty fosfátového pufru (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) omezují kinetiku a míru adsorpce TMPyPu. Za daných experimentálních podmínek je po 30 minutách nafionová membrána maximálně vysycena TMPyPem.

Z **Obr. 4.2\_B** plyne, že maximální emise vázaného TMPyPu na kyselé formě Nafionu bylo dosaženo po cca 3,5 minutách na rozdíl od neutrální formy, kde k maximální emisi dochází až po 30 minutách.

Kinetiku emise TMPyPu, především na kyselý povrch Nafionu provází více faktorů. Při delší době adsorpce, a tedy větší koncentraci adsorbovaného TMPyPu, dochází k tzv. samozhášení („self-quenching effect“), kdy jedna fotoaktivní molekula zháší druhou. Je pravděpodobné, že se

též uplatňuje tzv. stínící efekt („filter effect“), kdy jedna molekula stíní druhou<sup>57,72</sup>, především při vyšších koncentracích TMPyPu, při kterých se molekuly TMPyPu již nemohou vázat na nafionovou membránu a vážou se samy na sebe. Tento tzv. „stacking effect“ je běžný u planárních porfyrinoidních molekul<sup>66</sup>. Takto agregované molekuly jsou již v prostředí o jiné polaritě a pH, což se projevuje i na spektrálních vlastnostech TMPyPu jako celku<sup>34,57</sup>. Tento efekt lze nejlépe pozorovat na postupném štěpení excitačních pásů vázaného TMPyPu (**Obr. 4.2\_C**). Všechny tyto 3 efekty ovlivňují sledovanou kinetiku emise vázaného TMPyPu. „Stacking effect“ se projevuje už i na zdánlivé odchylce hyperbolického průběhu adsorpce na kyselou formu Nafionu. Na rozdíl od kyselé formy Nafionu, se u kinetiky absorpce/emise TMPyPu na neutrální Nafion tyto projevy neukázaly, zjevně z důvodu menšího množství adsorbovaného TMPyPu.

Množství TMPyPu adsorbované na Nafion (2,25 cm<sup>2</sup>, tloušťka 0,0178 cm) v čase 3,5 min bylo stanoveno pro Nafion v deionizované vodě a 30 minut pro Nafion ve fosfátovém pufru (pH = 7,0). K výpočtu adsorbovaného množství TMPyPu byl použit rozdíl absorpce ( $\lambda = 422$  nm) zásobního roztoku TMPyPu (5 ml, 10<sup>-5</sup> M,  $\epsilon(\text{TMPyP})_{422} = 2,26 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ ) (cit.<sup>73</sup>) před a po vložení Nafionu.

Vypočtené množství adsorbovaného TMPyPu u obou vzorků Nafionu shrnuje **Tab. 4.1** **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Z tabulky vyplývá, že Nafion v deionizované vodě adsorboval zhruba 3× vyšší množství TMPyPu, než Nafion ve fosfátovém pufru.

**Tab. 4.1:** Množství TMPyPu adsorbovaného po 3,5 min (deionizovaná voda), resp. 30 min (fosfátový pufr, pH = 7,0) z vodného zásobního roztoku TMPyPu (5 ml, 10<sup>-5</sup> M) na Nafion (2,25 cm<sup>2</sup>).

Vzorek	$\Delta A$	$m_{\text{TMPyP}} [\mu\text{g}]$
Nafion v deionizované vodě	0,98	29,6
Nafion ve fosfátovém pufru	0,37	11,2

Dále byl ověřen předpoklad, že tetrakationový TMPyP se bude silně iontově vázat na záporně nabitou membránu Nafionu a bude mít malou tendenci se z této matrice uvolňovat vlivem vysoké iontové síly. Sledováno, proto bylo případné zpětné uvolňování navázaného TMPyPu z membrány za zvýšené iontové síly 1M chloridu sodného. Bylo zjištěno, že k žádnému uvolňování TMPyPu při zvýšení iontové síly nedochází a vazba TMPyPu k nafionové membráně je dostatečně silná.

Vzorky nafionové membrány (0,75×3 cm) s adsorbovaným TMPyPem byly po 3,5 minutách z prostředí deionizované vody (protonizovaná forma), resp. po 30 minutách z prostředí fosfátového pufru (pH = 7,0; neutrální forma) použity pro fotooxidační a baktericidní testy. Popis všech vzorků je shrnut v **Tab. 4.2**.

**Tab. 4.2:** Charakterizace použitých vzorků

Vzorek	Popis
<b>NF_P</b>	Membrána Nafion bez adsorbovaného TMPyPu v protonizovaném stavu
<b>NF_N</b>	Membrána Nafion bez adsorbovaného TMPyPu v neutrálním stavu
<b>NF_TMPyP_P</b>	Membrána Nafion s adsorbovaným TMPyPem v protonizovaném stavu
<b>NF_TMPyP_N</b>	Membrána Nafion s adsorbovaným TMPyPem v neutrálním stavu

## 4.3 Detekce singletového kyslíku

Cílem práce bylo připravit fotoaktivní nafionovou membránu s imobilizovaným tetrakationtovým fotosenzitizerem TMPyPem generujícím  $O_2(^1\Delta_g)$  s vysokým kvantovým výtěžkem<sup>74</sup>. Pro ověření generace  $O_2(^1\Delta_g)$  byla použita časově rozlišená spektroskopie a nepřímé chemické detekční metody (viz **kap 4.3.2** Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.). Pro obě metody detekce byly použity vzorky Nafionu s adsorbovaným TMPyPem v neutrální či kyselé formě s maximální emisí (viz **kap. 4.2**).

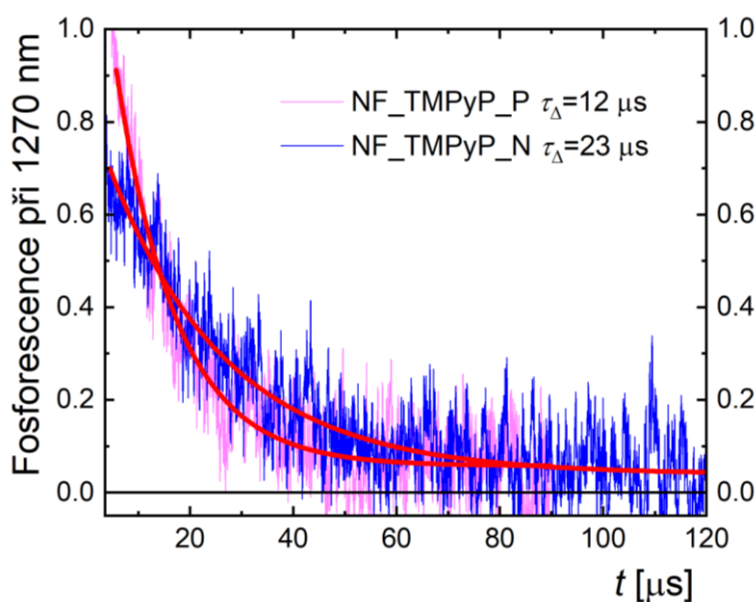
### 4.3.1 Časově rozlišenou spektroskopií

Vzhledem k tomu, že fosforescence  $O_2(^1\Delta_g)$  je přímou metodou jeho detekce, byla po laserovém pulsu metodou časově rozlišené spektroskopie sledována jeho fosforescence při  $\lambda = 1270$  nm. Protože kvantový výtěžek zářivé formy  $O_2(^1\Delta_g)$  dosahuje hodnot méně než  $10^{-4}$ , bylo nutné použít výkonné laserové zdroje a velmi citlivé, např. germaniové detektory<sup>27</sup>. Pro zvýraznění signálu fosforescence  $O_2(^1\Delta_g)$  vůči šumu je třeba měření mnohokrát opakovat.

Fosforescence  $O_2(^1\Delta_g)$  byla měřena u vzorků **NF\_N**, **NF\_P**, **NF\_TMPyP\_N** i **NF\_TMPyP\_P** vložených do křemenné kyvety s deionizovanou vodou. Experimentální body průměrované z 500 měření byly fitovány monoexponenciální funkcí. Z fitovací monoexponenciální funkce viz **Rov. (3.2)**, byla stanovena doba života  $O_2(^1\Delta_g)$  u obou měřených vzorků (viz. **Tab. 4.3**)

**Tab. 4.3:** Doba života  $\tau_\Delta$  stanovená časově rozlišenou spektroskopií z fluorescence  $O_2(^1\Delta_g)$  při  $\lambda = 1270$  nm u vzorků **NF\_TMPyP\_P** a **NF\_TMPyP\_N**

Vzorek	$\tau_\Delta(O_2(^1\Delta_g))$ [ $\mu$ s]
<b>NF_P</b>	/
<b>NF_N</b>	/
<b>NF_TMPyP_P</b>	12
<b>NF_TMPyP_N</b>	23



**Obr. 4.3:** Rozdíl signálu fosforescence  $O_2(^1\Delta_g)$  před a po excitačním laserovém pulzu sledovaný při  $\lambda = 1270$  nm u vzorku **NF\_TMPyP\_P** (modře) a **NF\_TMPyP\_N** (růžově). Červená křivka je fitovací funkce  $I = I_0 \times \exp(-t/\tau_{\Delta})$  prokládající průměrné experimentální body z 500 měření. Experimentální podmínky viz **kap. 3.3.7.1**.

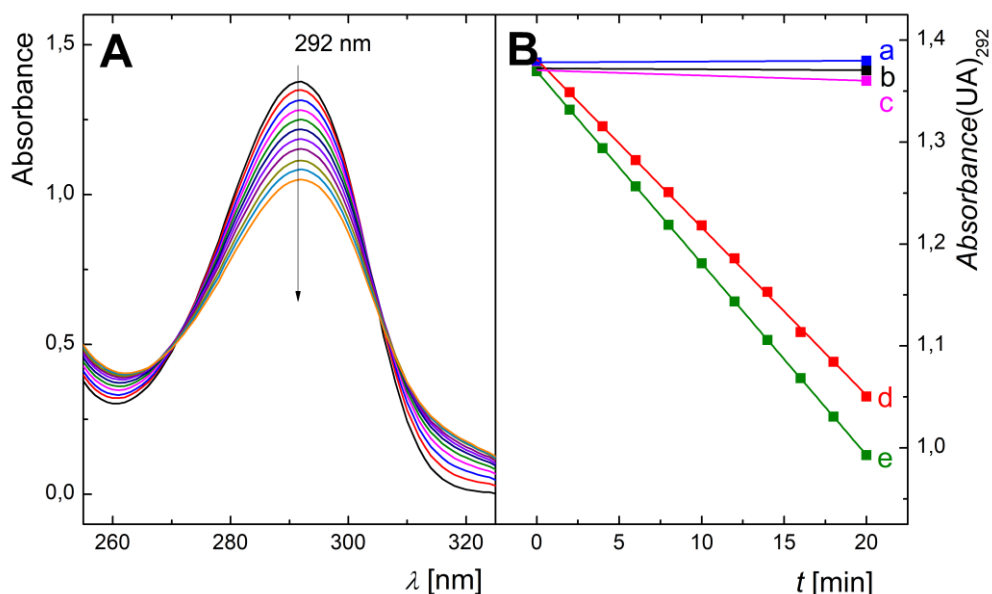
Jak vyplývá z **Obr. 4.3** u obou vzorků **NF\_TMPyP\_P** i **NF\_TMPyP\_N**, došlo po excitaci laserem k fotogeneraci  $O_2(^1\Delta_g)$ . U vzorku vyublaného dusíkem nebyl signál  $O_2(^1\Delta_g)$  nalezen. V případě protonizovaného vzorku byla doba života  $O_2(^1\Delta_g)$  zhruba 2× nižší než v případě neutralizované formy Nafionu. Důvodem je patrně již diskutovaná agregace („stacking effect“) TMPyPu, neboť agregované formy fotosensitizerů výrazně snižují dobu života tripletových stavů, a tedy i  $O_2(^1\Delta_g)$  (cit.<sup>66</sup>). U vzorků bez adsorbovaného TMPyPu nebyl signál  $O_2(^1\Delta_g)$  nalezen.

### 4.3.2 Chemickými metodami

Schopnost nafionové membrány s navázaným TMPyPem fotogenerovat  $O_2(^1\Delta_g)$  byla ověřena i pomocí dvou chemických metod detekce – fotodegradací kyseliny močové a jodidovou metodou. Tyto nepřímé metody detekce jsou důležité k potvrzení předpokladu, že  $O_2(^1\Delta_g)$  fotogenerovaný na povrchu membrány je schopen oxidovat chemické substráty ve svém okolí.

U metody fotodegradace kyseliny močové je využíván fakt, že tento vodorozpustný substrát specificky podléhá peroxidaci/degradaci účinkem  $O_2(^1\Delta_g)$ . Metoda, její princip a experimentální podmínky jsou popsány v **kap. 1.2.2**, resp. **kap.3.3.7.3**.

Fotooxidační účinek fotogenerovaného  $O_2(^1\Delta_g)$  byl touto metodou sledován pouze u vzorku **NF\_TMPyP\_N** připraveného adsorpcí z fosfátovém pufru a vzorku nafionové membrány bez navázaného TMPyPu. Vzorek **NF\_TMPyP\_P** připravený adsorpcí z deionizované vody nebyl použit, protože kyselý charakter jeho povrchu by mohl ovlivnit fotodegradační reakci kyseliny močové. Vedle ozářovaných vzorků byl testován i vzorek uchovávaný ve tmě (temná kontrola)<sup>29</sup>.



**Obr. 4.4:** UV/VIS spektra (**Panel\_A**) a kinetika fotodegradace (**Panel\_B**) kyseliny močové v přítomnosti vzorku **NF\_TMPyP\_N**, resp. **NF\_N** ozařovaném modrým LED zdrojem ( $\lambda = 413$  nm) 20 minut. Po 2 minutových ozařovacích intervalech byl měřen pokles absorpce kyseliny močové ( $\lambda = 292$  nm). **d** – **NF\_TMPyP\_N** ozařovaný; **b** – **NF\_N** ozařovaný; **c** – **NF\_TMPyP\_N** neozařovaný; **a** – **NF\_N** neozařovaný; **e** – **NF\_TMPyP\_N** ozařovaný v  $D_2O$ . Experimentální body v **Panelu\_B** jsou proloženy lineární regresní přímkou. Ozařovací zdroj: LED zdroj ( $\lambda = 413$  nm). Experimentální podmínky: nařionové vzorky ( $0,75 \times 3$  cm); kyselina močová ( $2,5$  ml,  $10^{-4}$  M, pH = 7,4); modrý LED zdroj ( $\lambda = 413$  nm).

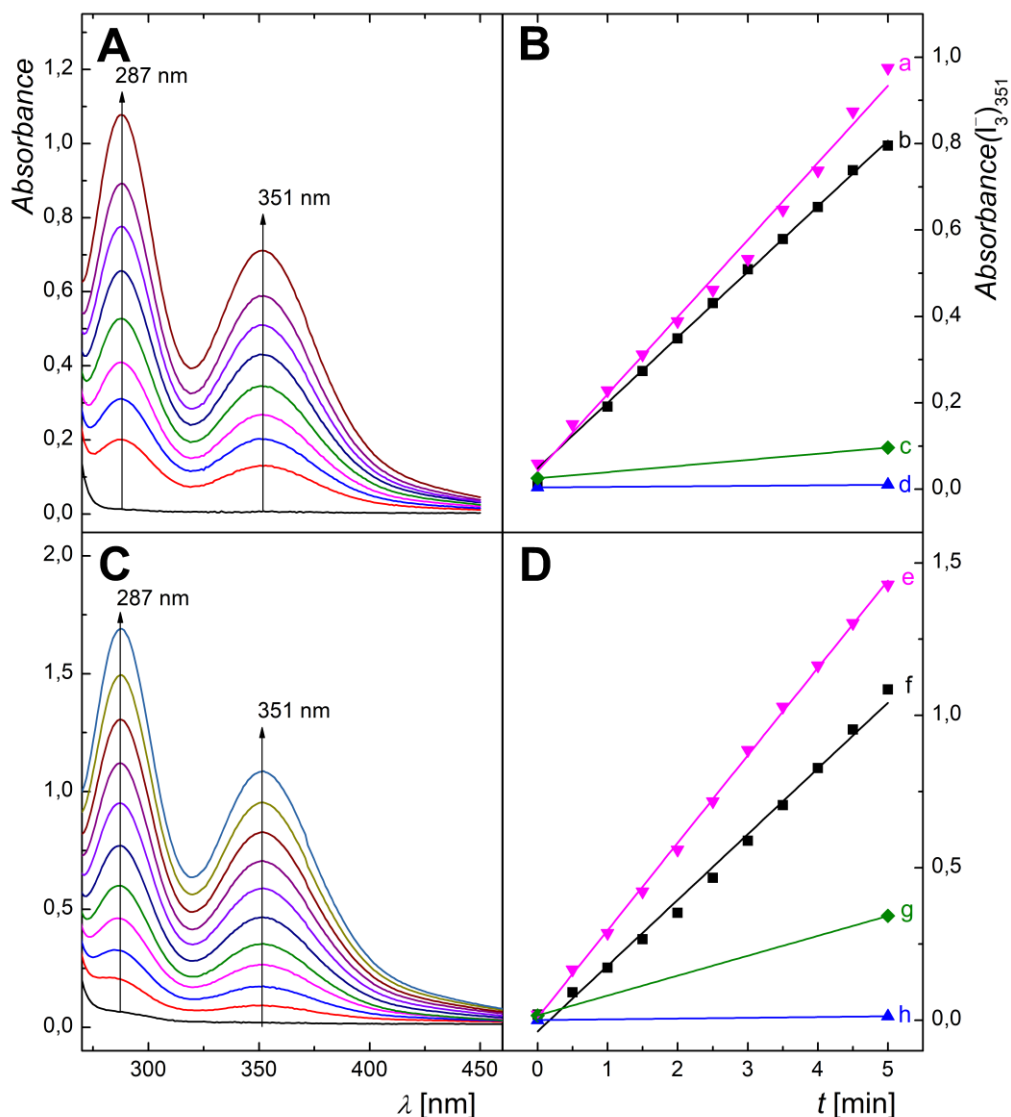
Vzorky Nafionu ( $0,75 \times 3$  cm) s či bez navázaného TMPyPu na křemenném sklíčku byly umístěny diagonálně v křemenné kyvetě ( $4 \times 1 \times 1$  cm) s obsahem  $2,5$  ml  $10^{-4}$  M sodné soli kyseliny močové a byly ozařovány LED zdrojem ( $\lambda = 413$  nm). Kinetika degradace kyseliny močové byla sledována pomocí UV/VIS spektroskopie, jako pokles jejího absorpčního pásu ( $\lambda = 292$  nm).

Jak je patrné z (**Obr. 4.4\_A**) u ozařovaného vzorku **NF\_TMPyP\_N**, dochází na rozdíl od kontrol k lineárnímu snižování absorpčního pásu kyseliny močové (neozářená membrána **NF\_TMPyP\_N**, ozařená i neozařená **NF\_N**). Nutná přítomnost světla a fotosensitizeru pro degradaci kyseliny močové, specifického substrátu pro detekci  $O_2(^1\Delta_g)$ , nepřímou dokazuje schopnost fotogenerovaného  $O_2(^1\Delta_g)$  účinně oxidovat i chemické substráty.

Další použitou chemickou metodou pro nepřímou detekci fotogenerovaného  $O_2(^1\Delta_g)$  byla jodidová metoda. Její princip je detailně popsán v **kap. 1.2.2**. Tato metoda je založena na oxidaci jodidu pomocí  $O_2(^1\Delta_g)$  v přítomnosti molybdenanového katalyzátoru. Sledován byl nárůst absorpance pásů  $I_3^-$ . Jedná se o metodu velmi citlivou, ale málo specifickou. Jodid je oxidován nejen fotogenerovaným  $O_2(^1\Delta_g)$ , ale i dalšími oxidujícími částicemi<sup>24</sup>.

Ozařovací pokusy byly prováděny podobně jako u testu s kyselinou močovou, na stejné optické lavici a s použitím stejného světelného zdroje, kyvety a plochy vzorku ( $2,25$  cm<sup>2</sup>). Rozdíl byl oproti předchozí metodě pouze v použití jodidového detekčního roztoku a v délce ozařovacích dob, které byly z důvodu vyšší citlivosti metody kratší. **3.2.1** Po 30s ozařovacích intervalech byl

u vzorků **NF\_TMPyP\_P** a **NF\_TMPyP\_N** v jodidovém detekčním roztoku (**Obr. 4.5\_A, C**) pozorován výrazný lineární nárůst absorpčních pásů  $I_3^-$  ( $\lambda = 287, 351$  nm).



**Obr. 4.5:** Absorpční spektra  $I_3^-$  fotogenerovaného z jodidového detekčního činidla s vloženým vzorkem nafionové membrány (**Panel\_A**) a (**Panel\_C**) a kinetika fotogenerace  $I_3^-$  ( $\lambda = 351$  nm) po 30s ozařovacích intervalech (**Panel\_B**), resp. (**Panel\_D**), pořadí křivek kinetiky odpovídá pořadí příslušných panelů. **a, e** – **NF\_TMPyP\_N**, resp. **NF\_TMPyP\_P** v jodidovém činidle s 50 %  $D_2O$ ; **b, f** – **NF\_TMPyP\_N**, resp. **NF\_TMPyP\_P**; **c, g** – **NF\_N**, resp. **NF\_P**; **d, h** – **NF\_TMPyP\_N**, resp. **NF\_TMPyP\_P** bez ozaření. Experimentální body v **Panelu\_B** a **Panelu\_D** jsou proloženy lineární regresní přímkou. Ozařovací zdroj: LED zdroj ( $\lambda = 413$  nm). Experimentální podmínky: nafionové vzorky (0,75×3 cm); jodidové detekční činidlo (2,5 ml, zředěno 1 : 1 deionizovanou vodou) ; modrý LED zdroj ( $\lambda = 413$  nm).

Kinetika fotogenerace trijodidu v jodidovém detekčním činidle byla u vzorku **NF\_TMPyP\_N** (**Obr. 4.5\_b**) nižší oproti vzorku **NF\_TMPyP\_P** (**Obr. 4.5\_f**), v souladu s nižším obsahem vázaného TMPyPu na povrch Nafionu (**viz. Obr. 4.2**).

Výrazný rozdíl je též patrný při částečném nahrazení podílu deionizované vody těžkou vodou (50 %  $D_2O$ ), v níž má  $O_2(^1\Delta_g)$  zhruba 16× delší dobu života. Pravděpodobnost oxidace jodidu

pomocí  $O_2(^1\Delta_g)$  je tedy výrazně vyšší. Tento test je často používán k ověření, že daná fotooxidace probíhá za přispění  $O_2(^1\Delta_g)^{24}$ .

Podle předpokladu, neozařované vzorky **NF\_TMPyP\_N** i **NF\_TMPyP\_P** (**Obr. 4.5\_d,h**) a membrána **NF\_N** bez vázaného fotosensitizeru (**Obr. 4.5\_c**) ozařovaná modrým světlem, ( $\lambda = 413 \text{ nm}$ ) generovala pouze zanedbatelné množství trijodidu. Oxidace u vzorků **NF\_TMPyP\_N** i **NF\_TMPyP\_P** ve tmě neproběhla. U vzorku **NF\_N** byla nalezena jen zanedbatelná fotooxidace. V případě protonizované formy Nafionu (**NF\_P**) byla však již průkazná (**Obr. 4.5\_c**). U tohoto vzorku nebyl vázaný fotosensitizer, zjevně tedy došlo k fotooxidaci trijodidu jinými reaktivními částicemi než  $O_2(^1\Delta_g)$ .

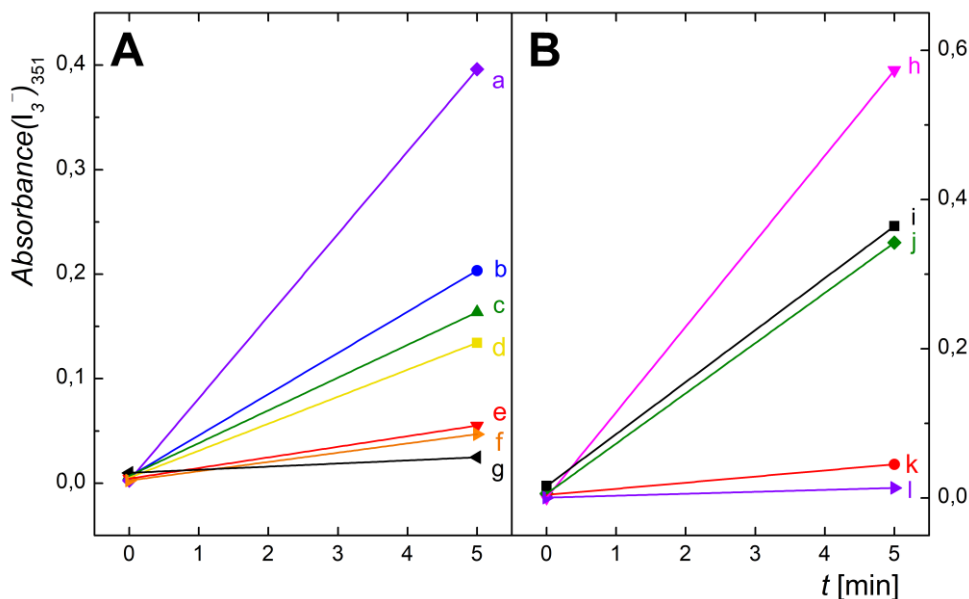
Pomocí orientačních diagnostických testů byl učiněn pokus tyto další reaktivní částice a případný mechanismus fotogenerace objasnit (**kap. 4.4**).

## 4.4 Fotogenerace ROS na povrchu nafionové membrány

Jak již bylo uvedeno v **kap. 1.4.4**, nafionová membrána v protonizovaném stavu (**NF\_P**) může být zdrojem radikálových částic. Autoři prací poukazují na disociaci či fotodisociaci vazeb C–F, C–S, vazby etherové a vazbu uhlíku na COOH skupinu v hlavním řetězci Nafionu. Klíčovou roli mají ionty  $Fe^{3+}$ , které jsou fotoredukovány na ionty  $Fe^{2+}$ , koordinující peroxid vodíku. Disociace vazeb spojená se vznikem radikálů se podílí na tvorbě dalších radikálových částic<sup>8,52</sup>.

Pro objasnění povahy těchto reaktivních částic byly použity orientační testy studující vliv absence kyslíku, vlnové délky (energie) použitého záření a přítomnosti iontů železa na jejich generaci u **NF\_P**, tedy Nafionu bez adsorbovaného fotosensitizeru. Použit byl opět jodidový detekční roztok (metoda viz **kap. 3.3.8.1**) umožňující detekovat širokou škálu oxidujících částic.

V této práci (**kap. 4.3.2**) bylo zjištěno, že **NF\_P** fotogeneruje reaktivní částice oxidující jodid v jodidovém detekčním činidle.



**Obr. 4.6:** Absorbance  $I_3^-$  v jodidovém detekčním číidle (2,5 ml, zředěno 1 : 1 deionizovanou vodou) po vložení **NF\_P** (0,75×1,5 cm) a následném 5min ozařování různými světelnými zdroji (**Panel\_A**) a **NF\_P** (0,75× 1,5 cm) ozařovaný 5 min modrým LED zdrojem ( $\lambda = 413$  nm) za dále uvedených podmínek (**Panel\_B**). **a** – nefiltrované modré světlo; **b** – modré světlo bez UV složky; **c** – zelené světlo; **d** – žluté světlo; **e** – červené světlo; **f** – solární simulátor; **g** – temná kontrola.; **h** – **NF\_P** s  $Fe^{3+}$  ionty; **i** – jodidové číidlo obohacené 50%  $D_2O$ ; **j** – nečištěný Nafion; **k** – čištěný Nafion roztokem EDTA; **l** – jodidové číidlo zbavené  $O_2$  bubláním  $N_2$ .

U vzorku **NF\_P** byla nejprve studována jeho fotoreakce za nepřítomnosti kyslíku. K odstranění rozpuštěného kyslíku byla kvjeta se vzorkem ponořeným do detekčního jodidového roztoku v průběhu ozařování probublávána dusíkem. Bylo zjištěno, že v nepřítomnosti kyslíku k fotoreakci (generaci trijodidu) nedochází (**Obr. 4.6\_l**). Na základě tohoto experimentu vznikl předpoklad, že reaktivními částicemi jsou reaktivní kyslíkové částice (ROS). ROS často vznikají za spoluúčasti kovových iontů (např. Fentonova reakce). Proto byla dále studována přítomnost těžkých kovů adsorbovaných v podobě nečistot na povrch nabitého Nafionu. Vzorek **NF\_P** byl pečlivě přečištěn omytím roztokem komplexačního číidla EDTA (5 ml,  $10^{-3}$  M, 30 min) a po následném 5minutovém ozařování modrým světlem ( $\lambda = 413$  nm) fotogeneroval pouze minimální množství trijodidu (**Obr. 4.6\_k**). Z toho lze usuzovat, že i takto malé množství iontů (komplexujících se pomocí EDTA) se významně podílí na fotoreakci.

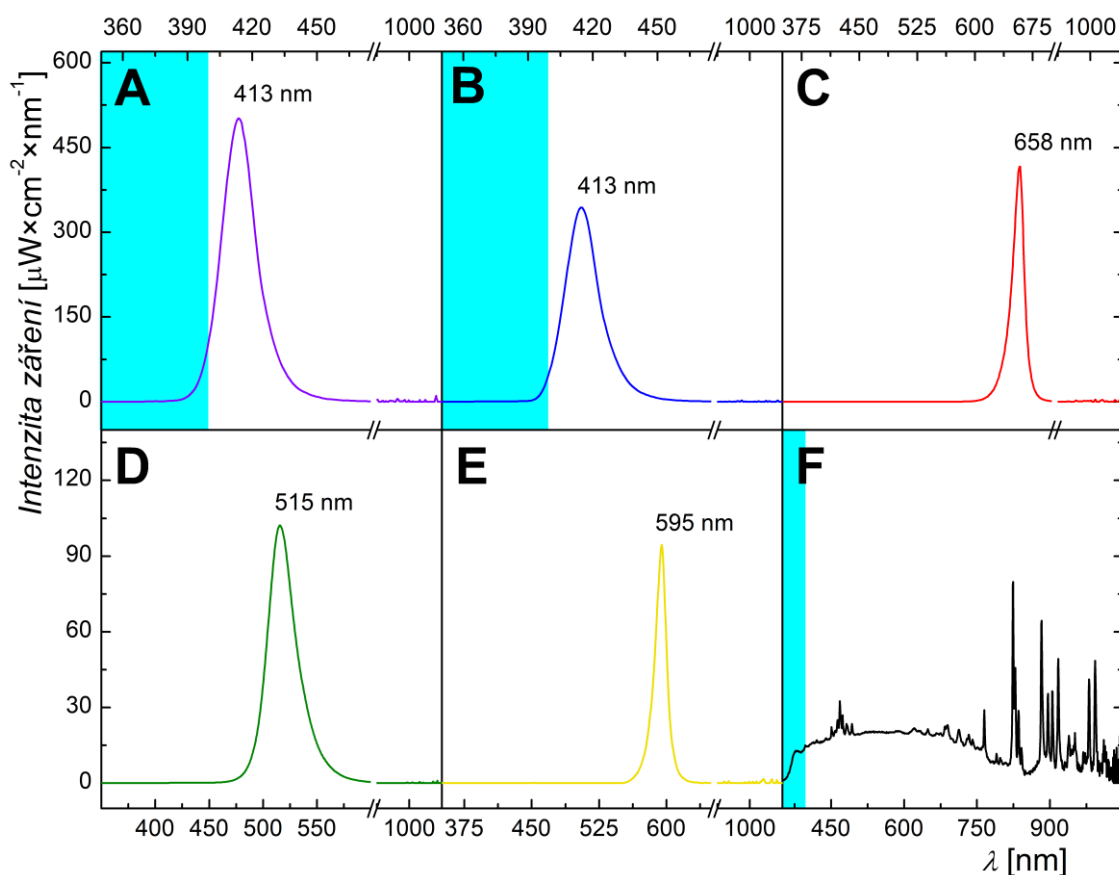
Proto byl učiněn pokus, kdy byly ionty železa cíleně adsorbovány na povrch vzorku **NF\_P**. Po adsorpci  $Fe^{2+}$  iontů na jeho povrch k fotogeneraci trijodidu nedošlo (v **Obr. 4.6** není uvedeno). V případě adsorpc  $Fe^{3+}$  iontů však k významné fotoreakci došlo.

Vzhledem k tomuto zjištění byl 30 minutovou adsorpcí z 5 ml  $10^{-3}$ M  $Fe(NO_3)_3$  dále připraven vzorek nafionové membrány (0,75×3 cm) vysycený  $Fe^{3+}$  ionty (**NF\_Fe<sup>3+</sup>**). Z úbytku absorbance ze zásobního roztoku ( $\epsilon(Fe^{3+})_{240} = 4230$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (cit.<sup>75</sup>) vyplynulo, že na povrch Nafionu se adsorbovalo cca 67,3  $\mu$ g  $Fe^{3+}$  iontů.

Po 5minutovém ozařování Nafionu s adsorbovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty ( $\text{NF\_Fe}^{3+}$ ) došlo oproti měření původního vzorku, tj. bez adsorbovaných  $\text{Fe}^{3+}$  iontů a čištění pomocí EDTA (**Obr. 4.6\_j**), zhruba k dvojnásobnému nárůstu absorbance fotogenerovaného  $\text{I}_3^-$  (**Obr. 4.6\_h**).

Pro tvorbu reaktivních částic jsou tedy klíčové adsorbované  $\text{Fe}^{3+}$  ionty na nafionové membráně, v souladu s literaturou popisující jejich vliv na tvorbu membránových radikálů na povrchu Nafionu, viz **kap.1.4.4** (cit. <sup>8,19,52</sup>).

U vzorku  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  byl dále studován vliv vlnové délky/energie použitého záření (**Obr. 4.6\_A**). Všechny použité světelné zdroje byly proměřeny spektrometrem (**Obr. 4.7**).



**Obr. 4.7:** Vyzařovací spektra použitých monochromatických LED zdrojů: nefiltrovaný modrý zdroj (**Panel\_A**); filtrovaný modrý zdroj (s optickým pásmovým filtrem,  $\lambda > 400$  nm) (**Panel\_B**); červený zdroj (**Panel\_C**); zelený zdroj (**Panel\_D**); žlutý zdroj (**Panel\_E**) a polychromatický solární simulátor (**Panel\_F**). Modrozelená plocha (**Panel\_A, B** a **F**) značí přesah světelného zdroje do UV oblasti.

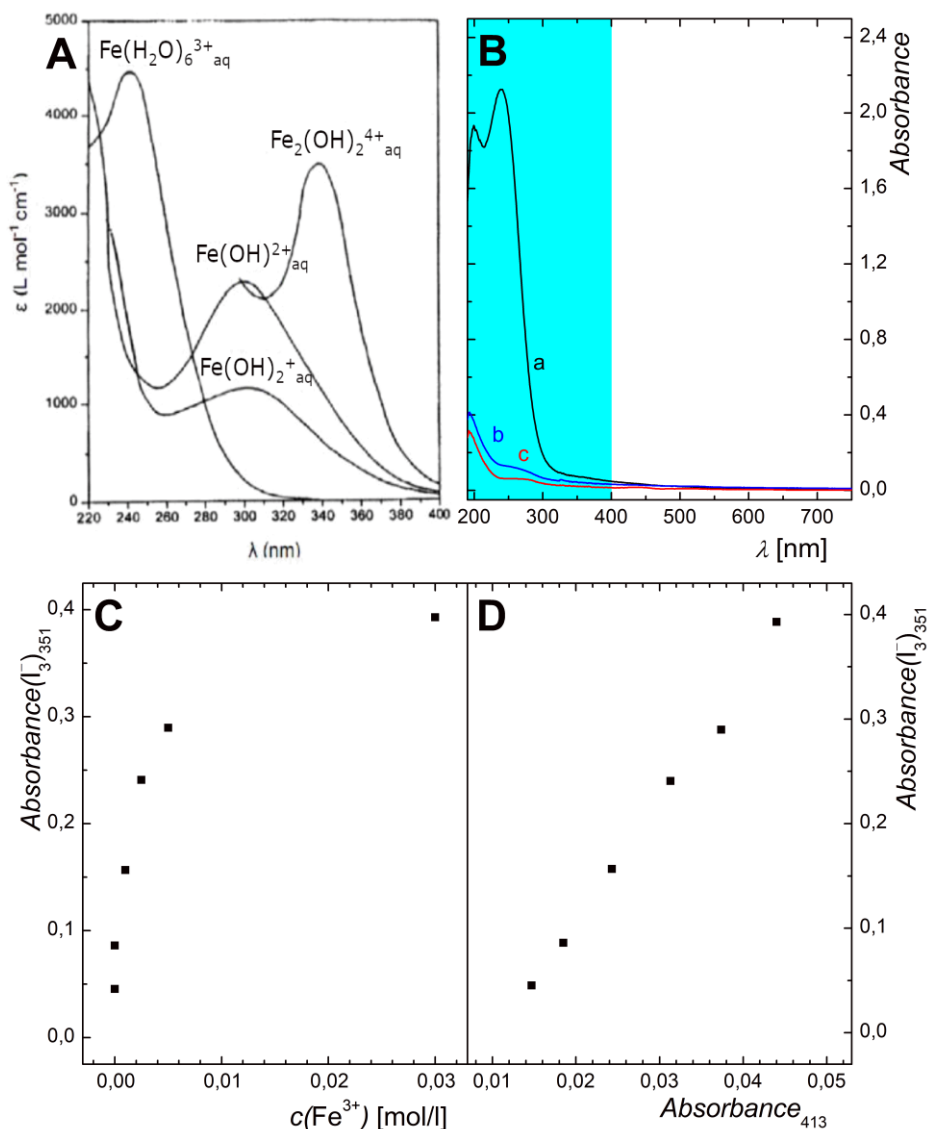
Použitý modrý LED světelný zdroj,  $\lambda = 413$  nm (**Obr. 4.7\_A**) i solární simulátor (**Obr. 4.7\_F**) mají přesah i do UV oblasti. Z literatury je známo, že při ozařování Nafionu UV zářením dochází k fotodisociaci vazby C–S v jeho struktuře a tvorbě membránových radikálů. Fotogeneraci těchto radikálů potvrdilo i měření ESR spekter<sup>53</sup>. Z **Obr. 4.6** plyne, že všechny použité světelné zdroje způsobily fotoreakci na  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  (**Obr. 4.6\_A, a, b, c, d, e, f**) oproti kontrole ve tmě (**Obr. 4.6\_A, g**).

I po odstínění UV složky záření optickým filtrem u modrého LED zdroje ( $\lambda = 413$  nm) a také u dalších zdrojů emitujících světlo výhradně ve viditelné oblasti, byla fotogenerace trijodidu stále značná. Jak plyne z **Obr. 4.6**, pro monochromatické LED zdroje je rozsah fotogenerace trijodidu ovlivňován vlnovou délkou/energií světelných zdrojů v pořadí: modrý ( $\lambda = 413$  nm) > zelený ( $\lambda = 515$  nm) > žlutý ( $\lambda = 595$  nm) > červený ( $\lambda = 656$  nm) LED zdroj. Vzorek **NF\_Fe<sup>3+</sup>** ozařovaný polychromatickým solárním simulátorem s nízkou intenzitou záření fotogeneroval množství trijodidu srovnatelné s Nafionem ozařovaným červeným LED zdrojem ( $\lambda = 658$  nm).

Detailnější pohled však ukázal, že rozdíly v účinnosti fotogenerace trijodidu, vztažením na intenzitu a absorpci použitého excitačního záření, jsou pro všechny použité zdroje nepatrné. Vzhledem k tomu, že absorpce železitých komplexů v oblasti  $\lambda = 400$ – $660$  nm je při excitačních vlnových délkách prakticky stejná (**Obr. 4.7\_A**), jsou rozdíly uvedené na **Obr. 4.7\_A** dány prakticky pouze rozdílnými intenzitami světelného zdroje (**Obr. 4.7**).

Jak je vidět z **Obr. 4.8\_A**, absorpce světla v oblasti  $\lambda = 400$ – $660$  nm je nízká. Podle základního fotochemického Grotthuss-Draperova zákona (princip fotochemické aktivace) však pouze světlo, které je absorbováno systémem, může způsobit fotochemickou změnu<sup>24</sup>. Z toho vyplývá, že daná fotoreakce probíhá s vysokou účinností resp. kvantovým výtěžkem. Takto účinné fotoreakce mívají obvykle radikálový mechanismus<sup>74</sup>.

Absorpce světla v oblasti  $\lambda = 400$ – $660$  nm je patrně dána vázanými železitémi ionty (**Obr. 4.8**). Z literatury jsou dobře známa absorpční spektra železitých hydroxo či aqua kationtů v UV oblasti spektra (**Obr. 4.8\_A**). Tyto, ale i další např. můstkové komplexní kationty nalezené na povrchu nafionových membrán ( $[\text{Fe}(\text{H}_3\text{O}_2)\text{Fe}]^{5+}$  a  $[\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}]^{4+}$ ) (cit.<sup>62</sup>), pak mohou mít absorpční přesah i do viditelné oblasti. Jak je vidět z naměřených absorpčních spekter, k menšímu přesahu skutečně dochází (**Obr. 4.8\_B**). Dále byla testována účinnost fotogenerace ROS v závislosti na koncentraci (**Obr. 4.8\_C**), resp. absorpci při excitační vlnové délce (pouze viditelná oblast) adsorbovaných  $\text{Fe}^{3+}$  iontů na nafionové membráně (**Obr. 4.8\_D**).



**Obr. 4.8:** Absorpční spektra železitých iontů přítomných ve vodném roztoku v UV oblasti (převzato a upraveno z cit.<sup>9</sup>) (**Panel\_A**). Absorpční spektra vzorků **NF\_P** s různou koncentrací železitých iontů (**Panel\_B**). Absorbance  $\text{I}_3^-$  ( $\lambda = 351 \text{ nm}$ ) v jodidovém detekčním činidle po vložení **NF\_P** a následném 5min ozařování v závislosti na koncentraci (**Panel\_C**), resp. absorbanci (**Panel\_D**) adsorbovaných  $\text{Fe}^{3+}$  iontů. **a** –  $\text{NF\_Fe}^{3+}$ ; **b** –  $\text{NF\_P}$ ; **c** –  $\text{NF\_P}$  očištěné roztokem EDTA. Modrozelená plocha v **Panelu\_B** značí UV oblast. Experimentální podmínky: nafionové vzorky ( $0,75 \times 1,5 \text{ cm}$ ); jodidové detekční činidlo (2,5 ml, zředěno 1 : 1 deionizovanou vodou) ; modrý LED zdroj ( $\lambda = 413 \text{ nm}$ ).

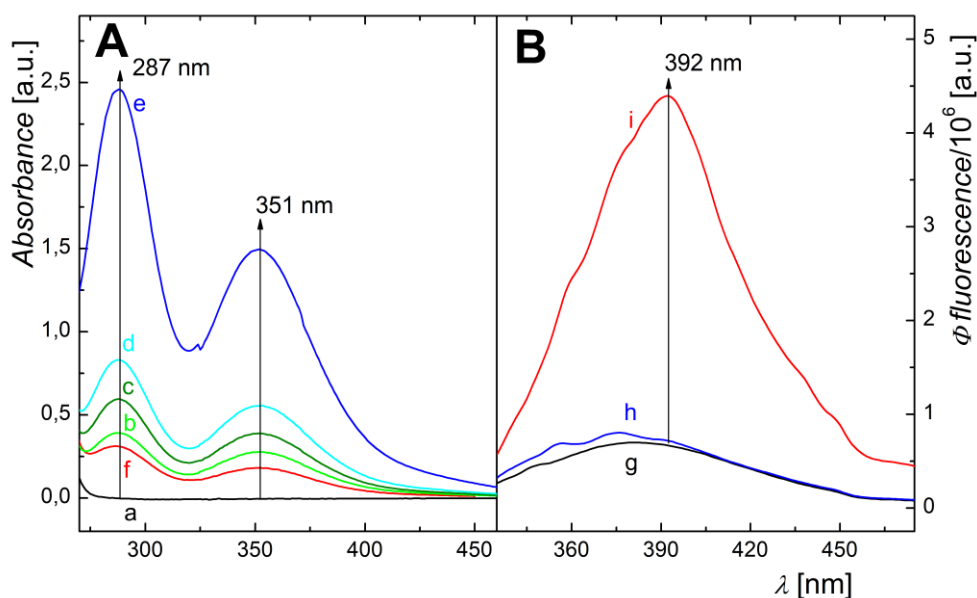
Z **Obr. 4.8\_C** vyplývá, že koncentrace, ale především absorbance  $\text{Fe}^{3+}$  iontů adsorbovaných na protonizovaném Nafionu silně ovlivňuje množství fotogenerovaného trijodidu.

Až do vysycení nafionové membrány  $\text{Fe}^{3+}$  ionty, dochází k výraznému růstu fotogenerace ROS spojené s neutralizací sulfo-skupin nafionové membrány. Vzorek s nejvyšší a pro další měření používanou koncentrací  $\text{Fe}^{3+}$  iontů ( $\text{NF\_Fe}^{3+}$ ) vykazoval nejvyšší absorpci a neúčinnější fotoreakci. Lineární závislost fotoreakce na absorpci při excitační vlnové délce ( $\lambda = 413 \text{ nm}$ ) je pak v souladu s představou, že fotoreakce probíhá mechanismem zahrnujícím komplexy železa navázané na nafionové membráně.

### 4.4.1 Identifikace fotogenerovaných ROS

Jak již bylo uvedeno, vzorek  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  fotogeneroval značné množství ROS. Z literatury vyplývá klíčová role  $\text{OH}^\cdot$  radikálů během (foto)degradace nafiionové membrány<sup>52</sup>.

U vzorku  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  byla proto sledována možná fotogenerace  $\text{OH}^\cdot$  specifickou fluorescenční detekční metodou na  $\text{OH}^\cdot$ , založenou na hydroxylaci kyseliny tereftalové za vzniku fluoreskující kyseliny 2-hydroxytereftalové. Samotná kyselina tereftalová fluorescenci neposkytuje nebo jen ve velmi omezené míře<sup>13</sup>. Princip metody je detailněji popsán v **kap. 1.1.2**. Vzorek  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  ponořený do roztoku kyseliny tereftalové byl ozařován modrým světlem ( $\lambda = 413 \text{ nm}$ ).



**Obr. 4.9:** Detekce fotogenerovaných ROS ozařováním vzorků  $\text{NF\_P}$  a  $\text{NF\_Fe}^{3+}$ . Absorbance  $\text{I}_3^-$  v jodidovém detekčním činidle (2,5 ml, zředěno 1 : 1 deionizovanou vodou) u vzorku  $\text{NF\_P}$  a  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  (**Panel A**). Stanovení  $\text{OH}^\cdot$  u vzorku  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  v kyselině tereftalové (**Panel B**). **a** –  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  před ozářením; **b** –  $\text{NF\_P}$  ihned po 5 min ozářením; **c** –  $\text{NF\_P}$  po 60 min od ozářením; **d** –  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  ihned po 5 min ozářování; **e** –  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  po 60 min od ozářování; **f** –  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  temná kontrola; **g** – kyselina tereftalová; **h** –  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  temná kontrola; **i** –  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  30 minut ozářování. Experimentální podmínky: nafiionové vzorky (0,75×3cm); jodidové detekční činidlo (2,5 ml, zředěno 1 : 1 deionizovanou vodou) kyselina tereftalová (3 ml, 10 mM, pH = 7,4); modrý LED zdroj ( $\lambda = 413 \text{ nm}$ ).

Po 5minutovém ozařování došlo k téměř desetinásobnému nárůstu fluorescence oproti vzorku uchovávanému ve tmě (**Obr. 4.9\_B**). Tento test tedy nepřímou potvrdil účast  $\text{OH}^\cdot$  radikálů během fotoreakce.

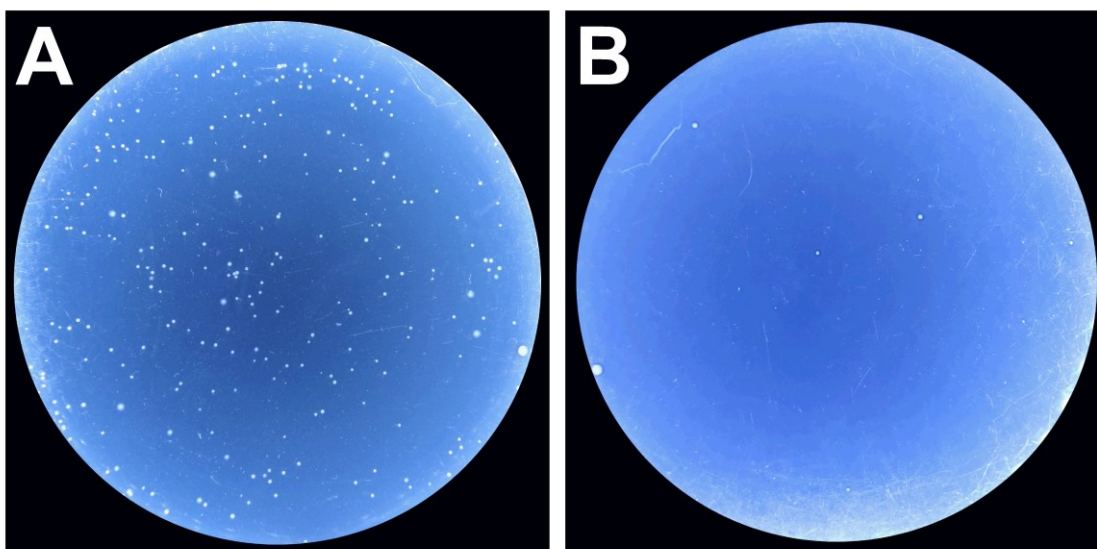
Možná účast dalších ROS ( $\text{O}_2^{\cdot-}$  a peroxid vodíku) na fotoreakci byla orientačně zjišťována pomocí post-iradiačního jodidového testu (**Obr. 4.9\_A**). Metoda (viz **kap. 3.3.8.3**) je založena na faktu, že pouze peroxid vodíku je ve srovnání s ostatními ROS déle žijící částicí a její oxidační efekt setrvává i po skončení ozařování. Molekula peroxidu vodíku je však často i konečným produktem reakcí ostatních ROS, především  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , který na peroxid vodíku rychle dismutuje<sup>15</sup>.

Tento test oproti kontrolám prokázal post-iradiační oxidativní působení  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  a tedy pravděpodobnou účast dalších ROS. Důkladná identifikace ROS pomocí EPR technik bude předmětem dalšího studia.

## 4.5 Foto-antibakteriální testy

Pro ověření foto-antibakteriálního účinku vzorků  $\text{NF\_TMPyP\_N}$  a  $\text{NF\_TMPyP\_P}$  fotogenerujících  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  a vzorku  $\text{NF\_Fe}^{3+}$  fotogenerující ROS modrým světlem ( $\lambda = 413 \text{ nm}$ ) byla použita bakteriální suspenze kmenu bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$ . Bakterie *E. coli* patří mezi Gram-negativní bakterie, které jsou vůči účinkům  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  odolnější, než Gram-pozitivní bakterie<sup>76</sup>.

Testované vzorky Nafionu ( $\text{NF\_TMPyP\_P}$ ,  $\text{NF\_P}$  a  $\text{NF\_Fe}^{3+}$ ) byly neutralizovány ve fosfátovém pufru (pH = 7,0). Toto pH bylo zvoleno, protože nízké pH nafionové membrány by negativně ovlivňovalo antibakteriální testy vlivem temné toxicity. Protože je skelet Nafionu tvořen hydrofobním Teflonem, je jeho povrch i přes přítomnost sulfo-skupin jen omezeně smáčivý<sup>61</sup>. Z tohoto důvodu byl Nafion zvlhčen na buničině napuštěné komerčním PBS (pH = 7,4) a bakteriální suspenze byla poté pipetována po 0,5  $\mu\text{l}$  kapkách pro zajištění maximální styčné plochy mezi membránou a bakteriální suspenzí.



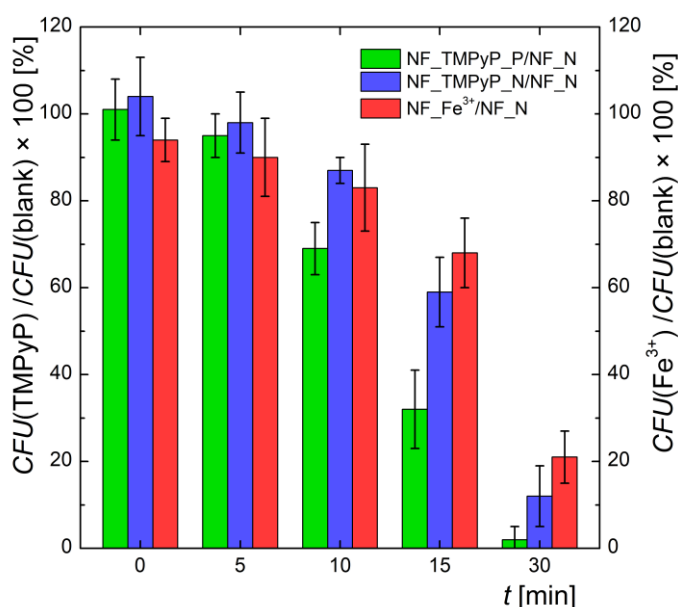
**Obr. 4.10:** Příklady snímků agarových ploten s narostlými koloniemi bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$ , po inkubaci 5  $\mu\text{l}$  bakteriální suspenze na povrchu vzorku  $\text{NF\_TMPyP\_P}$  (0,75 $\times$ 1,5 cm) neutralizovaném ve fosfátovém pufru (pH = 7,0). Agarová plotna inokulovaná *E. coli* DH5 $\alpha$  ze vzorku  $\text{NF\_TMPyP\_P}$  uchovávaného ve tmě (**Panel A**) a ze vzorku  $\text{NF\_TMPyP\_P}$  (0,75 $\times$ 1,5 cm) ozařovaného 30 min filtrovaným modrým LED zdrojem (**Panel B**).

Bakteriální suspenze *E. coli* na vzorcích byla definovanou dobu vystavena světlu (LED zdroj,  $\lambda = 413 \text{ nm}$ , pásmový filtr  $\lambda > 400 \text{ nm}$ ), či ponechána ve tmě. Poté byly vzorky vytřepány do PBS. Vzorky ozařené bakteriální suspenze (150  $\mu\text{l}$ ) byly naneseny na agarové plotny a inkubovány při

37 °C, po dobu 18 hodin. Poté byly bakteriální kolonie spočítány. Metodika foto-antibakteriálních testů je detailněji uvedena v **kap. 3.4**.

Antibakteriální účinky fotogenerovaného  $O_2(^1\Delta_g)$ , resp. dalších ROS byly vyhodnoceny jako poměr přeživších kolonií (CFU „colony-forming unit“) v přítomnosti či nepřítomnosti TMPyPu nebo železitých iontů (vázaných na nafionovou membránu) ve tmě nebo po 5, 10, 15 a 30minutovém ozařování LED zdrojem ( $\lambda = 413$  nm).

Po 30minutovém ozařování vzorku **NF\_TMPyP\_P** (**Obr. 4.10\_B**) modrým světlem ( $\lambda = 413$  nm) byl patrný výrazný úbytek bakteriálních kolonií *E. coli* oproti neozařovanému vzorku **NF\_TMPyP\_P** (**Obr. 4.10\_A**). Stejným způsobem byl vyhodnocen také foto-antibakteriální účinek ROS generovaných z **NF\_Fe<sup>3+</sup>**. Výsledky získané ze tří nezávislých měření vzorků **NF\_TMPyP\_P**, **NF\_TMPyP\_N** a **NF\_Fe<sup>3+</sup>** shrnuje **Obr. 4.11**. Jako kontrola („blank“) byl použit vzorek **NF\_P**.



**Obr. 4.11:** Foto-antibakteriální testy u vzorků Nafionu (0,75×1,5 cm), **NF\_TMPyP\_P/NF\_N** (zeleně), **NF\_TMPyP\_N/NF\_N** (modře) a **NF\_Fe<sup>3+</sup>/NF\_N** (červeně). Účinnost fotobakteriální inaktivace je vyjádřena poměrem CFU *E. coli* ozařovaných (5, 10, 15 a 30 min) či ve neozařovaných (0 min) v přítomnosti či nepřítomnosti vázaného TMPyPu či Fe<sup>3+</sup> iontů na nafionové membráně. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr ze 3 nezávislých měření opatřených směrodatnými odchylkami. Zdroj záření: modrý LED zdroj ( $\lambda = 413$  nm) s pásmovým filtrem  $\lambda > 400$  nm.

U žádného ze vzorků nebyla při ponechání ve tmě (30 minut) vůči kontrole (**NF\_P**) pozorována významná změna v počtu kolonií *E. coli*. S delším časem ozařování byl pozorován výraznější foto-antibakteriální efekt u všech tří vzorků.

U vzorku **NF\_TMPyP\_N/NF\_N** ozařovaného 30 minut přežilo zhruba 10 % bakteriálních kolonií vůči původnímu počtu. Vzorek **NF\_TMPyP\_P/NF\_N** fotogenerující  $O_2(^1\Delta_g)$  vykazoval nejúčinnější foto-antibakteriální efekt ze všech vzorků. Po 30minutovém ozařování tohoto vzorku přežilo méně než 5 % kolonií *E. coli* z původního počtu.

V případě vzorku fotogenerující ROS (**NF\_Fe<sup>3+</sup>/NF\_N**) po 30 minutách ozařování přežilo přibližně 20 % kolonií oproti jejich původnímu množství.



## ZÁVĚR

V této práci bylo zjištěno, že lze pevně, iontově vázat tetrakationový porfyrinoidní fotosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium)porfyrin tetra(p-toluensulfonát) (TMPyP) na záporně nabitou membránu Nafion, bez zpětného vymývání do vodných roztoků. Byla studována iontová kapacita membrány, kinetika adsorpce TMPyP a spektrální vlastnosti (adsorpce i emise) membrány s navázaným TMPyP. Po navázání TMPyP se nafionová membrána stává fotoaktivní a fotogeneruje  $O_2(^1\Delta_g)$  na základě fotosensitizované reakce po aktivaci viditelným světlem. Tato fotogenerace  $O_2(^1\Delta_g)$  byla dokázána pomocí časově rozlišené spektroskopie a dvěma chemickými metodami. Vysoká účinnost generace  $O_2(^1\Delta_g)$  je dána transparentností membrány a povrchovým vázáním (zajišťující snadný přístup světla a kyslíku), ale i chemickým složením membrány s malým zhášecím efektem vůči  $O_2(^1\Delta_g)$  a excitovaným stavům TMPyP. Použitý TMPyP je charakteristický vysokým kvantovým výtěžkem  $O_2(^1\Delta_g)$ . Vzhledem k fotogeneraci cytotoxického  $O_2(^1\Delta_g)$  byl zjištěn silný foto-antibakteriální efekt na povrchu membrány vzhledem ke gram-negativním bakteriím *E. coli*.

Dále bylo v této práci zjištěno, v soulase s literaturou, že i membrána Nafion bez fotosensitizeru ale s navázanými ionty  $Fe^{3+}$  může, s výjimkou  $O_2(^1\Delta_g)$ , fotogenerovat i další ROS, především  $OH^\cdot$  a  $H_2O_2$ . Nově bylo v této práci dokázáno, že ke generaci ROS částic stačí i viditelné záření. Fotogenerace těchto ROS má zřejmě radikálový mechanismus iniciovaný fotodisociací vazeb v Nafionu a vznikem membránových radikálů za spoluúčasti  $Fe^{3+}$ . Vzhledem k fotogeneraci ROS vykazuje i nafionová membrána s navázanými ionty  $Fe^{3+}$  silné foto-antibakteriální vlastnosti vůči bakteriím *E. coli* iniciované viditelným světlem.

Závěrem lze shrnout, že nafionové membrány s navázaným fotosensitizerem či ionty  $Fe^{3+}$  (včetně obojího) jsou zajímavé a perspektivní materiály vhodné pro oblast fotodesinfekce např. mikrobiálně znečištěných vod.



## SEZNAM LITERATURY

1. Krumova, K.; Cosa, G.: Overview of Reactive Oxygen Species. In: *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*. Nonell, S.; Flors, C. (Ed.). Royal Society of Chemistry, 2016, str. 1–21. ISBN 978-1782626961
2. Ahile, U. J.; Wuana, R. A.; Itodo, A. U.; Sha'Ato, R.; Dantas, R. F.: A review on the use of chelating agents as an alternative to promote photo-Fenton at neutral pH: Current trends, knowledge gap and future studies. *Sci. Total Environ.* **710** (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134872>
3. Li, Y.; Zhang, W.; Niu, J.; Chen, Y.: Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. *ACS Nano* **6**:5164–5173 (2012).
4. Hayyan, M.; Hashim, M. A.; Alnashef, I. M.: Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.* **116**:3029–3085 (2016).
5. Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S.: Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* **217**:1915–1928 (2018).
6. Babuponnusami, A.; Muthukumar, K.: A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *J. Environ. Chem. Eng.* **2**:557–572 (2014).
7. Tsuneda, T.: Fenton reaction mechanism generating no OH radicals in Nafion membrane decomposition. *Sci. Rep.* **10**:1–13 (2020).
8. Loures, C. A.; Alcântara, M. C.; Filho, H. J. I.; Teixeira, A. C. S. C.; Silva, F. T.; de Paiva, T. C. B.; Samanamud, G. L.: Advanced Oxidative Degradation Processes: Fundamentals and Applications. *Int. Rev. Chem. Eng.* **5** (2013). DOI: <https://doi.org/10.15866/ireche.v5i2.6909>
9. Murakami, Y.; Endo, K.; Ohta, I.; Nosaka, A. Y.; Nosaka, Y.: Can OH Radicals Diffuse from the UV-Irradiated Photocatalytic TiO<sub>2</sub> Surfaces? Laser-Induced-Fluorescence Study. *J. Phys. Chem. C* **111**:11339–11346 (2007).
10. Brown, J. M.; Kaise, M.; Kerr, C. M. L.; Milton, D. J.: A determination of fundamental Zeeman parameters for the OH radical. *Mol. Phys.* **36**:553–582 (1978).
11. Hawkins, C. L.; Davies, M. J.: Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. *Biochim. Biophys. Acta* **1840** (2013). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.034>
12. Barreto, J. C.; Smith, G. S.; Strobel, N. H. P.; McQuillin, P. A.; Miller, T. A.: Terephthalic acid: a dosimeter for the detection of hydroxyl radicals in vitro. *Life Sci.* **56**:89–96 (1995).
13. Loutit, G.; Foley, S.; Cabillic, J.; Coffigny, H.; Taran, F.; Valleix, A.; Renault, J. P.; Pin, S.: The reaction of coumarin with the OH radical revisited: hydroxylation product analysis determined by fluorescence and chromatography. *Radiat. Phys. Chem.* **72**:119–124 (2005).
14. Nosaka, Y.; Nosaka, A. Y.: Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis. *Chem. Rev.* **117**:11302–11336 (2017).

15. Diplock, A. T.; Symons, M. C. R.; Rice-Evans, C. A.: The detection and characterization of free radical species. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Burdon, R. H.; van Knippenberg, P. H. (Ed.). Elsevier, 1991, str. 51–100. ISBN 9780080858913
16. Katsounaros, I.; Schneider, W. B.; Meier, J. C.; Benedikt, U.; Biedermann, U. P.; Auer, A. A.; Mayrhofer, K. J. J.: Hydrogen peroxide electrochemistry on platinum: towards understanding the oxygen reduction reaction mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**:7384–7391 (2012).
17. Maletzky, P.; Bauer, R.; Lahnsteiner, J.; Pouresmael, B.: Immobilisation of iron ions on nafion® and its applicability to the photo-fenton method. *Chemosphere* **38**:2315–2325 (1999).
18. Litter, M. I.; Slodowicz, M.: An overview on heterogeneous Fenton and photoFenton reactions using zerovalent iron materials. *J. Adv. Oxid. Technol.* **20** (2017). DOI: <https://doi.org/10.1515/jaots-2016-0164>
19. Arslan-Alaton, I.; Gursoy, B. H.; Schmidt, J.-E.: Advanced oxidation of acid and reactive dyes: Effect of Fenton treatment on aerobic, anoxic and anaerobic processes. *Dyes Pigm.* **78**:117–130 (2008).
20. Teixeira, A. C. S. C.; Guardani, R.; Braun, A. M.; Oliveros, E.; Nascimento, C. A. O.: Degradation of an aminosilicone polymer in a water emulsion by the Fenton and the photochemically enhanced Fenton reactions. *Chem. Eng. Process.* **44**:923–931 (2005).
21. Jia, L.; Shen, Z.; Guo, W.; Zhang, Y.; Zhu, H.; Ji, W.; Fan, M.: QSAR models for oxidative degradation of organic pollutants in the Fenton process. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **46**:140–147 (2015).
22. Boix-Garriga, E.; Rodríguez-Amigo, B.; Planas, O.; Nonell, S.: Properties of Singlet Oxygen. In: *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, Nonell, S.; Flors, C. (Ed.). The Royal Society of Chemistry, 2016, str. 23–46. ISBN 978-1782626961
23. Lang, K.; Mosinger, J.; Wagnerová, D.: Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. *Chem. Listy* **99**:211–221 (2005).
24. Slavětínská, L.; Mosinger, J.; Kubát, P.: Supramolecular carriers of singlet oxygen: Photosensitized formation and thermal decomposition of endoperoxides in the presence of cyclodextrins. *J. Photochem. Photobiol.* **195**:1–9 (2008).
25. Lang, K.; Mosinger, J.; Wagnerová, D. M.: Singlet oxygen in practice - Present state and prospects. *Chem. Listy* **100**:169–177 (2006).
26. Nonell, S.; Flors, C.: Steady-State and Time-Resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Detection in the Near-IR. In: *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*. Nonell, S.; Flors, C. (Ed.). Royal Society of Chemistry, 2016, str. 7–26. ISBN 978-1782626961
27. Bregnhøj, M.; Dichmann, L.; McLoughlin, C. K.; Westberg, M.; Ogilby, P. R.: Uric Acid: A Less-than-Perfect Probe for Singlet Oxygen. *Photochem. Photobiol.* **95**:202–210 (2019).

28. Lang, K.; Mosinger, J.; Wagnerová, D. M.: Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.* **248**:321–350 (2004).
29. DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J.: Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **233–234**:351–371 (2002).
30. Kawawaki, T.; Negishi, Y.; Kawasaki, H.: Photo/electrocatalysis and photosensitization using metal nanoclusters for green energy and medical applications. *Nanoscale Adv.* **2**:17–36 (2020).
31. Mosinger, J.; Slavtínská, L.; Lang, K.; Coufal, P.; Kubát, P.: Cyclodextrin carriers of positively charged porphyrin sensitizers. *Org. Biomol. Chem.* **7**:3797–3804 (2009).
32. Mosinger, J.; Janošková, M.; Lang, K.; Kubát, P.: Light-induced aggregation of cationic porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **181**:283–289 (2006).
33. Dolanský, J.; Henke, P.; Kubát, P.; Fraix, A.; Sortino, S.; Mosinger, J.: Polystyrene Nanofiber Materials for Visible-Light-Driven Dual Antibacterial Action via Simultaneous Photogeneration of NO and O<sub>2</sub>(1Δg). *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**:22980–22989 (2015).
34. Mosinger, J.; Lang, K.; Kubát, P.: Photoactivatable nanostructured surfaces for biomedical applications. *Top. Curr. Chem.* **370**:135–168 (2016).
35. Chemours Company: Nafion™ Sulfonic Membranes. Dostupné z URL: <https://www.nafion.com/en/products/sulfonic-membranes>. [cit. 24. 8. 2022]
36. Resnick, P. R.: A short history of Nafion®. *L'Act. Chim.* **301–302**:144–147 (2006).
37. Yusoff, N.: Graphene–Polymer Modified Electrochemical Sensors. In: *Graphene-Based Electrochemical Sensors for Biomolecules*. Pandikumar, A.; Rameshkumar, P. (Ed.). Elsevier, 2018, str. 155–186. ISBN 9780128156391
38. Naughton, E. M.; Zhang, M.; Troya, D.; Brewer, K. J.; Moore, R. B.: Size dependent ion-exchange of large mixed-metal complexes into Nafion® membranes. *Polym. Chem.* **6**:6870–6879 (2015).
39. Maiyalagan, T.; Pasupathi, S.: Components for PEM fuel cells: An overview. *Mater. Sci. Forum* **657**:143–189 (2010).
40. Peighambardoust, S. J.; Rowshanzamir, S.; Amjadi, M.: Review of the proton exchange membranes for fuel cell applications. *Int. J. Hydrog. Energy* **35**:9349–9384 (2010).
41. Karimi, M. B.; Mohammadi, F.; Hooshyari, K.: Recent approaches to improve Nafion performance for fuel cell applications: A review. *Int. J. Hydrog. Energy* **44**:28919–28938 (2019).
42. Davidson, J. D.; Goulbourne, N. C.: The influence of microstructure on boundary layer interactions in ionic polymer transducers. *Int. J. Appl. Mech.* **3**:365–384 (2011).
43. Hall, L. M.; Stevens, M. J.; Frischknecht, A. L.: Effect of polymer architecture and ionic aggregation on the scattering peak in model ionomers. *Phys. Rev. Lett.* **106** (2011). DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.106.127801>

44. Wei, J.: Proton-Conducting Materials Used as Polymer Electrolyte Membranes in Fuel Cells. In: *Polymer-Based Multifunctional Nanocomposites and Their Applications*. Song, K.; Liu, C.; Guo, J. Z. (Ed.). Elsevier, 2018, str. 245–260. ISBN 9780128150689.
45. Kusoglu, A.; Weber, A. Z.: New Insights into Perfluorinated Sulfonic-Acid Ionomers. *Chem. Rev.* **117**:987–1104 (2017).
46. Ambrózy, A.; Hlavatá, L.; Labuda, J.: Protective membranes at electrochemical biosensors. *Acta Chim. Slov.* **6**:35–41 (2013).
47. Valdes, T. I.; Ciridon, W.; Ratner, B. D.; Bryers, J. D.: Surface modification of a perfluorinated ionomer using a glow discharge deposition method to control protein adsorption. *Biomaterials* **29**:1356–1366 (2008).
48. Valdes, T. I.; Ciridon, W.; Ratner, B. D.; Bryers, J. D.: Modulation of fibroblast inflammatory response by surface modification of a perfluorinated ionomer. *Biointerphases* **6**:43–45 (2011).
49. Wetzler, D. E.; García-Fresnadillo, D.; Orellana, G.: A clean, well-defined solid system for photosensitized  $1O_2$  production measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**:2249–2256 (2006).
50. Schalenbach, M.; Hoefner, T.; Paciok, P.; Carmo, M.; Lueke, W.; Stolten, D.: Gas Permeation through Nafion. Part 1: Measurements. *J. Phys. Chem. C* **119**:25145–25155 (2015).
51. Frühwirt, P.; Kregar, A.; Törring, J. T.; Katrašnik, T.; Gescheidt, G.: Holistic approach to chemical degradation of Nafion membranes in fuel cells: modelling and predictions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**:5647–5666 (2020).
52. Kadirov, M. K.; Bosnjakovic, A.; Schlick, S.: Membrane-derived fluorinated radicals detected by electron spin resonance in UV-irradiated nation and Dow ionomers: Effect of counterions and  $H_2O_2$ . *J. Phys. Chem. B* **109**:7664–7670 (2005).
53. Tsuneda, T.; Singh, R. K.; Iiyama, A.; Miyatake, K.: Theoretical Investigation of the  $H_2O_2$ -Induced Degradation Mechanism of Hydrated Nafion Membrane via Ether-Linkage Dissociation. *ACS Omega* **2**:4053–4064 (2017).
54. Henke, P.; Kirakci, K.; Kubát, P.; Fraiberk, M.; Forstová, J.; Mosinger, J.: Antibacterial, Antiviral and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**:25127–25136 (2016).
55. Ludačka, P.; Kubát, P.; Bosáková, Z.; Mosinger, J.: Antibacterial Nanoparticles with Natural Photosensitizers Extracted from Spinach Leaves. *ACS Omega* **7**:1505–1513 (2022).
56. Henke, P.; Lang, K.; Kubát, P.; Sýkora, J.; Šlouf, M.; Mosinger, J.: Polystyrene nanofiber materials modified with an externally bound porphyrin photosensitizer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**:3776–3783 (2013).
57. Mosinger, J.; Lang, K.; Plíštil, L.; Jesenská, S.; Hostomský, J.; Zelinger, Z.; Kubát, P.: Fluorescent polyurethane nanofabrics: A source of singlet oxygen and oxygen sensing. *Langmuir* **26**, 10050–10056 (2010).
58. Mosinger, J.; Jirsák, O.; Kubát, P.; Lang, K.; Mosinger, B.: Bactericidal nanofabrics based on photoproduction of singlet oxygen. *J. Mater. Chem.* **17**:164–166 (2007).

59. Lhotáková, Y.; Plíštil, L.; Morávková, A.; Kubát, P.; Lang, K.; Forstová, J.; Mosinger, J.: Virucidal Nanofiber Textiles Based on Photosensitized Production of Singlet Oxygen. *PLoS One* **7** (2012). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049226>
60. Mauritz, K. A.; Moore, R. B.: State of Understanding of Nafion. *Chem. Rev.* **104**:4535–4585 (2004).
61. Kiwi, J.; Denisov, N.; Gak, Y.; Ovanesyan, N.; Buffat, P. A.; Suvorova, E.; Gostev, F.; Titov, A.; Sarkisov, O.; Albers, P.; Nadtochenko, V.: Catalytic Fe<sup>3+</sup> clusters and complexes in Nafion active in photo-fenton processes. High-resolution electron microscopy and femtosecond studies. *Langmuir* **18**:9054–9066 (2002).
62. Zhong, L.; Song, Y.; Zhou, S.: The Effectiveness of Nafion-Coated Stainless Steel Surfaces for Inhibiting *Bacillus Subtilis* Biofilm Formation. *Appl. Sci.* **10** (2020). DOI: <https://doi.org/10.3390/app10145001>
63. Zhong, L. J.; Pang, L. Q.; Che, L. M.; Wu, X. E.; Chen, X. D.: Nafion coated stainless steel for anti-biofilm application. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **111**:252–256 (2013).
64. Sigwadi, R.; Mokrani, T.; Dhlamini, M. S.; Nonjola, P.; Msomi, P. F.: Nafion®/ sulfated zirconia oxide-nanocomposite membrane: the effects of ammonia sulfate on fuel permeability. *J. Polym. Res.* **26** (2019). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1760-2>
65. Mosinger, J.; Mosinger, B.: Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement. *Experientia* **51**:106–109 (1995).
66. Siggel, U.; Bindig, U.; Endisch, C.; Komatsu, T.; Tsuchida, E.; Voigt, J.; Fuhrhop, J.-H.: Photophysical and photochemical properties of porphyrin aggregates. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100**:2070–2075 (1996).
67. Zhang, X.-L.; Chen, X.-D.; Li, X.-Ch.; Ying, C.-F.; Liu, Z.-B.; Tian, J.-G.: Enhanced reverse saturable absorption and optical limiting properties in a protonated water-soluble porphyrin. *J. Opt.* **15** (2013). DOI: <https://doi.org/10.1088/2040-8978/15/5/055206>
68. Dias, P. M.; de Faria, D. L. A.; Leopoldo Constantino, V. R.: Clay-Porphyrin Systems: Spectroscopic Evidence of TMPyP Protonation, non-Planar Distortion and Meso Substituent Rotation. *Clays Clay Miner.* **53**:361–371 (2005).
69. Ou, Z. M.; Yao, H.; Kimura, K.: Organic nanoparticles of porphyrin without self-aggregation. *Chem. Lett.* **35**:782–783 (2006).
70. Vergeldt, F. J.; Koehorst, R. B. M.; van Hoek, A.; Schaafsma, T. J.: Intramolecular interactions in the ground and excited state of tetrakis(N-methylpyridyl)porphyrins. *J. Phys. Chem.* **99**:4397–4405 (1995).
71. Akins, D. L.; Zhu, H. R.; Guo, Ch.: Aggregation of tetraaryl-substituted porphyrins in homogeneous solution. *J. Phys. Chem.* **100**:5420–5425 (1996).
72. Yang, S.; Wang, Ch.; Liu, Ch.; Wang, Y.; Xiao, Y.; Li, J.; Li, Y.; Yang, R.: Fluorescence modulation by absorbent on solid surface: An improved approach for designing fluorescent sensor. *Anal. Chem.* **86**:7931–7938 (2014).
73. Pasternack, R. F.; Huber, P. R.; Boyd, P.; Engasser, G.; Francesconi, L.; Gibbs, E.; Fasella, P.; Venturo, G. C.; Hinds, L. deC.: On the Aggregation of Meso-Substituted Water-Soluble Porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **94**:4511–4517 (1972).

74. Reiß, B.; Hu, Q.; Riedle, E.; Wagenknecht, H. A.: The Dependence of Chemical Quantum Yields of Visible Light Photoredox Catalysis on the Irradiation Power. *ChemPhotoChem* **5**:1009–1019 (2021).
75. Knight, R. J.; Sylva, R. N.: Spectrophotometric investigation of iron (III) hydrolysis in light and heavy water at 25°C. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **37**:779–783 (1975).
76. Dahl, T. A.; Midden, W. R.; Hartman, P. E.: Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J. Bacteriol.* **171**:2188–2194 (1989).