

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Pavel Ludačka

FOTOAKTIVNÍ CHLOROFYLOVÉ NANOČÁSTICE

Photoactive Chlorophyll Nanoparticles

Bakalářská práce

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

Praha 2021

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 21. července 2021.

Pavel Ludačka

Abstrakt

Byly připraveny fotoaktivní sulfonované i nesulfonované polystyrenové nanočástice (NPs) s enkapsulovaným THF extraktem ze špenátu setého (*Spinacia oleracea*). Příprava NPs je založena na jednoduché nanoprecipitační metodě, která používá totéž rozpouštědlo (THF) pro rozpuštění výchozí sulfonované či nesulfonované polystyrenové nanovlákněné membrány i pro vlastní extrakci.

Na základě spektrální a HPLC analýzy bylo zjištěno že THF extrakt, resp. NPs obsahují chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, β -karoten a lutein.

Pomocí časově rozlišené spektroskopie bylo prokázáno, že extrakt je silným zdrojem singletového kyslíku $O_2(^1\Delta_g)$ díky přítomnému chlorofylovému fotosensitizeru. Fotogeneraci $O_2(^1\Delta_g)$ částečně tlumí v extraktu přítomné karotenoidy, které zhasí $O_2(^1\Delta_g)$. K snížení zhasacího efektu karotenoidů je možné použít zředěný extrakt nebo před-ozářené vzorky viditelným světlem, ve kterých rychle se fotodegradující karotenoidy nemají výrazný zhasací efekt.

Silný fotooxidační a antibakteriální efekt NPs připravených z extraktu fotogenerujícího $O_2(^1\Delta_g)$, byl prokázán vůči chemickým substrátům a *Escherichia coli*. Fotoaktivita NPs je iniciována viditelným světlem.

Klíčová slova

Chlorofyl, fotosensitizer, nanočástice, singletový kyslík

Abstract

Photoactive sulfonated and non-sulfonated polystyrene nanoparticles (NPs) with encapsulated THF extract from spinach (*Spinacia oleracea*) were prepared. The preparation of NPs is based on a simple nanoprecipitation method that uses the same solvent (THF) to dissolve the sulfonated or non-sulfonated polystyrene nanofiber membrane and for the extraction itself.

Based on spectral and HPLC analysis, it was found that the THF extract and NPs contain chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, β -carotene and lutein.

Time-resolved spectroscopy shows that the extract is a potent source of singlet oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ thank to the photosensitizer chlorophyll. The photogeneration of $O_2(^1\Delta_g)$ is partially suppressed by the carotenoids in the extract, which quench $O_2(^1\Delta_g)$. To reduce the quenching effect of carotenoids, it is possible to use dilute extract or pre-irradiated samples with visible light because of carotenoids rapid breakup.

A strong photooxidative and antibacterial effect of NPs prepared from an extract generating $O_2(^1\Delta_g)$ was demonstrated on chemical substrates and *Escherichia coli*. The photoactivity of NPs is initiated by visible light.

Key words

Chlorophyll, photosensitizer, nanoparticle, singlet oxygen

Obsah

Seznam zkratk a symbolů.....	6
1 Teoretická část	7
1.1 Úvod do chemie singletového kyslíku	7
1.2 Vznik singletového kyslíku fotosensitizovanou reakcí	8
1.3 Fotosensitizer excitující kyslík	9
1.4 Zhášení singletového kyslíku	11
1.5 Zánik excitovaných stavů fotosensitizeru vlivem agregace	12
1.6 Detekce singletového kyslíku.....	12
1.7 Praktické aplikace fotosensitizovaných reakcí	14
1.8 Aplikace fotosensitizerů na pevných nosičích.....	15
2 Cíl práce	17
3 Experimentální část.....	18
3.1 Chemikálie a roztoky	18
3.2 Přístroje a metody	18
3.2.1 Příprava extraktu	18
3.2.2 Analýza extraktu pomocí HPLC	18
3.2.3 Nanoprecipitační metoda přípravy nanočástic	18
3.2.4 Absorpční a emisní spektra	19
3.2.5 Dynamický rozptyl světla a zeta potenciál.....	19
3.2.6 Ozařovací aparatura.....	19
3.2.7 Fotofyzikální experimenty	19
3.2.8 Chemická detekce singletového kyslíku	20
3.2.9 Antibakteriální test	20
3.2.10 Filtrace NPs	21
3.2.11 Elektronová mikroskopie	21
4 Výsledky a diskuze	22
4.1 Složení THF extraktu	22
4.2 Charakterizace Chl extraktu pomocí časově rozlišené spektroskopie.....	23
4.3 Fotostabilita chlorofylových extraktů.....	25
4.4 Příprava a charakterizace fotoaktivních nanočástic.....	26
4.4.1 Příprava NPs.....	26
4.4.2 Charakterizace připravených NPs	27
4.4.3 Filtrace nanočástic a odhad jejich složení	29
4.5 Kinetika fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ v NPs.....	29
4.5.1 Sulfonované NPs	29
4.5.2 Nesulfonované NPs	31
4.5.3 Porovnání fotooxidačních schopností NPs.....	32
4.6 Antibakteriální vlastnosti nanočástic	33
5 Závěr	35
Poděkování.....	35
Literatura.....	36

Seznam zkratek a symbolů

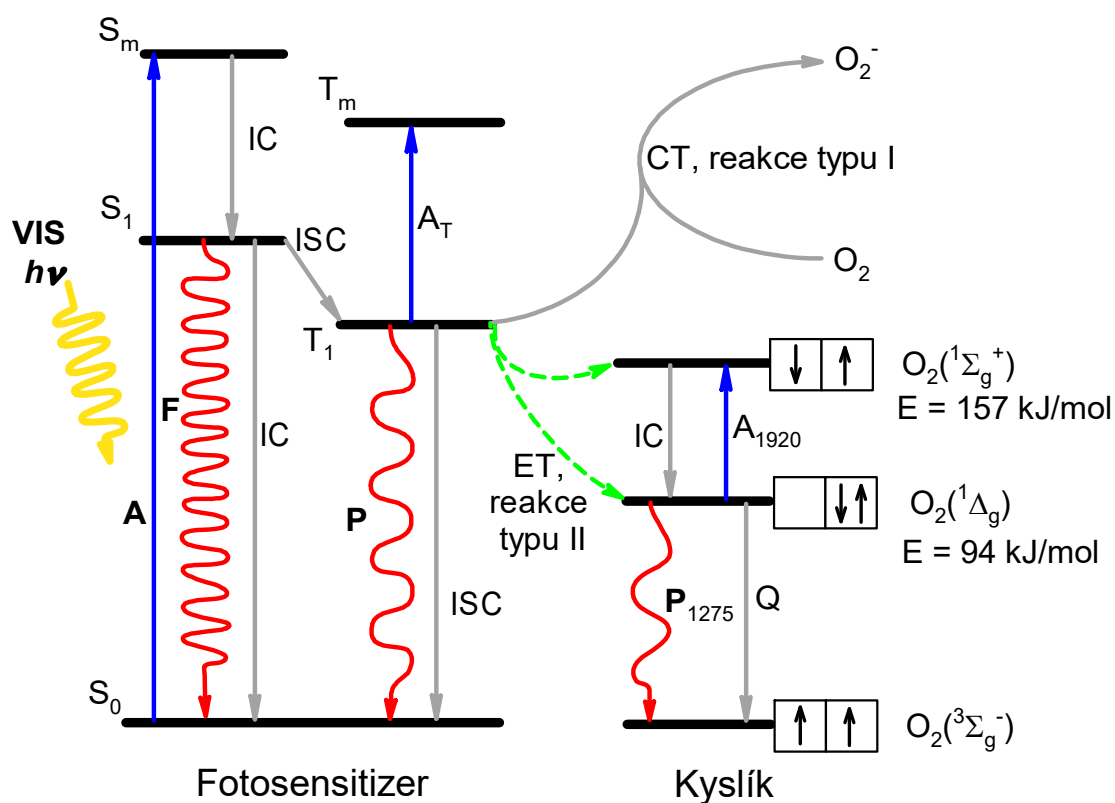
@PS	polystyrenové nanočástice
@PS-sulfo	sulfonované polystyrenové nanočástice
$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
A	absorbance
Car	β -karoten
CFU	jednotka tvořící kolonie bakterií („colony forming unit“)
CT	přenos náboje („charge transfer“)
DLS	dynamický rozptyl světla („dynamic light scattering“)
ET	přenos energie („energy transfer“)
Chl	chlorofyl
ChIE	chlorofylový extrakt (špenát v THF)
ChIR	chlorofylový extrakt (šťovík tupolistý v THF)
IC	vnitřní konverze („internal conversion“)
ISC	mezisystémový přechod („intersystem crossing“)
Lut	lutein
NPs	nanočástice („nanoparticles“)
$\text{O}_2(^1\Delta_g)$	molekulární kyslík v prvním singletovém stavu
$\text{O}_2(^1\Sigma_g^+)$	molekulární kyslík ve vyšším singletovém stavu
$\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$	molekulární kyslík v základním stavu
PBS	pufrovaný fyziologický roztok („phosphate buffer saline“)
PDI	fotodynamická inaktivace („photodynamic inactivation“)
PDT	fotodynamická terapie („photodynamic therapy“)
ROS	reaktivní kyslíkové částice („reactive oxygen species“)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
S_m	m-tý singletový stav ($m = 0, 1, 2, 3$)
t	čas
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
THF	tetrahydrofuran
T_m	m-tý tripletový stav ($m = 0, 1, 2, 3$)
TPP	5,10,15,20- <i>meso</i> -tetrafenylporfyrin
λ	vlnová délka (nm)
τ_T	doba života tripletových stavů fotosensitizeru (s)
τ_{Δ}	doba života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$
Φ_{Δ}	kvantový výtěžek $\text{O}_2(^1\Delta_g)$

1 Teoretická část

1.1 Úvod do chemie singletového kyslíku

Kyslík jako jeden z nejvíce zastoupených prvků na Zemi se za běžných podmínek vyskytuje ve formě dvouatomové molekuly O_2 . Kyslík v základním stavu má v nejvyšších obsazených molekulových orbitalech dva nepárové elektrony (multiplicita 3), tedy elektronový triplet označený jako $O_2(^3\Sigma_g^-)$. Podle zákona zachování spinu při chemických reakcích je spinově zakázáno, aby $O_2(^3\Sigma_g^-)$ reagoval s molekulami, které mají elektronový singlet¹⁻³. Spinový zákaz zvýší aktivační energii chemické reakce, a tím je snížena pravděpodobnost jejího uskutečnění. Většina molekul má všechny valenční elektrony spárované (jsou v singletovém stavu), a proto má $O_2(^3\Sigma_g^-)$ relativně nízkou reaktivitu.

Molekulární kyslík má základní stav $O_2(^3\Sigma_g^-)$ a dvě excitované (singletové) energetické hladiny^{1,2} (Obr. 1). První singletová hladina $O_2(^1\Delta_g)$ má dva spárované



Obr. 1: Schéma fotosensitizované reakce. Znázorněny jsou energetické hladiny fotosensitizeru a molekulárního kyslíku. Singletové stavy jsou označeny S, tripletové T. VIS $h\nu$ označuje viditelné záření, A absorpci (A_T absorpci tripletových stavů), IC vnitřní konverzi, F fluorescenci, ISC mezisystémový přechod, P fosforescenci, ET přenos energie, CT přenos elektronu, Q zhašení. Zářivé přechody jsou znázorněny vlnitou šipkou. Cit.^{1-3,8,9}

elektrony s opačným spinem a je prvním singletovým excitovaným stavem kyslíku. Díky jeho relativně nízké excitační energii (94 kJ/mol) vzniká snadno. Doba života (τ_d) $O_2(^1\Delta_g)$ se pohybuje v řádu μs až ms v závislosti na jeho okolí. Při dodání excitační energie 157 kJ/mol může být kyslík excitován do energeticky bohatšího druhého singletového stavu $O_2(^1\Sigma_g^+)$, který má dva nepárové elektrony s opačným spinem. Reakce této formy excitovaného kyslíku nejsou příliš známy, protože $O_2(^1\Sigma_g^+)$ se záhy po svém vzniku – ve vodě za $\sim 8,2$ ps, (cit.³) – deexcituje za vzniku $O_2(^1\Delta_g)$ či do základního stavu. Z důvodu krátké doby života $O_2(^1\Sigma_g^+)$ je proto pod pojmem singletový kyslík (1O_2) myšlena především forma $O_2(^1\Delta_g)$. Reakce $O_2(^1\Delta_g)$ jsou s většinou molekul spinově dovolené, a proto mají nízkou aktivační energii. Tyto vlastnosti $O_2(^1\Delta_g)$ jsou příčinou jeho velké reaktivity s většinou molekul.

1.2 Vznik singletového kyslíku fotosensitizovanou reakcí

Singletový kyslík vzniká mnoha fyzikálními i chemickými procesy. Například při mikrovlnném výboji v kyslíkové atmosféře, reakcí chlornanu s peroxidem vodíku, dále tepelným rozkladem endoperoxidů, peroxochromanu nebo peroxomolybdenanu, reakcemi nebo fotolýzou ozonu a působením peroxidas^{3,4}. Chloraminy jsou zdrojem $O_2(^1\Delta_g)$ *in vivo*⁵. Singletový kyslík obtížně vzniká přímou světelnou excitací, protože nemá ve viditelné (VIS) ani ultrafialové (UV) oblasti spektra výrazné absorpční pásy².

Singletový kyslík lze generovat nepřímou prostřednictvím fotosensitizované reakce (**Obr. 1**, str. 7). K této reakci je zapotřebí jen kyslík, viditelné záření a tzv. fotosensitizer. Fotosensitizer je obvykle organické barvivo se specifickými vlastnostmi, které absorbuje světelné záření ve viditelné oblasti spektra, a tím se excituje do excitovaného singletového stavu, a poté poskytuje relativně dlouho trvající excitovaný tripletový stav.

Reakční mechanismus^{1,2} fotosensitizované reakce je ilustrován na **Obr. 1** (str. 7). Fotosensitizer se nachází v základním stavu. Po absorpci světelného kvanta viditelného záření se excituje do vyšších singletových stavů (S_m). Následně dochází k vnitřní konverzi (IC, „internal conversion“), pomocí které se fotosensitizer nezářivě deexcituje ze stavu S_m do stavu S_1 . Ze stavu S_1 se fotosensitizer deexcituje nezářivě pomocí IC nebo zářivě pomocí fluorescence do základního stavu S_0 . Ze stavu S_1 však může fotosensitizer částečně stabilizovat tím, že párové elektrony přemění na nepárové a přejde do tripletového stavu T_1 . Tento nezářivý přechod ze singletového stavu do tripletového se nazývá mezisystémový přechod (ISC, „intersystem crossing“). Proces ISC do vzniku

tripletového stavu trvá 0,1 až 10 ns. Tripletový stav fotosensitizeru má dlouhou dobu života (μs), což umožňuje průběh bimolekulárních chemických reakcí, zejména přenos energie (ET, „energy transfer“) nebo přenos elektronu (CT, „charge transfer“) na molekulu kyslíku^{2,3,6}.

Pokud tripletový stav fotosensitizeru nezanikne pomocí IC nebo fosforescence, nastávají dva procesy, které se rozlišují podle svých konečných produktů jako reakce typu I a typu II (cit.^{1,2,7}). Při reakci typu I se z tripletové hladiny fotosensitizeru uvolní elektron (CT), který je přenesen na jinou molekulu v okolí fotosensitizeru, která se tím přemění na radikál. Radikál může přenést elektron na molekulu kyslíku za vzniku superoxidového anion-radikálu a dalších reaktivních kyslíkových částic (ROS, „reactive oxygen species“). Superoxidový anion-radikál vzniká také přenosem elektronu z anion-radikálu fotosensitizeru přímo na molekulární kyslík⁷. Ve fotosensitizerech, které upřednostňují reakci typu I, probíhá excitace elektronu z nevazebného do π^* -antivazebného molekulového orbitalu³.

Reakce typu II spočívá v přenosu energie (ET) z tripletové hladiny fotosensitizeru na singletové hladiny kyslíku $\text{O}_2(^1\Sigma_g^+)$ a $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Reakce typu II se účastní pouze fotosensitizer a kyslík (jiné substráty excitace se nepočítají do reakce typu II)⁷. Díky dlouhým dobám života tripletových stavů fotosensitizeru je hlavní cestou vzniku $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ tripletová fotosensitizace. Vedlejší cestou je pak singletová fotosensitizace, při níž kyslík zhasí singletové stavy fotosensitizeru⁸. Singletová fotosensitizace obvykle nestačí proběhnout kvůli krátké době života singletových stavů fotosensitizeru. Při reakci typu II se uplatňuje přechod elektronu z π -vazebného do π^* -antivazebného orbitalu fotosensitizeru³.

Obvykle probíhají současně reakce typu I i typu II a jednu z nich lze posílit volbou koncentrace a druhu fotosensitizeru. Účinnost fotosensitizované reakce je popsána veličinou kvantového výtěžku, který je roven poměru počtu přeměněných molekul ku počtu absorbovaných světelných kvant³.

1.3 Fotosensitizery excitující kyslík

Vznik $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ je usnadněn tzv. fotosensitizerem, který přenáší energii viditelného záření na kyslík. Fotosensitizer je molekula, která je schopna absorbovat jedno nebo i dvě světelná kvanta^{1,8-10} a tím se excitovat. Fotosensitizer se částečně stabilizuje za vzniku dlouho žijícího excitovaného tripletového stavu T_1 , ze kterého může být přenesena

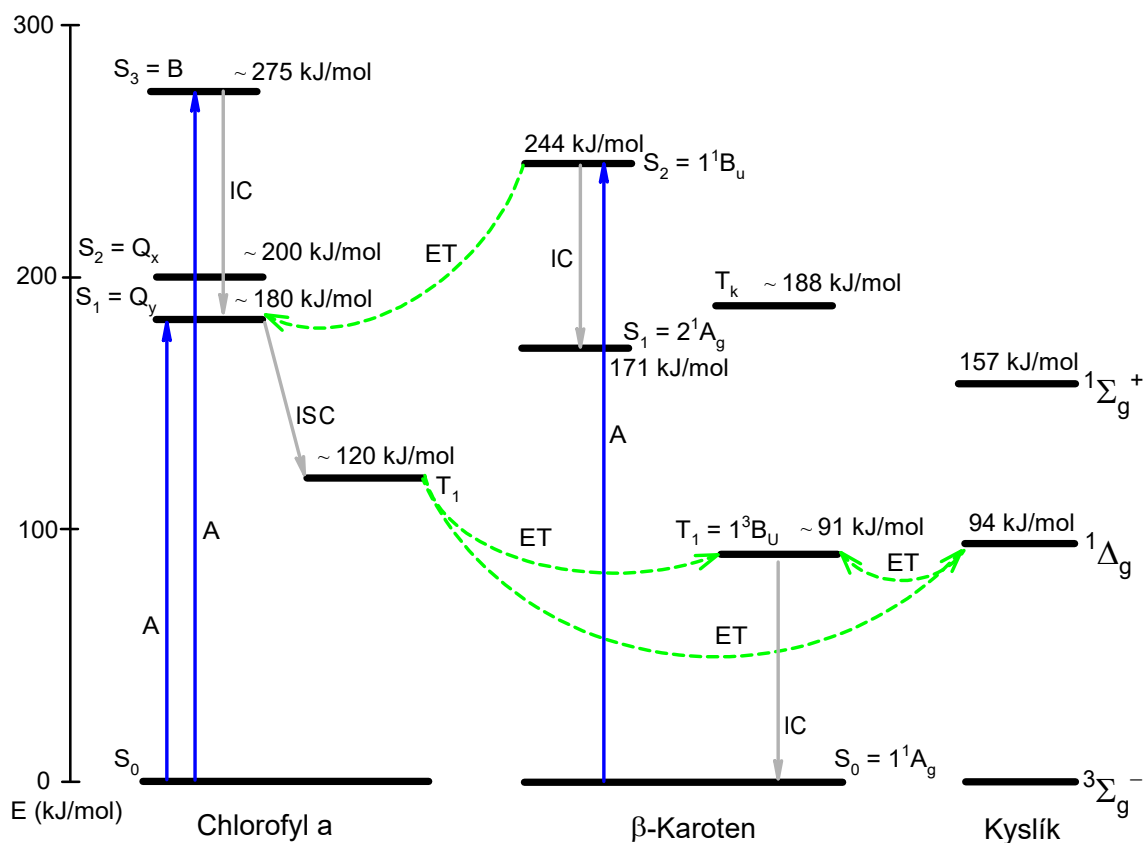
energie na kyslík v základním stavu, který je excitován na singletový kyslík⁸. Tato vlastnost fotosensitizeru se označuje jako fotokatalytická aktivita¹¹. Fotosensitizer musí mít T₁ stav vyšší než 94 kJ/mol, což odpovídá excitační energii S₁ stavu kyslíku (**Obr. 1**, str. 7). Pokud je T₁ vyšší než 157 kJ/mol, vznikají obě singletové formy O₂(¹Σ_g⁺) a O₂(¹Δ_g).

Vhodný fotosensitizer po excitaci téměř kvantitativně přechází do déle žijícího T₁ stavu, má vysoký kvantový výtěžek T₁ stavu i O₂(¹Δ_g), vysokou fotostabilitu a případně nízkou temnou toxicitu (pro medicínské aplikace, viz **kap. 1.7**). Fotosensitizer je obvykle barevná látka, která může být odvozena od mnoha chemických struktur. Struktura fotosensitizeru rozhoduje o tom, zda bude vznikat superoxidový anion-radikál (reakce typu I) nebo singletový kyslík (reakce typu II)⁴. Například antrachinon, akridinová a xanthenová barviva upřednostňují reakci typu I (vznik O₂⁻ a ROS). Naproti tomu eosin, bengálská červeň, methylenová modř, antracen, triarylmethanová barviva, ftalocyaniny, porfyriny a jejich deriváty³ preferují reakci typu II (vznik O₂(¹Δ_g)). Jedním z porfyrinoidních fotosensitizerů je i chlorofyl.

Chlorofyl (Chl) spolu s porfyriny byl jedním z prvních zkoumaných fotosensitizerů⁴. Chlorofyl je v přírodě jedno z nejvíce rozšířených barviv, protože se vyskytuje v zelených rostlinách. Struktura chlorofylu je tvořena především základním skeletem odvozeným od chlorinu. Podle substituentů na chlorinovém skeletu se rozlišuje více druhů chlorofylů, ze kterých jsou nejvýznamnější Chl *a* a Chl *b* (cit.^{12,13}). Chlorofyl *a* se vyznačuje methylovou skupinou v poloze 7. Tím se liší od druhého významného pigmentu chlorofylu *b*, který má v poloze 7 aldehydovou skupinu. Obě struktury obsahují fytylový řetězec.

Chlorofyl *a* absorbuje ve dvou oblastech spektra, v modré (Soretův pás ~ 436 nm) a v červené (Q_y-pás ~ 664 nm)^{1,14,15}. Absorpční Q-pás v červené oblasti spektra je výhodný i pro využití ve fotodynamické terapii² (PDT, „**photodynamic therapy**“, viz **kap. 1.7**). Chlorofyl v přítomnosti světla tvoří na základě fotosensitizované reakce O₂(¹Δ_g) a působí proto oxidačními účinky. Naopak ve tmě se chová jako antioxidant díky konjugovanému systému dvojných vazeb v porfyrinovém kruhu^{16,17}.

Chlorofyly jsou v zelených rostlinách doprovázeny dalšími listovými pigmenty jako β-karoten, lutein a jiné karotenoidy. Především karotenoidy zhášejí excitované stavy chlorofylu i singletový kyslík (**Obr. 2**)¹⁸. Kromě zhášení se karotenoidy podílejí i na



Obr. 2: Schéma zhášení excitovaných energetických stavů chlorofylu *a*, β -karotenu a kyslíku. Singletové stavy jsou označeny S, tripletové T, absorpce záření A, vnitřní konverze IC, mezisystémový přechod ISC, přenos energie ET. Cit. ^{1,15,21-26}

excitaci chlorofylu s účinností 15 – 90 % (cit.¹²), protože samy absorbují viditelné záření a získanou energii přenášejí na chlorofyl.

1.4 Zhášení singletového kyslíku

Singletový kyslík nese velkou energii a může oxidovat mnoho okolních molekul. Singletový kyslík se ale přednostně deexcituje srážkami molekul v okolí. K zesílenému zhášení může dojít i za asistence jiných molekul (zhášečů) v okolí.

Zhášeč (např. β -karoten) je molekula, jejíž tripletový stav se nachází pod 94 kJ/mol, tj. energií hladiny $O_2(^1\Delta_g)$ (cit.³). Pak dochází k přenosu energie z $O_2(^1\Delta_g)$ na zhášeč. Excitovaný zhášeč následně uvolní získanou energii do okolí ve formě tepla (**Obr. 2**).

Molekuly obsahující hydroxy-skupiny (např. H_2O) se významně podílejí na nezářivě deexcitaci $O_2(^1\Delta_g)$, protože energie přechodu $O_2(^1\Delta_g)$ do základního stavu rezonuje s vibračními módy hydroxy-skupin. Doba života (τ_A) je čas, za který množství $O_2(^1\Delta_g)$ klesne na hodnotu $1/e$ ($\sim 0,37$). Po uplynutí pěti dob života je množství $O_2(^1\Delta_g)$

zanedbatelně malé ($< 1 \%$). Např. v plynné fázi¹⁹ je doba života 54 ms, ve vodě^{1,3} 3,5 μs . Delší doba života zvyšuje účinky $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Singletový kyslík difunduje do prostředí a během doby života urazí difúzní dráhu (d), která v roztoku závisí na době života τ_A a difúzním koeficientu D podle vztahu $d = \sqrt{6D\tau_A}$ (cit.¹). Ve vodě lze difúzní dosah $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ odhadnout jako 205 nm od místa vzniku²⁰, v plynné fázi až 2,7 mm (cit.¹⁹).

1.5 Zánik excitovaných stavů fotosensitizeru vlivem agregace

Ke vzniku $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ fotosensitizedovanou reakcí je potřeba, aby fotosensitizer poskytoval excitované tripletové stavy po tak dlouhou dobu, aby jeho energie mohla být předána na tripletový kyslík. V okolí fotosensitizeru se nevyskytuje pouze kyslík, ale i zhášee. Tyto zhášee deexcitují tripletové stavy fotosensitizeru, a tím zabrání vzniku $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Jako zhášee může působit ale i sousední molekula fotosensitizeru.

Molekuly fotosensitizeru se v prostředí nevyskytují odděleně, ale v roztoku dochází k jejich srážkám, interakcím. Srážky jsou častější při vyšších koncentracích fotosensitizeru²⁷. Pokud excitovaná molekula fotosensitizeru narazí do neexcitované, dojde k přenosu energie z excitované molekuly na neexcitovanou. Tento proces se nazývá samozhášení („self-quenching“)²⁸ fotosensitizeru. Samozhášení zkracuje doby života excitovaných tripletových stavů fotosensitizeru, a tím je zkrácena i doba života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Extrémní samozhášení nastává během agregace²⁹. Agregace se týká především planárních fotosensitizerů. Při agregaci se už nejedná o srážení molekul, ale o stálou interakci konjugovaných systémů. Tím dojde k vytvoření agregovaných struktur fotosensitizeru především na základě π - π interakce. π - π interakce způsobují zvýšené ztráty energie a snižují doby života excitovaných stavů fotosensitizeru. Je snížena pravděpodobnost průběhu bimolekulárních reakcí, a tedy i vznik singletového kyslíku³⁰. Vlivem π - π interakce také dojde ke snížení energie Q_y -pásu a tím i hladiny T_1 fotosensitizeru²¹ (**Obr. 1**, str. 7). Hladina T_1 se agregací může snížit pod energii $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, a tak může být zcela zablokovan vznik $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Agregace se týká fotosensitizerů rozpustných i nerozpustných ve vodě.

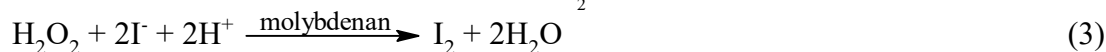
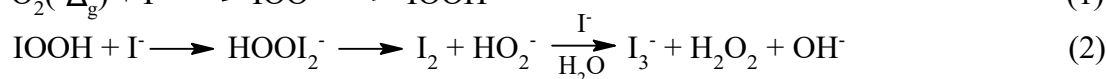
1.6 Detekce singletového kyslíku

Singletový kyslík lze detekovat chemickými nebo fyzikálními metodami^{1,3}. Fyzikální metody jsou často založeny na časově rozlišeném měření fosforescence $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ při

1270 nm (cit.¹). Chemické metody umožňují dokázat $O_2(^1\Delta_g)$ v roztoku a jsou obvykle jednoduché na provedení. Nejčastěji jsou založeny na UV/VIS nebo fluorescenčním sledování úbytku specifického substrátu s $O_2(^1\Delta_g)$. Nevýhodou je v některých případech malá specifická pro $O_2(^1\Delta_g)$.

K chemické detekci $O_2(^1\Delta_g)$ se využívá například degradace kyseliny močové^{31,32}. Její reakce s $O_2(^1\Delta_g)$ se projeví jako pokles absorbance při 292 nm. Tato metoda detekce $O_2(^1\Delta_g)$ je hojně využívána díky rozpustnosti sodné soli kyseliny močové ve vodě. Kyselina močová navíc je biokompatibilní a dobře reaguje s $O_2(^1\Delta_g)$ za vzniku kyseliny parabanové. Její nevýhodou je omezená stabilita v čase. Navíc může být oxidována kromě $O_2(^1\Delta_g)$ i jinými oxidačními činidly nebo ROS, např. superoxidovým anion-radikálem³³ a může zhaset i excitované stavy fotosensitizeru.

Jinou chemickou metodou založenou na sledování změn absorbance patří tzv. jodidový test³⁴. Spočívá v reakci $O_2(^1\Delta_g)$ s jodidovým iontem za vzniku trijodidového iontu s absorpčními pásy při 287 a 351 nm. Mechanismus reakce lze popsat takto:



Reakce $O_2(^1\Delta_g)$ s jodidem vede ke vzniku trijodidu, ale i peroxidu vodíku, který dále reaguje opět za vzniku trijodidu. Činidlo tedy detekuje $O_2(^1\Delta_g)$ i peroxid vodíku, což snižuje selektivitu, ale zvyšuje míru odezvy.

Pro lepší diagnostiku přítomnosti $O_2(^1\Delta_g)$ pomocí jodidového testu se používá prostředí D_2O , kde má $O_2(^1\Delta_g)$ díky izotopovému efektu vyšší dobu života a působí vyšší míru fotooxidace oproti témuž experimentu v H_2O . Podobný účinek na fotooxidaci má zvýšení koncentrace kyslíku v roztoku. Třetím způsobem detekce přítomnosti $O_2(^1\Delta_g)$ je přidání specifického zhasěče $O_2(^1\Delta_g)$. Oxidace jodidu bez přítomnosti zhasěče probíhá, ale v přítomnosti zhasěče nikoliv, protože zhasěč (azidový ion, β -karoten, histidin, kyselina močová³) zkrátí dobu života $O_2(^1\Delta_g)$ natolik, že se nestihne zúčastnit oxidační reakce.

1.7 Praktické aplikace fotosensitizovaných reakcí

Fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ je výhodná pro jeho vznik přesně v místě potřeby. Pro cílený efekt je potřeba dopravit fotosensitizer do blízkosti chemického nebo biologického terče, zajistit dostatečnou koncentraci kyslíku v jeho okolí a ozářením aktivovat vznik $O_2(^1\Delta_g)$.

Singletový kyslík lze díky jeho vysoké reaktivitě využít např. v organických syntézách^{4,35}. Jeho reakcemi ve smyslu [2 + 4] cykloadice vznikají endoperoxidy, ve smyslu [2 + 2] cykloadice vznikají dioxethany, jeho „en“ reakce poskytují hydroperoxy, další možnou reakcí $O_2(^1\Delta_g)$ je oxidace sulfidů⁷.

Reakce $O_2(^1\Delta_g)$ s organickými molekulami a makromolekulami v buňce mohou způsobit buněčnou smrt. Singletový kyslík reaguje např. s proteiny a nukleovými kyselinami³, s guaninem v DNA, nenasycenými mastnými kyselinami, aminokyselinami (hlavně tryptofanem, histidinem, methioninem a cysteinem)⁷. Proto lze v medicínských aplikacích využít fotogeneraci $O_2(^1\Delta_g)$ k fotodynamické inaktivaci bakterií (PDI, „**photodynamic inactivation**“)^{11,20,36,37} včetně kmenů rezistentních na antibiotika. Pokud je použit fotosensitizer vázaný na pevný nosič, nehrozí navíc vyvinutí rezistence (vypuzení fotosensitizeru z bakteriální buňky)²⁰.

Mechanismus účinku fotodynamické inaktivace bakterií závisí na povaze fotosensitizeru (aniontové nebo kationtové nebo nerozpustné ve vodě). Náboj nebo lipofilita fotosensitizeru určuje místo, kam se fotosensitizer v buňce naváže a způsobí degradaci singletovým kyslíkem. Aniontové fotosensitizer se iontovou vazbou navazují na kladně nabitě skupiny proteinů³. Tak je v blízkosti proteinů fotogenerován $O_2(^1\Delta_g)$ a dojde k jejich oxidaci. Kationtové fotosensitizery interkalují do DNA a na světle způsobují její poškození. Lipofilní fotosensitizer lze navázat do micel, liposomů, cyklodextrinů, nebo pevného polymerního nosiče. Lipofilní fotosensitizer tvoří $O_2(^1\Delta_g)$ v blízkosti buněčných membrán, a tím dochází k narušení integrity bakteriální buňky. Účinek fotodynamické inaktivace závisí na druhu bakterie²⁰. Obecně Gram-negativní bakterie jsou odolnější vůči oxidaci membrán oproti Gram-pozitivním. Fotodynamická inaktivace $O_2(^1\Delta_g)$ umožňuje fotodezinfekci povrchů a mikrobiálně znečištěných vod³⁸.

V medicíně lze využít fotogeneraci cytotoxického $O_2(^1\Delta_g)$ k tzv. fotodynamické terapii (PDT, „**photodynamic therapy**“)¹⁰ (léčba rakoviny a aterosklerózy). Fotodynamická terapie spočívá v dopravení vhodného fotosensitizeru s afinitou k patologické (např. rakovinné) tkáni, která je následně ozářena dávkou viditelného světla

selektivního pro použitý fotosensitizer. Tím dojde k fotogeneraci $O_2(^1\Delta_g)$ a k porušení peroxidovaných patologických buněk tkáně. Pro PDT je výhodné používat záření o delších vlnových délkách (např. červené světlo), které proniká do tkáně hlouběji. Používané fotosensitizery jako porfyriny, chloriny a bakteriochloriny absorbují i v červené oblasti spektra³⁹.

Singletový kyslík se využívá také v herbicidech a insekticidech¹. V porovnání s biocidy stačí fotosensitizerům velmi malá koncentrace k podobnému biologickému účinku. Jedna molekula fotosensitizeru totiž excituje tisíce molekul kyslíku, než je sama odbourána^{11,37}.

1.8 Aplikace fotosensitizerů na pevných nosičích

Navázání fotosensitizeru na pevný nosič má (oproti fotosensitizerům rozpuštěným v roztoku) několik výhod.

První výhodou je skutečnost, že v/na pevném nosiči obvykle nedochází k výraznější agregaci fotosensitizeru^{30,40,41}. Pevný nosič fixuje molekuly fotosensitizeru na jednom místě a nedochází k přenosům energie srážkami. Další výhodou je nezávislost produkce $O_2(^1\Delta_g)$ na rozpouštědle. Pevný nosič vytváří fotosensitizeru stabilní prostředí a chrání fotosensitizer před případnými zhášeči v roztoku⁴¹ a prodlužuje doby života tripletových stavů i $O_2(^1\Delta_g)$, což posiluje fotosensitizedovanou reakci. Další výhodou je možnost oddělení (např. filtrací³⁸) fotosensitizeru v pevném nosiči od produktu fotooxidační reakce, a tím lze např. získat produkt o vyšší čistotě.

Aby pevný nosič účinně napomáhal fotosensitizedované reakci, musí splňovat určité požadavky. Těmi je na prvním místě velký měrný povrch kvůli krátkému dosahu a době života $O_2(^1\Delta_g)$, dále vysoký difúzní koeficient v nosiči pro kyslík a stabilita nosiče v čase. Dále by nosič neměl být toxický a neměl by zhášet $O_2(^1\Delta_g)$ ani excitované stavy fotosensitizeru⁴².

V naší laboratoři se připravují fotoaktivní materiály založené na fotosensitizeru navázaném v pevném nosiči (např. nanovláknenné membrány⁴² a nanočástice^{38,40,41}). Do pevných nosičů se navazují porfyrinové fotosensitizery z důvodu silné absorpce záření ve viditelné oblasti spektra (při 420 nm). Pokud je potřeba fotosensitizer s absorpcí v červené oblasti (660 nm), využívají se ftalocyaniny. Byly připraveny nanomateriály obsahující oba tyto fotosensitizery³⁰.

Výše uvedené požadavky na pevný nosič splňují sulfonované polystyrenové nanočástice^{38,41}. Jsou stabilní vůči ozařování i v čase, jsou hydrofilní, netoxické a mají vysoký difúzní koeficient pro kyslík. Velikost měrného povrchu a průměr polystyrenových nanočástic lze ovlivnit stupněm (dobou) sulfonace polystyrenové nanovlákněné membrány, ze které jsou nanočástice připravovány pomocí nanoprecipitace. Více sulfonované nanočástice mají menší velikost^{38,40}. Do polystyrenu byly navázány např. porfyrinové fotosensitizery (5,10,15,20-*meso*-tetrafenylporfyrin, TPP), které měly v polystyrenu vysoké doby života tripletových stavů¹¹, což zvyšuje produkci $O_2(^1\Delta_g)$. Kromě polystyrenových nanočástic byly připraveny i nanočástice z kopolymeru polyethylenglykol-polykaprolakton, který má výhodu biodegradability⁴⁰.

Podle literatury⁴³ je na Zemi ročně vyprodukováno 1,2 miliard tun chlorofylu. Proto se tato práce zabývá otázkou, zda lze široce a snadno dostupný chlorofyl získaný z levného přírodního zdroje navázat do nanočástic a tyto nanočástice použít pro fotodezinfekci mikrobiálně znečištěných vod.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo jednoduchou metodou připravit fotoaktivní nanočástice s obsahem chlorofylu, který byl získán z THF extraktu špenátu setého (*Spinacia oleracea*). Tyto nanočástice charakterizovat pomocí UV/VIS spektroskopie a dynamického rozptylu světla (DLS) a zhodnotit jejich fotoaktivitu (produkci reaktivního a cytotoxického singletového kyslíku) a antibakteriální účinnost vůči *Escherichia coli*.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie a roztoky

Chemikálie chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, β -karoten, lutein, kyselina močová, Na_2MoO_4 , KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich), ampicilin, CELL-PBS (CELLPURE), LB Agar (Lennox), LB Medium (Lennox) (Carl Roth), H_2SO_4 , HCl, tetrahydrofuran, NaOH (Penta), KI, (Fluka), D_2O (VWR Chemicals), NaN_3 (Lachema) byly použity bez další purifikace. Polystyrenová nanovlákná membrána byla získána od firmy Elmarco s.r.o.

Listy špenátu setého (*Spinacia oleracea*) byly získány z obchodního řetězce Lidl (země původu Itálie). Listy šťovíku tupolistého (*Rumex obtusifolius*) byly nasbírány v ČR v jarním období.

Escherichia coli DH5 α s plazmidem pGEM11Z byla zakoupena od firmy Invitrogen.

3.2 Přístroje a metody

3.2.1 Příprava extraktu

Listy špenátu setého a šťovíku tupolistého byly omyty a 5 dní sušeny mezi filtračními papíry na stinném místě při laboratorní teplotě. Suché listy byly poté nadrceny a stříhány v THF, dokud nevznikl tmavě zelený až černý extrakt (extrakce trvala 5 min). Extrakt byl přefiltrován přes papírový filtr. Spektrometricky byla odhadnuta koncentrace chlorofylu pomocí extinkčního koeficientu Chl *a* při 664 nm ($\alpha = 0,10396 \text{ l/mg/cm}$). Extrakt špenátu je označen ChIE, extrakt šťovíku ChIR.

3.2.2 Analýza extraktu pomocí HPLC

Extrakt ChIE a ChIR byly analyzovány pomocí HPLC Agilent Technologies, LC 1290 Infinity, 6460 Triple Quad LC/MS (Waldbroon) na koloně SunFireTM C18, 150 \times 4,6 mm, se zrněním 5 μm , (Waters) pomocí mobilní fáze o složení 100 % CH_3OH s 0,5 % HCOOH . Průtok byl zvolen 0,8 ml/min, dávkování vzorku bylo 20 μl . Byla zvolena UV/VIS detekce při 436 nm (chlorofyl *a*), 463 nm (chlorofyl *b*), 459 nm (β -karoten) a 453 nm (lutein).

3.2.3 Nanoprecipitační metoda přípravy nanočástic

Do 50ml kádinky bylo odváženo 16 mg suché polystyrenové (PS) nanovlákné (sulfonované nebo nesulfonované) membrány. Poté bylo přidáno množství THF extraktu obsahující 0,2 mg Chl *a*. Směs chlorofylu a PS byla poté naředěna dalším THF na celkový

objem 4 ml. Za 1 min intenzivního míchání bylo rychle přidáno 20 ml destilované vody, tím došlo k nanoprecipitaci. Vzniklé nanočástice (NPs, „nanoparticles“) byly odpařeny ve vakuové rotační odparce (≤ 60 °C) na objem disperze 15 ml. Poté byly NPs odstředěny (3040 g, 10 min) a dialyzovány pomocí dialyzačních střívek (Float-A-Lyzer G2 s molekulární hranou 50 kDa) ve 2 l destilované vody, po dobu 15 h. Dialýza se provádí za účelem odstranění možných příměsí nečistot včetně THF a jeho peroxidické formy.

3.2.4 Absorpční a emisní spektra

UV/VIS absorpční spektra byla pořízena spektrofotometrem UV 300 Unicam (Spectronic Unicam) v křemenných kyvetách.

Emisní spektra byla pořízena fluorimetrem FLS 980 (Edinburgh Instruments) za použití pásmového filtru $\lambda > 590$ nm a křemenné kyvety.

3.2.5 Dynamický rozptyl světla a zeta potenciál

Velikost a zeta potenciál NPs byly měřeny přístrojem Zetasizer Ultra (Malvern). Pro měření koncentrace byl vzorek NPs $11\times$ zředěn ze zásobní disperze.

3.2.6 Ozařovací aparatura

Kyveta s disperzí NPs a detekčním činidlem byla ozařována pomocí optické aparatury Newport, s temperovaným kyvetovým prostorem GREGORY Instruments, 500 W xenonovou výbojkou, časovanou clonou a pásmovým filtrem $\lambda \geq 400$ nm.

Porovnání fotooxidace různých nanočástic bylo provedeno pomocí 36W LED zdroje (KINGBO) s emisním spektrem 640 – 680 nm umístěné 12 cm od kyvety.

3.2.7 Fotofyzikální experimenty

Vzorky byly excitovány laserem Lambda Physik FL3002 ($\lambda_{\text{exc}} = 664$ nm, délka pulzu ~ 28 ns, XeCl excimerový laser), který svou vlnovou délkou odpovídal Q pásu chlorofylu v extraktu, standardu chlorofylu *a* (Chl *a*). Časově rozlišená luminiscence $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ v blízké infračervené oblasti (1270 nm) byla měřena v pravém úhlu k excitačnímu paprsku pomocí detektorové jednotky (interferenční filtr, Ge dioda).

Časové profily luminiscence $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ byly zprůměrovány a vypočteny jako rozdíl mezi signály v H_2O nasycené kyslíkem a argonem. Signály byly proloženy jednoduchou exponenciální funkcí: $I = I_0 \exp(-t/\tau_A)$, τ_A je doba života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Prokládání exponenciály nezahrnuje počáteční část grafu, která je ovlivněna rozptylem světla, fluorescencí

a tvorbou $O_2(^1\Delta_g)$ z tripletových stavů fotosensitizerů). Na laserovém kinetickém spektrometru LKS 20 v rozpouštědlech nebo disperzích nasycených kyslíkem, vzduchem a argonem byla měřena triplet-tripletová absorpční spektra fotosensitizerů a kinetika rozpadu tripletových stavů fotosensitizerů.

3.2.8 Chemická detekce singletového kyslíku

Generace $O_2(^1\Delta_g)$ z NPs s chlorofylovým fotosensitizerem byla detekovaná pomocí jodidové metody³⁴.

Jodidové činidlo bylo připraveno jako roztok 0,12 mol/l KI, 0,020 mol/l KH_2PO_4 , 10 μ mol/l Na_2MoO_4 , pH 6,2 nastaveno pomocí koncentrovaného NaOH. Čerstvě připravené nezoxidované činidlo má obvykle absorpenci při 351 nm nižší než 0,01.

Disperze NPs (~200 μ l sulfonovaných NPs nebo ~ 100 μ l nesulfonovaných NPs) s 1,5 ml jodidového činidla byla doplněna do 3 ml destilovanou vodou v 4×1×1 cm křemenné kyvetě. Disperze fotoaktivních NPs v přítomnosti jodidového činidla byla ozařována 500W xenonovou lampou (plné VIS spektrum) nebo 36W LED zdrojem (pouze pro červenou oblast) v pravidelných časových intervalech. Sledována byla absorpance I_3^- při 351 nm. Změny A_{351} byly vynášeny v závislosti na čase ozařování.

Alternativně byla fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ detekována pomocí fotodegradace kyseliny močové ($2 \cdot 10^{-4}$ mol/l, v pufru pH 7,4) v přítomnosti disperze fotoaktivních NPs. Sledována byla degradace absorpčního pásu při 292 nm v průběhu ozařování.

3.2.9 Antibakteriální test

Agarová půda byla připravena tak, že LB Agar (23 g) byl rozpuštěn v 650 ml destilované vody, kádinka lehce uzavřena alobalem a vložena do autoklávu (30 min, 121 °C). Po vychladnutí agarů na 60 °C (měřeno IR teploměrem) bylo přidáno 100 mg sodné soli ampicilinu a sterilně zamícháno. Agar byl rozlit na asi 60 sterilních Petriho misek.

Byla založena bakteriální kultura „over-night“ smísením 1 ml uskladněné (8 °C) zásobní kultury s ~ 10 ml LB média (20 g/l se 100 mg ampicilinu). Kultura byla aerobně inkubována při 37 °C a 120 RPM po dobu 15 h (přes noc).

Poté byla připravena lépe definovaná kultura „morning“ smísením 1,00 ml kultury „over-night“ s 10 ml LB média (20 g/l se 100 mg ampicilinu). Kultura „morning“ byla aerobně inkubována při 37 °C a 120 RPM. Průběžně byly odebírány vzorky kultury

a měřena jejich absorbance při 560 nm. Při dosažení $A_{560} \sim 1,2$ (asi za 2 h, $67 \cdot 10^6$ CFU/ml) byla kultura „morning“ 5000× zředěna v PBS. Do plastové kyvety bylo pipetováno 1,00 ml zředěné kultury a 1,00 ml disperze NPs. Kyveta byla ozařována 36W LED zdrojem s emisí v červené oblasti spektra a v pravidelných časových intervalech bylo odebíráno 150 μ l vzorku, který byl rozetřen na agar v Petriho misce (každý vzorek jako triplikát). Petriho misky byly inkubovány ve 37 °C po dobu ~ 15 h (přes noc).

Poté byly pořízeny fotografie agarových misek. Počet kolonií (CFU) byl určen pomocí softwaru Open CFU. Software využívá obrazovou analýzu. Počítání bylo provedeno s parametry: recognize similar colors, minradius = 1, draw mask. Obvykle se počet CFU na agarové misce temné kontroly pohyboval kolem 1000.

3.2.10 Filtrace NPs

Plastová špička (1000 μ l) pro automatické pipety byla seříznuta pro rozšíření užšího otvoru. Na špičku byla připevněna polyurethanová (Tecophilic) nanovláčková membrána (cca 5 cm²). Takto připravený filtr byl vložen do mikroskopické kumavky. Na filtr byla nanášena disperze fluoreskujících NPs. Filtrace byla urychlena centrifugací (50 g, 10 min). Schopnost filtrovat NPs přes nanovláčkovou membránu byla sledována fluorimetricky.

3.2.11 Elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) byla provedena pomocí mikroskopu JEOL NEOARM pracujícího při napětí 200 kV a vybaveným TemCam-XF416R 4k × 4k CMOS detektorem (TVIPS). Disperze NPs (10 μ l) byla pipetována na TEM mřížku s uhlíkovým filmem propustným pro elektrony, který byl zbaven náboje po 30 s před pipetováním disperze. Po 1 min byl roztok odstraněn z TEM mřížky filtračním papírem.

4 Výsledky a diskuze

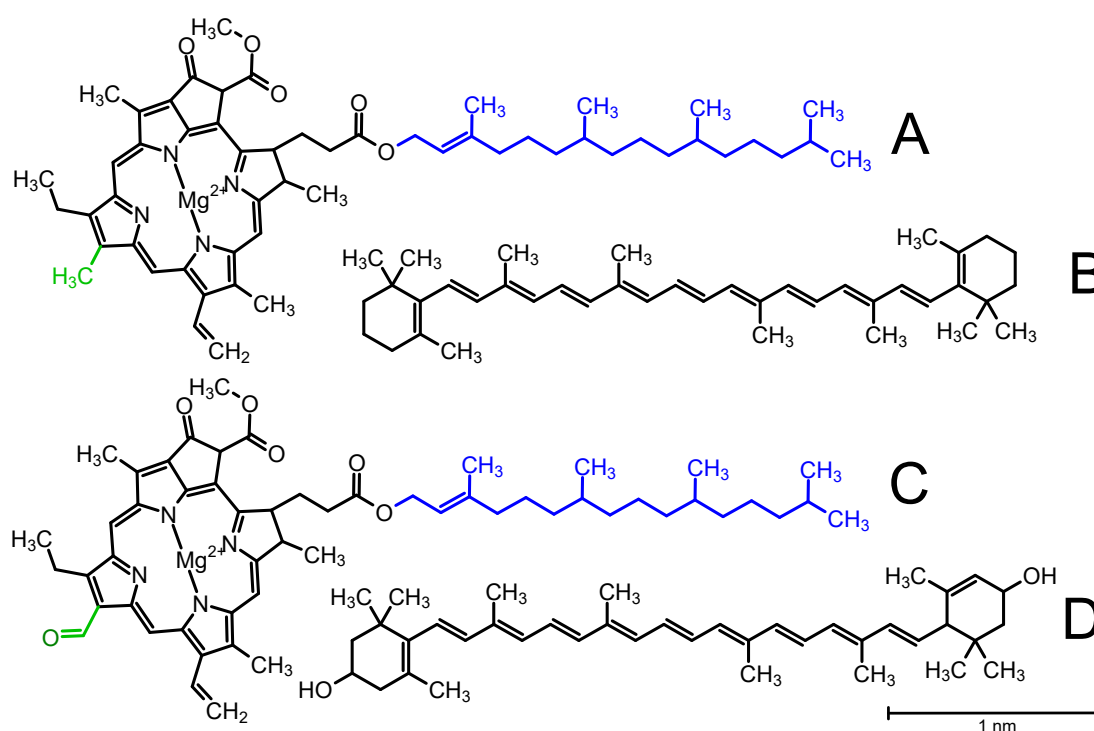
4.1 Složení THF extraktu

Jak již bylo uvedeno v **kap. 2**, cílem této práce bylo zjistit, zda lze fotogenerovat singletový kyslík $O_2(^1\Delta_g)$ využitím chlorofylového (Chl) extraktu zelených rostlin vázaného v polymerní nanočásticové (NPs) matici. Za tímto účelem byly připraveny chlorofylové extrakty z přírodního materiálu špenát setý (*Spinacia oleracea*) označený ChlE, šťovík tupolistý (*Rumex obtusifolius*) označený ChlR (**kap. 3.2.1**).

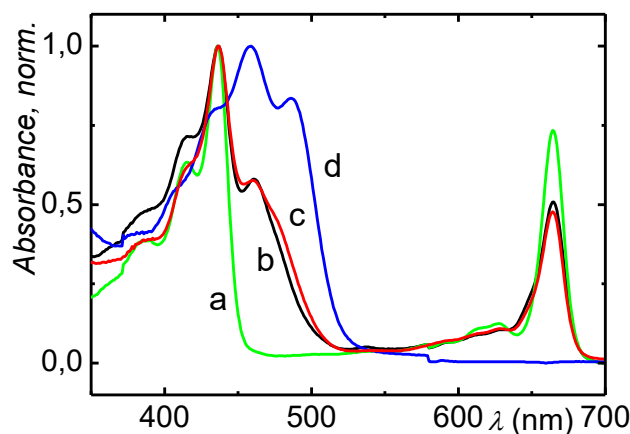
Je známo, že Chl *a* a Chl *b* je v přírodním materiálu doprovázen mnoha ochrannými barvivy, především karotenoidy⁴⁴⁻⁴⁶. Extrakt ChlE byl podroben HPLC analýze. Byly porovnány retenční časy složek extraktu s retenčními časy standardů Chl *a*, Chl *b*, karotenu (Car), luteinu (Lut) (**Tab. 1, Obr. 3**). Byla provedena kvantifikace těchto

Tab. 1: Retenční časy standardů a koncentrace látek v extraktu ChlE.

Pigment	Chlorofyl <i>a</i>	Chlorofyl <i>b</i>	β -Karoten	Lutein
t_R (min)	17,6	9,8	56,7	4,3
<i>c</i> (mg/l)	160	54	50	55



Obr. 3: Struktury chlorofylu *a* (A), β -karotenu (B) chlorofylu *b* (C) a luteinu (D). Fytylový řetězec je vyznačen modře, skupina odlišující Chl *a* od Chl *b* zeleně.



Obr. 4: Normalizovaná absorpční spektra standardů Chl *a* (a) a Car (d), špenátového extraktu ChlE (b), šťovíkového extraktu ChlR (c) v THF.

klíčových složek extraktu ChlE. Pomocí směsných vzorků standardů o koncentracích 1; 2,5; 5 a 10 mg/l byly sestrojeny kalibrační přímky pro příslušné analyty. Poté byl změřen i $10 \times$ zředěný extrakt ChlE a koncentrace příslušných analytů byly odečteny z kalibračních přímek a shrnuty do **Tab. 1**. Chlorofyl *a* je dominantním barvivem v ChlE.

Dále byly chlorofylové extrakty (ChlE a ChlR) analyzovány pomocí UV/VIS spektroskopie srovnáním absorpčních pásů extraktu se standardy látek nejběžněji se v listech vyskytujících, jmenovitě Chl *a*, Chl *b*, Car (**Obr. 4**). Koncentrace Chl *a* odhadnutá z absorbance při 664 nm byla podobná koncentraci určené pomocí HPLC.

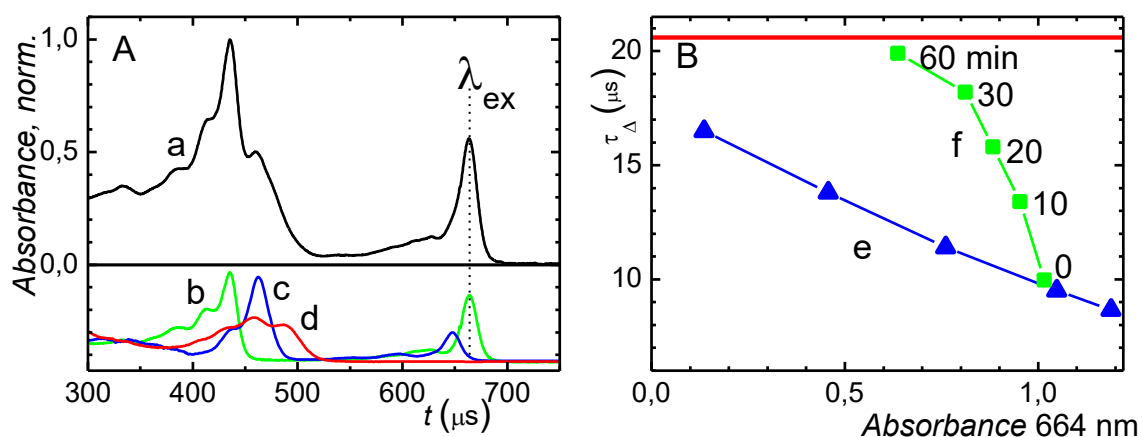
Je známo, že množství chlorofylu a karotenoidů závisí obecně na složení půdy, druhu rostliny, světelných podmínkách, teplotě, stresu a dalších biologických faktorech¹². Z toho vyplývá, že opakovatelnost experimentů je v tomto ohledu snižena.

Z charakteru spekter na **Obr. 4** vyplývá, že hlavní absorbující složkou THF extraktů je Chl *a*, který je známým fotosensitizerem s vysokým kvantovým výtěžkem (cit.^{47,48}).

4.2 Charakterizace Chl extraktu pomocí časově rozlišené spektroskopie

Jak již bylo uvedeno, v roztocích fotosensitizerů za přítomnosti kyslíku a světla probíhá fotosensitizovaná reakce. V rámci fotosensitizované reakce vystupuje několik zářivých přechodů zejména absorpce tripletových stavů fotosensitizeru a fosforescence $O_2(^1\Delta_g)$ při 1270 nm, kterou lze měřit pomocí časově rozlišené spektroskopie a je přímým důkazem vzniku singletového kyslíku^{1,3} (**Obr. 1**, str. 7).

Z HPLC analýzy vyplývá, že v THF extraktu se kromě fotosensitizeru Chl *a* nacházejí i karotenoidy (zhášeče), které chrání Chl před degradací pomocí přenosů



Obr. 5: Panel **A**: Normalizovaná UV/VIS absorpční spektra THF extraktu ChIE (a), v porovnání se standardy Chl *a* (b), Chl *b* (c), Car (d). ChIE byl excitován vlnovou délkou Q-pásu Chl *a*. Panel **B**: Závislost doby života $O_2(^1\Delta_g)$ na absorbanci Q-pásu ChIE. Doby života $O_2(^1\Delta_g)$ v různě naředěném ChIE (e). Doby života $O_2(^1\Delta_g)$ při ozařování ChIE xenonovou lampou (>400 nm) (f). Červená přímka označuje dobu života $O_2(^1\Delta_g)$ ze standardu Chl *a* v THF.

energie²⁴. To může snižovat dobu života tripletových stavů chlorofylu i $O_2(^1\Delta_g)$. Bylo klíčové zjistit, zda bude $O_2(^1\Delta_g)$ fotogenerován i v tomto extraktu.

Jak ukazuje **Obr. 5A**, v extraktu ChIE byl $O_2(^1\Delta_g)$ pomocí časově rozlišené spektroskopie přímo detekován. Dále byly určeny doby života (τ_{Δ}) $O_2(^1\Delta_g)$ pro různé koncentrace extraktu. Při vyšších koncentracích byla doba života $O_2(^1\Delta_g)$ nižší kvůli samozhášení a efektu stínění fotosensitizeru. V koncentrovanějším extraktu mohou mít ale také karotenoidy silnější zhášecí efekt. Pro dosažení vyšší doby života $O_2(^1\Delta_g)$ je proto výhodnější používat zředěný extrakt s Chl *a*.

Zajímavé výsledky byly získány z měření dob života $O_2(^1\Delta_g)$ s různými koncentracemi karotenoidů v extraktu. Množství karotenoidů lze zmenšit ozářením extraktu, protože karotenoidy podléhají rychlé degradaci světlem (viz **kap. 4.3**). Čím delší je doba ozáření vzorku viditelným světlem, tím menší je koncentrace karotenoidů. Extrakt ChIE byl proto ozařován xenonovou lampou a v průběhu ozařování byly určovány doby života $O_2(^1\Delta_g)$. Bylo zjištěno, že s rostoucí dobou ozáření ChIE, klesalo množství Chl *a* (A_{664}) a zvyšovala se doba života $O_2(^1\Delta_g)$ (**Obr. 5B**). To potvrzuje fotodegradaci zhášečů v ChIE.

Druhým způsobem zvýšení doby života je ředění ChIE. Při nižších koncentracích (A_{664}) ChIE byla doba života vyšší díky menšímu vlivu stínění molekul Chl *a* a samozhášení (**Obr. 5B**).

Karotenoidy v extraktu kromě doby života $O_2(^1\Delta_g)$ ovlivňují i dobu života excitovaných (tripletových) stavů chlorofylu. Lze porovnat doby života tripletových

Tab. 2: Fotofyzikální parametry: doba života singletového kyslíku v THF (τ_A), doba života tripletových stavů chlorofylu ve vzorku nasyceném argonem (τ_T), kvantový výtěžek singletového kyslíku (Φ_A).

	τ_A (μs)	τ_T (μs)	Φ_A
ChlE	10,2	110	0,64
ChlE* ^{a)}	19,9	141	-
Chl <i>a</i>	20,7	294	0,66
Chl <i>b</i>	20,7	229	-

^{a)} ChlE ozářený xenonovou lampou 10 min

stavů (τ_T) Chl ve vzorku s větším a menším obsahem karotenoidů (**Tab. 2**). Jako vzorek s vyšším obsahem karotenoidů byl použit neozářený ChlE, menšího obsahu karotenoidů bylo dosaženo ozářením vzorku (ChlE*). Ve vzorku ChlE s vysokým obsahem karotenoidů byly pozorovány krátké τ_T Chl ve srovnání s ozářeným vzorkem ChlE*, který měl díky fotodegradaci nižší obsah karotenoidů. Vyšší τ_T Chl byly pozorovány v roztoku standardu Chl *a*, který žádné karotenoidy neobsahoval. Experiment potvrdil, že karotenoidy zhasí tripletové stavy i $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

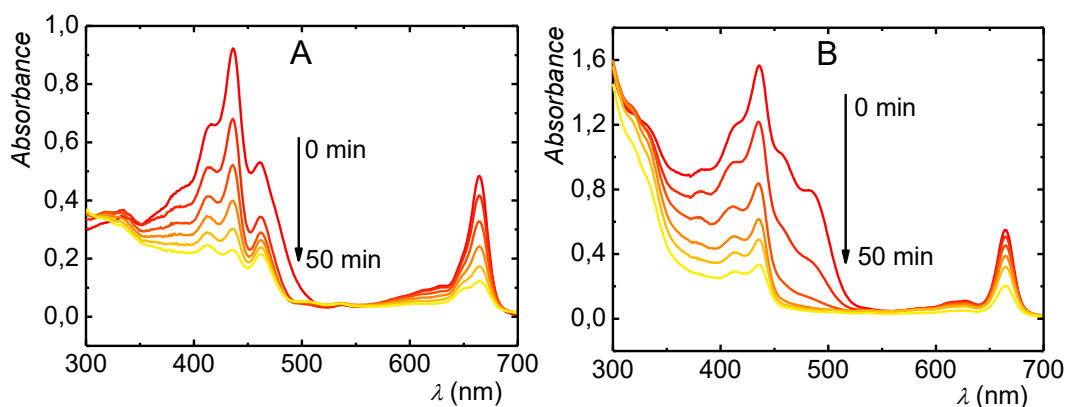
Ve vzorcích (ChlE, ChlE*) byla měřena doba života (τ_A) $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (**Tab. 2**). V původním vzorku ChlE s vysokým obsahem karotenoidů byla naměřena kratší τ_A $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ než v ozářeném extraktu ChlE*. Je zajímavé, že τ_A $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ je po ozáření velmi blízká τ_A $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ ve vzorku standardu Chl *a*. I přes obsah karotenoidů v extraktu ChlE je tedy dosaženo stejné τ_A $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, a tím i účinku oxidace singletovým kyslíkem, jako v roztoku standardu Chl *a*. Díky tomu by mohly být přírodní extrakty chlorofylu velmi dobře využitelné pro fotogeneraci $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Byly měřeny i kvantové výtěžky (Φ_A) singletového kyslíku pro THF roztok standardu Chl *a* a extraktu ChlE. Jejich hodnoty jsou pro chlorofyl překvapivě vysoké a vzájemně podobné navzdory obsahu karotenoidů v ChlE (**Tab. 2**).

4.3 Fotostabilita chlorofylových extraktů

Chemická stabilita vůči ozařování (fotostabilita) je důležitou vlastností fotosensitizeru. Ke zjištění této fotostability a tedy i praktické použitelnosti byl proveden následující test.

Extrakt ChlE ($\sim 4,7$ mg/l Chl *a*) byl ozařován 500W Xe lampou s pásmovým filtrem omezujícím UV záření (> 400 nm). Degradace látek v ChlE byla sledována spektrometricky v průběhu ozařování (**Obr. 6A**).



Obr. 6: Fotostabilita špenátového extraktu ChlE $\sim 4,7$ mg/l Chl *a* (panel A) a standardů chlorofylu *a* o koncentraci 5,3 mg/l a β -karotenu o koncentraci 51 mg/l (Chl *a* + Car, panel B). V obou případech dochází k degradaci chlorofylu (664 nm) i karotenu (490 nm).

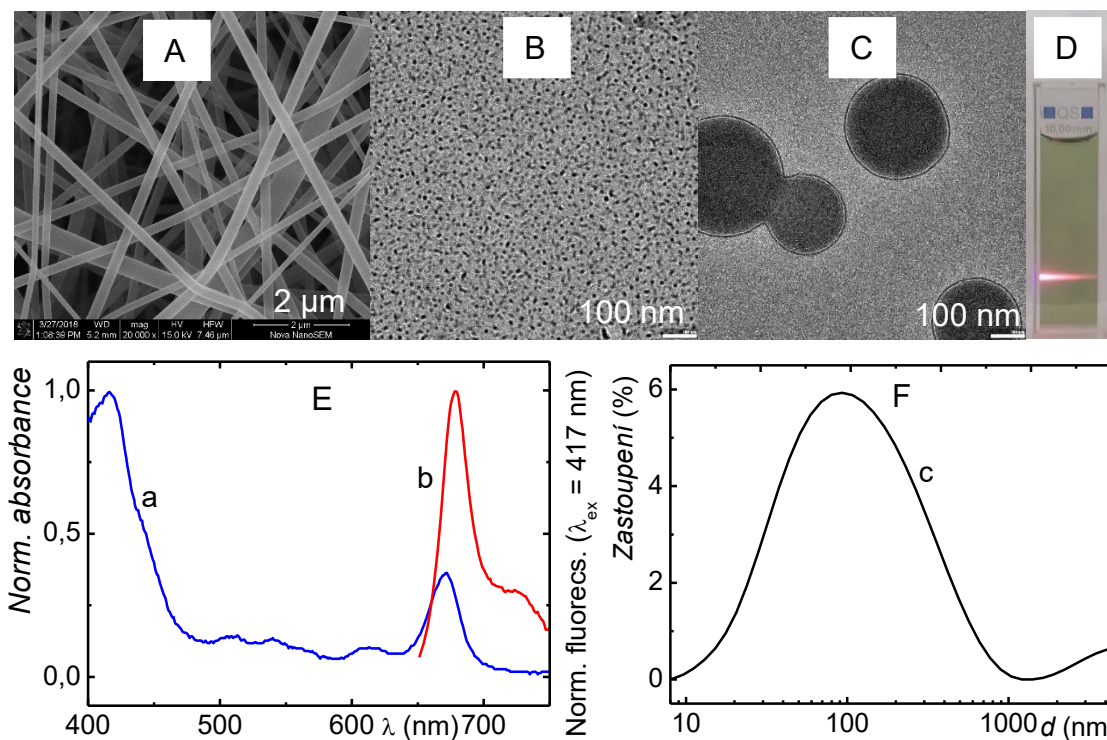
Pokles pásu na 664 nm a 436 nm značí fotodegradaci Chl *a*. Je známo, že Chl je degradován světlem za vzniku glycerolu, alaninu, kyseliny mléčné, citronové, jantarové a malonové⁴⁹. Antioxidanty včetně β -karotenu podléhají rychlejší fotodegradaci na rozmezí vlnových délek 460 – 490 nm. To je ve shodě s literaturou⁵⁰. Jak vyplývá z **Obr. 6**, kinetika degradace je podobná jako u směsi standardu Chl *a* v přítomnosti Car a umožňuje využití Chl *a* (**kap. 4.6**) pro fotooxidační studie v řádu desítek minut.

4.4 Příprava a charakterizace fotoaktivních nanočástic

4.4.1 Příprava NPs

V předchozím oddílu bylo dokázáno, že v samotném THF extraktu chlorofylu probíhá účinná fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$. Byl učiněn pokus zapouzdřit (enkapsulovat) ChlE do sulfonovaných a nesulfonovaných nanočástic (NPs, „nanoparticles“).

Nanočástice byly připraveny z extraktu (ChlE, ChlR) nebo standardu (Chl *a*, Chl *a* + Car) chlorofylu v THF. Koncentrace Chl *a* v extraktu byla vypočítána pomocí extinkčního koeficientu Chl *a* v THF při 664 nm (0,10396 l/mg/cm). Do 50ml kádinky bylo odváženo 16 mg sulfonované nebo nesulfonované polystyrenové (PS) nanovlákněné membrány (**Obr. 7A**). Pro přípravu NPs byl použit takový objem extraktu o vypočtené koncentraci, aby kádinka obsahovala 0,2 mg Chl *a* (spektra extraktů viz **Obr. 4**, str. 23). Roztok byl poté naředěn THF na celkový objem 4 ml. Za 1 min intenzivního míchání bylo rychle přidáno 20 ml destilované vody. Nanoprecipitací vzniklé NPs byly odpařeny v rotační vakuové odparce (≤ 60 °C) na objem disperze 15 ml. Poté byly centrifugací



Obr. 7: Panel A: SEM snímek výchozí polystyrenové nanovlákněné membrány pro přípravu NPs. Panel B: TEM snímek ChlE@PS-sulfo. Panel C: TEM snímek ChlE@PS. Panel D: Fluorescenční stopa ChlE@PS-sulfo při excitaci 402 nm laserem. Panel E: Absorpční (a) a emisní (b) spektrum ChlE@PS-sulfo. Panel F: Distribuce velikostí (c) v disperzi ChlE@PS-sulfo podle DLS.

(3040 g, 10 min) odstraněny větší částice a následně byla disperze NPs dialyzována k odstranění stop THF.

Tímto postupem byl chlorofylový extrakt navázán do polystyrenového nosiče za vzniku sulfonovaných nebo nesulfonovaných NPs. Vzorky NPs byly označeny následovně:

NPs vytvořené ze sulfonovaného polystyrenu: @PS-sulfo

Sulfonované NPs s navázaným špenátovým extraktem: ChlE@PS-sulfo

Sulfonované NPs s navázaným standardem chlorofylu *a*: Chl*a*@PS-sulfo

Sulfonované NPs s navázanými standardy chlorofylu *a* a β -karotenu: Chl*a*Car@PS-sulfo

NPs vytvořené z nesulfonovaného polystyrenu: @PS

Nesulfonované NPs s navázaným extraktem šťovíku tupolistého: ChlR@PS

4.4.2 Charakterizace připravených NPs

Základní vlastnosti připravených NPs shrnuje **Tab. 3**. Sulfonované NPs mají lepší spektrální vlastnosti díky menší velikosti, a tedy nižšímu rozptylu světla. Červená stopa fluorescence a rozptyl světla v disperzi ChlE@PS-sulfo je vidět na **Obr. 7D** při excitaci

Tab. 3: Porovnání vlastností sulfonovaných a nesulfonovaných NPs.

Vlastnost	@PS	ChIE@PS	ChIR@PS	@PS-sulfo	ChIE@PS-sulfo	ChIa@PS-sulfo	ChIaCar@PS-sulfo
Průměr (nm)	278	227	231	64	61	60	60
Zeta-potenciál (mV)	-34,38	-31,19	-38,55	-33,08	-26,14	-31,26	-34,53
Počet NPs v 1 ml disperze	$2,60 \cdot 10^{10}$	$4,48 \cdot 10^{10}$	$4,16 \cdot 10^9$	$1,41 \cdot 10^{13}$	$2,02 \cdot 10^{13}$	$1,98 \cdot 10^{14}$	-
Povrch (nm ²)	243 000	162 000	168 000	13 000	12 000	11 000	11 000
Povrch/objem	0,02	0,03	0,03	0,09	0,10	0,10	0,10
Vzhled	Mléčná	Mléčně zelená	Světle hnědá	Průhledná	Průhledná zelená	Průhledná zelená	Mléčně oranžová

402 nm laserem. Příklad absorpce a emise ChIE@PS-sulfo je ukázán na **Obr. 7E**. Nesulfonované NPs mají větší velikost, a tedy velký rozptyl světla zejména u kratších vlnových délek, což se projeví zvýšenou hodnotou pozadí absorpce.

Vzniklé NPs mají různou velikost a koncentraci. Tyto parametry byly určeny metodou DLS (viz. **kap. 3.2.5**). Sulfonované NPs měly velikost ve vyšších desítkách nm a koncentraci v řádu 10^{13} NPs/ml (ChIE@PS-sulfo $d = 61$ nm, $c = 2,02 \cdot 10^{13}$ NPs/ml). Nesulfonované NPs měly velikost v nižších stovkách nm a koncentraci v řádu 10^{10} NPs/ml (ChIE@PS $d = 402$ nm, $c = 4,48 \cdot 10^{10}$ NPs/ml). Při nanoprecipitaci vznikají nejčastěji dvě nebo tři populace NPs.

Podle transmisní elektronové mikroskopie (TEM) mají NPs homogenní velikost, sférický charakter³⁸ a mohou se řetězit (**Obr. 7C**). Velikost nesulfonovaných NPs podle TEM je blízká velikosti naměřené podle DLS. Naopak velikost sulfonovaných NPs je podle TEM menší než podle DLS.

Tab. 4: Časová stabilita velikosti (d) a zeta-potenciálu ChIE@PS-sulfo.

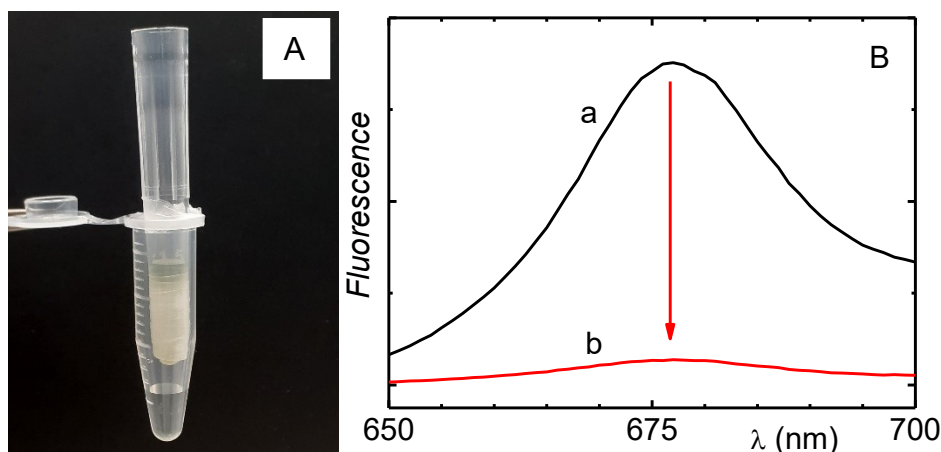
Čas (dny)	d (nm)	$zeta$ (mV)
0	60,99	-26,14
9	62,42	-21,58
13	59,37	-27,19
63	60,53	-28,79

Metodou DLS byla určena časová stabilita velikosti a zeta-potenciálu (povrchového náboje) NPs. Sulfonované NPs poskytují v průběhu času podobné hodnoty velikosti i zeta-potenciálu (**Tab. 4**). Naopak nesulfonované NPs podléhají rychlejší agregaci, která se projeví tvorbou sedimentujících sraženin, které lze pozorovat pouhým okem.

4.4.3 Filtrace nanočástic a odhad jejich složení

Pro praktické využití bylo vhodné vyvinout metodu odstranění NPs z roztoku. K tomu byla využita nanovlákněná membrána z polymeru Tecophillic. Přesný postup filtrace je popsán v **kap. 3.2.10**. Fluorimetricky bylo určeno množství NPs v původním vzorku a ve filtrátu (**Obr. 8**). Účinnost jedné filtrace se pohybovala v rozmezí 80 – 90 %. Opakovanou filtrací lze odstranit prakticky všechny fluoreskující NPs.

Byl učiněn pokus pomocí filtrace odhadnout chemické složení vzniklých ChIE@PS-sulfo. Za tímto účelem byl analyzován filtrát ze ChIE@PS-sulfo po trojnásobné filtraci přes nanovlákněnou membránu. Vysušený filtrát byl rozpuštěn v THF a podroben HPLC analýze. HPLC analýza ukázala zanedbatelné množství Chl *a* ve filtrátu, což potvrzuje domněnku, že složení extraktu ChIE (**Tab. 1**, str. 22) odpovídá i složení ChIE@PS-sulfo.

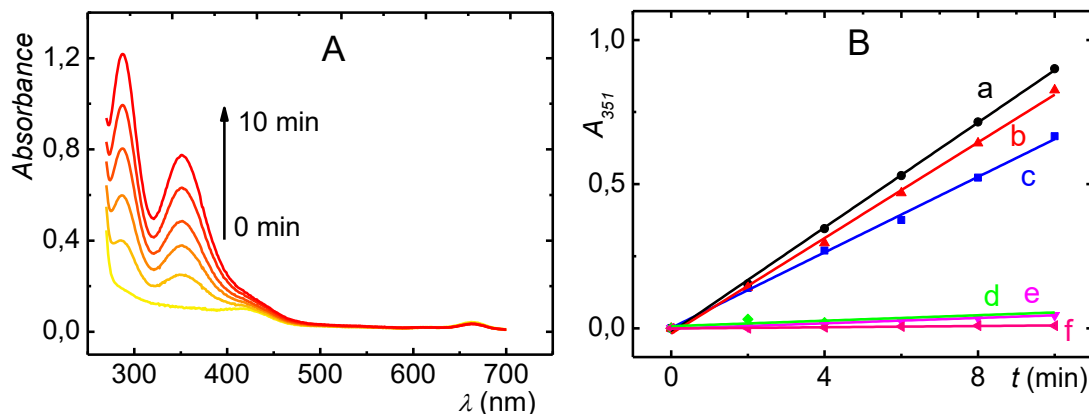


Obr. 8: Panel A: Filtrační aparatura. Panel B: Fluorescenční porovnání původní disperze ChIE@PS-sulfo (a) s filtrátem (b). $\lambda_{exc} = 420$ nm.

4.5 Kinetika fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ v NPs

4.5.1 Sulfonované NPs

Sulfonované NPs mají oproti nesulfonovaným NPs menší velikost, a tedy větší měrný povrch, resp. poměr povrch/objem (**Tab. 3**). Pokud je v nich vázán fotosensitizer, dochází za přítomnosti viditelného světla k fotogeneraci $O_2(^1\Delta_g)$. Bylo očekáváno, že pokud do



Obr. 9: Jodidový test nanočástic ChIE@PS-sulfo ($1,3 \cdot 10^{12}$ NPs/ml). Panel **A**: Růst absorbance při 287 nm a 351 nm odpovídá množství fotogenerovaného $O_2(^1\Delta_g)$. Panel **B**: Jodidový test ChIE@PS-sulfo, za různých podmínek, které dokazují fotogeneraci $O_2(^1\Delta_g)$. Zvýšená koncentrace O_2 (a) a D_2O (50 %) (b), fotooxidace na vzduchu v H_2O (c), přítomnost zhášече N_3^- iontu (0,9 M) (d), nebo bublení disperze dusíkem (e). Ozařované činidlo bez NPs (f). Ozařovací zdroj: 500W Xe lampa.

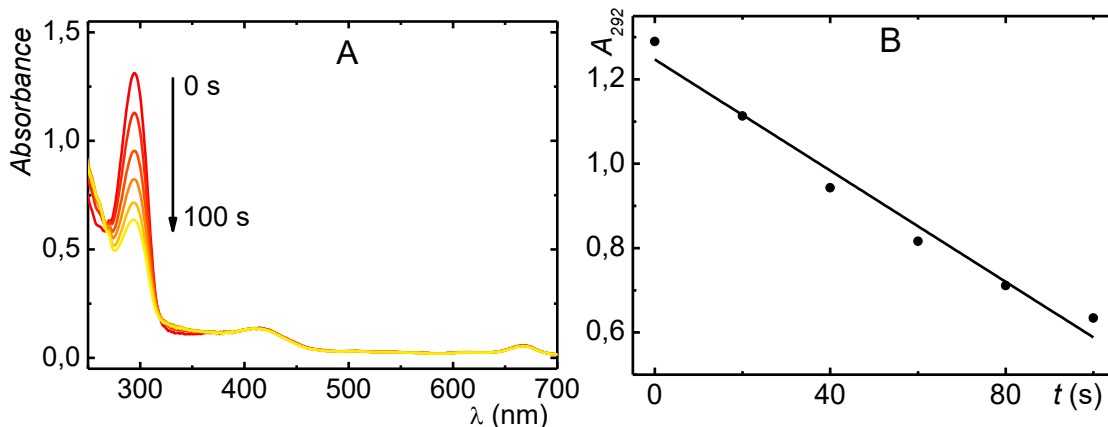
NPs bude navázán fotoaktivní chlorofylový extrakt, bude docházet k fotogeneraci $O_2(^1\Delta_g)$ podobným způsobem. K důkazu fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ ve vodných disperzích NPs byla použita jodidová metoda a metoda odbarvování kyseliny močové (viz. **kap. 3.2.8**).

U jodidové metody je sledována absorbance při 351 nm (absorpční pás I_3^-), která je úměrná množství $O_2(^1\Delta_g)$ (cit.³⁴). Jodidová metoda není specifická jen pro $O_2(^1\Delta_g)$. Oxidaci I^- mohou způsobit i jiné fotogenerované ROS. Proto byly provedeny fotooxidační testy v jodidovém činidle s ChIE@PS-sulfo ($1,3 \cdot 10^{12}$ NPs/ml) bez a s přítomností diagnostických činidel (O_2 , N_2 , D_2O , NaN_3).

U vzorku saturovaného (bublaného) O_2 nebo s obsahem D_2O (50 %) byla zjištěna rychlejší kinetika fotooxidace I^- v důsledku vyšší koncentrace, resp. vyšší doby života $O_2(^1\Delta_g)$. Naopak u vzorku saturovaného N_2 nebo s obsahem 0,9M N_3^- , specifického zhášече $O_2(^1\Delta_g)$, fotooxidace prakticky neprobíhá (**Obr. 9**). Samotné jodidové činidlo bez ChIE@PS-sulfo se působením světla neoxiduje.

Obdobná odezva jodidového činidla byla pozorována i u nanočástic ChIa@PS-sulfo. Nanočástice bez fotosensitizeru @PS-sulfo při ozáření nevykazovaly žádnou fotooxidaci podobně jako vzorky ChIE@PS-sulfo a ChIa@PS-sulfo uchovávané ve tmě.

Fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ byla sledována i jako pokles hodnoty absorbance $10^{-4}M$ kyseliny močové (292 nm) ve vodné disperzi NPs (**Obr. 10**). Odbarvování kyseliny močové je specifičtější pro $O_2(^1\Delta_g)$ než jodidový test, ale méně citlivé (viz **kap. 1.6**).

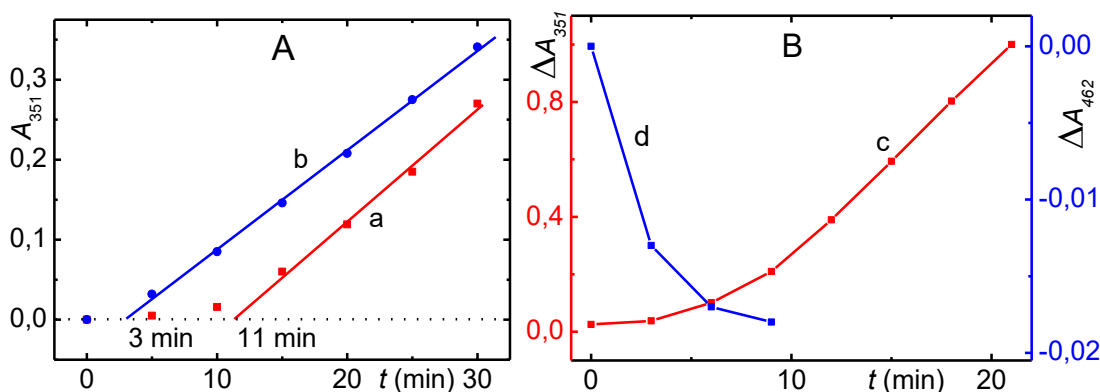


Obr. 10: Detekce fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ metodou degradace kyseliny močové. Panel **A**: Spektra směsi kyseliny močové (10^{-4} M) s disperzí ChlE@PS-sulfo v čase ozařování. Panel **B**: Kinetika fotodegradace kyseliny močové. Ozařovací zdroj: 36W LED s emisí v červené oblasti.

Těmito dvěma metodami byla dokázána fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ ve vodných disperzích NPs s chlorofylovým extraktem (ChlE@PS-sulfo).

4.5.2 Nesulfonované NPs

Nesulfonované NPs se liší od sulfonovaných větší velikostí a menší polaritou (absencí $-SO_3^-$ skupin na povrchu). Kvůli větší velikosti mají menší měrný povrch, resp. menší poměr povrch/objem, a tedy nižší schopnost fotooxidace (**Obr. 12**). U některých nesulfonovaných NPs bylo pozorováno, že fotooxidace neprobíhá bezprostředně od začátku ozařování, ale až několik minut po začátku (**Obr. 11**). Toto zpoždění fotooxidace bylo pozorováno jen u ChlR@PS, které vznikly navázáním extraktu šřovíku tupolistého



Obr. 11: Panel **A**: Demonstrace zpoždění fotooxidace při jodidovém testu u ChlR@PS (a). Jodidový test ChlR@PS po jejich předchozím ozáření (45 min, 500 W plné spektrum) (b). Panel **B**: Kinetika růstu koncentrace I_3^- (c) se současným poklesem množství antioxidantů (d).

(ChlR) do NPs. Zpoždění nebylo pozorováno u ChlE@PS, ChlE@PS-sulfo, ani u NPs se standardy Chl *a* + Car navázaných v jedné nanočástici.

Zpoždění fotooxidace lze vysvětlit přítomností neznámého zhášedce $O_2(^1\Delta_g)$, který je přítomen v nesulfonované nanočástici a nedovolí $O_2(^1\Delta_g)$ difundovat do vodného roztoku. Zhášedč je singletovým kyslíkem degradován (pokles A_{462}). Lze se domnívat, že v čase, kdy se celkové množství vzniklého $O_2(^1\Delta_g)$ vyrovná zhruba celkovému množství zhášedce, je degradována většina zhášedce a $O_2(^1\Delta_g)$ se začne uvolňovat z NPs do roztoku činidla, kde způsobí fotooxidaci I^- (nárůst absorbance I_3^-).

Předchozím ozářením NPs lze tuto dobu prodlevy zkrátit, např. ChlR@PS byla fotooxidace zpožděná o 11 min, ale po ozáření NPs (45 min, 500 W plným spektrem) se zpoždění zmenšilo na 3 min (**Obr. 11A**). To je v souladu s dříve diskutovanou fotodegradací zhášedců (viz **kap. 4.2**). Podrobnější sledování tohoto fenoménu bude předmětem další studie.

4.5.3 Porovnání fotooxidačních schopností NPs

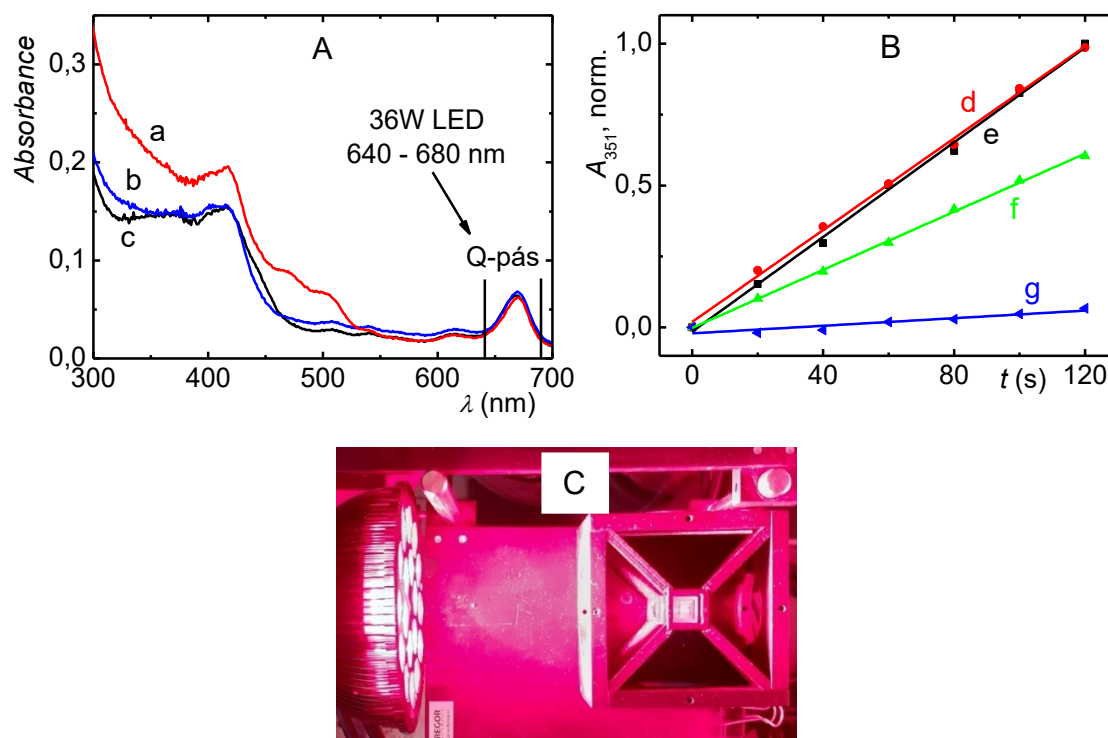
Důležitou otázkou bylo, do jaké míry karotenoidy v NPs zháší $O_2(^1\Delta_g)$ a omezují fotooxidační schopnost.

Porovnány byly relativní fotooxidační schopnosti sulfonovaných NPs obsahujících i) standard Chl *a*, ii) směs standardů Chl *a* + Car a iii) špenátový extrakt (Chl*a*@PS-sulfo, Chl*a*Car@PS-sulfo, ChlE@PS-sulfo).

Disperze NPs v jodidovém činidle byly naředěny tak, aby měly shodnou absorbanci Q-pásu při 670 nm. Disperze byly následně ozařovány červeným 36W LED zdrojem, s emisí v oblasti Q-pásu chlorofylu (**Obr. 12A**). Hodnoty A_{351} v průběhu času ozařování byly poděleny plochou Q-pásu nad vodorovnou linií spektra, a normalizovány.

Všechny sledované NPs mají dle DLS zhruba stejnou velikost (viz **Tab. 3**, str. 28).

U nanočástic Chl*a*Car@PS-sulfo s vysokým obsahem karotenoidů byla pozorována pomalá kinetika fotooxidace, na rozdíl od ChlE@PS-sulfo s nižším obsahem karotenoidů a rychlejší kinetikou fotooxidace (**Obr. 12**). Žádné karotenoidy nebyly obsažené v Chl*a*@PS-sulfo, ale jejich kinetika fotooxidace byla stejně rychlá jako u ChlE@PS-sulfo (**Obr. 12B**, d, e). Tento fakt lze vysvětlit tím, že v ChlE@PS-sulfo je natolik nízký vliv zhášedců (**Obr. 12A**) (molekuly Chl *a* zhášedců jsou daleko od sebe), že nedochází k



Obr. 12: Panel **A**: Absorpční spektra ChlaCar@PS-sulfo (a), Chla@PS-sulfo (b) a ChlE@PS-sulfo (c). Panel **B**: Jodidový test porovnávající kinetiku fotooxidace Chla@PS-sulfo (d), ChlE@PS-sulfo (e), ChlaCar@PS-sulfo (f) a ChlE@PS (g). Panel **C**: Ozařovací aparatura.

významnějšímu zhášení $O_2(^1\Delta_g)$. A především toho $O_2(^1\Delta_g)$, který je fotogenerován z bezprostředního okolí povrchu NPs a je tedy vzhledem ke své krátké difúzní dráze (cca 200 nm, cit.²⁰) nejvíce zodpovědný za fotooxidační působení.

To potvrzuje výhodu navázání fotosensitizeru do pevného nosiče. Nanočástice vzniklé z přírodního extraktu s kontaminací karotenoidních zlášťečů jsou ve fotooxidaci prostřednictvím $O_2(^1\Delta_g)$ stejně účinné jako NPs vzniklé z analytického standardu Chl *a*.

4.6 Antibakteriální vlastnosti nanočástic

U fotoaktivních NPs, které fotogenerují $O_2(^1\Delta_g)$, lze předpokládat antibakteriální vlastnosti. Ty byly zkoumány u *Escherichia Coli* metodou sledování poklesu počtu bakterií (CFU, „colony forming units“) v přítomnosti NPs a viditelného světla.

Pro antibakteriální test (viz. **kap. 3.2.9**) byly porovnávány tři vzorky: samotná kultura bakterií (označena *E.coli*, o koncentraci 6700 CFU/ml), kultura bakterií vystavená vodné disperzi NPs bez fotoaktivní látky o koncentraci $7,1 \cdot 10^{12}$ NPs/ml (*E.coli* + @PS-sulfo) a kultura bakterií vystavená vodné disperzi NPs s ChlE o koncentraci $1,0 \cdot 10^{13}$ NPs/ml (*E.coli* + ChlE@PS-sulfo). Vzorky byly ozařovány 36W LED zdrojem s emisí v červené

Tab. 5: Vývoj počtu CFU v čase (stání ve tmě nebo ozařování). Průměr ze tří nezávislých experimentů.

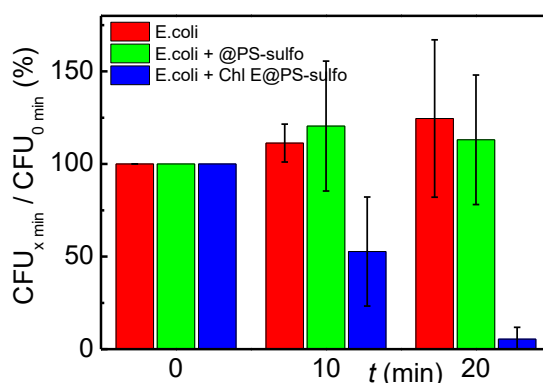
Čas (min)	E.coli -hv	E.coli + ChIE@PS-sulfo -hv	E.coli +hv	E.coli + @PS-sulfo +hv	E.coli + ChIE@PS-sulfo +hv
0	2422	2472	1684	2195	2171
10	1984	2009	1940	2497	1388
20	2318	2347	2182	2141	203

oblasti VIS spektra nebo ponechány ve tmě. Po inokulaci agarové plotny odpovídajícím alikvotem daného vzorku a následné inkubaci byl spočítán počet CFU na agaru.

Bylo zjištěno, že po 20 min ozařování vzorku *E.coli* + *ChIE@PS-sulfo* červeným zdrojem záření bylo inaktivováno 95 % bakterií *Escherichia coli* (**Obr. 13, Tab. 5**). U ostatních vzorků počet CFU naopak mírně vzrostl, patrně vlivem mírného zahřátí (cca o 2 °C) během ozařování. Vzorky ponechané ve tmě nejevily pokles počtu CFU.

Difúzní dosah $O_2(^1\Delta_g)$ lze uvažovat ~ 200 nm (cit.²⁰), průměr NPs 60 nm a jejich koncentraci $1,0 \cdot 10^{13}$ NPs/ml. Pomocí výpočtu objemu NPs (koule) o poloměru 60 nm lze vypočítat, že NPs zaujímají cca 0,1 % objemu disperze a dosah $O_2(^1\Delta_g)$ (koule o poloměru 230 nm) pokrývá cca 51 % objemu disperze.

Tento test ukázal, že *ChIE@PS-sulfo* produkující $O_2(^1\Delta_g)$ (viz **kap. 4.5.1**) mají silné antibakteriální účinky aktivované červenou oblastí VIS světla. Úspěšný test byl navíc proveden u Gram-negativních *Escherichia Coli*, které jsou obecně odolnější vůči $O_2(^1\Delta_g)$ než Gram-pozitivní kmeny bakterií²⁰.



Obr. 13: Antibakteriální testy nanočástic *ChIE@PS-sulfo*. Byl porovnán ozářený vzorek bakteriální suspenze bez NPs (*E.coli*), s NPs bez fotosensitizeru (*E.coli* + @PS-sulfo) a s NPs s chlorofylem (*E.coli* + *ChIE@PS-sulfo*). Po 20 min ozařování červeným světlem (36 W LED zdroj) došlo k inaktivaci cca 95 % bakterií v přítomnosti *ChIE@PS-sulfo*. Výsledek je průměrem 3 nezávislých experimentů.

5 Závěr

Fotosensitizer chlorofyl (Chl) byl získán jednoduchou extrakcí z přírodního zdroje, špenátu setého. Při ozařování extraktu viditelným světlem docházelo k fotogeneraci singletového kyslíku, jehož přítomnost byla detekována pomocí časově rozlišené spektroskopie.

Z extraktu byly připraveny fotoaktivní polystyrenové nanočástice (NPs). Nanočástice fotogenerovaly do svého okolí singletový kyslík, který byl detekován pomocí chemických spektrofotometrických metod.

Chlorofyl je v extraktu i v NPs doprovázen karotenoidy, které zhášejí singletový kyslík a snižují fotoaktivitu NPs. Vliv karotenoidů může být redukován pomocí zředění extraktu, před-ozařením vzorku nebo použitím polárnější polymerní matrice (sulfonovaných polystyrenových NPs). Tím lze zvýšit fotoaktivitu NPs.

Byl proveden test fotodynamické inaktivace NPs vůči Gram-negativním *Escherichia coli*. Během 20 min ozařování bakteriální kultury s fotoaktivními NPs červeným světlem bylo inaktivováno přes 95 % bakterií oproti kontrolám.

Vzhledem k tomu, a vzhledem k faktu, že NPs je možné odstranit filtrací (např. přes nanovláknennou membránu), je možné konstatovat, že tyto z levných zdrojů připravené NPs je možné prakticky použít pro různé antimikrobiální aplikace, např. v oblasti čištění mikrobiálně znečištěných vod.

Poděkování

Děkuji prof. RNDr. Jiřímu Mosingerovi, Ph.D. za vedení práce a cenné konzultace, prof. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za provedení HPLC analýzy THF extraktu, RNDr. Pavlu Kubátovi, CSc. za měření časově rozlišené fosforescence $O_2(^1\Delta_g)$, prof. RNDr. Miroslavu Štěpánkovi, Ph.D. za měření TEM a RNDr. Petru Henkemu, Ph.D., Bc. Vojtěchu Liškovi a Mgr. Petře Křtěnové za praktické rady a přátelskou atmosféru v laboratoři.

Literatura

1. Ogilby, P. R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 3181–3209 (2010).
2. 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).
3. Lang, K., Mosinger, J. & Wagnerová, D. M. Progress in photochemistry of singlet oxygen. *Chem. List.* **99**, 211–221 (2005).
4. Greer, A. Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [$^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)] in photosensitized oxidation reactions. *Acc. Chem. Res.* **39**, 797–804 (2006).
5. Stief, T. W. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med. Hypotheses* **60**, 567–572 (2003).
6. Itoh, T. Fluorescence and phosphorescence from higher excited states of organic molecules. *Chem. Rev.* **112**, 4541–4568 (2012).
7. Baptista, M. S. *et al.* Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. *Photochem. Photobiol.* **93**, 912–919 (2017).
8. Schmidt, R. Photosensitized generation of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **82**, 1161–1177 (2007).
9. Bolze, F., Jenni, S., Sour, A. & Heitz, V. Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **53**, 12857–12877 (2017).
10. Hamblin, M. R. & Chiang, L. Y. Nanotechnology for photodynamic therapy: a perspective from the laboratory of Dr. Michael R. Hamblin in the Wellman center for photomedicine at Massachusetts general hospital and Harvard Medical School. *Nanotechnol. Rev.* **4**, 359–372 (2015).
11. Kubát, P., Henke, P. & Mosinger, J. The effect of iodide and temperature on enhancing antibacterial properties of nanoparticles with an encapsulated photosensitizer. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **176**, 334–340 (2019).
12. Zielewicz, W., Wróbel, B. & Niedbała, G. Quantification of chlorophyll and carotene pigments content in mountain melick (*Melica nutans* L.) in relation to edaphic variables. *Forests* **11**, 1197–1213 (2020).
13. Rajalakshmi, K. & Banu, N. Extraction and estimation of chlorophyll from medicinal plants. *Int. J. Sci. Res.* **4**, 209–212 (2015).
14. Ritchie, R. J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* **89**, 27–41 (2006).
15. Kosumi, D., Nishiguchi, T., Amao, Y., Cogdell, R. J. & Hashimoto, H. Singlet and triplet excited states dynamics of photosynthetic pigment chlorophyll a investigated by sub-nanosecond pump-probe spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **358**, 374–378 (2018).
16. Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M. C. & Sinnecker, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res. Int.* **38**, 885–891 (2005).
17. Küpper, H., Džedić, R., Svoboda, A., Hála, J. & Kroneck, P. M. H. Kinetics and efficiency of excitation energy transfer from chlorophylls, their heavy metal-substituted derivatives, and pheophytins to singlet oxygen. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1572**, 107–113 (2002).
18. Cogdell, R. J. *et al.* How carotenoids protect bacterial photosynthesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **355**, 1345–1349 (2000).
19. Schweitzer, C. & Schmidt, R. Physical mechanism of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem. Rev.* **103**, 1685–1758 (2003).
20. Malá, Z. *et al.* Photodynamic effect of TPP encapsulated in polystyrene nanoparticles toward multi-resistant pathogenic bacterial strains: AFM evaluation. *Sci. Rep.* **11**, 6786–6796 (2021).
21. Hartzler, D. A. *et al.* Triplet excited state energies and phosphorescence spectra of (bacterio)chlorophylls. *J. Phys. Chem. B* **118**, 7221–7232 (2014).
22. Bachilo, S. M. β -Carotene triplet state absorption in the near-IR range. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **91**, 111–115 (1995).
23. Lambert, C. & Redmond, R. W. Triplet energy level of β -carotene. *Chem. Phys. Lett.* **228**, 495–498 (1994).
24. Green, B. R. & Parson, W. W. *Light-harvesting antennas in photosynthesis*. in: *Advances in Photosynthesis and Respiration* vol. 13 (Springer Science, 2003).
25. Reimers, J. R. *et al.* Assignment of the Q-bands of the chlorophylls: coherence loss via Q_x - Q_y mixing. *Sci. Rep.* **3**, 2761–2768 (2013).
26. Meneghin, E. *et al.* Coherence in carotenoid-to-chlorophyll energy transfer. *Nat. Commun.* **9**, 3160–3168 (2018).
27. Ghosh, M., Nath, S., Hajra, A. & Sinha, S. Fluorescence self-quenching of tetraphenylporphyrin in liquid medium. *J. Lumin.* **141**, 87–92 (2013).
28. Moiseev, A. G., Margulies, E. A., Schneider, J. A., Bélanger-Gariépy, F. & Perepichka, D. F. Protecting

- the triplet excited state in sterically congested platinum porphyrin. *Dalt. Trans.* **43**, 2676–2683 (2014).
29. Mosinger, J., Janošková, M., Lang, K. & Kubát, P. Light-induced aggregation of cationic porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **181**, 283–289 (2006).
 30. Mosinger, J. *et al.* Photofunctional polyurethane nanofabrics doped by zinc tetraphenylporphyrin and zinc phthalocyanine photosensitizers. *J. Fluoresc.* **19**, 705–713 (2009).
 31. 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 (2018).
 32. Fischer, F. *et al.* A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers. *Clin. Chim. Acta* **274**, 89–104 (1998).
 33. Rizzi, V., Fini, P., Semeraro, P. & Cosma, P. Detailed investigation of ROS arisen from chlorophyll a/chitosan based-biofilm. *Colloids Surf., B* **142**, 239–247 (2016).
 34. Mosinger, J. & Mosinger, B. Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement. *Experientia* **51**, 106–109 (1995).
 35. Ghogare, A. A. & Greer, A. Using singlet oxygen to synthesize natural products and drugs. *Chem. Rev.* **116**, 9994–10034 (2016).
 36. Jesenská, S. *et al.* Antibacterial nanofiber materials activated by light. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **99 A**, 676–683 (2011).
 37. Dolanský, J. *et al.* Antibacterial nitric oxide- and singlet oxygen-releasing polystyrene nanoparticles responsive to light and temperature triggers. *Nanoscale* **10**, 2639–2648 (2018).
 38. Henke, P. *et al.* Antibacterial, antiviral, and oxygen-sensing nanoparticles prepared from electrospun materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 25127–25136 (2016).
 39. Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M. & Stewart, F. A. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* **11**, 1034–1044 (2006).
 40. Kubát, P., Henke, P., Raya, R. K., Štěpánek, M. & Mosinger, J. Polystyrene and poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles with porphyrins: structure, size, and photooxidation properties. *Langmuir* **36**, 302–310 (2020).
 41. Kubát, P. *et al.* Nanoparticles with embedded porphyrin photosensitizers for photooxidation reactions and continuous oxygen sensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 36229–36238 (2017).
 42. Mosinger, J., Lang, K. & Kubát, P. *Photoactivatable nanostructured surfaces for biomedical Applications.* in: *Light-Responsive Nanostructured Systems for Applications in Nanomedicine. Topics in Current Chemistry* vol. 370 (Springer, Cham, 2016).
 43. Humphrey, A. M. Chlorophyll as a color and functional ingredient. *J. Food Sci.* **69**, 422–425 (2006).
 44. Sikorska-Zimny, K. *et al.* Influence of agronomic practice on total phenols, carotenoids, chlorophylls content, and biological activities in dry herbs water macerates. *Molecules* **26**, 1047–1059 (2021).
 45. Cruz, R. & Casal, S. Direct analysis of vitamin A, vitamin E, carotenoids, chlorophylls and free sterols in animal and vegetable fats in a single normal-phase liquid chromatographic run. *J. Chromatogr. A* **1565**, 81–88 (2018).
 46. Carvalho, E., Fraser, P. D. & Martens, S. Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chem.* **139**, 744–752 (2013).
 47. Campanholi, K. D. S. S. *et al.* Biomedical Platform Development of a Chlorophyll-Based Extract for Topic Photodynamic Therapy: Mechanical and Spectroscopic Properties. *Langmuir* **34**, 8230–8244 (2018).
 48. Kozlov, A. S. & Krasnovsky, A. A. Generation of singlet oxygen by chlorophyll and related pigments in aqueous systems: results of photochemical and luminescence studies. in *International Conference Laser Optics (ICLO)* 599–599 (IEEE, 2018). doi:10.1109/LO.2018.8435640.
 49. Bonnett, R. & Martinez, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **57**, 9513–9547 (2001).
 50. Andreeva, A., Abarova, S., Stoitchkova, K., Picorel, R. & Velitchkova, M. Selective photobleaching of chlorophylls and carotenoids in photosystem I particles under high-light treatment. *Photochem. Photobiol.* **83**, 1301–1307 (2007).