



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC GREEN SYNTÉZOU

NANOPARTICLES PREPARATION BY GREEN SYNTHESIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. DOMINIKA KORTUSOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. MICHAELA ŠIMŠÍKOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

Akademický rok: 2013/14

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): Dominika Kortusová

který/která studuje v **magisterském studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901T043)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Příprava nanočástic green syntézou

v anglickém jazyce:

Nanoparticles preparation by green synthesis

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Nanočástice jsou jedinečné pro své fyzikálně-chemické vlastnosti, díky kterým mají široké možnosti využití v mnoha odvětvích průmyslu a medicíny. Vadou mnohých postupů jejich přípravy je však tendence uvolňovat škodlivé vedlejší produkty do životního prostředí, což může vést k toxikologickým problémům. Proto se stále více klade důraz na netoxické, bio-kompatibilní a k životnímu prostředí šetrné přístupy k přípravě nanomateriálů, tzv. „green“ přístupy, které k výrobě nanočástic využívají biologické metody za účinku enzymů, hub, řas a rostlinných extraktů. Kromě šetrnosti k životnímu prostředí se syntézy za pomoci biologických entit vyznačují jednoduchostí, bezpečností a nízkonákladovostí.

Velká část úsilí zaměřená na biosyntézu anorganických materiálů, především kovových nanočástic, byla provedena za pomoci mikroorganismů. Naproti tomu syntéza nanočástic kovů pomocí rostlin je velice zajímavou ekologicky přijatelnou alternativou k tradičním chemickým a fyzikálním metodám, která je ale doposud poměrně málo prozkoumaná.

Cíle diplomové práce:

- zpracování literárního přehledu o syntéze nanostruktur
- příprava nanostruktur za pomoci rostlinných extraktů
- charakterizace nanostruktur metodami AFM, SEM, XPS, FT-IR, UV-vis a fluorescenční spektroskopie

Seznam odborné literatury:

Odborné články z vědeckých časopisů

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Michaela Šimšiková, Ph.D.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2013/14.

V Brně, dne 31.10.2013



prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
Ředitel ústavu



prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc., dr. h. c.
Děkan

Abstrakt

Tato práce se zabývá green syntézou nanočástic ušlechtilých kovů. V první části práce byla provedena literární rešerše, která mapuje tradiční i nové způsoby výroby kovových nanočástic. Největší pozornost je věnována různým druhům green syntéz, které jsou ekologicky šetrnou alternativou dnes průmyslově používaných metod. Druhá část práce popisuje přípravu nanočástic zlata a stříbra za pomoci čajových výluhů. Zde je podrobně popsán postup a průběh syntézy a to včetně fotografické dokumentace. Celkem bylo připraveno osm koloidních roztoků nanočástic, čtyři od každého kovu. Vzniklé nanočástice byly následně podrobeny UV-vis spektrální analýze. Spektrofotometricky byl též zmapován časový vývoj jednotlivých syntéz. Dále byla změřena objemová distribuce velikostí nanočástic, která je v závěru práce srovnána se snímky pořízenými skenovacím elektronovým mikroskopem. Výsledky ukázaly, že výluhy z čajů, především z černého a rooibosu, jsou vhodné pro green syntézu stabilních nanočástic ušlechtilých kovů.

Klíčová slova

green syntéza, nanočástice, zlato, stříbro, spektroskopie, koloidní roztoky, čaj

Abstract

This thesis deals with green synthesis of noble metals nanoparticles. The first part contains secondary literature research which maps both the traditional and newly developed techniques of nanoparticles preparation. Most attention is given to the various types of green synthesis, which constitute an environmentally friendly alternative to industrially applied methods. The second part deals with the preparation of noble metal nanoparticles using tea broths. The section describes the entire synthesis process and includes photographic documentation. A total of eight colloidal solutions were prepared, four of each metal. The nanoparticles were subsequently analyzed using UV-vis spectroscopy. A time-lapse spectroscopic description of each synthesis was also undertaken. Furthermore, the size distribution of the particles by volume was measured and compared with the pictures obtained by scanning electron microscopy. The results have showed that tea broths, especially those from black tea and rooibos, are suitable for the biosynthesis of stable noble metal nanoparticles.

Keywords

green synthesis, nanoparticles, gold, silver, spectroscopy, colloids, tea

KORTUSOVÁ, D. *Příprava nanočástic green syntézou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 51 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Michaela Šimšíková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze za odborného vedení RNDr. Michaely Šimšíkové, Ph.D., a že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Bc. Dominika Kortusová

Nejprve bych chtěla poděkovat RNDr. Michaele Šimšíkové, Ph.D. za vedení této diplomové práce, užitečné nápady a připomínky, ale především za obrovskou trpělivost. Poděkování patří též Katedře biochemie Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košicích, která umožnila mé vedoucí práce uskutečnit měření na zetasizeru. Dále bych ráda poděkovala Ing. Rostislavu Měchovi (nyní Váňovi) za pomoc s měřením a vyhodnocením spekter a za velikou morální vzpruhu. Děkuji též kolegům, kamarádům a svému příteli za podporu a toleranci především v závěrečných dnech tvorby této práce. Speciální poděkování patří mé rodině, nejvíce pak babičce Kortusové, za podporu během celého studia.

I když už nejsi mezi námi, tato práce je pro tebe, mami!

Obsah

1	Úvod	3
2	Příprava kovových nanočástic	5
2.1	Tradiční “bottom-up” metody přípravy nanočástic	6
2.2	Green metody přípravy nanočástic	9
2.2.1	Syntéza nanočástic za pomoci bakterií	11
2.2.2	Syntéza nanočástic kvasinkami	12
2.2.3	Syntéza nanočástic mořskými řasami	13
2.2.4	Syntéza nanočástic mikroskopickými houbami	13
2.2.5	Syntéza nanočástic vyššími rostlinami	13
2.2.6	Syntéza nanočástic již zpracovanými potravinami	17
3	Experimentální část	23
3.1	První pokusy přípravy nanočástic výluhy z čajů	23
3.2	Stanovení stability první série nanočástic	24
3.3	Příprava zlatých a stříbrných nanočástic čtyřmi druhy čajů	25
3.3.1	Časový vývoj reakce – pozorování barvy roztoků	26
3.3.2	Časový vývoj tvorby nanočástic – spektrální analýza	28
3.4	Charakterizace syntetizovaných nanočástic	37
3.4.1	Analýza distribuce velikostí částic pomocí zetasizeru	37
3.4.2	Analýza tvaru a velikosti částic elektronovým mikroskopem	41
4	Závěr	46
5	Literatura	47

1 Úvod

Nanočástice ušlechtilých kovů, především zlaté, získávají v poslední době stále větší pozornost, a to především díky jejich odlišným chemickým a fyzikálním vlastnostem od jejich “bulkových” variant. Jejich nejvýraznějším rysem jsou skvělé optické vlastnosti, a to především vysoký koeficient extinkce, závislost barvy koloidního roztoku na prostředí a samotné velikosti částic či vysoké zhášení fluorescence, kterým si vysloužily pozornost především na poli biosenzorické výroby [1]. Velký zájem vyvolaly též v oblasti produkce solárních článků, kde mohou pozitivně ovlivnit jejich účinnost [2]. Jsou také velmi často používány v experimentální biochemii k detekci bakteriálních toxinů, protilátek, DNA či jiných biomolekul, které se při diagnostice pomocí nanostruktur již nemusí ničím značit (např. fluorescenčními barvivy), neboť se jedná o tzv. „label-free“ metody detekce [3].

Zlaté či stříbrné nanočástice však lidstvo používalo mnohem dříve, než bylo schopno porozumět jejich fyzikálním či chemickým vlastnostem. Pravděpodobně nejznámější ukázkou raného využití zlatých nanočástic jsou tzv. Lykurgovy poháry (viz obrázek 1) pocházející asi ze 4. století našeho letopočtu, které se nyní nacházejí v Britském muzeu v Londýně. Tato ukázka starořímského umění je vyrobena z dichroického skla, které mění barvu v závislosti na poloze zdroje světla. Díváme-li se na pohár osvětlený zvenku, vidíme jej zelený. Umístíme-li ale zdroj světla, například svíčku, dovnitř poháru, jeho barva se změní v červenou. Za tímto jevem stojí přítomnost malého množství zlata (cca 40 ppm) a stříbra (cca 300 ppm) ve formě nanokrystalů o rozměru cca 70 nm. Tyto krystalky jsou slitinou zlata a stříbra v poměru 3:7 a dodnes není známo, jakou technologii starořímsští skláři k výrobě podobných artefaktů používali [4].

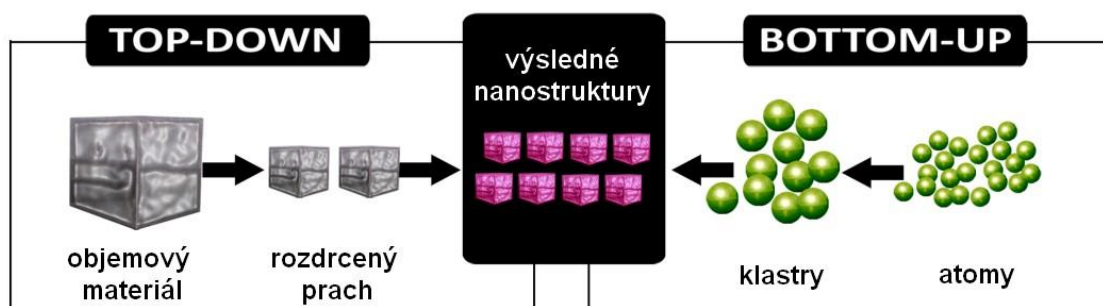


Obr.1: Lykurgovy poháry, vlevo při pozorování v odraženém světle (zelená barva), vpravo při umístění zdroje světla dovnitř poháru (červená barva). Převzato z [5].

I přes časté využití kovových nanočástic v průběhu lidské historie se první vědecké zmínky o výrobě a využití koloidních roztoků zlata objevily až v roce 1857, kdy Michael Faraday popsal tvorbu koloidního roztoku zlata rubínové barvy redukcí vodného roztoku tetrachlorozlatitanu [6]. Termín koloid (z francouzského colle = lepidlo) byl vytvořen Thomasem Grahamem v roce 1861. Od té doby propukla “zlatá horečka” a vědecká komunita začala hledat nové možnosti výroby a využití koloidních roztoků kovů stejně jako vysvětlení jejich unikátních vlastností. Na rozkvět si ale oblast nanotechnologie, která je pokračováním koloidní chemie, musela počkat ještě celé jedno století. Až v roce 1959 představil Richard Feynman na své přednášce “There is plenty of room at the bottom” koncept, kterým navrhl směr pro rychle se rozvíjející vědeckou oblast nanotechnologie.

2 Příprava kovových nanočástic

Obecně existují dva přístupy k výrobě nanočástic a to tzv. “top-down” a “bottom-up” metody (viz obrázek 2). Některé zdroje rozdělují metody přípravy též na fyzikální a chemické, přestože toto označení je poměrně sporné, neboť v obou přístupech je využito jak chemie, tak fyziky. Navíc v oblasti nanostruktur se už jen těžko dá stanovit hranice mezi “čistou” chemií a fyzikou.



Obr.2: Rozdělení metod přípravy nanostruktur na “top-down” a “bottom-up”.

Převzato a upraveno z [7].

Takzvané metody “top-down” jsou starší z obou přístupů k výrobě nanostruktur a jak již dává tušit samotný název znamenající v překladu “shora dolů”, tyto metody postupně zmenšují daný materiál na menší a menší částice, až nakonec dosáhnou nano rozměru. Patří sem například mechanické mletí materiálů se stabilizací vzniklých nanočástic, miniaturizace struktur konvenční a elektronovou litografií nebo chemické leptání či laserová ablace. Největším problémem těchto metod je velká variabilita velikosti částic. Částice mají obvykle průměr v řádu desítek až stovek nanometrů a nejsou reprodukovatelně připravitelné. Tyto metody jsou též velmi nákladné a to jak finančně tak energeticky, proto nebudou v textu blíže rozebírány.

Metodika výroby nanočástic “bottom-up” je protipólem metody “top-down”. Zde jsou nanostruktury budovány z jednotlivých atomů, které se získají například chemickou či elektrochemickou redukcí kovu z jeho solného roztoku nebo kontrolovaným rozkladem metastabilních organokovových sloučenin. Tyto atomy poté tvoří klastry, které se následně shlukují za tvorby nanostruktur. Tvar, velikost a stabilita nanočástic je závislá na termodynamických a chemických podmínkách panujících při samotné reakci. Díky tomu lze reprodukovatelně připravit nanočástice s předem přesně definovanými vlastnostmi a to i o velikostech v řádech jednotek nanometrů. Na druhou stranu je nutné říci, že kontrola celého procesu je velice náročná a malá chyba vede k velkým odchylkám. Přesto možnost velkovýroby nanočástic s volitelným rozměrem od jednotek do stovek nanometrů vedla k tomu, že většina dnes průmyslově vyráběných nanočástic je připravována právě touto cestou [8].

První reprodukovatelný standardní návod na přípravu koloidů kovů popsal poprvé John Turkevich se svým kolektivem v roce 1951. Jeho týmu se podařilo získat zlaté nanočástice redukcí tetrachlorozlatitanu citrátem sodným [9]. Při této reakci se

vyredukované zlato pomalu shlukuje za tvorby nanočástic, které jsou navíc stabilizovány negativně nabitými citrátovými ionty. Růst nanočástic je možno kontrolovat množstvím jednotlivých reagujících činidel a jejich chemickou rovnováhou.

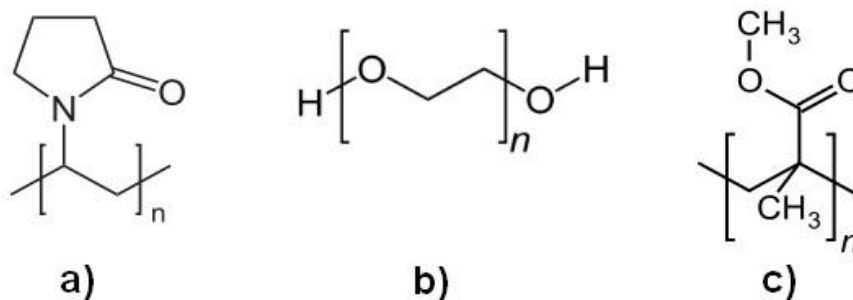
Další výzkum této metody vedl k velmi přesné kontrole jednotlivých parametrů nanostruktur a především k získání koloidních roztoků nanočástic s úzkou distribucí velikosti i tvaru. Koloidní roztok je obecně popisován jako monodisperzní, pokud je směrodatná odchylka průměru částic menší než 15% z průměrné hodnoty. Je-li odchylka přibližně 20%, jedná se o roztok s “malou variabilitou” rozdělení velikosti částic. Nanočástice s požadovaným rozdělením lze získat buďto selektivní syntézou, kterou navrhl právě Turkevich, nebo selektivní separací částic. Separční metody zahrnují například chromatografii či ultracentrifugaci [4].

V dnešní době je možné zakoupit stabilní roztoky nanočástic různých kovů s velmi úzkou distribucí velikostí a to v rozmezí zhruba od 2 do 250 nm. Částice mohou navíc být funkcionalizovány různými molekulami pro další využití například v senzorice či biochemii. Mezi nejvýznamnější výrobce patří Sigma-Aldrich či BBI.

2.1 Tradiční “bottom-up” metody přípravy nanočástic

Mezi nejčastější metody přípravy kovových nanočástic chemickou cestou patří již zmiňovaná redukce solí přechodných kovů v roztoku, která se od Turkevichova prvního podrobného popisu stala v podstatě standardem. Touto metodou lze připravit téměř monodisperzní částice v řádově gramových množstvích. Jako nejčastější redukční činidla se používají například hydridy, citráty, askorbáty, alkoholy nebo elementární vodík [4,10]. Samotná reakce začíná redukcí aniontů kovů vybraným redukčním činidlem, která vede k formování nulmocných atomů kovu. Ty se následně shlukují do klastrů, které vytvoří zárodek koloidní nanočástice. Rozměr výsledné nanostruktury závisí převážně na poměru reagujících látek, chemické a termodynamické rovnováze v roztoku. Studie kinetiky reakcí ukázaly, že při použití velmi silného redukčního činidla, jako je například borohydrid, se tvoří monodisperzní částice malých rozměrů. Pokud se ale nechá reakce “běžet” déle, tvoří se velké struktury s téměř nekontrolovatelnou distribucí velikostí. Použije-li se slabší reduktant, tvorba nanostruktur je pomalejší a rozdělení velikosti částic není úzké [10].

Jako velmi důležité se ukázalo použití ochranných činidel ke stabilizaci nanočástic v roztoku a to již při jejich syntéze. Nejčastější strategií ochrany před koagulací nanočástic je použití ochranných látek, které mohou být absorbovány nebo přímo navázány na povrch částic. Zde je časté použití polymerů, které díky svým prostorově velkým molekulám spolehlivě zabrání agregaci [10]. Mezi nejvíce používané patří například polyvinylpyrrolidon (PVP), polyethylenglykol (PEG) nebo polymethylmethakrylát (PMMA) (viz obrázek 3).



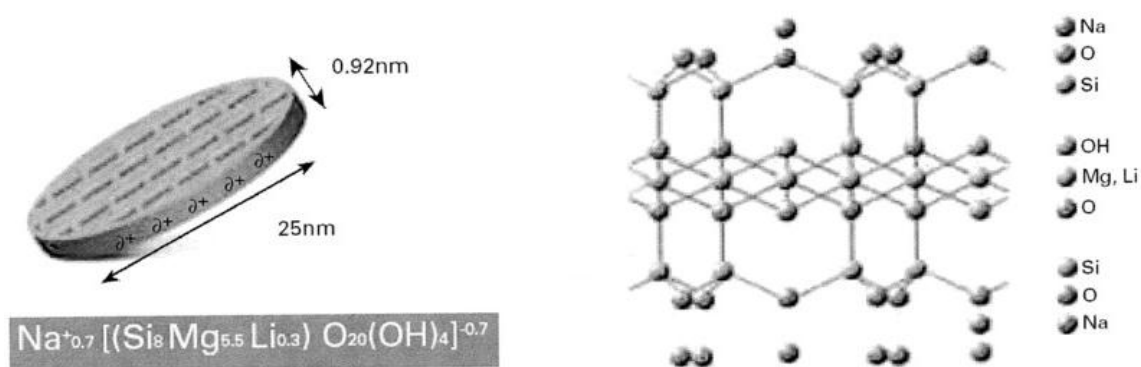
Obr.3: Strukturní vzorce nejčastěji používaných polymerů pro stabilizaci nanočástic:
a) polyvinylpyrrolidon, b) polyethylenglykol, c) polymethylmaethakrylát.

Převzato a upraveno z [11-13].

Jiný ale přesto podobný způsob výroby nanočástic je jejich syntéza za použití mikroemulze. Ve dvoufázovém roztoku jsou separovány prekursorů ve vzájemně nemísitelných kapalinách, které tvoří organické rozpouštědlo s redukčním činidlem a vodný roztok soli. Pouze na rozhraní obou roztoků dochází k redukci kovu a formování nanostruktur. Výsledné nanočástice jsou stabilizovány nepolárními molekulami vyskytujícími se ve vodném roztoku a následně přesunuty do organického rozpouštědla [10]. Touto metodou lze připravit uniformní nanostruktury s kontrolovatelnou velikostí. Na druhou stranu je nutné říci, že organická rozpouštědla jsou často velmi toxická a je nutné je z výsledných struktur odstranit. Tím se zvyšuje časová a finanční náročnost celého procesu.

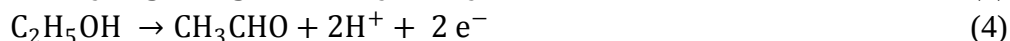
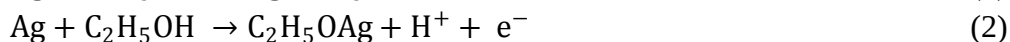
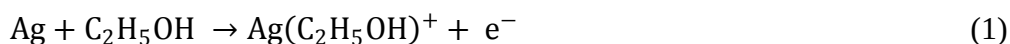
Další zajímavou variantou klasické syntézy nanočástic v roztoku je použití UV záření k iniciaci redukce kovů z roztoku. Dle [10] lze tímto způsobem připravit nanočástice zlata a stříbra za přítomnosti citrátu, kolagenu, polyvinylpyrrolidonu (PVP) a kyseliny polyakrylové (PAA). Úspěšná byla též fotoredukce stříbrných nanočástic ze suspenze dusičnanu stříbrného (AgNO_3) a laponitu - syntetického jílu se smektickou fází¹, který tvoří tixotropní gel při rozpuštění ve vodě (viz obrázek 4). Vlastnosti vzniklých nanočástic byly studovány v závislosti na době osvitů UV zářením, kdy při době ozáření pohybující se okolo tří hodin vznikly relativně velké částice s bimodální distribucí velikostí. Při delším osvitě byly tyto větší částice rozloženy na menší s již jednomódovým rozdělením. Přesná velikost částic však není ve zdroji uvedena.

¹ Fáze kapalného krystalu, ve které jsou molekuly uspořádány pravidelně do vrstev.

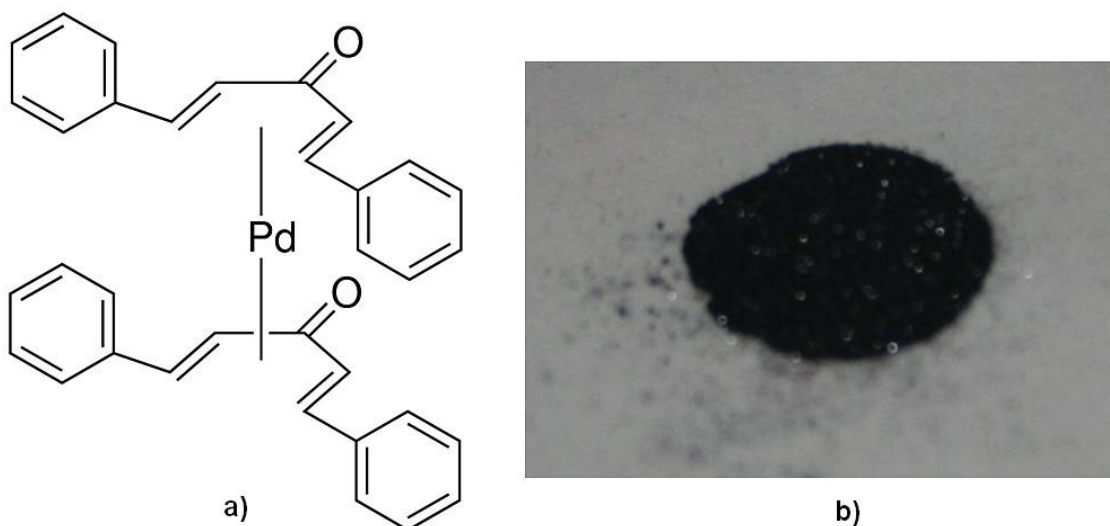


Obr.4: Laponit - velikost a tvar nanokrystalu, přesné složení a molekulární struktura.
Převzato a upraveno z [14].

Poměrně novou metodou přípravy kovových nanočástic je elektrochemická redukce vyvinutá v 90. letech 20. století. Mezi její hlavní výhody patří možnost kontrolovat velikost vzniklých nanočástic, jejich snadná izolace z roztoku a zamezení tvorby nežádoucích vedlejších produktů. Touto metodou byly již připraveny částice zlata, stříbra, niklu, železa či paladia [4]. Princip této metody je popsán například v [15] při elektrochemické syntéze stříbrných nanočástic. Autoři použili stříbrné a platinové elektrody, dusičnan stříbrný (AgNO_3) a ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). Stříbro je zde z anody oxidováno ethanolom za vzniku pseudomolekulárního iontu (1) a alkoxidu stříbra (2), který se následně rozpadá za vzniku oxidu stříbrného (3). Paralelně dochází k oxidaci ethanolu (4). Acetaldehyd vzniklý při této reakci reaguje s oxidem stříbrným za vzniku nulmocného stříbra a kyseliny octové (5). Je nutné dodat, že nulmocné stříbro může vzniknout též redukcí pseudomolekulárního iontu na katodě (6). Nulmocné atomy stříbra se poté shlukují a tvoří kýžené nanostruktury.

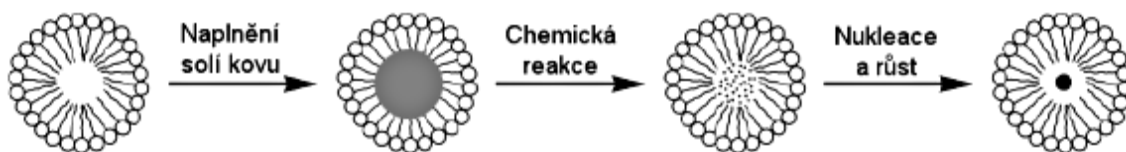


Další možnou metodou přípravy kovových nanočástic je odstranění ligandů z organokovových sloučenin. Podmínkou úspěšnosti reakce je, aby se kov vyskytoval ve sloučenině v nulmocném stavu. Takové sloučeniny mohou být změněny na koloidní roztok nanočástic redukcí kovů nebo odstraněním ligandů [4]. Například redukce bis(dibenzylidenacetonu) paladia či platiny vede k přípravě nanočástic o velikosti několika nanometrů. Bis(dibenzylidenaceton) paladia neboli $\text{Pd}(\text{dba})_2$ (viz obrázek 5) se využívá v chemických laboratořích jako homogenní katalyzátor a je běžně komerčně dostupný [16].



Obr.5: Bis(dibenzylidenaceton) paladia - a) strukturní vzorec molekuly $\text{Pd}(\text{dba})_2$, b) fotografie komerčně dostupného $\text{Pd}(\text{dba})_2$. Převzato a upraveno z [16].

Mezi okrajové “bottom-up” metody lze zahrnout též syntézu nanočástic v nanoreaktoru tvořeném polymerními micelami [4]. Jedná se o elegantní řešení, kdy velikost micely určuje velikost připravované nanočástice, neboť samotná syntéza probíhá uvnitř tohoto shluku molekul. Micelární nanoreaktory mohou mít rozličný tvar, například tyčinkový či kulový (viz obrázek 6). Jako redukční činidla se zde využívají především hydroboritany či hydrazin a lze s nimi připravit nanočástice rozličných kovů, například zlata, platiny, paladia, rhodia, kobaltu, mědi, zinku či niklu. Kromě toho lze připravit i nanočástice tvořené oxidy nebo sulfidy kovů.



Obr.6: Jednotlivé kroky používané při syntéze nanočástic uvnitř micelárního reaktoru. Převzato ze [4].

2.2 Green metody přípravy nanočástic

Green metody přípravy nanočástic dostávají v posledních několika letech značnou pozornost vědecké společnosti a to především díky celosvětovému problému znečištění životního prostředí. Tradiční způsoby syntézy nanostruktur chemickou cestou totiž vyžadují často velmi toxické látky, které v procesu výroby hrají roli redukčních či stabilizačních činidel jako jsou například hydridy, askorbáty či složité polymery jako je polyvinylpyrrolidon (PVP). Škodlivé však nejsou jen prekursorzy, ale často i meziprodukty reakcí bývají toxické [17]. Fyzikální metody přípravy nanočástic jako jsou například laserová ablace či litografie sice vyžadují menší množství

nebezpečných látek, avšak jsou finančně a energeticky nákladné a neumožňují produkci v tak velkém množství, jako je tomu u “mokrých” metod vedoucích k získání koloidních roztoků nanočástic [18]. Je tedy logické, že se vědecká komunita snaží najít levné a ekologicky šetrné způsoby přípravy nanočástic, kterými by ale bylo možné produkovat nanočástice v průmyslovém měřítku.

Řešením tohoto problému se zdají být takzvané green či greener syntézy, ve kterých jsou škodlivá redukční a stabilizační činidla nahrazena přírodními či biologickými látkami. Česky jsou tyto způsoby přípravy nanočástic označovány též jako biosyntézy a zapadají do oblasti bionanotechnologií. Biosyntetické metody v podstatě patří mezi chemické metody, avšak s účastí biokatalyzátorů. Pojmem biokatalyzátor se rozumí molekuly tvořené či syntetizované živým organismem, které se podílejí na redukci daného kovu za vzniku příslušných nanočástic [19]. Může se jednat například o enzymy, vitamíny, cukry, aminokyseliny, proteiny, bakterie, viry, řasy, houby nebo části vyšších rostlin či výluhy z nich. Použity mohou být též výrobky na rostlinné bázi jako jsou biopolymery, med, stolní víno, čaj nebo káva [17-21]. Mezi greener se řadí také syntézy s výrazně sníženou energetickou spotřebou jako je například syntéza nanočástic za pomoci mikrovlnného záření [20].

Výsledkem biosyntézy jsou nanočástice buď v izolované formě, například koloidu, nebo ve formě nanokompozitu, tedy směsi cílových nanočástic s buněčnými zbytky či metabolickými produkty. Tyto buněčné metabolity a další biomolekuly ovlivňují výsledné vlastnosti nanočástic a rovněž nanočástice stabilizují a zabraňují jejich agregaci. Jedná se o stejný princip jako při stabilizaci nanočástic za pomoci surfaktantů či polymerů. Nanočástice připravené biosyntézou mohou mít v určitých aspektech lepší vlastnosti než ty připravené tradičními metodami. Jedná se například o vyšší katalytickou aktivitu, vyšší stabilitu, menší velikost či vyšší chemickou čistotu a biokompatibilitu [19]. Navíc jsou “odpadní” látky green reakcí kompatibilní s přírodním prostředím a nijak ho nezatěžují. Jedinou výjimku tvoří syntézy mikrobiálními kulturami, které mohou být potenciálně nebezpečné v závislosti na použitých mikroorganismech [18].

Jak již bylo řečeno, v green syntézách bylo od jejich objevení vyzkoušeno relativně velké množství organismů. Zpočátku se používaly hlavně mikroorganismy a to díky zkušenostem z klasických biotechnologických procesů jako jsou remediace nebo rekultivace, jejichž pomocí je možné dekontaminovat například odpadní vody od těžkých kovů. Spojením biotechnologických procesů čištění odpadních vod s biosyntézou by bylo možné tyto cenné kovy z vody nejen odstranit, ale též získat zpět ve formě nanočástic. V poslední době se ke green syntézám využívají také rostlinné extrakty, jejichž velkou výhodou je snadné vypěstování dostatečného množství biomasy a absence zbytků buněčné hmoty ve výsledné směsi nanočástic. Navíc je dlouhodobé působení extraktů léčivých a medicínsky významných rostlin na lidský organismus dobře známé a předpokládá se, že nanočástice připravené využitím takovýchto extraktů budou netoxické, biokompatibilní a s potenciálním využitím v medicíně [19].

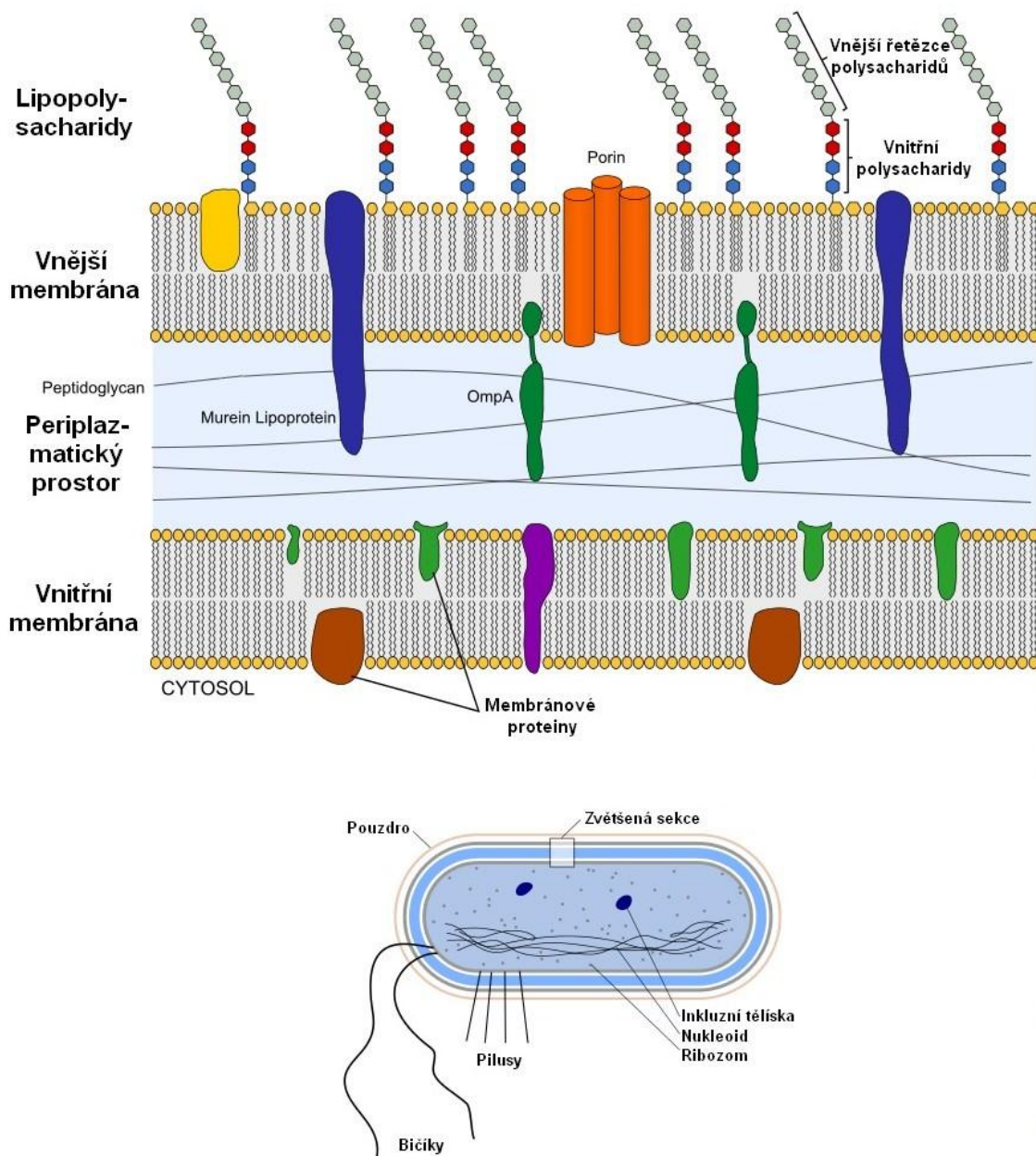
2.2.1 Syntéza nanočástic za pomoci bakterií

Jak již bylo zmíněno, ze všech přírodních zdrojů použitelných pro výrobu nanočástic se prokaryotické bakterie zkoumají nejdéle a nejvíce intenzivně a to nejen díky dlouholetým zkušenostem, ale také díky relativně snadné manipulaci s tímto biologickým materiálem. Při jedné z prvních studií této technologie bylo zjištěno, že bakterie ze stříbru odolného kmene *Pseudomonas stutzeri* AG259 izolované ze stříbrných dolů nakumulovaly ve svém periplazmatickém prostoru (prostor vyplněný periplazmou mezi vnitřní cytoplazmatickou membránou a vnější membránou u gramnegativních bakterií, viz obrázek 7) stříbrné nanočástice o velikosti 35 až 46 nm. Zajímavé je, že když jsou tyto bakterie umístěny v koncentrovaném vodném roztoku stříbra (50 mM), jsou formovány nanočástice o velikosti cca 200 nm [17]. Takovéto bakterie by bylo možné využít v již nastíněném biotechnologickém čištění odpadních či průmyslových vod ve spojení s opětovným získáním kovového stříbra ve formě nanočástic.

Zkoumána byla též biochemická syntéza stříbrných nanočástic bakteriálním kmenem *Morganella* sp. RP-42, který byl izolován z trávicí soustavy hmyzu. Tento kmen bakterií produkuje extracelulární krystalické nanočástice stříbra o velikosti 20 ± 5 nm, je-li vystaven roztoku dusičnanu stříbrného (AgNO_3). Byly nalezeny tři geny (*silE*, *silP* a *silS*), které pravděpodobně hrají roli v odolnosti těchto bakterií ke stříbru. Gen *silE* je zodpovědný za kódování periplazmatického proteinu, který je schopen navázat stříbro. Přesný mechanismus tvorby nanočástic však není znám a přítomnost výše zmíněných genů je jediným pojitkem syntézy stříbrných nanočástic k molekulární struktuře mikroorganismů [17].

Byla provedena též studie bakteriálního kmene *Lactobacillus* běžně se vyskytujícího v mléce a mléčných výrobcích. Je-li tento kmen vystaven vysoké koncentraci kovových iontů stříbra či zlata, dojde k intracelulární produkci mikroskopických krystalů s dobře definovanou strukturou. Je kupodivu, že bakterie zůstávají živé i přes poměrně velké krystaly uvnitř jejich buněk. Tyto krystaly o velikosti řádově až jednotek mikrometrů mohou být stříbrné, zlaté nebo dokonce tvořené slitinou obou kovů [17].

Bylo dokázáno, že při syntéze nanočástic za pomoci bakterií hraje důležitou roli pH prostředí. Například při biosyntéze zlatých nanočástic mezofilními bakteriemi kmene *Shewanella algae* za přítomnosti molekul vodíku (H_2) jako donoru elektronů bylo autory měněno pH prostředí, čímž získali nanočástice různé velikosti. Bylo-li pH roztoku rovno 7, bakterie produkovaly zlaté nanočástice o rozměrech 10 až 20 nm a to intracelulárně v periplazmatickém prostoru. Pokud došlo ke snížení pH na hodnotu 1, byly získány větší nanočástice o průměru 50 až 500 nm a to extracelulárně. V analogické studii bakteriálního kmene *Rhodopseudomonas capsulata* vystaveného roztoku tetrachlorozlitanu o pH z rozsahu 4-7 bylo zjištěno, že nanočástice mají nejen jinou velikost, ale též tvar. Při pH 7 byly formovány sférické zlaté nanočástice o průměru 10 až 20 nm, avšak při pH 4 byly tvořeny zlaté šupinky různých velikostí [17].



Obr.7: Gramnegativní bakterie - řez buněčnou stěnou se zobrazením periplazmatického prostoru (nahore) a schéma celé bakterie (dole). Převzato a upraveno z [22].

2.2.2 Syntéza nanočástic kvasinkami

Na rozdíl od syntézy za pomoci bakterií bylo vedeno jen velmi málo studií syntézy nanočástic kvasinkami. V jedné z mála dostupných studií byl stříbru odolný druh kvasinek s označením MKY3 vystaven 1 mM roztoku dusičnanu stříbrného v exponenciální fázi růstu, což vedlo k extracelulární produkci stříbrných nanočástic s průměrem 2 až 5 nm. Celý proces trval 24 hodin. Autoři následně použili novou technologii separace nanočástic z biologického roztoku založenou na zmrazení a postupném zahřívání přirovnatelnou k frakční destilaci [23].

2.2.3 Syntéza nanočástic mořskými řasami

Stejně jako bylo zmíněno v předchozí kapitole je i studium biosyntézy nanočástic za pomoci řas velmi ojedinělé. Mořské řasy *Sargassum wightii* sesbírané na jihovýchodním pobřeží Tamil Nadu v Indii byly použity k syntéze zlatých nanočástic. Jako ve většině případů i zde autoři použili vodný roztok tetrachlorozlatitanu jako zdroj zlatých iontů. V průběhu 12 hodin bylo za neustálého míchání redukováno 95% zlatých iontů z roztoku. Výsledkem byly velmi stabilní zlaté nanočástice s průměrem v rozmezí 5 až 15 nm. Tyto částice byly syntetizovány extracelulárně. Autorům se podařilo stejným způsobem připravit i nanočástice paladia a platiny [24].

2.2.4 Syntéza nanočástic mikroskopickými houbami

Díky vysoké toleranci a schopnosti akumulace kovů jsou houby vhodným biokatalyzátorem syntézy metalických nanočástic. Mezi jejich další výhody patří rychlé množení a vysoká sekrece extracelulárních enzymů. Nicméně jejich značnou nevýhodou je složitější manipulace s genetickým materiálem, neboť se jedná o eukaryotické buňky (na rozdíl od bakterií a řas, jež jsou prokaryotické). Přesto jsou houby k syntéze nanočástic poměrně často využívány.

Jedna ze studií využívá houby *Verticillium* k syntéze stříbrných nanočástic. Vystavení houbové biomasy vodnému roztoku dusičnanu stříbrného mělo za následek intracelulární redukci stříbra a vznik nanočástic s velikostí 25 ± 12 nm. Analýza tenkých řezů houbových buněk elektronovou mikroskopií ukázala, že stříbrné nanočástice byly formovány těsně za buněčnou membránou. K tomu došlo pravděpodobně proto, že stříbrné ionty byly redukovány enzymy, které se vyskytují právě v buněčné stěně. Separace nanočástic od buněčné hmoty se tím však stala poměrně složitou a nákladnou [17].

Použití vláknitých hub, například *Aspergillus fumigatus*, vede na rozdíl od prvního případu k extracelulární biosyntéze nanočástic, která je navíc velmi rychlá, probíhá během několika minut. Výsledkem jsou krystalické stříbrné nanočástice s velikostí v rozmezí 5 až 25 nm. Tyto částice jsou navíc velmi stabilní, ve vodném roztoku vydrží ve stejném stavu až 4 měsíce. Bohužel se však ukázalo, že většina vláknitých hub je pro člověka patogenní, což je velmi nepraktické a tento fakt v podstatě znemožňuje průmyslovou výrobu nanočástic s využitím vláknitých hub [17].

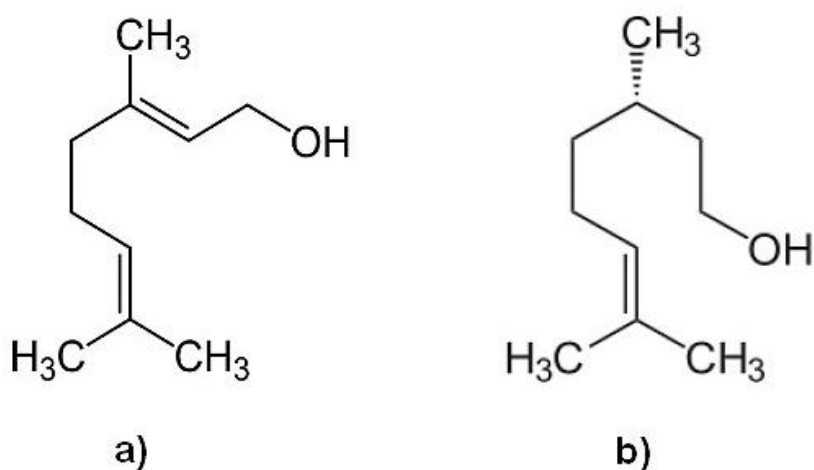
Nicméně jedna z posledních studií demonstruje přípravu velmi stabilních krystalických stříbrných nanočástic pomocí nepatogenních a zemědělsky důležitých hub *Trichoderma asperellum* [17]. Velikost výsledných nanočástic však není ve zdroji uvedena.

2.2.5 Syntéza nanočástic vyššími rostlinami

Ze všech živých organismů používaných k výrobě nanočástic se vyšší rostliny a jejich části jeví jako nejslibnější pro průmyslovou výrobu a to především díky dobré

dostupnosti velkého množství materiálu potřebného pro syntézu, nízké finanční náročnosti (obvykle jsou využívány rostliny dobře dostupné v daném regionu, například kaktusy v Mexiku nebo čaj v Indii), vysokou rychlost reakce a stabilitu výsledných nanočástic. Navíc nanočástice získané biosyntézou vyššími rostlinami vykazují větší tvarovou variabilitu než je tomu při použití ostatních organismů [25]. Obecně může být použita téměř jakákoliv část rostliny - kořen, list, plod, semeno, stonek či kmen nebo dokonce mlčí. Je obecně předpokládáno, že na biosyntéze se podílí především antioxidanty, cukry a proteiny, přestože ještě nebylo dosaženo přesného vědeckého vysvětlení celého procesu [26]. Vzhledem k tomu, že v průběhu posledních zhruba deseti let bylo pro biosyntézu nanočástic použito velké množství vyšších rostlin, budou v následujícím textu uvedeny jen ty nejčastěji používané.

Jednou z nejoblíbenějších rostlin pro výrobu nanočástic je ve vědeckých kruzích *Pelargonium graveolens* (česky muškát vonný). Jedná se o silně aromatické keřové muškáty, které můžeme běžně najít na mnohých českých balkonech. Pro syntézu nanočástic se používá extrakt z listů této rostliny získaný jejich nakrájením a následným povařením. Takto získaný "vývar" se po přefiltrování použije jako redukční činidlo. Například v [26] je malé množství extraktu smícháno s vodným roztokem tetrachlorozlatitanu (HAuCl_4) o koncentraci 1 mM. Výsledkem jsou stabilní zlaté nanočástice, jejichž syntéza je navíc, v porovnání s ostatními metodami, velmi rychlá (maximální čas reakce je uváděn na 2 hodiny). Je předpokládáno, že redukčním a zároveň stabilizačním činidlem jsou zde geraniol a citronellol (viz obrázek 8). Tyto dva monoterpenoid-alkoholy jsou častou součástí esenciálních vonných olejů a hojně se vyskytují právě v listech muškátu. Analýza transmisní elektronovou mikroskopií ukázala, že nejčastěji jsou tvořeny desetistěnné a dvacetistěnné nanočástice o velikosti 20 až 40 nm.

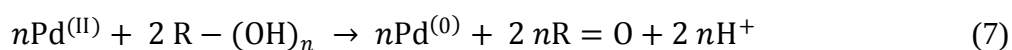


Obr.8: Molekulární struktura alkoholů obsažených v muškátu vonném patřících mezi terpeny: a) geraniol, b) citronellol. Převzato a upraveno z [27,28].

Extraktem z listů muškátu vonného byly připraveny i stříbrné nanočástice [17,26]. V tomto případě byl extrakt smíchán s vodným roztokem dusičnanu stříbrného (AgNO_3), což opět vedlo k poměrně rychlé syntéze nanočástic. U stříbra byla reakce

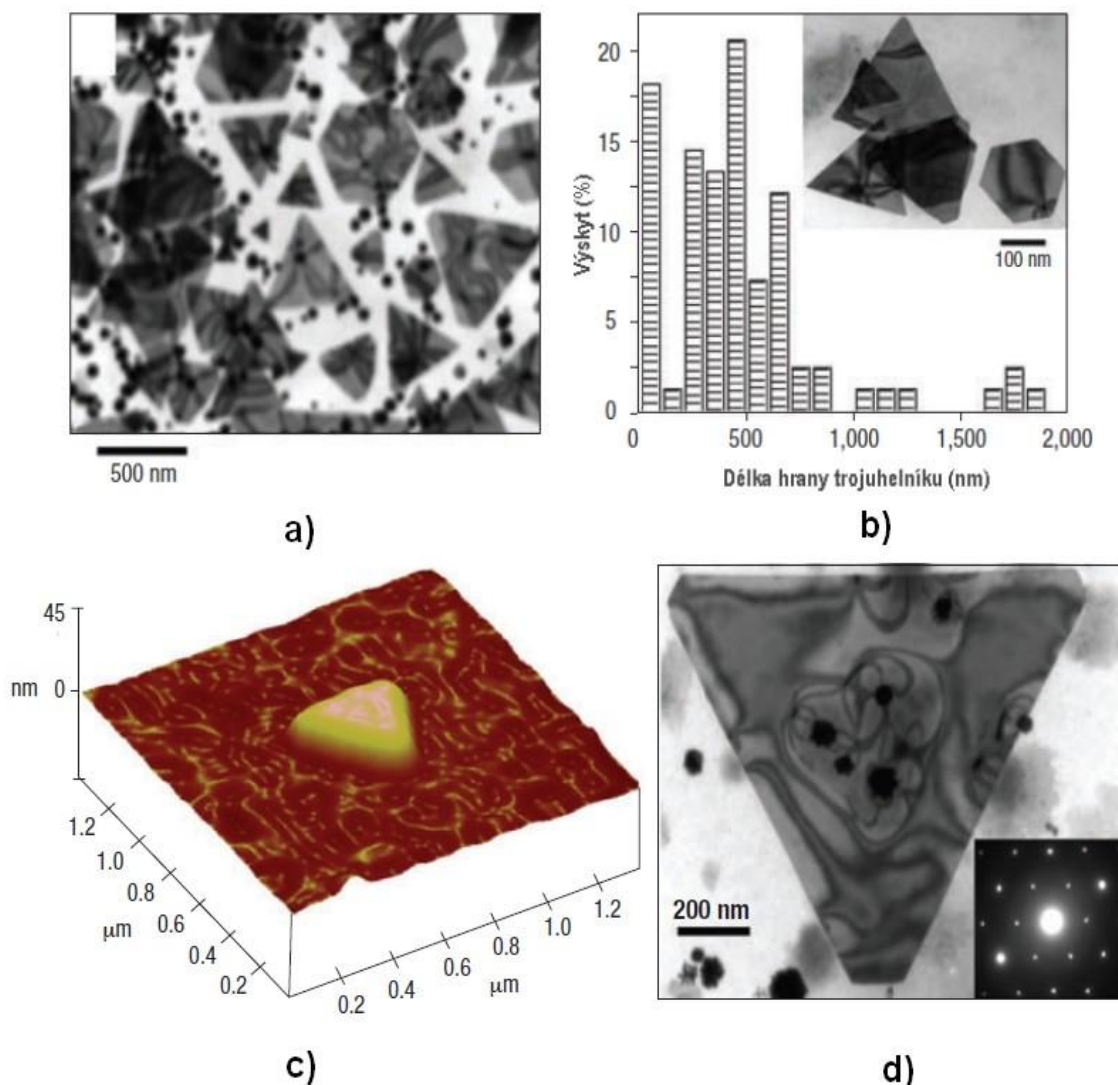
o něco pomalejší než u zlata - zhruba za 9 hodin bylo redukováno 90% zásobního roztoku. Výsledkem syntézy byly vysoce stabilní krystalické stříbrné nanočástice o velikosti v rozmezí 16 až 40 nm. I zde autoři postulují, že na reakci se podílejí především terpeny obsažené v listech muškátu (geraniol, citronellol).

Další oblíbenou rostlinou pro výrobu nanočástic je *Cinnamomum camphora* (česky kafrovník lékařský). Jedná se o stálezelený strom, z jehož silice se získává kafr hojně využívaný v medicíně a parfumerii. Zde byl výluh získaný ze sluncem vysušených listů kafrovníku smíchán s vodným roztokem se stříbrnými ionty. Počáteční teplota roztoku byla 90 °C, což vedlo k rychlé tvorbě zárodků stříbrných nanočástic. Následně byl pozorován růst nanočástic v průběhu chladnutí roztoku. Velikost vzniklých nanočástic se pohybovala v rozmezí 5 až 40 nm [18]. V případě, že reakce probíhala za pokojové teploty, byly výsledné nanočástice větší a to v rozmezí 55 až 80 nm [26]. Za pomoci výluhu z listů kafrovníku byly syntetizovány i nanočástice paladia o velikost 3 až 6 nm. Předpokládá se, že za redukci kovových iontů stojí opět terpeny obsažené v listech a to především kafr. Dle [18] biosyntéza probíhá následujícím mechanismem:



Mezi další často využívané rostliny patří *Ocimum sanctum* (česky bazalka posvátná). Tento druh bazalky, zvaný též tulsí, je posvátnou bylinou hinduismu. Pochází z Indie, kde se již po tisíciletí používá v lidové medicíně k léčbě zažívacích potíží, infekcí a horečky. Své využití má též v kuchyni, kde je ceněným kořením chutí připomínající anýz nebo hřebíček [29]. Pro syntézu stříbrných nanočástic byly využity výluhy ze sušených stonků a kořenů. V obou případech došlo k formování malých nanočástic s krystalickou strukturou. Analýza transmisním elektronovým mikroskopem ukázala, že velikost nanočástic je 10 ± 2 nm v případě použití výluhu z kořene a 5 ± 2 nm v případě použití výluhu ze stonku [20]. Princip redukce stříbrných iontů je zde stejný jako u kafrovníku, neboť i bazalka ve svých silicích obsahuje kafr.

Další rostlinou úspěšně použitou k biosyntéze nanomateriálů je *Cymbopogon flexuosus* (česky citrónová tráva). Smíchá-li se extrakt z citronové trávy s vodným roztokem tetrachlorozlatitanu, vzniknou zdánlivě tekuté malé zlaté nanočástice, které se postupně shlukují za tvorby trojbokých hranolů se širokým rozdělením velikostí (viz obrázek 9a). Velikost trojúhelníkové základny se pohybuje v rozmezí 0.05 až 1.8 μm , zatímco výška hranolů je z rozmezí 8 až 18 nm (viz obrázek 9b a 9c). Po 6 hodinách od začátku reakce tvoří trojúhelníkové útvary 45% všech nanočástic [30]. Autoři uvádí, že množství trojúhelníkových nanočástic v roztoku lze zvýšit až 90 %, je-li roztok opakovaně centrifugován při 3,4 g a promýván. Vzniklé trojúhelníkové nanočástice jsou monokrystalické s orientací (111), jak je vidět z difraktogramu pořízeného metodou SAED (viz obrázek 9d).



Obr. 9: Trojúhelníkové zlaté nanočástice syntetizované výluhem z citronové trávy.
a) TEM snímek nanočástic, b) graf distribuce velikosti hrany trojúhelníkových částic,
c) výškový profil a velikost nanočástice z AFM, d) TEM fotografie a bodový difraktogram nanočástice zformované po 6 hodinách od začátku reakce.

Převzato a upraveno z [30].

Potenciálně velmi zajímavá je studie výroby nanočástic za pomoci biomasy obilí zbylé po sklizni, především ovsa setého (*Avena sativa*) a pšenice seté (*Triticum aestivum*) [31]. Tato zbylá biomasa byla několikrát omyta destilovanou vodou a poté sušena při 95 °C po dobu jednoho týdne. Vysušené obilí bylo namleto najemno, proseto skrz síto s velikostí ok zhruba 150 μm, znovu opakovaně omyto destilovanou vodou a rozděleno do vzorků o hmotnosti 10 mg. Toto množství získaného obilného prachu bylo smícháno s 2 ml roztoku tetrachlorozlatitanu o koncentraci 0,03 mM při různé hodnotě pH roztoku (v rozmezí od 2 do 6). Při nízké hodnotě pH v roztoku (pH = 2) byl pozorován vznik malého množství větších nanočástic s rozdělením velikostí v rozmezí 25 až 85 nm. Při vyšších hodnotách pH (3 až 6) vznikaly menší nanočástice s velikostí v rozmezí 10 až 20 nm, avšak v daleko větším množství. Autoři tento jev vysvětlují

tím, že při nízké hodnotě pH je proces agregace za tvorby velkých nanočástic preferovanější než tvorba zárodků nových nanočástic.

Jednou z posledních zajímavých alternativ green syntézy vyššími rostlinami je použití exotického ovoce. Například zlaté nanočástice o rozměru zhruba 300 nm byly syntetizovány předvařenou, rozdrcenou a vzduchem sušenou banánovou slupkou, která byla před reakcí namočená do acetonu. Zajímavé je, že takovéto nanočástice vykazovaly zvláštní chování, neboť měly tendenci se shlukovat za tvorby nanodrátů na okraji použitého biologického materiálu. Taktéž slupky z pomeranče se uplatnily při syntéze tentokrát stříbrných nanočástic, které měly navíc silné antibakteriální vlastnosti [18]. Jiný tým použil plody papáji k syntéze stříbrných nanočástic krychlovitého tvaru, které měly průměrnou velikost 15 nm. Bylo zjištěno, že takto připravené nanočástice stříbra jsou vysoce toxické vůči mnohým lidským lékům odolným patogenům [20]. Zdá se tedy, že vitaminy a antioxidanty obsažené v ovoci posilují antibakteriální vlastnosti stříbrných nanočástic.

Posledním použitým zástupcem exotického ovoce v dostupné literatuře je *Diopyros kaki* (česky tomel japonský nebo jen kaki), kterým byly úspěšně syntetizovány platinové nanočástice o velikosti 2 až 12 nm. Jako prekurzor platiny byla použita ve vodě rozpuštěná kyselina hexachloroplatinčitá též zvaná dihydrogenhexachloroplatinčitan (H_2PtCl_6) [18].

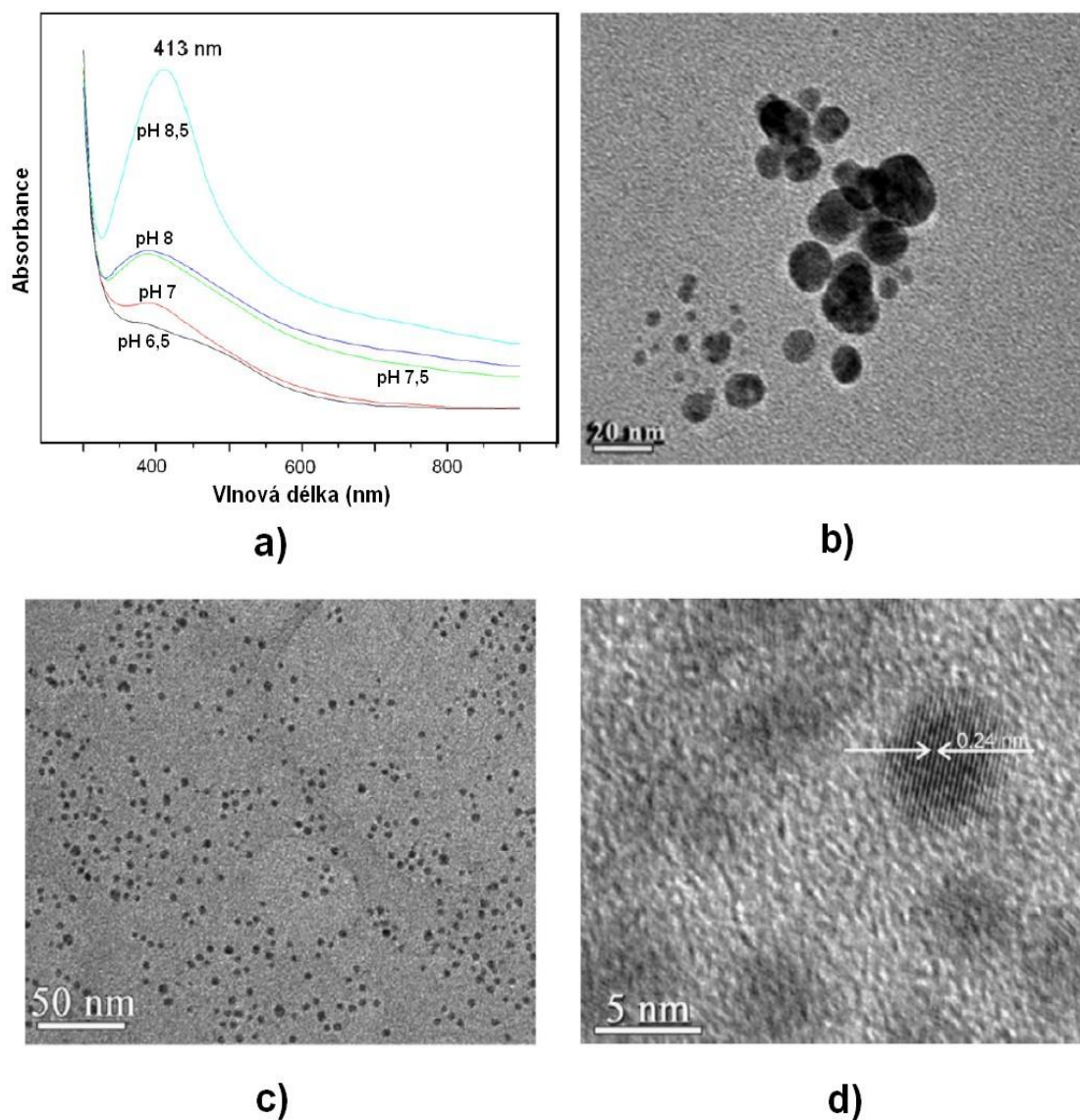
Ještě mnoho dalších rostlin bylo úspěšně použito při biosyntéze stříbrných či zlatých nanočástic. Jmenovat můžeme extrakt z listů *Aloe vera*, který vedl k syntéze stříbrných nanočástic s velikostí $15,2 \pm 4,2$ nm [20], nebo výluh z listů *Hibiscus rosa sinensis* (česky ibišek), kterým se podařilo připravit stříbrné nanočástice různého tvaru v závislosti na pH roztoku [32]. Mezi další použité rostliny patří například *Eucalyptus hybrida* (česky blahovičník), *Phytolacca decandra* (česky ličidlo obecné), *Capsaicum annum* (česky paprika setá), *Glycine max* (česky sója luštinatá) nebo *Cicer arietinum* (česky cizrna beraní) [18, 20, 26].

2.2.6 Syntéza nanočástic již zpracovanými potravinami

Samostatnou kapitolou green syntéz se stala příprava nanočástic za použití již zpracovaných potravin. Do této skupiny je možné zahrnout použití čaje, kávy, medu nebo například stolního vína. Tyto levné a komerčně běžně dostupné výrobky jsou příslibem budoucí ekologicky šetrné biosyntézy nanočástic ve velkém měřítku.

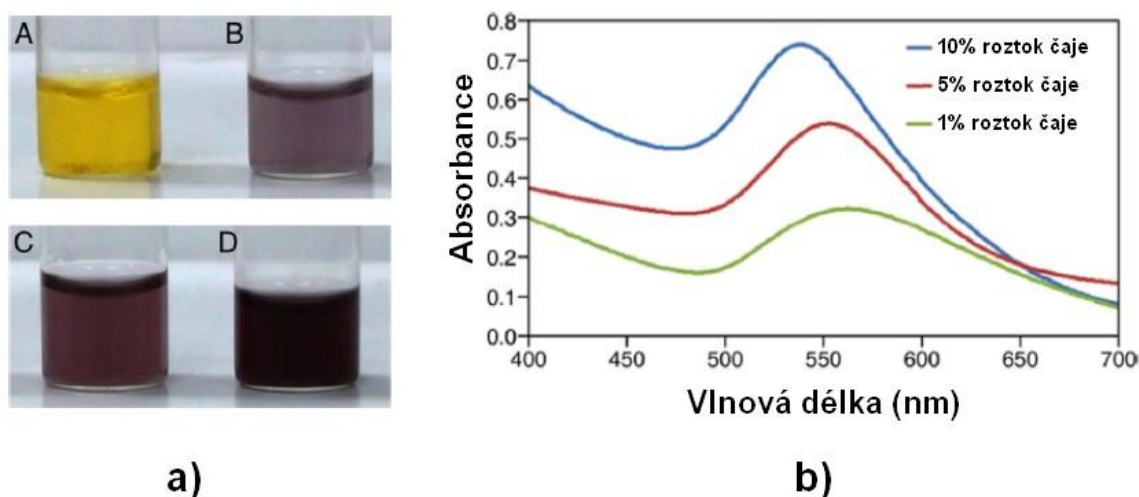
Jako velmi jednoduchá se ukázala být biosyntéza stříbrných nanočástic za pomoci medu [21]. Autoři zde rozpustili 20 g medu v 80 ml destilované vody a tento "naředěný med" smíchali s 20 ml vodného roztoku dusičnanu stříbrného (AgNO_3) o koncentraci 0,01 M. K iniciaci reakce byla použita změna pH vyvolaná přidáním malého množství hydroxidu sodného (NaOH). Celkem bylo vyzkoušeno pět různých hodnot pH z rozmezí 6,5 až 8,5 odstupňovaných po polovině jednotky. UV-vis analýzou vzniklých nanočástic bylo zjištěno, že se zvyšujícím se pH roztoku se snižuje velikost částic a zároveň se zužuje distribuce velikostí (viz obrázek 10a). Při pH 8 byly syntetizovány téměř sférické nanočástice s průměrnou velikostí 4 nm. Na fotografiích

pořízených transmisním elektronovým mikroskopem s vysokým rozlišením je jasné patrná krystalická mřížka s meziatomovou vzdáleností 0,24 nm, což napovídá, že se jedná o zlaté krystaly s orientací (111) (viz obrázek 10d). Naopak větší nanočástice syntetizované za nižší hodnoty pH se zdají být anizotropní. Autoři předpokládají, že redukčním činidlem je v případě medu glukóza a roli stabilizačního činidla hraje některý z přirozeně se v medu vyskytujících proteinů.



Obr.10: Analýza stříbrných nanočástic syntetizovaných medem za různých hodnot pH:
a) Porovnání UV-vis spekter vzniklých koloidních roztoků s různým pH,
b) TEM snímek různorodých nanočástic z roztoku s nejnižší hodnotou pH (6,5),
c) TEM snímek uniformních nanočástic z roztoku s nejvyšší hodnotou pH (8,5),
d) HRTEM snímek nanočástice z roztoku o pH 8,5 s viditelnou krystalickou strukturou.
Převzato a upraveno z [21].

Podobně jednoduchá jako syntéza medem je i jednokroková příprava nanočástic výluhem z černého čaje [33]. Autoři připravili zásobní roztok čaje louhováním běžně dostupného černého čaje (darjeeling) po dobu 15 minut za intenzivního míchání. Následnou filtrací byla z roztoku odstraněna biomasa čaje a tento čirý roztok byl poté smíchán s malým množstvím vodného roztoku tetrachlorozlatitanu (HAuCl_4). Během 5 minut se barva kapaliny změnila z jasně žluté na fialovou, což indikuje vznik zlatých nanočástic. Celá redukce zlata byla dokončena během 30 minut za pokojové teploty. Celkem byly provedeny tři syntézy s různou koncentrací čaje na počátku reakce a to 10 %, 5 % a 1 % koncentrace oproti zásobnímu roztoku (viz obrázek 11a). Následně byla zkoumána závislost velikosti vzniklých nanočástic na této koncentraci. Bylo zjištěno, že čím větší je koncentrace čajového výluhu v roztoku, tím menší částice jsou formovány (viz obrázek 11b).



Obr.11: Nanočástice syntetizované roztokem černého čaje o různé koncentraci.
a) Fotografie výsledných koloidních roztoků s různou koncentrací zásobního roztoku na počátku reakce: A – 0 %, B – 1 %, C – 5 % a D – 10 % připraveného roztoku čaje.
b) UV-vis analýza vzniklých koloidních roztoků o různé počáteční koncentraci čaje.

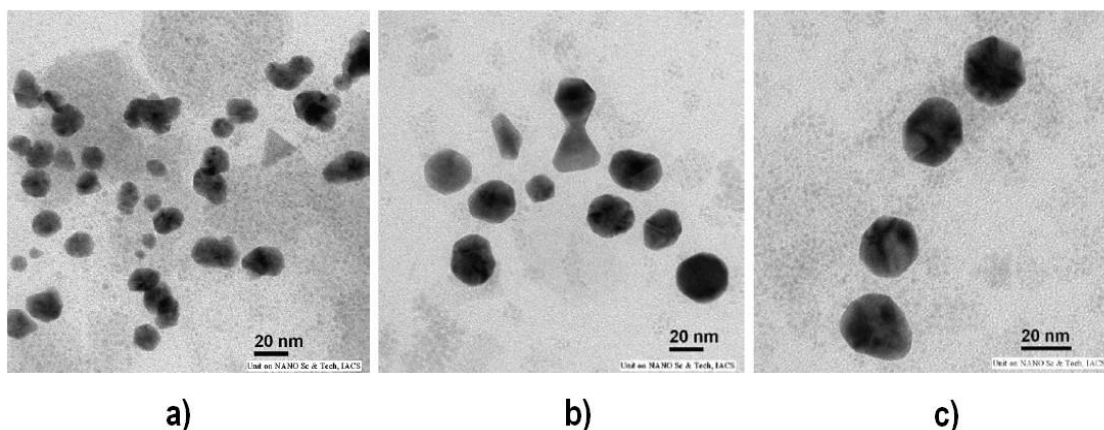
Převzato a upraveno z [33].

Podrobnější studie možnosti využití výluhu černého čaje pro biosyntézu zlatých i stříbrných nanočástic je popsána v [34]. Celkem byly použity tři různé extrakty z černých čajových lístků - “klasický” výluh čaje ve vodě, extrakt čaje získaný ethylacetátem ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) a extrakt získaný pomocí dichlormethanu (CH_2Cl_2). Jako čtvrtý byl použit roztok quercetinu, který se vyskytuje v čajových listech a je jednou z možných látek, která může mít vliv na syntézu nanočástic. Quercetin patří mezi flavonoidy, látky vyskytující se v tělech rostlin známé pro své vysoké antioxidační účinky. Je nutné dodat, že quercetin použitý ve čtvrtém roztoku byl při výrobě získán též z černého čaje. Pro výrobu zásobních roztoků autoři použili běžně dostupný černý čaj z místního obchodu (výzkumný tým je z Indie). Ve 400 ml vody bylo povařeno 180 g čajové směsi a výsledný výluh byl opakovaně filtrován, dokud nebyl zcela zbaven pevné složky. Část tohoto roztoku byla oddělena (roztok č.1)

a zbytek byl použit pro získání ethylacetátového roztoku (č.2) a roztoku dichlormethanu (č.3).

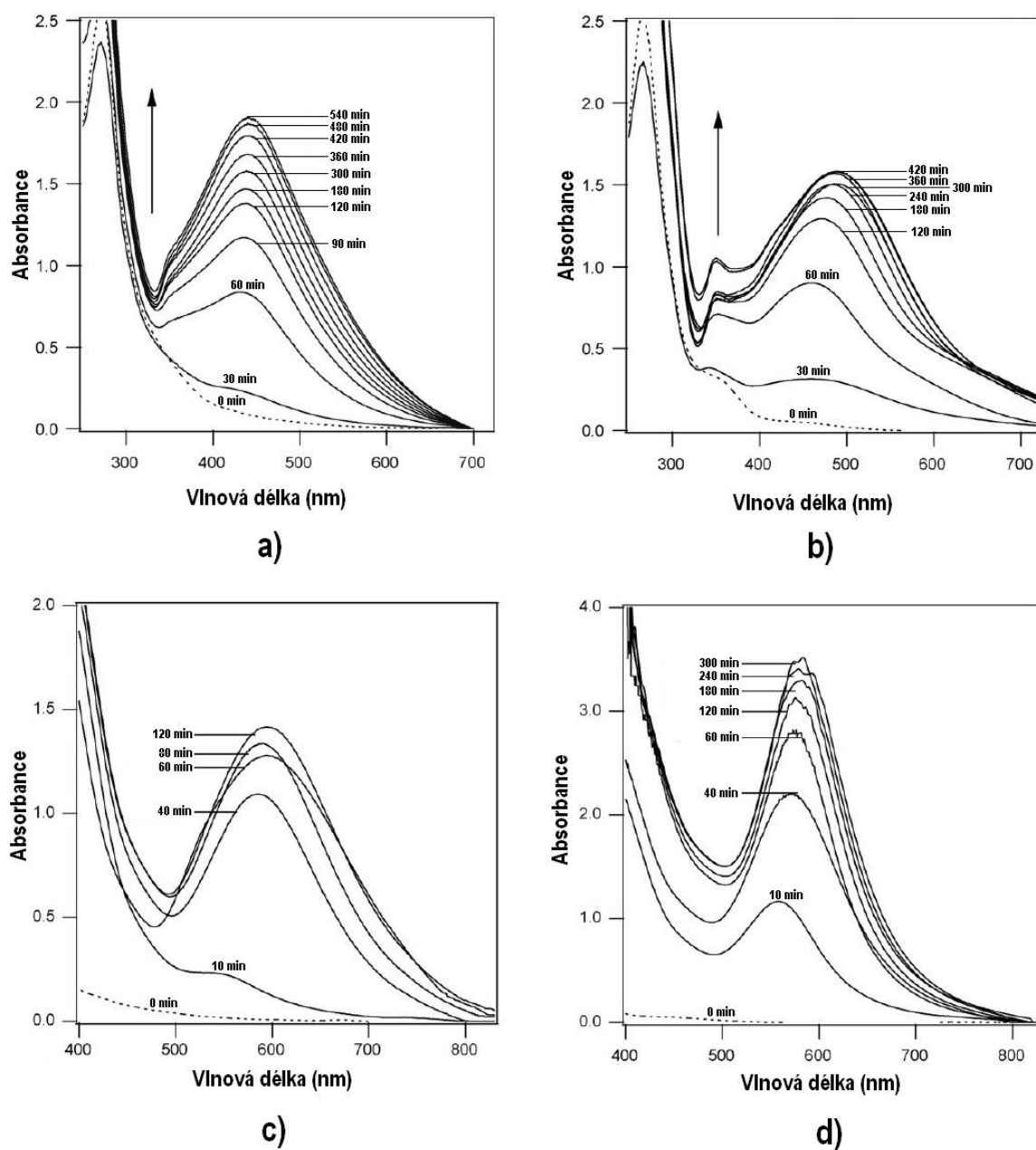
Samotná syntéza spočívala ve smíchání roztoků č.1 - č.4 (quercetin) s vodnými roztoky dusičnanu stříbrného (AgNO_3) při výrobě stříbrných a tetrachlorozlatitanu (HAuCl_4) při výrobě zlatých nanočástic. Vždy bylo použito 75 μl roztoku prekursoru kovu o koncentraci 0,01 M a 10 ml jednoho ze čtyř připravených roztoků čaje/quercetinu. Reakce probíhala při teplotě 40 °C za neustálého míchání. Do 30 minut se barva roztoku vždy změnila, což indikovalo formování nanočástic příslušného kovu. Průběh reakce byl monitorován měřením UV-vis absorpčních spekter v přesně daných časových intervalech. Výsledná spektra časových průběhů reakcí prvních dvou roztoků (viz obrázek 13) ukazují, že výluh z čaje i jeho ethylacetátový extrakt jsou vhodnými redukčními činidly pro syntézu zlatých i stříbrných nanočástic. Výsledné nanočástice byly pro oba roztoky téměř shodné, avšak koloidní roztok stříbra ethylacetátu obsahoval nanočástice ze širšího rozsahu velikostí. V obou případech probíhala redukce stříbrných nanočástic výrazně pomaleji. Autoři v souvislosti s tím naznačují, že redukce zlata ($\text{Au}^{(\text{III})} \rightarrow \text{Au}^{(0)}$) je při použití extraktů z čaje za stejných podmínek kineticky jednodušší než redukce stříbra ($\text{Ag}^{(\text{I})} \rightarrow \text{Ag}^{(0)}$). V obou případech je však proces formování nanočástic podobný. Reakce ze začátku běží velmi rychle, ale postupem času se zpomaluje, až nakonec dojde k saturaci. Patrný je též rudý posuv v absorpčním spektru, který naznačuje shlukování nanočástic za tvorby větších struktur. Konečným výsledkem je však vždy stabilní koloidní roztok nanočástic, které již dále neagregují.

Na rozdíl od úspěšného použití prvních dvou roztoků bylo použití roztoku č.3 neúspěchem. Jeho pomocí se nepodařilo syntetizovat ani zlaté ani stříbrné nanočástice. Důvodem neúspěchu je pravděpodobně nepřítomnost polyfenolů/flavonoidů v čajovém extraktu získaném dichlormethanem. Při použití quercetinu jako roztoku č.4 byl zaznamenán jen poloviční úspěch. Podařilo se získat zlaté nanočástice velmi podobné těm získaným roztoky č.1 a č.2 (viz obrázek 12). V případě smíchání quercetinu a vodného roztoku dusičnanu stříbrného však syntéza nanočástic neproběhla. Zdá se tedy, že přestože quercetin hraje hlavní roli při redukci zlatých nanočástic, syntéza stříbrných nanočástic je zapříčiněna nějakým jiným polyfenolem/flavonoidem.



Obr.12: Porovnání zlatých nanočástic syntetizovaných různými druhy výtažků z čaje: a) vodným roztokem čaje, b) ethylacetátovým extraktem z čaje, c) roztokem quercetinu.

Převzato a upraveno z [34].

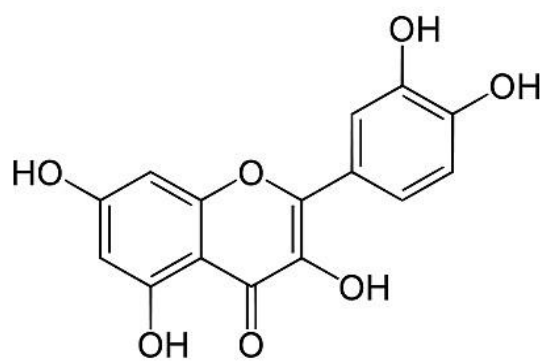


Obr.13: Časový vývoj syntézy nanočástic sledovaný UV-vis spektroskopií:

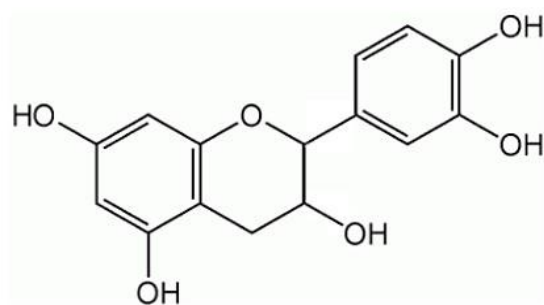
- a) syntéza stříbrných nanočástic roztokem č.1 a b) roztokem č.2,
c) syntéza zlatých nanočástic roztokem č.1 a d) roztokem č.2.

Převzato a upraveno z [34].

Fytochemikálii mající zodpovědnost za redukci stříbrných iontů by mohl být epikatechin, který je dalším z výrazných zástupců flavonoidů vyskytujících se v čajových lístcích (porovnání molekul quercetinu a epikatechinu viz obrázek 14). Roztokem epikatechinu se podařilo syntetizovat stříbrné nanočástice velmi podobné těm, které produkuje vodný roztok čaje [35].



a)



b)

Obr.14: Porovnání strukturních vzorců důležitých antioxidantů obsažených v čaji:
a) quercetin, b) epikatechin. Převzato a upraveno z [36, 37].

3 Experimentální část

Pro samotnou green syntézu nanočástic ušlechtilých kovů byly vybrány výluhy z běžně dostupných čajů a to především díky častému výskytu syntéz tohoto druhu v literatuře. Dalším rozhodujícím faktorem byla snadná dostupnost čaje v běžném obchodě s potravinami a jednoduchá příprava výluhů. V neposlední řadě je třeba zmínit finanční nenáročnost takovéto syntézy, která by v případě úspěchu byla vhodným kandidátem pro přípravu nanočástic ve větším měřítku.

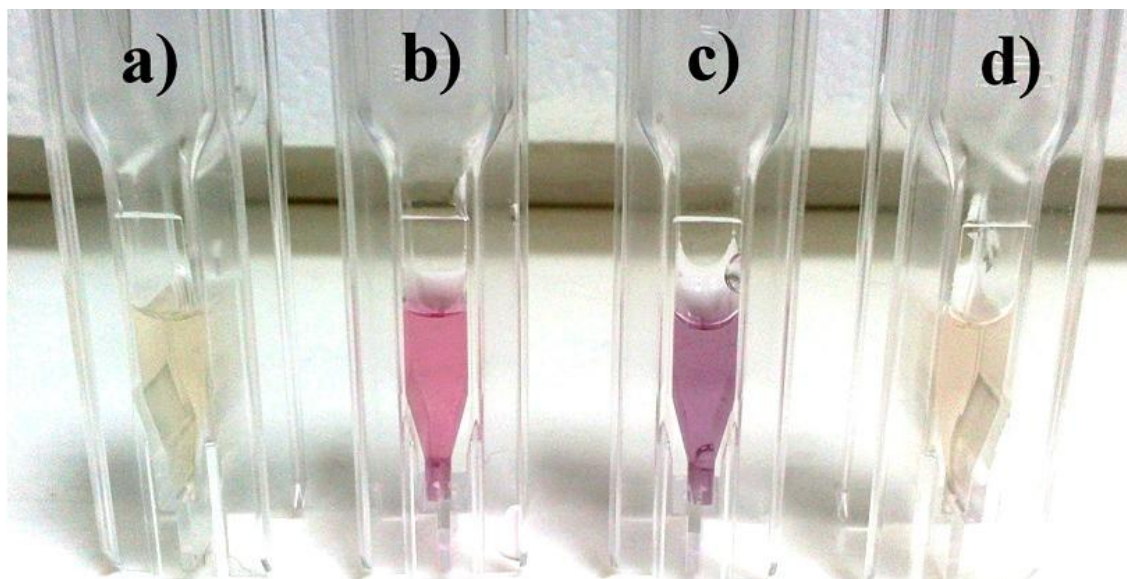
3.1 První pokusy přípravy nanočástic výluhy z čajů

Na samotném začátku bylo důležité najít správnou koncentraci výluhu z čaje, která by umožnila vznik nanočástic. Nejprve byl připraven výluh z čajových lístků sypaného zeleného čaje darjeeling v bio kvalitě. Použit byl standardní způsob přípravy čaje k následné konzumaci. Lístky byly zality horkou vodou a louhovány po dobu 5 minut. Čajový výluh byl poté přefiltrován. Následně bylo 10 ml tohoto extraktu smícháno s 1 mM roztokem tetrachlorozlatitanu. Bohužel nedošlo k žádné reakci. Důvodem byla pravděpodobně příliš vysoká koncentrace čajového výluhu.

Po několika nevydařených pokusech byly nakonec úspěšně syntetizovány první zlaté a stříbrné nanočástice. Použity byly výluhy z běžně dostupných porcovaných čajů a to zeleného a černého. Zde bylo 1,2 g daného čaje louhováno v 10 ml destilované vody po dobu 5 minut a výsledný roztok byl ihned poté zbaven pevné složky filtrací. Následně bylo 200 μ l čajového roztoku smícháno s 5 ml 1 mM roztoku tetrachlorozlatitanu. Během několika minut se barva roztoku změnila ze světle hnědé na tmavě fialovou, což indikovalo formování zlatých nanočástic. Experiment byl zopakován s roztokem dusičnanu stříbrného o stejné koncentraci. I zde došlo ke změně barvy roztoku, tentokrát ze světle hnědé na tmavě hnědou. Formování stříbrných nanočástic však probíhalo podstatně pomaleji než v případě nanočástic zlata. Změna barvy roztoku byla pozorovatelná zhruba za 30 minut od začátku reakce.

Výsledkem první úspěšné série pokusů byly čtyři různé koloidní roztoky nanočástic – zlaté a stříbrné nanočástice získané pomocí výluhu z černého čaje a zlaté a stříbrné nanočástice získané výluhem ze zeleného čaje (viz obrázek 15). Již pouhým okem byl viditelný rozdíl mezi barvou roztoků černého a zeleného čaje a to především u zlatých nanočástic. Jejich roztok získaný výluhem z černého čaje měl po naředění růžovou barvu, zatímco roztok získaný výluhem ze zeleného čaje se jevil více fialový. Je známo, že barva koloidních roztoků kovů závisí především na velikosti a tvaru dispergovaných částic. Procházející světlo vyvolá kolektivní oscilace elektronů na povrchu kovových částic, které jsou v rezonanci s určitou částí jeho spektra, jež je částicemi absorbováno. Tyto oscilace jsou známy pod pojmem povrchový plazmon. Jsou-li částice malé (zhruba do 30 nm v průměru), jejich rezonanční frekvence leží v modro-zelené části spektra (přibližně kolem 450 nm). Odstraněním modré části viditelného spektra se roztok jeví červený. Se zvyšující se velikostí částic se plazmonová rezonance posouvá k vyšším vlnovým délkám, což má za následek

absorpci převážně červené části viditelného spektra světla. Roztok se tedy jeví čím dál více fialový. Zvětší-li se velikost částice až na hranici objemového materiálu, plazmonová rezonance bude probíhat v infračervené části spektra, takže roztok bude bezbarvý/průsvitný [38]. Z porovnání barev vzniklých roztoků zlata lze tedy říci, že při syntéze černým čajem vznikly menší částice.

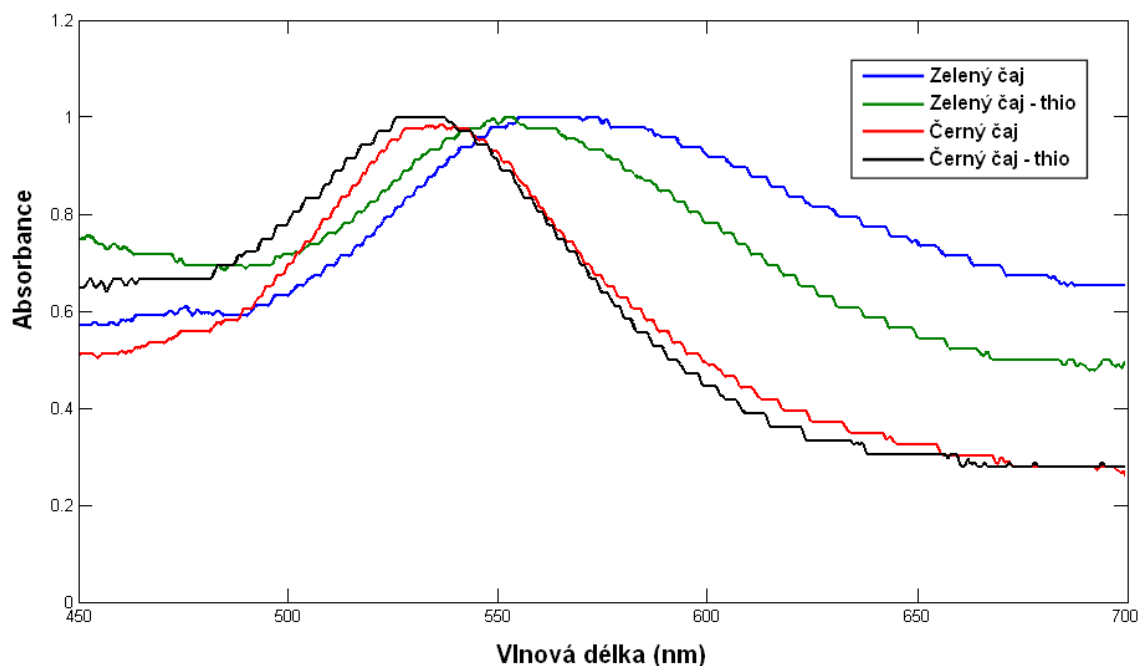


Obr.15: Fotografie roztoků: a) stříbrných, b) zlatých nanočástic syntetizovaných výluhem z černého čaje, c) zlatých, d) stříbrných nanočástic syntetizovaných výluhem ze zeleného čaje. Odlišná barva roztoků viditelná především mezi b) a c) napovídá, že každým výluhem z čaje byly připraveny nanočástice jiné velikosti. Dle fialovějšího zabarvení roztoku c) lze předpokládat, že částice syntetizované přidavkem zeleného čajem mají větší velikost.

3.2 Stanovení stability první série nanočástic

Pro zjištění stability částic byly provedeny dvě série spektrální analýzy. Nejprve byly roztoky nanočástic naředěny na 1/10 původní koncentrace a v tomto zředěném stavu podrobeny UV-vis spektrální analýze. Poté byly roztoky smíchány se sterickým stabilizátorem a následně centrifugovány, aby došlo k případné disperzi již agregovaných nanočástic. Jako stabilizátor byl použit 11-merkaptoundecyl hexa(etylen glykol) ($C_{23}H_{48}O_7S$), který systematicky patří mezi thioly. Následně byla znovu změřena absorpční spektra. Porovnání spekter thiolovaných a původních koloidních roztoků ukázalo, že částice lze považovat ze stabilní, neboť mezi spektry byl jen malý rozdíl (viz obrázek 16). Nanočástice připravené výluhem z černého čaje se ukázaly jako stabilnější, neboť vrchol obou píků leží v téměř shodné poloze. U nanočástic připravených přidavkem zeleného čaje došlo k většímu posuvu vrcholu píku i k jeho celkovému zúžení, což napovídá, že se v původním roztoku vyskytovaly

shluky agregovaných nanočástic, které byly centrifugací dispergovány a následně stabilizovány navázáním thiolových skupin na jejich povrch.



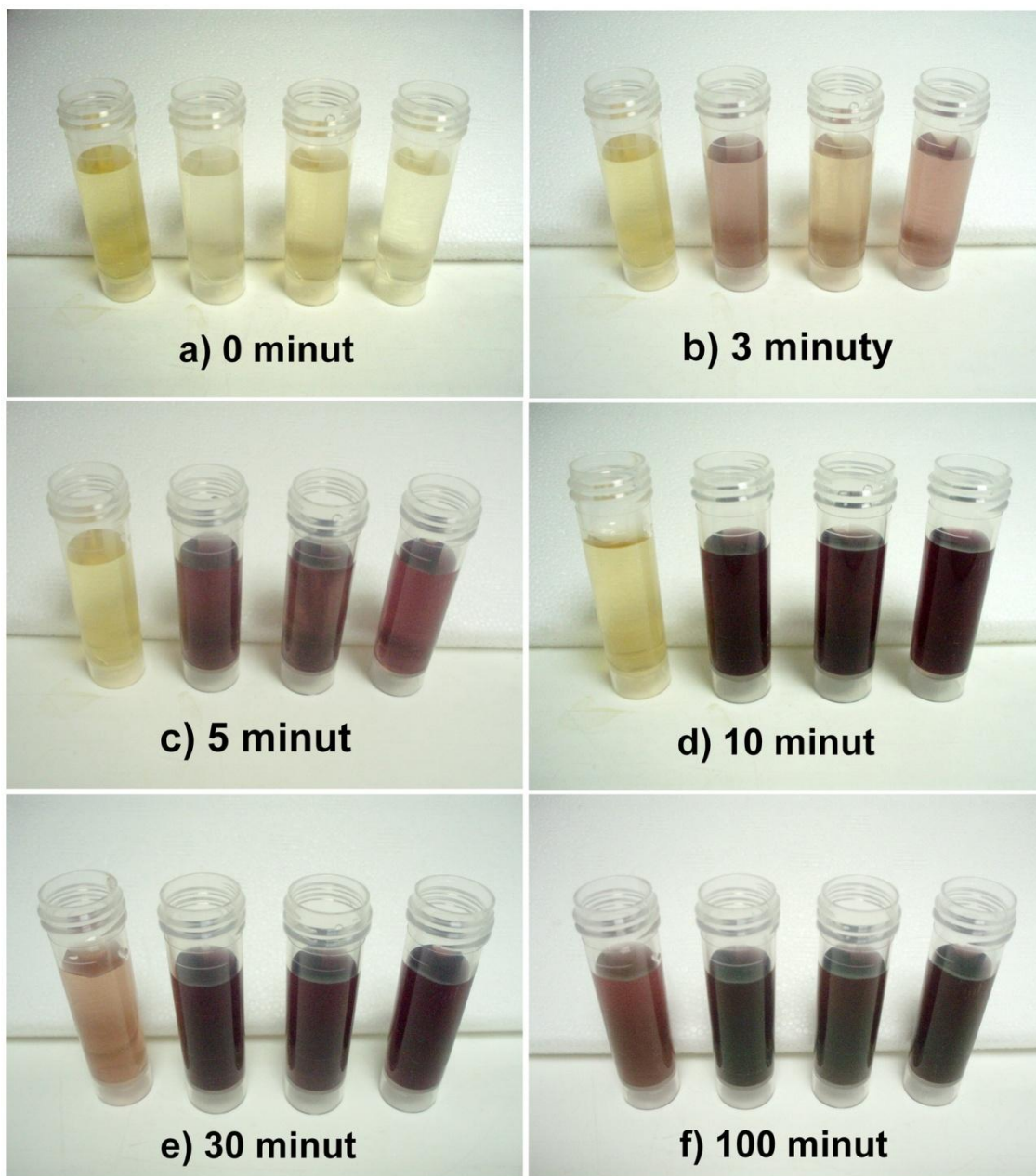
Obr.16: Porovnání spekter zlatých nanočástic původních a thiolovaných koloidních roztoků. U roztoku připraveného výluhem ze zeleného čaje je jasně patrné zúžení a posunutí píku směrem k nižším vlnovým délkám. U roztoku připraveného výluhem z černého čaje je zúžení o poznání menší.

3.3 Příprava zlatých a stříbrných nanočástic čtyřmi druhy čajů

Po úspěšném definování vstupních koncentrací výluhu z čaje byla provedena druhá sada experimentů, tentokrát již s výluhy ze čtyř různých čajů. Kromě zeleného a černého čaje byl použit ještě čaj bílý a rooibos, zvaný též červený čaj. Zásobní roztoky čajů byly připraveny stejně jako v případě první úspěšné syntézy. Vždy 1,2 g daného čaje bylo 5 minut louhováno v 10 ml destilované vody za občasného míchání při teplotě 80 °C. Roztok byl poté filtrací zbaven veškeré pevné složky a ponechán ke zchladnutí na pokojovou teplotu. Mezitím byly připraveny zásobní roztoky zlatých a stříbrných solí o koncentraci 1 mM. Pro syntézu zlatých nanočástic byl použit roztok tetrachlorozlatitanu (HAuCl_4) rozpuštěním 7,89 mg této soli ve 20 ml destilované vody. Pro syntézu stříbrných nanočástic pak roztok dusičnanu stříbrného (AgNO_3) rozpuštěním 3,39 mg soli ve 20 ml destilované vody. Jakmile měly zásobní roztoky stejnou teplotu, bylo smícháno vždy 200 μl výluhu z čaje s 5 ml roztoku prekursoru kovu.

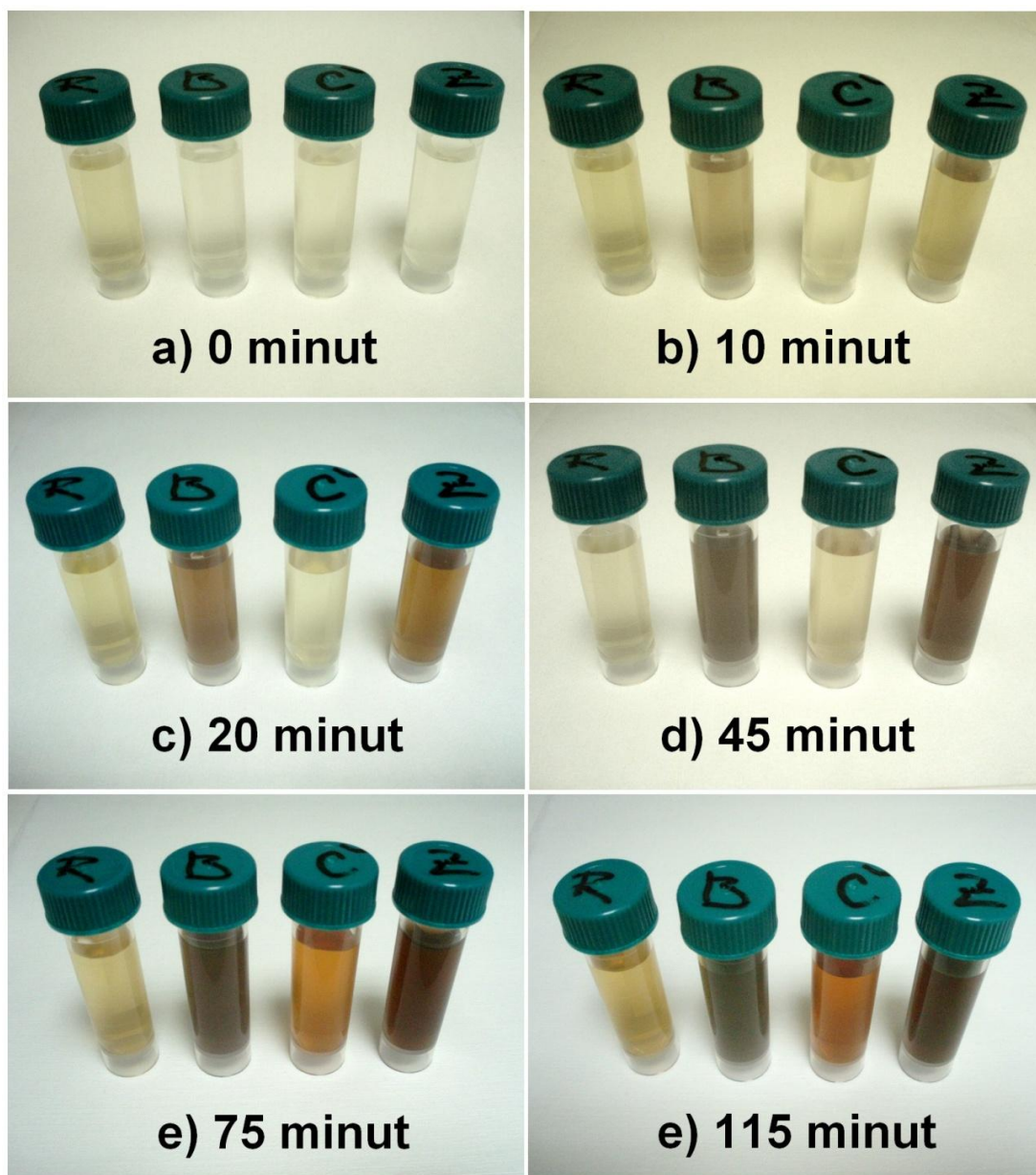
3.3.1 Časový vývoj reakce – pozorování barvy roztoků

Stejně jako v předchozím případě proběhla redukce zlata velmi rychle a již během několika minut měly roztoky sytě fialovou barvu. Jedinou výjimkou byl roztok syntetizovaný výluhem z rooibosu, který na sytě fialové zabarvení potřeboval více než 30 minut. Výsledná barva všech čtyř roztoků zlatých nanočástic však byla po zhruba 100 minutách téměř totožná (viz obrázek 17).



Obr.17: Fotografie časového vývoje barvy roztoků při syntéze zlatých nanočástic. Roztoky jsou seřazeny vždy stejně, zleva: rooibos, bílý čaj, černý čaj, zelený čaj. a) fotografie počáteční barvy roztoků ihned po smíchání výluhů čaje a solí kovů, b) – e) fotografie roztoků v odstupu 3, 5, 10 a 30 minut od začátku reakce. Zde je možné porovnat rychlost formování nanočástic pomocí jednotlivých výluhů čajů. f) fotografie konečného zbarvení roztoků, kterého bylo dosaženo za necelé 2 hodiny.

V případě stříbrných nanočástic byla změna barvy roztoku patrná za zhruba 15 minut u roztoků připravených výluhy ze zeleného a bílého čaje, které nakonec získaly sytě hnědou barvu. Roztok stříbrné soli se po přidání výluhu z černého čaje zabarvil zhruba po 60 minutách a jeho výsledná barva byla hnědo-červená. V případě výluhu z rooibosu trvala změna barvy opět nejdéle a to zhruba dvě hodiny. I zde byl časový vývoj všech reakcí fotograficky zachycen (viz obrázek 18).



Obr.18: Fotografie časového vývoje barvy roztoků při syntéze stříbrných nanočástic.

Roztoky jsou seřazeny vždy stejně, zleva: rooibos, bílý čaj, černý čaj, zelený čaj.

a) fotografie počáteční barvy roztoků ihned po smíchání výluhů čaje a solí kovů,

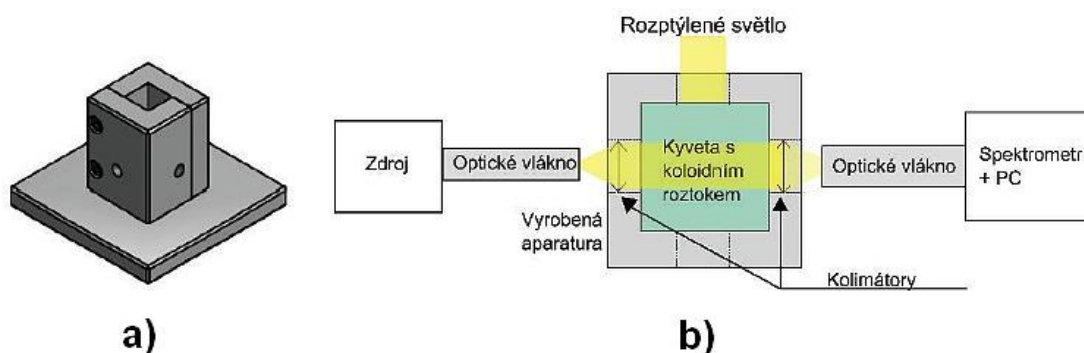
b) – e) fotografie roztoků v odstupu 10, 20, 45 a 75 minut od začátku reakce. Zde je možné porovnat rychlost formování nanočástic pomocí jednotlivých výluhů čajů.

f) fotografie konečného zbarvení roztoků, kterého bylo dosaženo za necelé 2 hodiny.

Oproti roztokům zlata je u roztoků stříbra daleko větší rozdíl v barvě roztoků částic získaných jednotlivými druhy čajů – rooibos je jasně nejsvětlejší, zelený čaj nejtmavší.

3.3.2 Časový vývoj tvorby nanočástic – spektrální analýza

Abychom měli jasnou představu o procesu tvorby nanočástic za pomoci výluhů z čaje, bylo provedeno sledování časového vývoje reakcí přímo ve spektrometru. Použit byl k tomuto účelu přípravek na měření spektrofotometrie vyrobený Ing. Rostislavem Měchem v rámci projektu IMPI² v roce 2014 (viz obrázek 19). Přípravek sestává z hranolu se čtyřmi otvory pro kolimátory, na každé stěně jeden. Uprostřed je místo pro vložení kyvety se vzorkem. Celý přípravek se následně přiklopí krytem, který odstíní okolní světlo. Tímto přípravkem lze měřit spektra nejen koloidních roztoků, ale i jiných materiálů jako jsou například uhlíkové nanotrubičky [3].

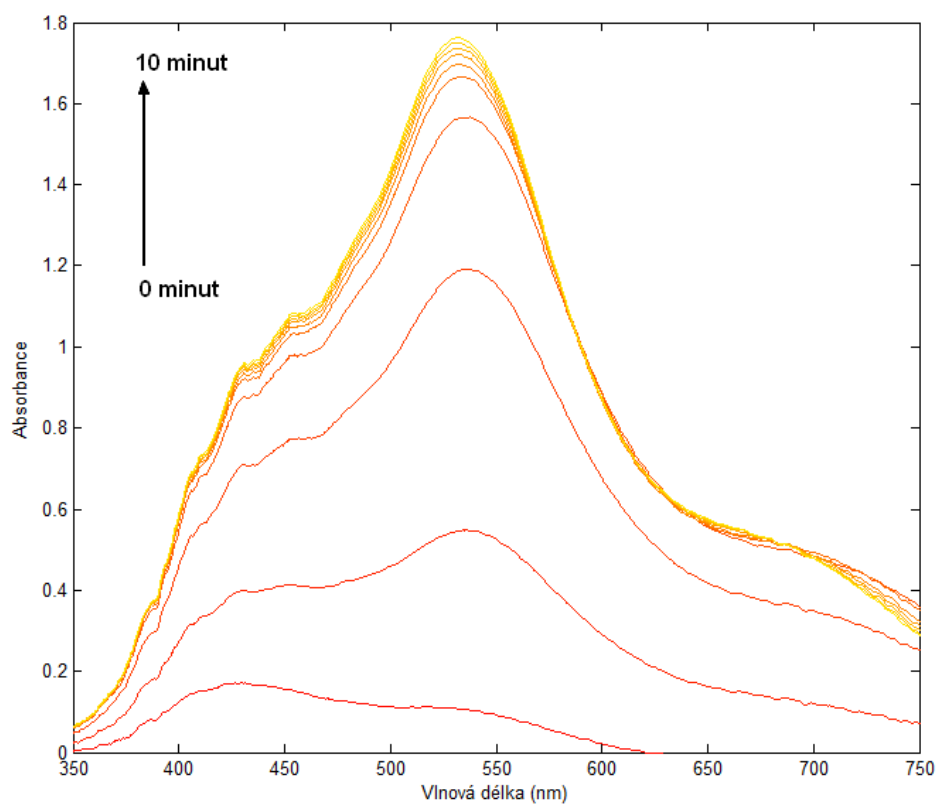


Obr.19: Aparatura použitá pro spektrální analýzu koloidních roztoků nanočástic.

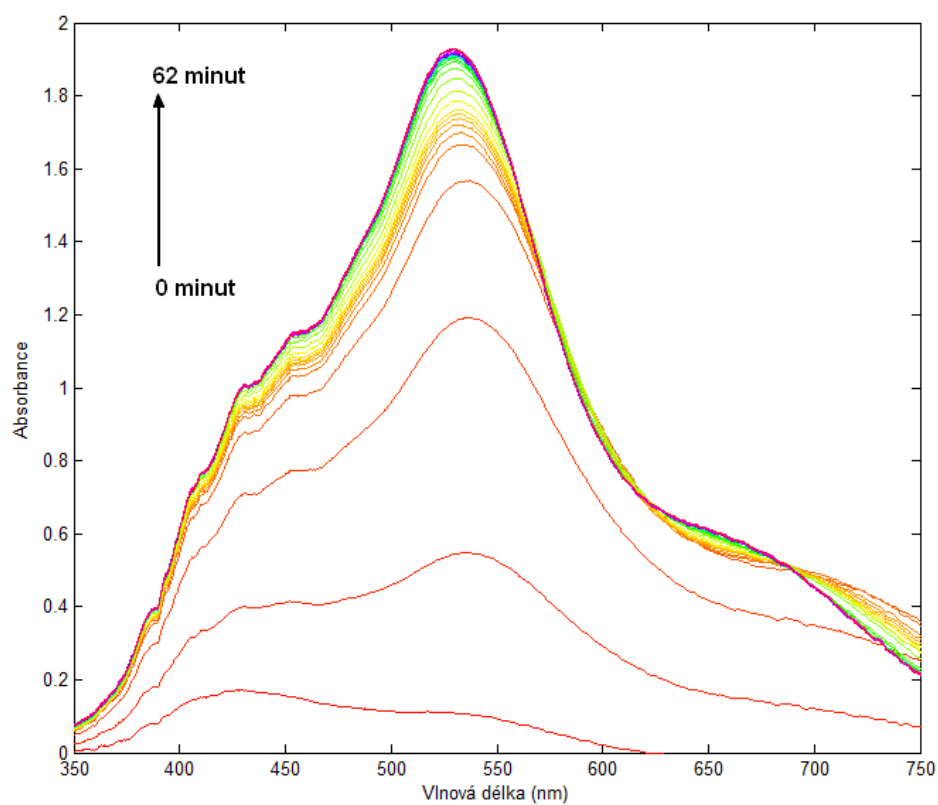
a) náčrtek speciálního přípravku, b) schéma měření na aparatuře. Převzato z [3].

Pro spektrální analýzu byly připraveny naředěné roztoky čajů přímo do kyvety, která se ihned po naplnění vložila do aparatury spektrofotometru. Byly sledovány časové vývoje všech čtyř syntéz zlatých nanočástic a jedné syntézy stříbrných nanočástic a to kvůli její vyšší časové náročnosti a několika nevydařeným pokusům. Roztoky byly vytvořeny následovně. V případě syntézy zlatých nanočástic bylo 0,25 ml zásobního roztoku tetrachlorozlatitanu smícháno s 10 μ l výluhu z čaje a s 0,75 ml destilované vody. V případě stříbrných nanočástic tento poměr nevyvolal žádnou reakci, takže koncentrace reagujících látek musela být zvýšena. Nakonec bylo použito 0,5 ml zásobního roztoku dusičnanu stříbrného, 20 μ l výluhu z čaje a 0,5 ml destilované vody. Spektra byla zachycována v pravidelných časových intervalech – prvních deset minut po 1 minutě, od desáté minuty po 2 minutách až do konce reakce (cca 60 až 90 minut). Naměřená spektra byla následně vyhodnocena v programu MATLAB a složena do jednoho grafu pro každý výluh z čaje (viz obrázky 20-25). V takto vytvořených grafech je možné sledovat vývoj rychlosti reakce a zároveň odhadnout velikost vznikajících nanočástic včetně jejich případné agregace. Pro lepší přehlednost průběhu reakce byly vyhotoveny dva grafy. První z nich mapuje začátek reakce, přesněji prvních 10 minut po minutovém intervalu. Druhý pak celou reakci včetně prvních 10 minut. Z porovnání obou grafů je patrné, že většina částic vznikne právě již v průběhu prvních 10 minut. Jedinou výjimku tvoří syntéza nanočástic výluhem z rooibosu.

² Inovace mezioborového studia přírodních věd a inženýrství - více viz <http://physics.fme.vutbr.cz/impi/>.

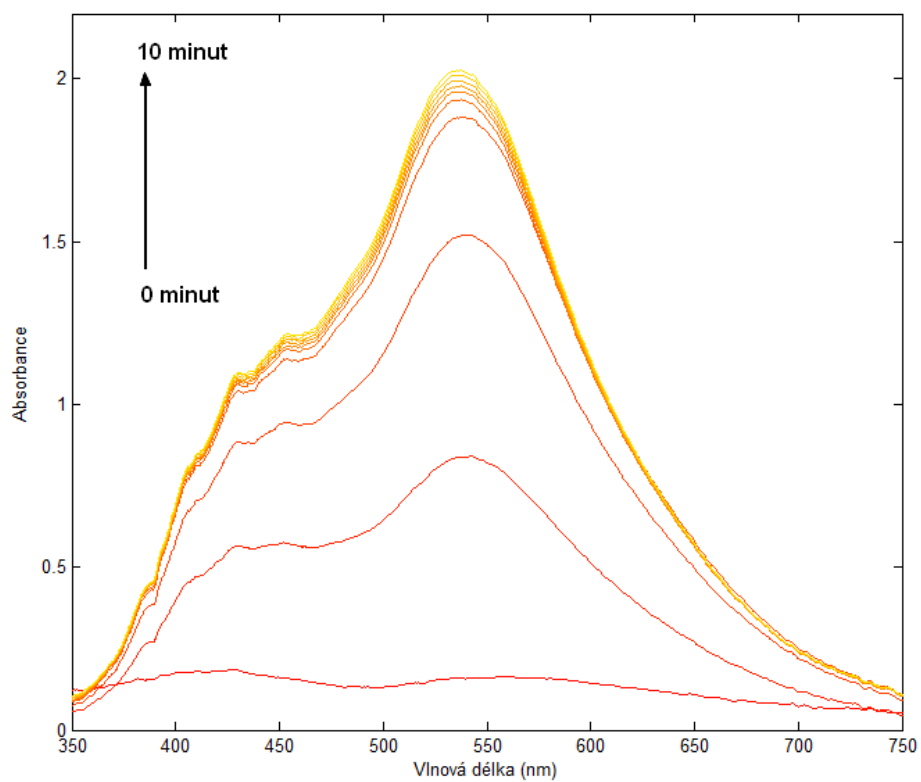


a)

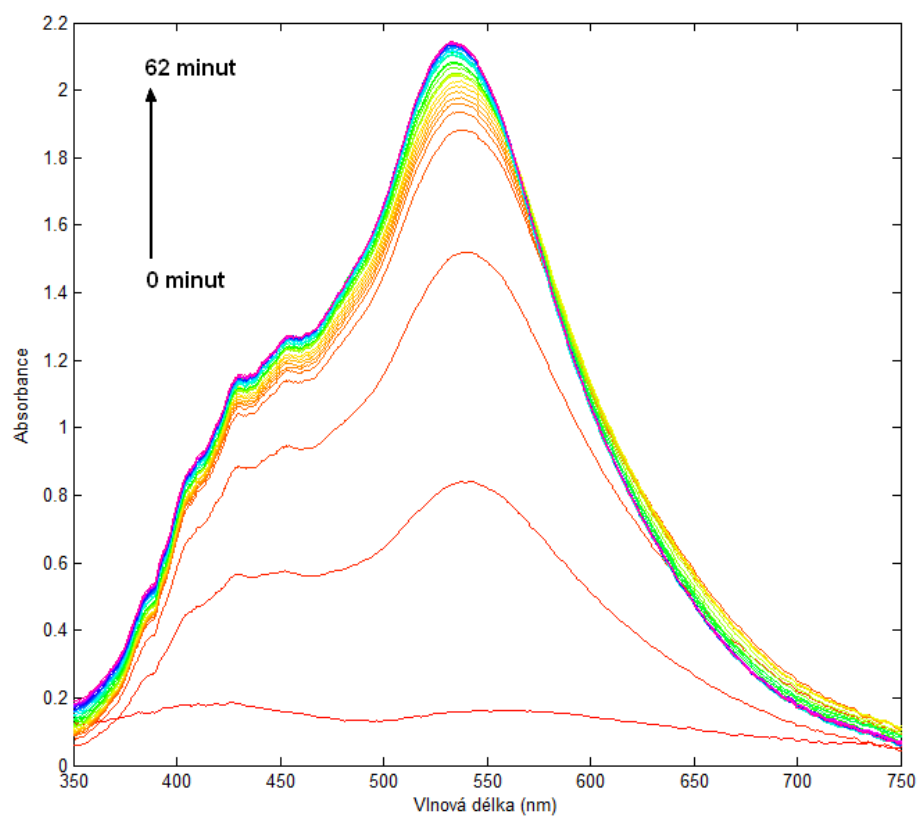


b)

Obr.20: Časový vývoj syntézy zlatých nanočástic výluhem z černého čaje.
a) spektra prvních deseti minut reakce, b) spektra od začátku do konce reakce (62 min)

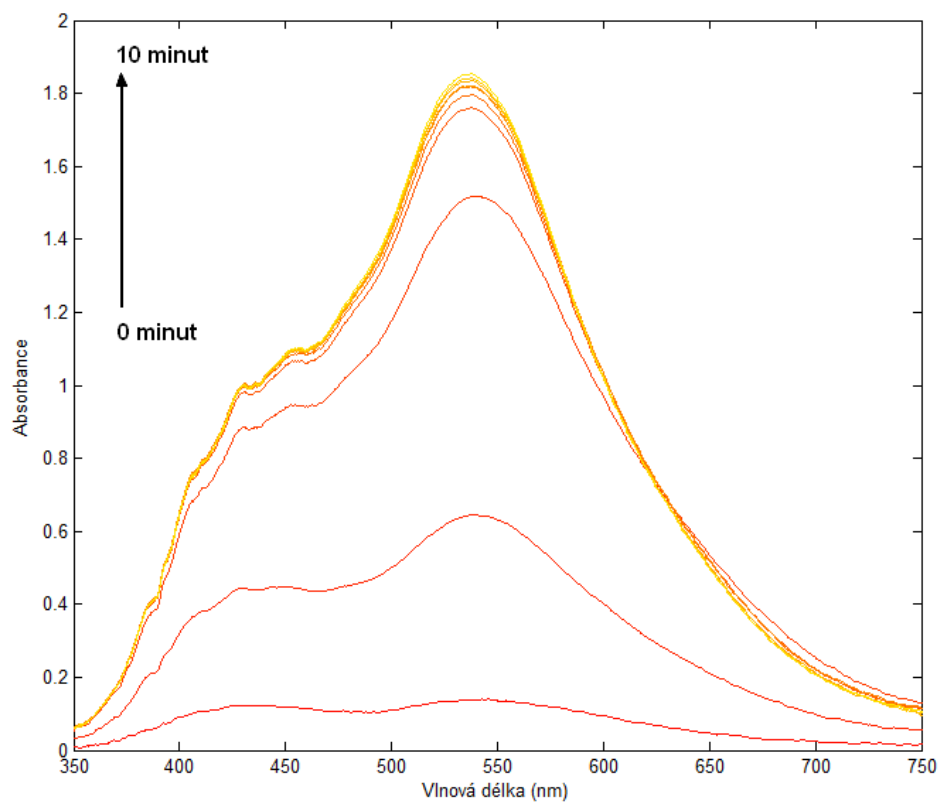


a)

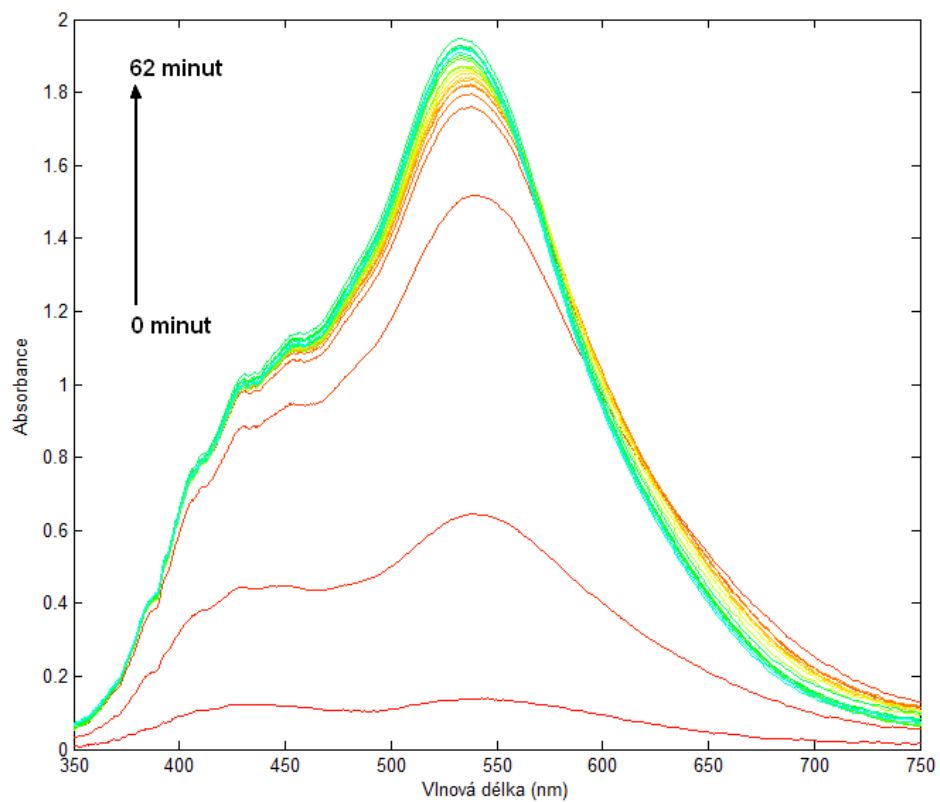


b)

Obr.21: Časový vývoj syntézy zlatých nanočástic výluhem ze zeleného čaje.
a) spektra prvních deseti minut reakce, b) spektra od začátku do konce reakce (62 min)

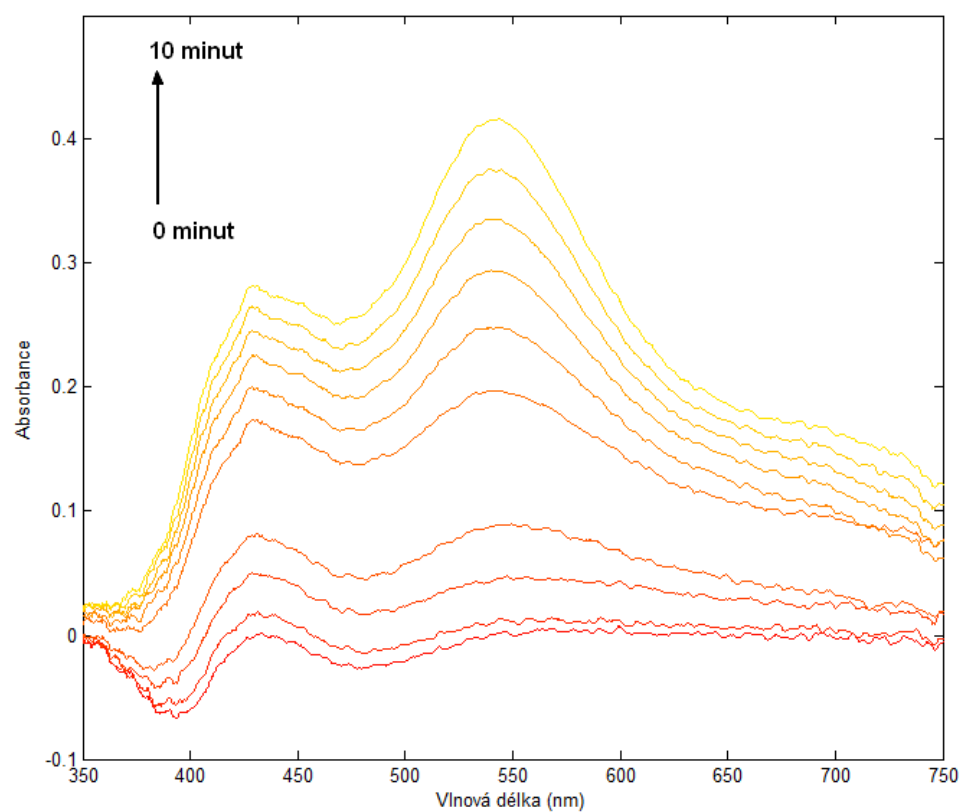


a)

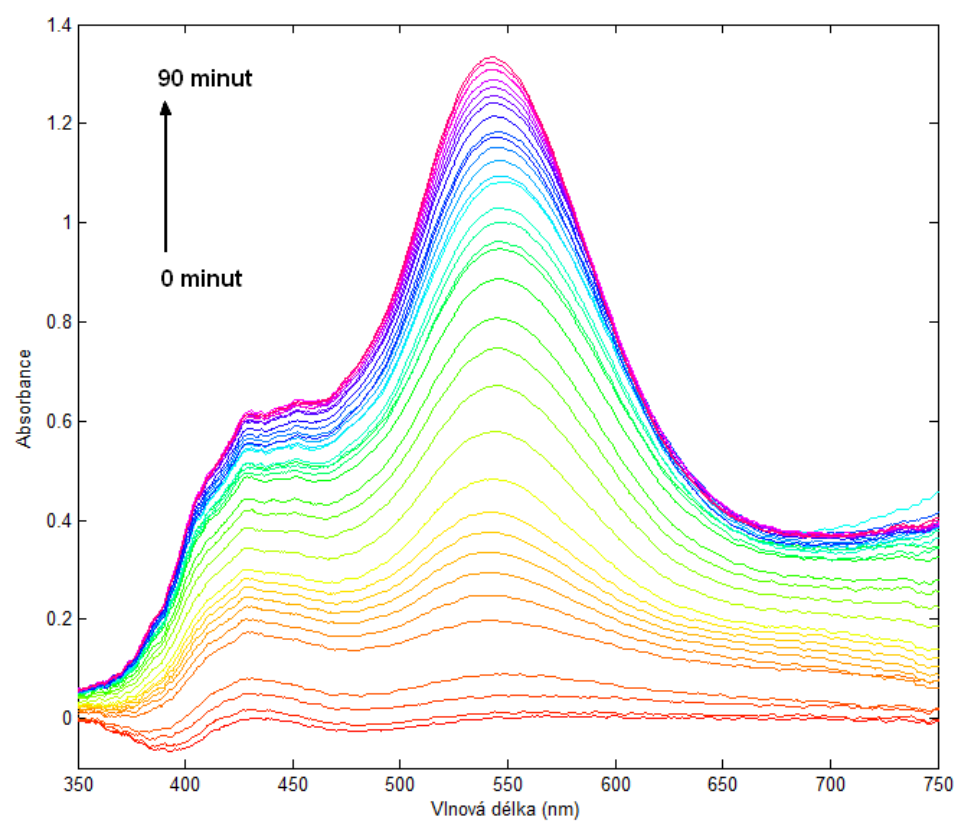


b)

Obr.22: Časový vývoj syntézy zlatých nanočástic výluhem z bílého čaje.
a) spektra prvních deseti minut reakce, b) spektra od začátku do konce reakce (62 min)



a)



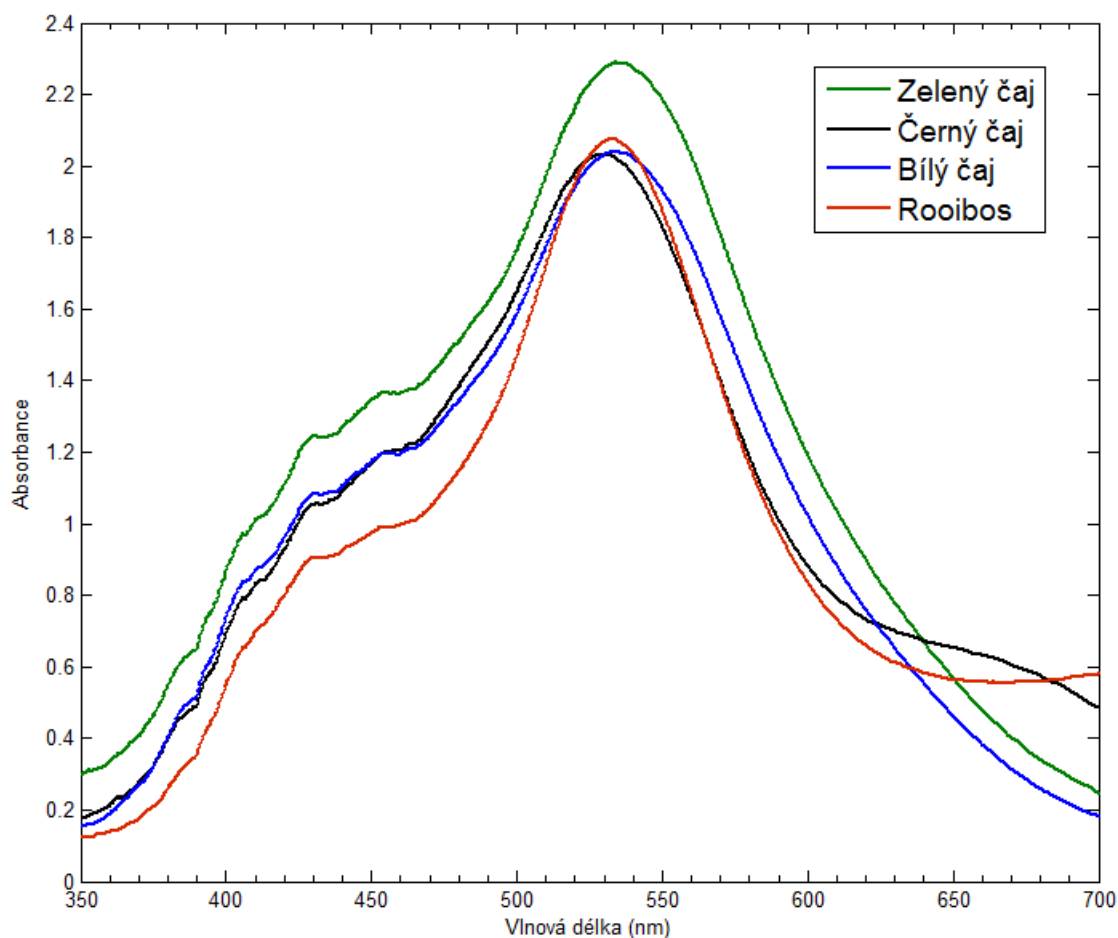
b)

Obr.23: Časový vývoj syntézy zlatých nanočástic výluhem z rooibosu.
a) spektra prvních deseti minut reakce, b) spektra od začátku do konce reakce (90 min)

Z grafů výše je patrné, že syntézy výluhem ze zeleného, černého a bílého čaje probíhají téměř totožně. V podstatě celý pík je zformován v průběhu prvních 10 minut a po zbylou dobu reakce se pouze lehce zvyšuje jeho intenzita. Většina částic tedy vznikne téměř okamžitě. Je důležité zdůraznit, že nedochází k posunu píku žádným směrem. Z toho lze usoudit, že nanočástice vznikající při této biosyntéze jsou velmi rychle stabilizovány a nedochází tak k jejich koagulaci.

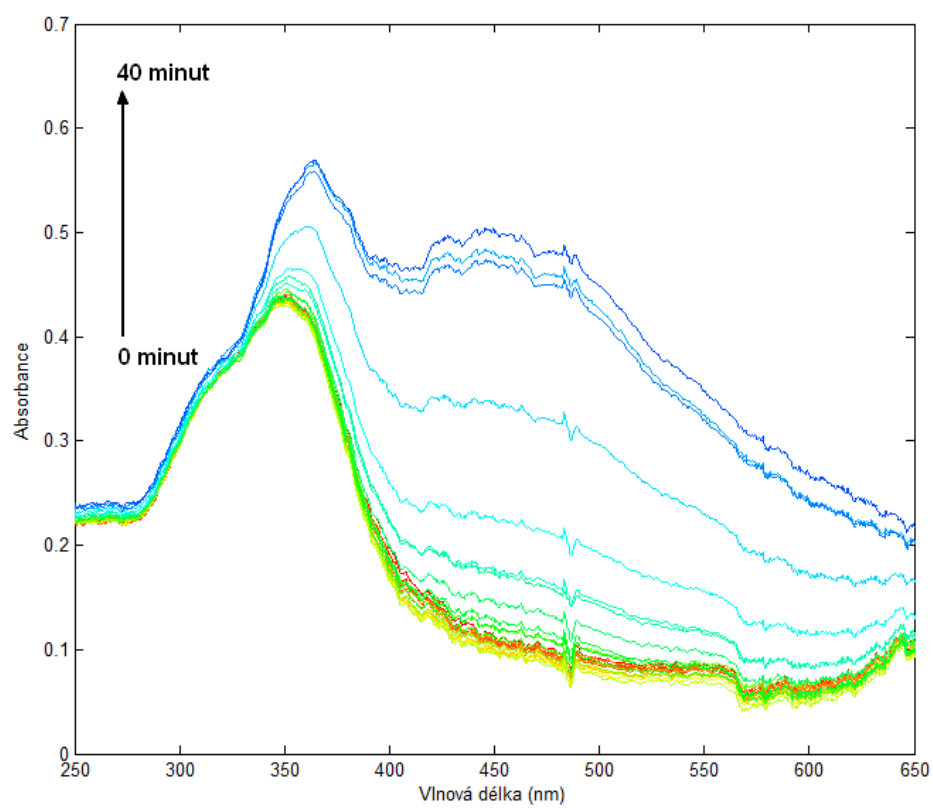
Syntéza zlatých nanočástic výluhem z rooibosu však probíhá jiným mechanismem. Z grafů je patrné, že částice jsou formovány postupně, téměř konstantní rychlostí. Až po 60 minutách se reakce dostane do podobné fáze jako u ostatních čajů po 10 minutách. Tento jev by mohl být způsobený odlišným chemickým složením výluhu rooibosu oproti ostatním čajům a to především absencí kofeinu, který je obsažen ve všech zbylých výluzích. Bílý, zelený i černý čaj je vyroben z lístků rostliny *Camellia sinensis*, které mohou být tvořeny až ze 7 % právě kofeinem. Navzájem se tyto čaje liší pouze technologií výroby, přesněji dobou fermentace – zelený čaj je nefermentovaný, bílý jen lehce fermentovaný a černý čaj je dokonale fermentovaný. Fermentace je přirozený kvasný proces, který probíhá v listech čajovníku od jejich utržení. Jedná se v podstatě o oxidaci polyfenolů, které tvoří až 30 % čajových lístků. Naproti tomu čaj rooibos je vyroben z lístků rostliny *Aspalathus linearit*, která obsahuje menší množství polyfenolů a žádný kofein. Nicméně je bohatá na vitamin C a jiné antioxidanty, které se mohou podílet na syntéze nanočástic ať už jako redukční nebo stabilizační činidla.

Pro konečné porovnání zlatých nanočástic syntetizovaných pomocí jednotlivých výluhů byl vytvořen graf sestávající ze spekter koloidních roztoků naměřených po 24 hodinách od začátku reakce (viz obrázek 24). Z grafu je dobře vidět, že spektra všech čtyř koloidních roztoků mají v podstatě stejný průběh. Poloha vrcholů píků jednotlivých spekter je téměř totožná, pohybuje se v rozmezí 531 až 535 nm. Pokud by byly roztoky monodisperzní, tento rozptyl vlnových délek by dle [38] ukazoval na částice o velikosti zhruba 40 až 50 nm a to za předpokladu, že částice mají sférický tvar. Roztoky však s velkou pravděpodobností budou složeny z nejméně dvou frakcí velikostí, neboť jsou naměřená spektra poměrně široká. Nalevo od vrcholu hlavního píku je též možné pozorovat obrys menšího píku, který byl pohlcen právě píkem hlavním. Vrcholek malého píku by pravděpodobně ležel ve vlnových délkách kolem 500 nm, což ukazuje na možný výskyt nanočástic velmi malých rozměrů, řádově v jednotkách nm. Je překvapivé, že nejširší pík ze všech vykazuje koloidní roztok nanočástic připravených zeleným čajem, neboť ten je přirozeně nejbohatší na polyfenoly, které by měly částice nejen formovat, ale též stabilizovat. Zdá se však, že zde naopak bylo vytvořeno největší množství různých druhů nanočástic. V tomto případě lze předpokládat, že alespoň malá část vzniklých nanočástic bude větších rozměrů, řádově stovek nm. Na druhou stranu nejužší pík vykazuje roztok nanočástic připravených výluhem z rooibosu. Z toho lze usuzovat, že obsahuje nejvíce uniformní částice. Konečná absorbance roztoků nanočástic syntetizovaných výluhem z rooibosu, černého a bílého čaje dosáhla hodnoty kolem 2, u výluhu ze zeleného čaje pak 2,2.

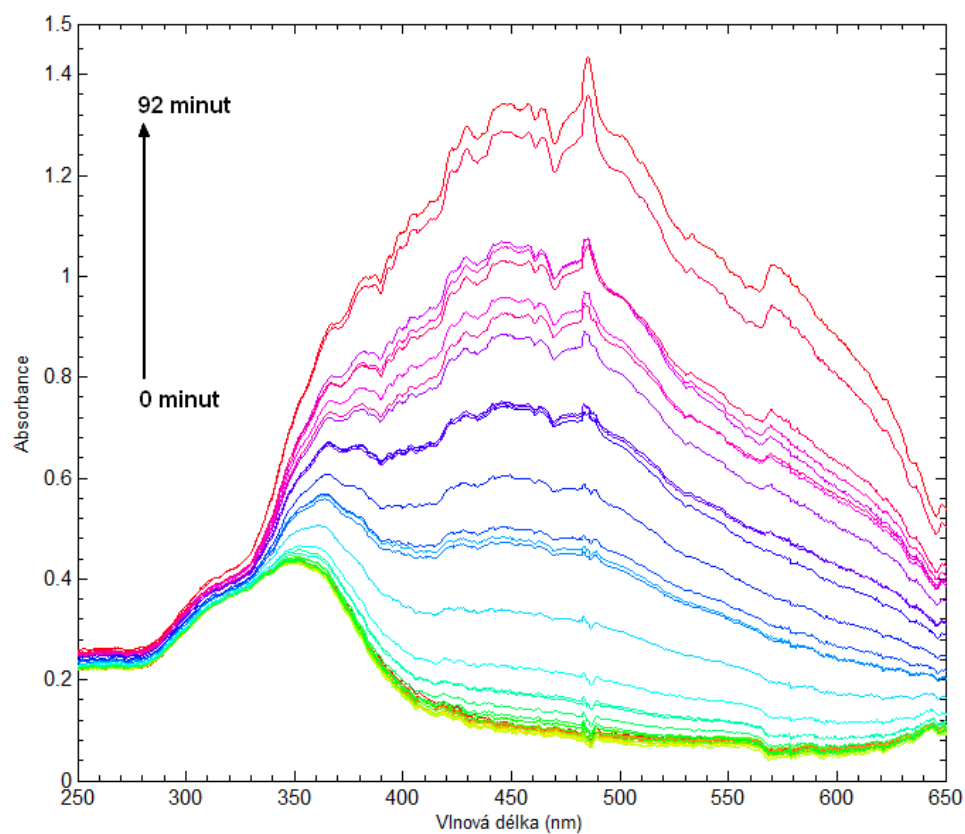


Obr.24: Porovnání výsledných spekter roztoků zlatých nanočástic naměřených po 24 hodinách od začátku reakce. Vrcholy píků jednotlivých spekter leží v poloze: 531,5 nm pro přidavek černého čaje, 533,1 nm pro přidavek rooibosu, 533,5 nm pro přidavek bílého čaje a 535,5 nm pro přidavek zelené čaje k roztoku zlaté soli.

Časový vývoj spekter při syntéze stříbrných nanočástic je o poznání složitější (viz obrázek 25). V prvních 30 minutách dochází jen k minimální reakci. Po 40 minutách se začíná objevovat první pík, který je poměrně úzký a má vrchol zhruba kolem 370 nm, což pravděpodobně indikuje vznik velmi malých stříbrných nanočástic. Současně s ním se objevuje druhý velmi široký pík s vrcholem okolo 450 nm. Po 60 minutách však tento široký satelitní pík získá „převahu“ a v podstatě pohltí první pík. Dle [39] takto široký pík s vrcholem v okolí 450 nm vykazují stříbrné nanočástice o průměru 70 nm. Tyto částice pravděpodobně vznikají koagulací menších, dříve vzniklých nanočástic, které jsou v konečné fázi reakce s velkou pravděpodobností přítomny už jen v minimálním množství. Kromě komplikovaného procesu syntézy se navíc zdá, že reakce probíhá skokově, jakoby se v určitých momentech téměř zastavila. Nejvíce je tento jev patrný kolem padesáté minuty od začátku reakce (tmavě modrý „shluk“ spekter), kdy se široký pík stává majoritním. Pro tento fenomén však nebylo nalezeno uspokojivé vysvětlení.



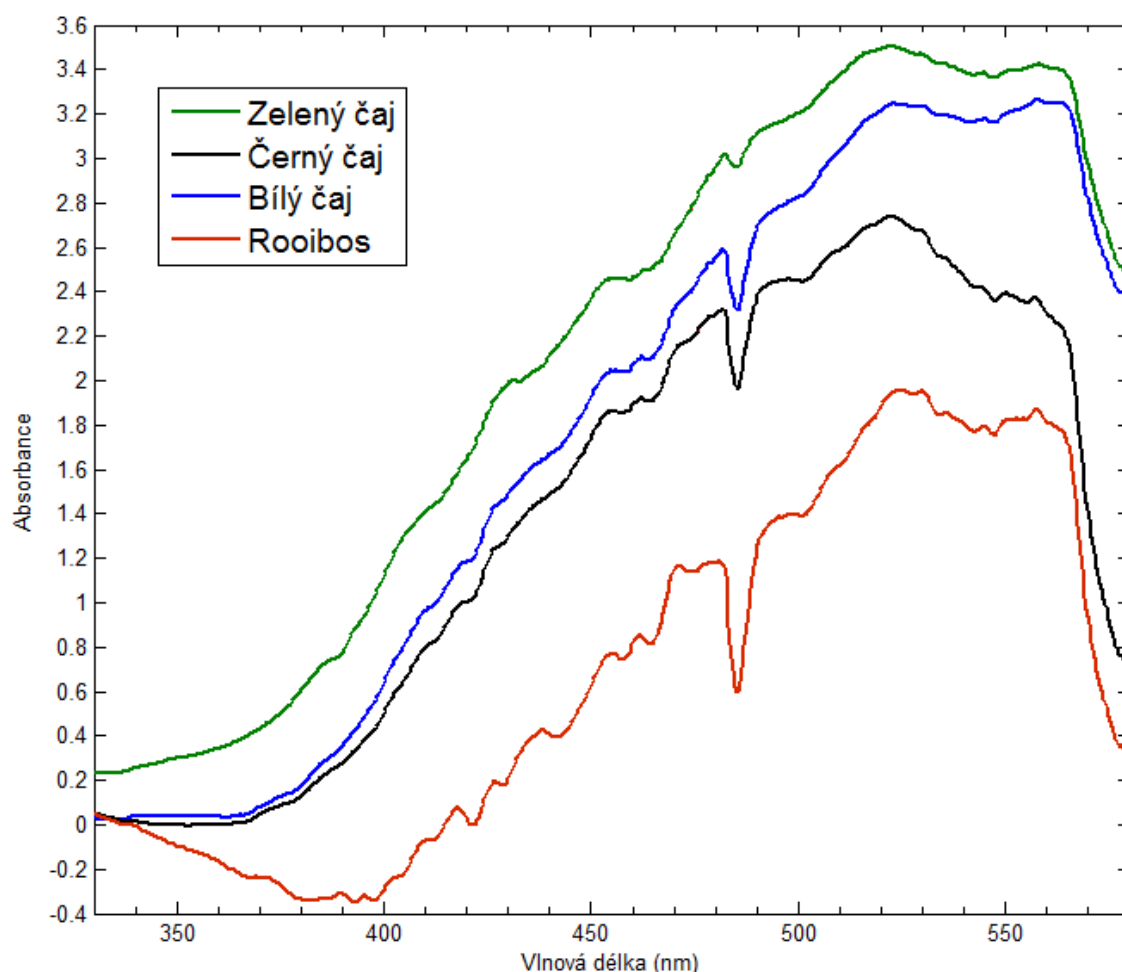
a)



b)

Obr.25: Časový vývoj syntézy stříbrných nanočástic výluhem ze zeleného čaje.
a) spektra prvních 40 minut reakce, b) spektra od začátku do konce reakce (92 min)

Stejně jako v případě zlatých nanočástic, tak i zde byla naměřena výsledná spektra všech čtyřech roztoků po 24 hodinách od počátku reakce (viz obrázek 26). Spektra opět vykazují stejný průběh, nicméně je zde velký rozdíl v konečné hodnotě absorbance. Nejnižší hodnota absorbance 1,95 byla naměřena u roztoku stříbrných nanočástic připravených výluhem z rooibosu a nejvyšší hodnota 3,50 u roztoku připraveného výluhem ze zeleného čaje. Koloidní roztok připravený reakcí bílého čaje s dusičnanem stříbrným vykazuje absorbanci 3,24 a roztok připravený reakcí s černým čajem pak 2,73. Takto markantní rozdíl v absorbanci světla je pozorovatelný i pouhým okem. Zatímco roztoky připravené v přítomnosti rooibosu a černého čaje jsou průsvitné, roztoky po přidavku zeleného a bílého čaje působí kalným dojmem. Nejvyšší poloha píku všech spekter je nicméně velmi podobná a leží v rozmezí 521 až 525 nm. Vzhledem k velké šířce píku však lze jen těžko odhadnout rozložení velikostí vzniklých nanočástic.



Obr.26: Porovnání výsledných spekter roztoků stříbrných nanočástic naměřených po 24 hodinách od začátku reakce. Vrcholy píků jednotlivých spekter leží v poloze:
 521,6 nm pro výluh ze zeleného čaje, 522,2 nm pro výluh z černého čaje,
 523,9 nm pro výluh z bílého čaje a 525,2 nm pro výluh z rooibosu.

3.4 Charakterizace syntetizovaných nanočástic

Přestože UV-vis spektrální analýza koloidních roztoků nanočástic by se též dala zařadit do kapitoly charakterizace, byla přidružena k přípravě nanočástic, neboť nejvíce mapuje samotný průběh reakce. Představa o velikosti vzniklých částic získaná její pomocí je však jen orientační a je nutno ji ověřit jinými technikami.

3.4.1 Analýza distribuce velikostí částic pomocí zetasizeru

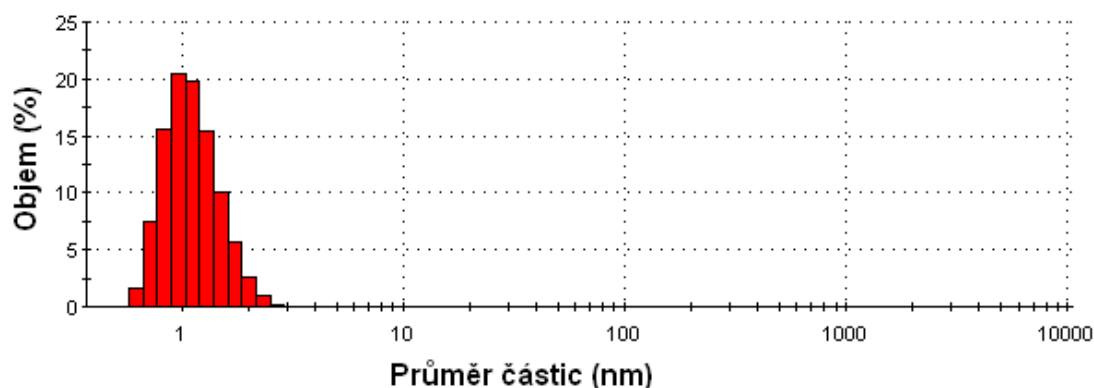
Pro zjištění distribuce velikostí vzniklých nanočástic byl použit zetasizer od výrobce Malvern, který umožňuje charakterizovat koloidní disperze měřením velikosti jejich částic. Přístroj je schopen měřit vzorky v širokém rozmezí koncentrací a velikostí částic od několika desetin nanometrů až do řádů několika jednotek mikrometrů. Pro měření velikosti částic v koloidním roztoku využívá zetasizer metodu dynamického rozptylu světla (DLS – Dynamic Light Scattering). Vzorek je zde osvětlován monochromatickým světlem z helium-neonového laseru o vlnové délce 633 nm, které je částicemi rozptylováno. Přístroj sleduje fluktuace intenzity rozptýleného světla, které vznikají neustálým neuspořádaným pohybem částic v roztoku. Na základě toho je určen difúzní koeficient, ze kterého lze spočítat velikost částic pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice. Výstupem měření je pak intenzitní distribuce velikostí částic, jež lze převést na objemovou distribuci velikostí, ve které je lépe zohledněn objem částic rozptylujících světlo [40, 41].

Pro všech osm roztoků nanočástic získaných výluhy z čajů byla změřena objemová distribuce částic (viz obrázky 27-34). Byla vždy provedena série tří měření pro každý roztok. Výsledné hodnoty rozdělení velikosti částic jsou zaznamenány v tabulce níže. Červeně jsou vyznačeny částice o velikosti neodpovídající nanorozměru. Takovéto částice lze najít výhradně v roztocích nanočástic připravených výluhem ze zeleného a bílého čaje. Ostatní roztoky jsou však poměrně monodisperzní.

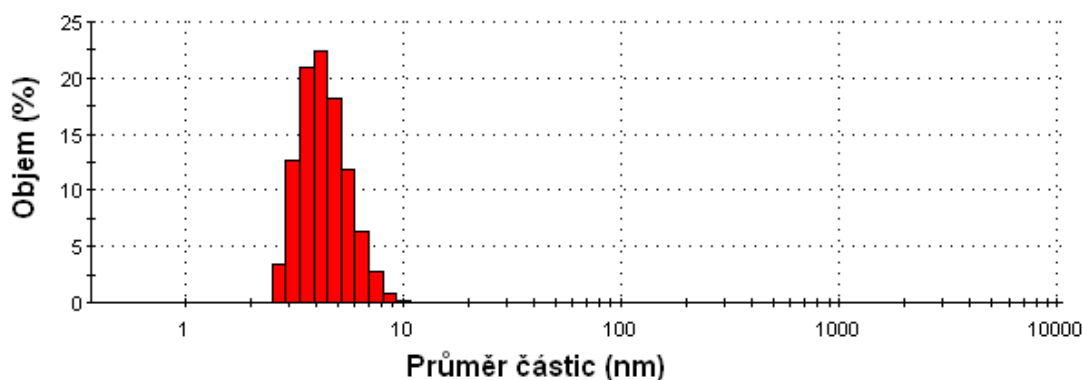
Tab.1: Výsledky měření objemové distribuce velikostí nanočástic v jednotlivých čajích

nano-částice	použitý čaj	měření č.1				měření č.2				měření č.3			
		velikost částic (nm)	objem (%)	velikost částic (nm)	objem (%)	velikost částic (nm)	objem (%)	velikost částic (nm)	objem (%)	velikost částic (nm)	objem (%)	velikost částic (nm)	objem (%)
zlaté	černý	0,971	100	-	-	1,142	100	-	-	0,8943	100	-	-
	zelený	74,31	80,3	5100	19,7	65,6	84,5	5171	15,5	84,31	79,8	4369	20,2
	zelený II.	61,59	84	322,1	16	70,74	86,4	322	13,6	88,86	77,1	385,3	22,9
	bílý	40,88	95,2	4862	4,8	56,29	95,5	4867	4,5	38,65	96,1	5446	3,9
	rooibos	43,27	2,3	6,264	97,7	39,39	1,8	5,024	98,2	44,32	1,4	5,275	98,6
stříbrné	černý	52,82	0,3	4,612	99,7	47,68	0,4	4,462	99,6	53,98	0,2	3,518	99,8
	zelený	58,08	0,7	7,534	99,3	56,76	0,8	7,796	99,2	54,75	0,8	7,076	99,2
	bílý	38,68	96,6	5118	3,4	19,38	90,4	119,6	9,6	18,16	88,1	101,8	11,9
	rooibos	44,69	100	-	-	45,16	100	-	-	44,54	100	-	-

Roztok černého čaje se ukázal jako vhodný pro syntézu zlatých i stříbrných nanočástic velmi malých rozměrů v řádu jednotek nanometrů. V případě zlata je průměrná velikost nanočástice 1 nm (viz obrázek 27). Ojedinelé je, že se v roztoku nevyskytují částice jiné velikosti a roztok tak lze považovat za monodisperzní. U stříbrných nanočástic je průměrná velikost 99,7 % částic necelých 5 nm (viz obrázek 28). Zbylé 0,3 % tvoří částice o velikosti zhruba 50 nm, které pravděpodobně vznikly agregací menších částic.



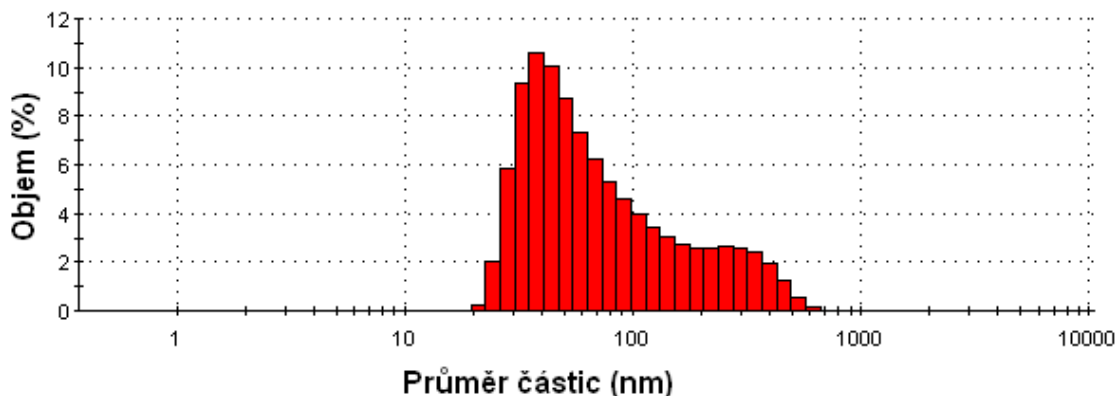
Obr.27: Objemová distribuce velikostí zlatých nanočástic připravených černým čajem. Zde byly syntetizovány pouze malé nanočástice s velikostí v rozmezí 1 až 2 nm.



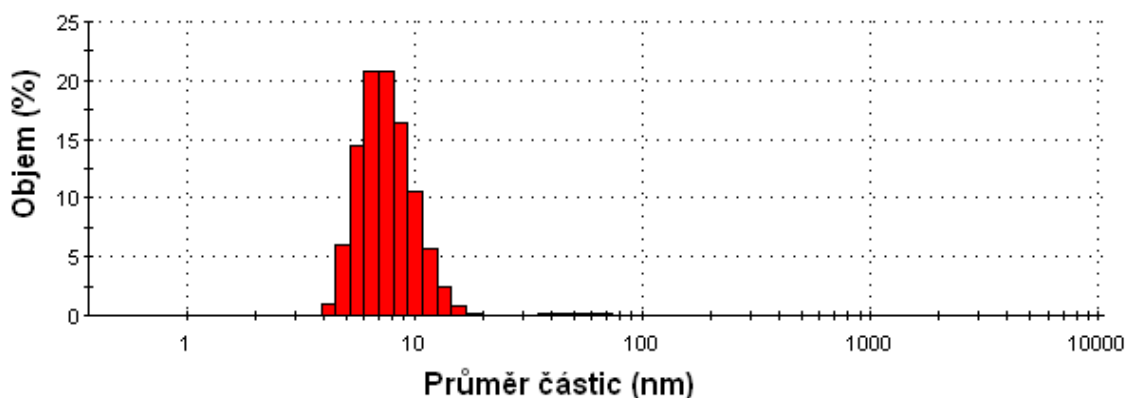
Obr.28: Objemová distribuce velikostí stříbrných nanočástic připravených černým čajem. Minoritní pík nanočástic s průměrem cca 50 nm zde není viditelný, protože zaujímá jen 0,3 % objemu všech částic.

Roztok zeleného čaje se naopak ukázal jako nejméně vhodný pro syntézu zlatých nanočástic, neboť přibližně 20 % objemu tvoří částice o velikosti zhruba 3 až 5 μm . Jsou-li tyto nanočástice z roztoku odstraněny, můžeme zde najít ještě dva druhy nanočástic (viz tabulka 1, sekce zlaté nanočástice, řádek zelený II.). První o velikosti 60 až 80 nm, které tvoří přibližně 70 % celkového objemu zlata. Zbylých 10 % je tvořeno částicemi s průměrnou velikostí kolem 350 nm (viz obrázek 29). V případě stříbrných nanočástic byl roztok v podstatě monodisperzní, velmi podobný roztoku stříbrných částic připravených výluhem z černého čaje. Průměrná velikost 99,2 % částic

se pohybuje mezi 7 a 8 nm. Zbylých 0,8 % částic má velikost přibližně 55 nm (viz obrázek 30).

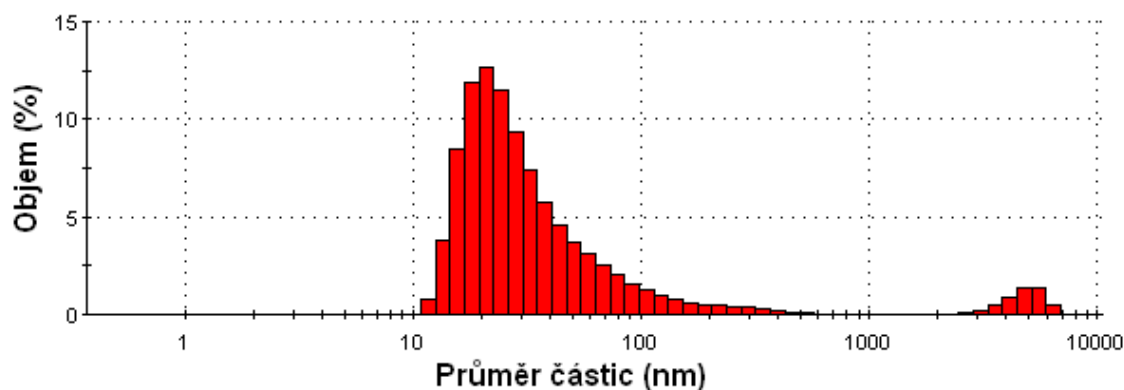


Obr.29: Objemová distribuce velikostí zlatých nanočástic připravených zeleným čajem měřená po odstranění velkých mikronových částic. Roztok je i přes to velmi polydisperzní. Vyskytují se zde částice o velikosti 20 až 600 nm.

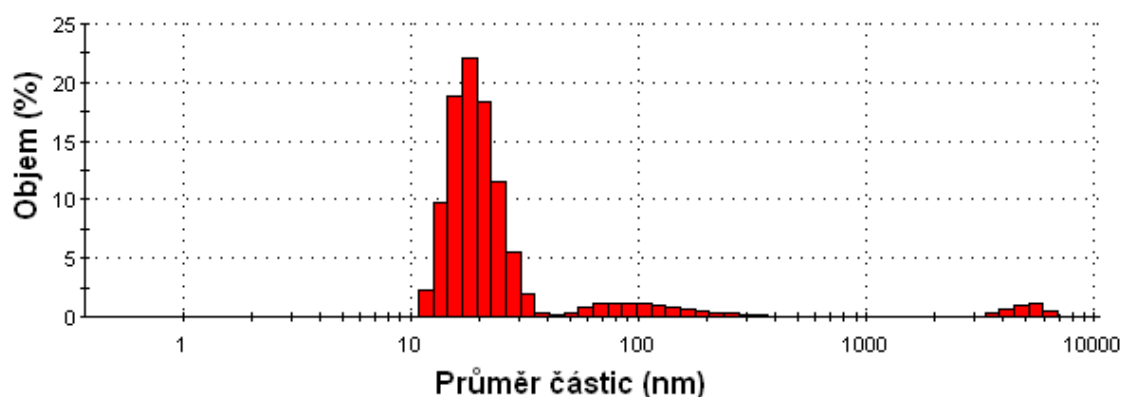


Obr.30: Objemová distribuce velikostí stříbrných nanočástic připravených zeleným čajem. Minoritní pík nanočástic s průměrem cca 55 nm je zde jen těžko viditelný, protože zaujímá jen 0,7 % objemu všech částic.

Také bílý čaj se ukázal jako nevhodný pro syntézu a to nejen zlatých, ale též stříbrných nanočástic. V obou případech zde byly zjištěny velké částice o velikosti cca 4 μm , které v případě zlata tvoří 5 % a v případě stříbra 3 % z objemu (viz obrázky 31 a 32). I po odstranění těchto částic však roztok zůstává v obou případech polydisperzní s velikostí nanočástic v rozmezí 10 až 300 nm. Tato distribuce velikostí je vůbec nejširší ze všech připravených roztoků. Bílý čaj je tedy nejméně vhodným kandidátem pro přípravu kovových nanočástic, chceme-li získat co nejvíce monodisperzní roztok. Nehomogenost distribuce velikosti částic v tomto koloidním roztoku je pravděpodobně způsobena příliš vysokou koncentrací polyfenolů. Pro přesné vysvětlení by však byl nutný další výzkum a to především v oblasti chemického složení výluhu z lístků bílého čaje.

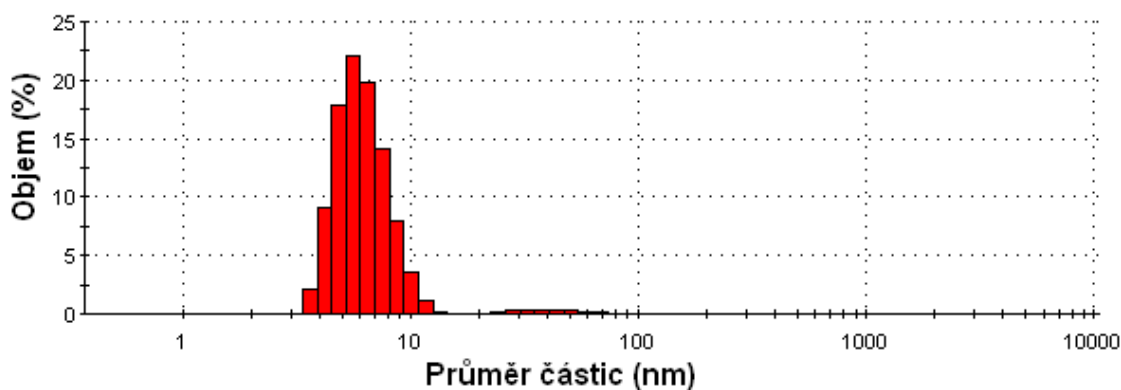


Obr.31: Objemová distribuce velikostí zlatých nanočástic připravených bílým čajem. Roztok je velmi polydisperzní. Nejmenší částice mají velikost cca 10 nm, největší pak 5 μm . Najdeme zde však nanočástice s různou velikostí, nejvíce v oblasti 15 až 300 nm.

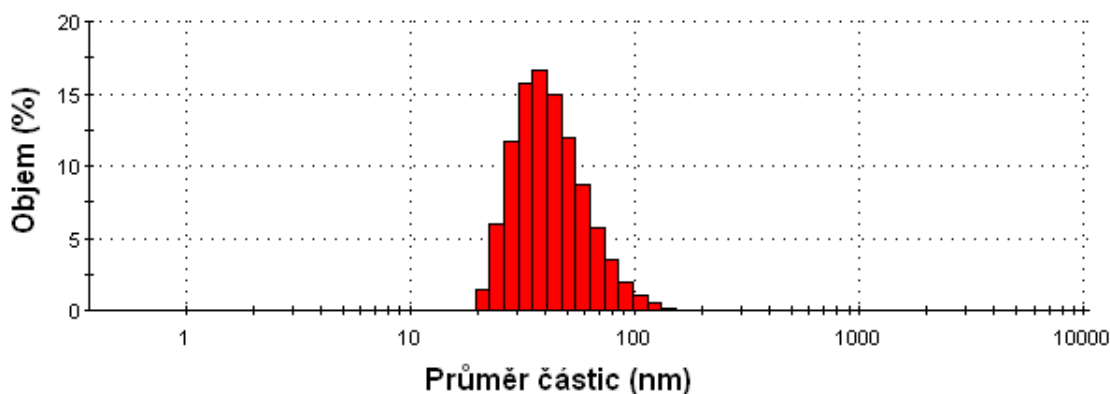


Obr.32: Objemová distribuce velikostí stříbrných nanočástic připravených bílým čajem. Roztok je opět polydisperzní a stejně jako v případě zlatých nanočástic zde lze najít tři skupiny velikostí částic. Částice s průměrnou velikostí cca 20 nm, 100 nm a 4 μm .

Naproti tomu byla analýza velikostí částic připravených v roztoku rooibosu příjemným překvapením. Oba roztoky vykazovaly poměrně úzkou distribuci částic. V případě zlata je zhruba 98 % objemu tvořeno nanočásticemi o velikosti přibližně 5 nm, zbylá 2 % tvoří částice s průměrnou velikostí kolem 40 nm (viz obrázek 33). V případě stříbra je situace ještě příznivější, neboť je roztok tvořen pouze nanočásticemi o velikosti přibližně 45 nm (viz obrázek 34). Úzká distribuce velikostí nanočástic syntetizovaných výluhem z rooibosu, který obsahuje jen malé množství polyfenolů, ještě více podporuje myšlenku, že nadměrné množství těchto organických sloučenin destabilizuje výsledný roztok.



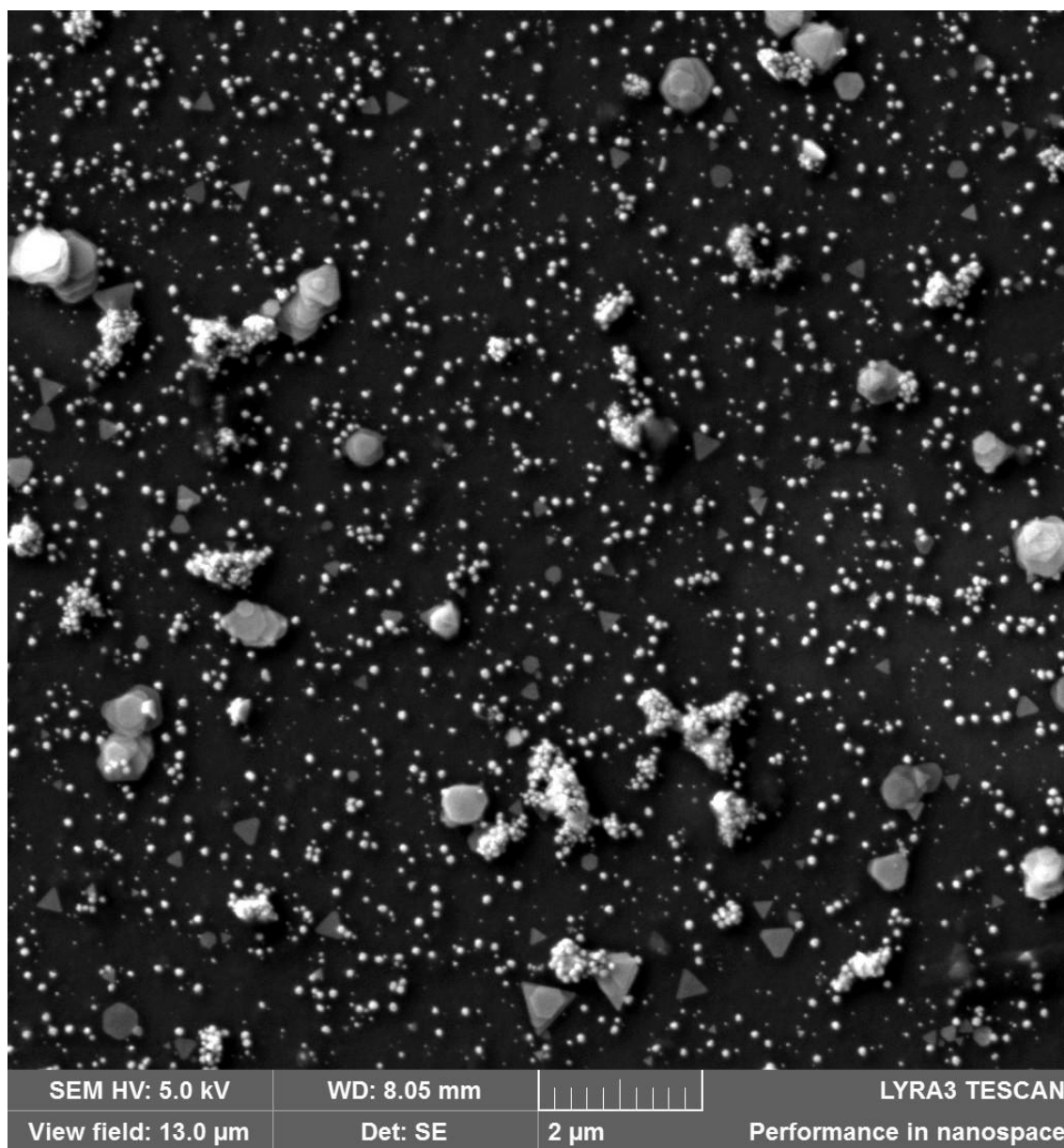
Obr.33: Objemová distribuce velikostí zlatých nanočástic připravených výluhem z rooibosu. Naprostou většinu objemu (98 %) zde tvoří nanočástice o velikosti 3 až 10 nm. Zbývá 2 % jsou tvořena částicemi o velikosti přibližně 20 až 50 nm.



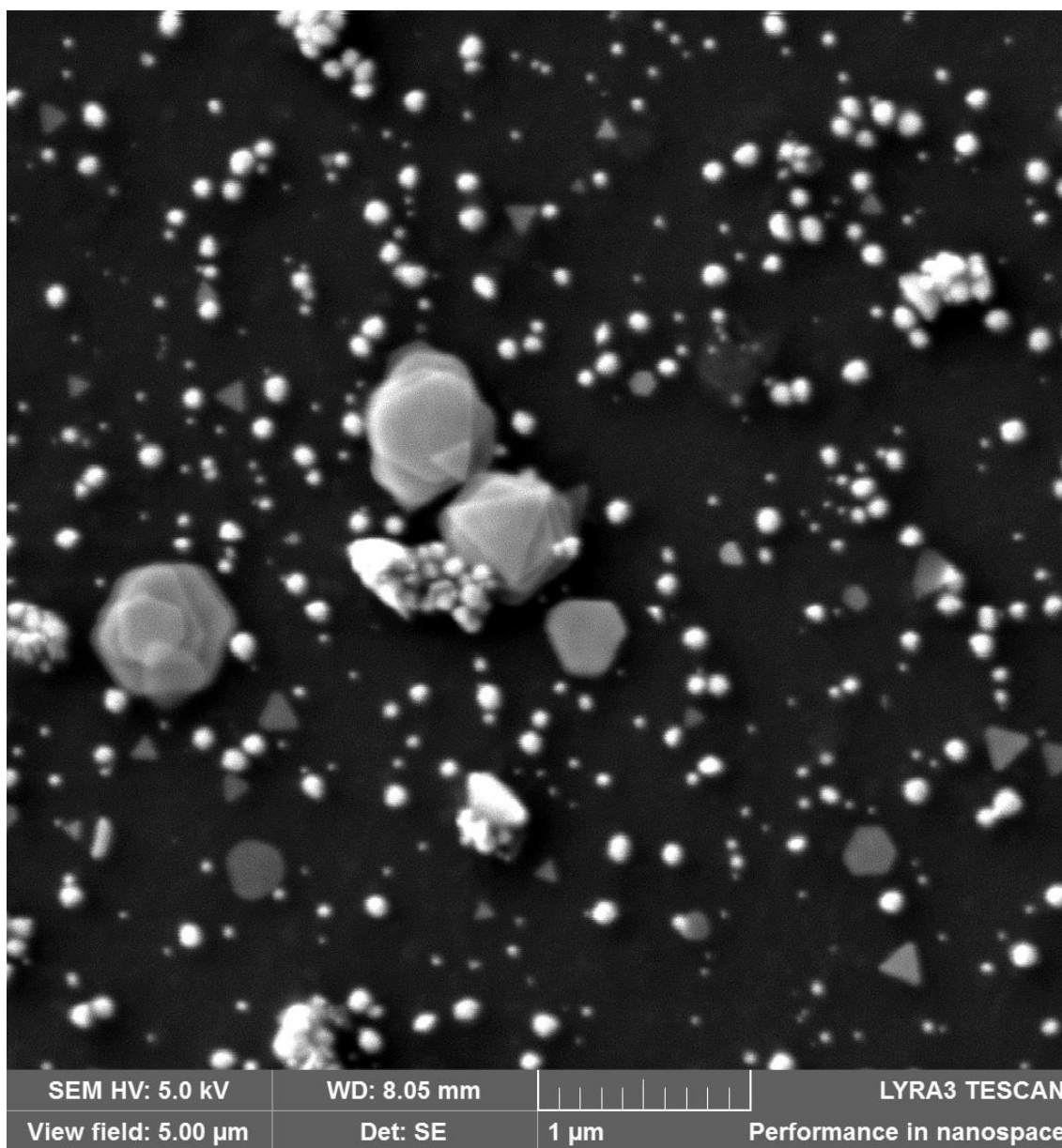
Obr.34: Objemová distribuce velikostí stříbrných nanočástic připravených výluhem z rooibosu tvořená pouze jedním píkem o šířce 20 až 100 nm. Většina objemu je však tvořena nanočásticemi z rozměrem 20 až 60 nm a průměrná velikost částice je 45 nm.

3.4.2 Analýza tvaru a velikosti částic elektronovým mikroskopem

Pro analýzu skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM, Tescan LYRA3 XMH) byly vybrány nanočástice syntetizované zeleným čajem, aby bylo zjištěno, je-li roztok skutečně tak polydisperzní, jak napovídají výsledky ze zetasizeru. Bylo třeba též ověřit, jakou strukturu mají mikronové částice, jestli jsou celistvé, nebo jsou-li pouze tvořené agregovanými nanočásticemi. Ze snímků z mikroskopu je vidět, že obě varianty jsou správně. V roztoku koloidního zlata se vyskytuje velké množství sraženin tvořených kulatými nanočásticemi o průměru přibližně 100 nm. Tyto sraženiny mají různý tvar i velikost a to v rozmezí od 0,5 do 3 μm (viz obrázek 35). Taktéž je zde možné pozorovat velké konzistentní částice trojúhelníkového či hexagonálního tvaru o velikosti zhruba 1 μm . Tyto částice mají šupinkový charakter a svojí strukturou připomínají slídu (viz obrázek 36).

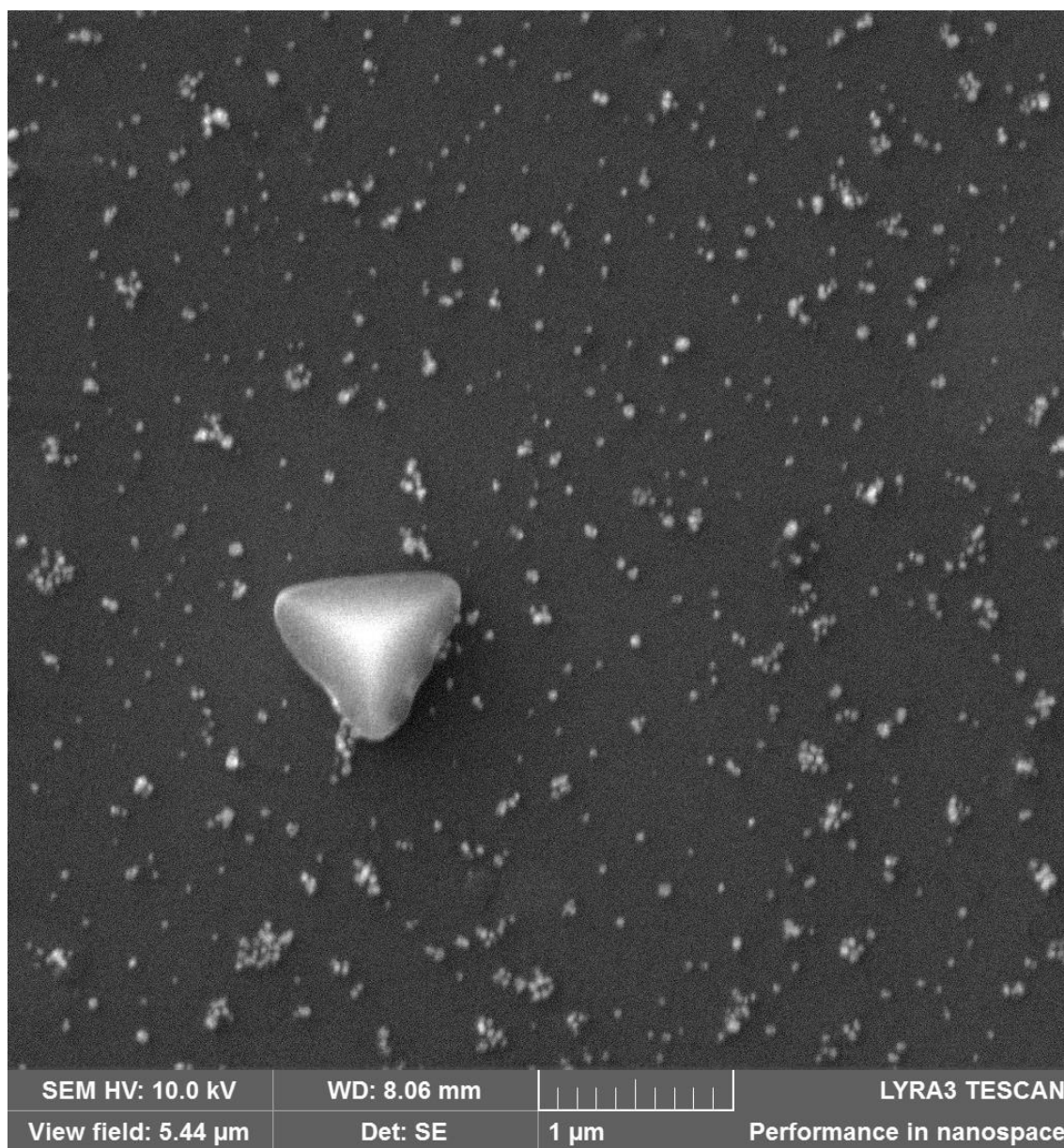


Obr.35: Snímek zlatých nanočástic syntetizovaných výluhem ze zeleného čaje pořízený pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Zde jsou jasně viditelné velké jakoby šupinkové částice trojúhelníkového tvaru o velikosti přibližně 1 μm . Zbytek viditelných nanočástic tvoří kuličky o průměru zhruba 100 nm, které lze najít jak rozptýlené, tak ve formě sraženin různého tvaru. Tyto sraženiny jsou zhruba 1 až 2 μm velké a mají tendenci se nadále shlukovat.

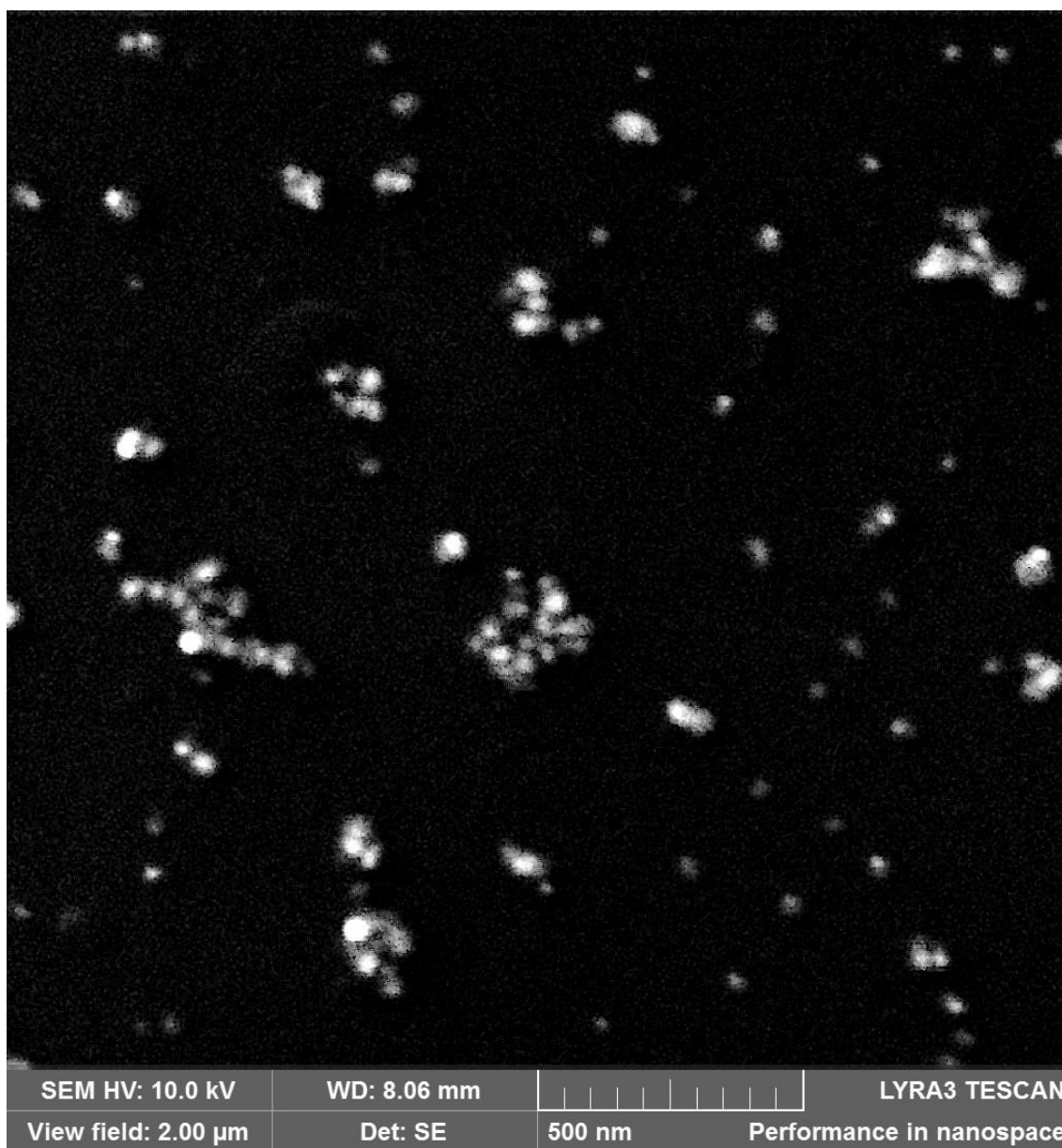


Obr.36: Přiblížený SEM snímek zlatých nanočástic syntetizovaných zeleným čajem. V tomto detailu je vidět, že ploché jakoby šupinkové částice mají tvar trojúhelníku či šestihranu. Je též patrná jejich tendence vrstvit se na sebe, čímž připomínají slídu.

V případě stříbrných nanočástic byl roztok o poznání jednotnější. Většinu zorného pole zabírají zhruba 50 nm velké nanočástice, které se částečně shlukují. Výjimku tvoří jediná částice o tvaru čtyřstěnu o velikosti necelého 1 μm připomínající pyramidu (viz obrázek 37). Na rozdíl od šupinkových částic zlata je tento útvar dokonale konzistentní a jednolité. Pravděpodobně se jedná o jev způsobený přípravou vzorku pro měření, neboť v tomto roztoku stříbra nebyly zetasizerem naměřeny částice dané velikosti. Na přiblíženém snímku lze vidět částečně se shlukující částice o velikosti cca 50 nm a náznak ještě menších částic, které by se měly dle zetasizeru v roztoku vyskytovat (viz obrázek 38). Díky špatné kvalitě snímku však není možné zjistit přesnou velikost ani tvar těchto menších nanočástic.



Obr.37: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu zachycující stříbrné nanočástice syntetizované výluhem ze zeleného čaje. Nejvýraznější strukturou je zhruba 1 μm velká pyramidě podobná uniformní částice. Dále je možné vidět malé nanočástice sférického tvaru o rozměru přibližně 50 nm, které jsou částečně agregované.



Obr.38: Přiblížený SEM snímek stříbrných nanočástic syntetizovaných výluhem ze zeleného čaje. Přestože je tento detail ve špatné kvalitě, je patrné, že částice mají velikost 50 nm nebo menší. Jasně viditelná je též tvorba sraženin, které mají velikost do 200 nm. Tendence ke shlukování je tedy u stříbrných nanočástic podstatně menší než zlatých nanočástic.

4 Závěr

V první části této práce se zabývám zpracováním literárního přehledu přípravy nanočástic. Rešerše mapuje tradiční i nové metody syntézy kovových nanočástic se speciálním důrazem na green syntézy, které jsou v poslední době hodně diskutovaným tématem. V průběhu posledních zhruba deseti let bylo navrženo a úspěšně otestováno velké množství biosyntéz, které jsou ekologicky šetrnou alternativou dnes průmyslově využívaných metod. V práci jsou uvedeny nejvíce zkoumané oblasti green syntéz, které mají předpoklady pro výrobu nanočástic ve větším měřítku.

V druhé části práce se podařilo úspěšně syntetizovat zlaté i stříbrné nanočástice za pomoci výluhů z rooibosu, černého, bílého a zeleného čaje. Celkem bylo připraveno osm koloidních roztoků nanočástic ušlechtilých kovů. Přesný postup syntézy je v práci detailně zaznamenán a doplněn fotografiemi, které ilustrují změnu barvy koloidních roztoků při formování nanočástic. Tyto roztoky byly následně podrobeny UV-vis spektrální analýze, která mapuje časový průběh celé reakce i konečná spektra všech osmi koloidních roztoků. Dále byla změřena objemová distribuce velikostí nanočástic, díky níž bylo zjištěno, které roztoky jsou monodisperzní a které nikoliv. Jako polydisperzní se ukázaly koloidní roztoky nanočástic připravené výluhy ze zeleného a bílého čaje. Nehomogenost distribuce velikostí částic je u těchto koloidních roztoků pravděpodobně způsobena nadměrnou koncentrací polyfenolů v čajových výluzích. Naopak poměrně úzkou distribuci velikostí částic vykazovaly roztoky připravené výluhy z rooibosu a černého čaje. Nejvíce monodisperzní byl v případě zlatých nanočástic roztok připravený přidavkem černého čaje, který vedl ke tvorbě nanočástic o velikosti v rozmezí 1 až 2 nm. V případě stříbrných nanočástic měl nejužší distribuci velikostí nanočástic koloidní roztok připravený přidavkem rooibosu. Průměrná velikost částic byla v tomto případě zhruba 45 nm. Jako poslední metoda charakterizace nanočástic byla zvolena skenovací elektronová mikroskopie. Snímky ze SEM potvrzují polydisperzitu koloidních roztoků připravených výluhem ze zeleného čaje a ukazují, že zde došlo k agregaci částic za tvorby struktur o velikosti několika mikrometrů. V koloidním roztoku zlatých nanočástic byly též nalezeny zhruba mikronové struktury tvořené tenkými šupinami zlata trojúhelníkového tvaru.

Výsledky této práce ukazují, že výluhy z čajů, a to především z černého a rooibosu, jsou vhodné pro green syntézu stabilních nanočástic ušlechtilých kovů. Nejvhodnějším kandidátem pro zavedení green syntézy zlatých a stříbrných nanočástic ve větším měřítku je výluh z černého čaje. Biosyntéza provedená tímto výluhem je velmi rychlá, energeticky i finančně nenáročná, nezatěžuje životní prostředí a produkuje koloidní roztoky nanočástic s úzkou distribucí velikostí. Dosažení takovýchto parametrů přípravy nanočástic je hlavní myšlenkou green syntéz, které jsou jedním z mnoha kroků k udržitelnému rozvoji vědy a průmyslu pro budoucí generace.

5 Literatura

- [1] ZENG, S., YONG, K.T., ROY, I., DINH, X.Q., Yu, X., a LUAN, F. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics*, 6 (3), 2011, s. 491–506 [cit. 2015-05-05]. DOI:10.1007/s11468-011-9228-1.
- [2] ATWATER, H.A. a POLMAN, A. Plasmonics for improved photovoltaic devices. *Nature Materials*, 9 (3), 2010, s. 205–213 [cit. 2015-05-05]. DOI:10.1038/nmat2629.
- [3] MĚCH, R. Aplikace nanotechnologií pro detekci biomolekul. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 61 s. Vedoucí práce Ing. Miroslav Kolibal, Ph.D.
- [4] ŘEZANKA, P. KSICHT Korespondenční Seminář Inspirovaný Chemickou Tematikou [online]. 2009 [cit. 2015-05-05]. Nanočástice I. Dostupné z: <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/nanocastice/1>
- [5] BERÁNEK, J. Surface Plasmon Resonances on Colloidal Nanoparticles. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. 61 s. Vedoucí práce prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
- [6] FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147, 1857, s. 145–181 [cit. 2015-05-05]. DOI:10.1098/rstl.1857.0011.
- [7] DOMENECH, B., BASTOS-ARRIETA, J., ALONSO, A., MACANAS, J., MUNOZ, M., a DMITRI, N. Bifunctional Polymer-Metal Nanocomposite Ion Exchange Materials. *Ion Exchange Technologies*. 2012 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.5772/51579. ISBN 978-953-51-0836-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/ion-exchange-technologies/bifunctional-polymer-metal-nanocomposite-ion-exchange-materials>
- [8] JIN, Y. Engineering Plasmonic Gold Nanostructures and Metamaterials for Biosensing and Nanomedicine. *Advanced Materials*, 24 (38), 2012, s. 5153–5165 [cit. 2015-05-09]. DOI: 10.1002/adma.201200622.
- [9] TURKEVICH, J., STEVENSON, P.C., a HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 1951, s. 55–75 [cit. 2015-05-09]. DOI: 10.1039/DF9511100055.
- [10] EL-NOUR, K.M.M.A., EFTAIHA, A., AL-WARTHAN, A. a AMMAR, R.A.A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2010, s. 135-140 [cit. 2015-05-09]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.04.008.

- [11] Polyvinylpyrrolidon – Wikipedie [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Polyvinylpyrrolidon>
- [12] Polyethylenglykol – Wikipedie [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Polyethylenglykol>
- [13] Polymethylmethacrylat – Wikipedia [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://de.wikipedia.org/wiki/Polymethylmethacrylat>
- [14] Improving the Physical Properties of Silica Aerogels Using a 3-Step Method - 14266 - MIT Technology Licensing Office - MIT Patents and Technologies Available for Licensing - Massachusetts Institute of Technology [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: http://technology.mit.edu/technologies/14266_improving-the-physical-properties-of-silica-aerogels-using-a-3-step-method
- [15] STAROWICZ, M., STYPUŁA, B. a BANAŚ, J. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *Electrochemistry Communications* [online]. 2006, s. 227-230 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1016/j.elecom.2005.11.018.
- [16] Pd(dba)₂ - Bis(dibenzylideneacetone)palladium(0) | Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/227994?lang=en®ion=CZ>
- [17] THAKKAR, K.N., MHATRE S.S. a PARIKH, R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2010, s. 257-262 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/j.nano.2009.07.002.
- [18] KHARISSOVA, O.V., DIAS, H.V.R., KHARISOV, B.I., PÉREZ, B.O. a PÉREZ, V.M.J. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology* [online]. 2013, s. 240-248 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.01.003.
- [19] FILIPOVÁ, Z. Biosyntéza nanomateriálů. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012, 63 s. ISBN 978-80-244-3202-1.
- [20] HEBBALALU, D., LALLEY, J., NADAGOUDA, M.N. a VARMA, R.S. Greener Techniques for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers, and Microwaves. *ACS Sustainable Chemistry* [online]. 2013, [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1021/sc4000362. ISSN 2168-0485. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/sc4000362>
- [21] PHILIP, D., LALLEY, J., NADAGOUDA, M.N. a VARMA, R.S. Honey mediated green synthesis of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2010, s. 1078-1081

[cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/j.saa.2009.12.058. ISSN 13861425. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142509007057>

[22] Periplasm - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Periplasm>

[23] KOWSHIK, M., ASHTAPUTRE, S., KHARRAZI, S., VOGEL, W., URBAN, J., KULKARNI, S.K. a PAKNIKAR, K.M. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. Nanotechnology [online]. 2002, s. 95-100 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1088/0957-4484/14/1/321.

[24] SINGARAVELU, G., AROCKIAMARY, J.S., KUMAR, V.G. a GOVINDARAJU, K. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]. 2007, s. 97-101 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2007.01.010.

[25] IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green Chemistry [online]. 2011 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1039/c1gc15386b.

[26] KUMAR, V. a YADAV, S.K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. Journal of Chemical Technology [online]. 2009, s. 151-157 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1002/jctb.2023. ISSN 02682575.

[27] Geraniol – Wikipédia, a enciclopédia livre [online]. [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Geraniol>

[28] File:(S)-Citronellol.svg - Wikimedia Commons [online]. [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:\(S\)-Citronellol.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:(S)-Citronellol.svg)

[29] Ocimum sanctum - bazalka posvátná, tulsi Zahradnictví Krulichovi - zahradnictví, květinářství, trvalky, skalničky, bylinky a koření [online]. [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <http://www.zahradnictvikrulichovi.cz/prodej/Ocimum-sanctum---bazalka-posvatna--tulsi>

[30] SHANKAR, S.S., RAI, A., ANKAMWAR, B., SINGH, A., AHMAD, A. a SASTRY, M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. Nature Materials [online]. 2004-6-20, s. 482-488 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1038/nmat1152. ISSN 1476-1122.

[31] ARMENDARIZ, V., GARDEA-TORRESDEY, J.L., JOSE-YACAMAN, M., GONZALES, J., HERRERE, I. a PARSONS, J.G. Gold nanoparticles formation by oat and wheat biomasses, in Proceedings – Waste Research Technology Conference at the

Kansas City, Marriott-Country Club Plaza [online]. 2002. [cit. 2015-05-12]. Dostupné z: www.engg.ksu.edu/HSRC/ag/2002/proceed/k09.pdf

[32] PHILIP, D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa sinensis. Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures [online]. 2010, s. 1417-1424 [cit. 2015-05-12]. DOI: 10.1016/j.physe.2009.11.081. ISSN 13869477. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386947709005177>

[33] SHARMA, R. K., GULATI, S. a MEHTA, S. Preparation of Gold Nanoparticles Using Tea: A Green Chemistry Experiment. Journal of Chemical Education [online]. 2012, s. 1316-1318 [cit. 2015-05-12]. DOI: 10.1021/ed2002175. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed2002175>

[34] BEGUM, N.A., MONDAL, S., BASU, S., LASKAR, R.A. a MANDAL, D. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts: A Green Chemistry Experiment. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]. 2009, s. 113-118 [cit. 2015-05-12]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.01.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776509000198>

[35] MOULTON, M.C., BRAYDICH-STOLLE, L.K., NADAGOUDA, KUNZELMAN, S., HUSSAIN, S.M. a VARMA, R.S. Synthesis, characterization and biocompatibility of “green” synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols. Nanoscale. 2010, s. 763 [cit. 2015-05-12]. DOI: 10.1039/c0nr00046a. ISSN 2040-3364. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0nr00046a>

[36] Quercetin - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2015-05-12]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>

[37] Catechin - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2015-05-12]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Catechin>

[38] Gold Nanoparticles: Properties and Applications | Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>

[39] Silver Nanoparticles: Properties and Applications | Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>

[40] Využití disperzního analyzátoru Zetasizer Nano ZS pro charakterizaci disperzních soustav, Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-disperzniho-analyzatoru-zetasizer-nano-zs-pro-charakterizaci-disperznich-soustav>

[41] Zetasizer Nano ZS for size, zeta potential, protein mobility and microrheology [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/default-b.aspx?utm_expid=16625614-17.89fYjnFqSFSdf4iAk0XU2A.1&utm_referrer=https%3A%2F%2Fwww.google.cz%2F