

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ПОЛИМЕРИ

НАСКО ХРИСТОВ НАЧЕВ

**НОВИ ЕКО-СЪОБРАЗНИ ЕЛЕКТРООВЛАКНЕНИ ПОЛИМЕРНИ
МАТЕРИАЛИ С ФУНГИЦИДНА АКТИВНОСТ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд, представен за присъждане на образователната и
научна степен „Доктор”

София, 2022

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ПОЛИМЕРИ

НАСКО ХРИСТОВ НАЧЕВ

**НОВИ ЕКО-СЪОБРАЗНИ ЕЛЕКТРООВЛАКНЕНИ ПОЛИМЕРНИ
МАТЕРИАЛИ С ФУНГИЦИДНА АКТИВНОСТ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд, представен за присъждане на образователната и
научна степен „Доктор”

Професионално направление: 4.2. Химически науки

Специалност: Полимери и полимерни материали

Научни ръководители:

чл.-кор. дн Илия Рашков

доц. д-р Мария Спасова-Тодорова

София, 2022

Дисертационният труд е обсъден и допуснат до защита на заседание на Колоквиума на Института по полимери - БАН.

Дисертационният труд е изложен на 115 страници, включва 45 фигури. Използвани са 257 литературни източника. Резултатите са публикувани в 3 научни статии и са докладвани на 9 научни форума.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2022 г. от ч. в заседателната зала на Института по полимери - БАН, на заседание на научното жури.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на Институт по полимери - БАН; София, ул. "Акад. Г. Бончев", бл. 103В.

Автор: Наско Христов Начев

Заглавие: НОВИ ЕКО-СЪОБРАЗНИ ЕЛЕКТРООВЛАКНЕНИ ПОЛИМЕРНИ МАТЕРИАЛИ С ФУНГИЦИДНА АКТИВНОСТ

Благодарности

Тези изследвания са част от изследванията, провеждани в ЛБАП, в областта на новите полимерни материали с фунгицидна активност, получени чрез метода на електроовлажняване, които са предназначени за приложение в селското стопанство.

*Настоящата дисертационна работа е разработена с финансовата подкрепа на Фонд "Научни изследвания", Договор КП-06-ОПР03/2 „Дизайн и методи за получаване на иновативни полимерни композити с фунгицидно действие спрямо *Phaeomoniella chlamydospora* и *Phaeoacremonium aleophilum*“, за което изказвам своята благодарност.*

Бих искал най-сърдечно да благодаря на чл.-кор. дн Илия Рашков, проф. дн Невенка Манолова и доц. д-р Мария Спасова-Тодорова за доверието в мен, за ценните напътствия и съвети, за получените нови знания и безкрайната подкрепа при разработването и оформянето на дисертацията. Високо ценя всестранната помощ, проявеното разбиране, търпение, добро и приятелско отношение.

Благодаря на всички колеги от Лаборатория Биологично активни полимери, ИП-БАН за отзивчивостта, неоценимата помощ, подкрепата и куража.

Благодаря на доц. д-р Младен Найденов от Лаборатория по микробиологични технологии, Катедра Микробиология и екологични биотехнологии, Аграрен Университет – Пловдив за съдействието и консултациите при провеждане и обсъждане на микробиологичните изследвания.

Искрено благодаря на моето семейство за подкрепата и вярата!

Изследванията, обект на дисертационния труд са проведени в лаборатория “Биологично активни полимери“, Научно направление „Полимерни биоматериали“, Институтът по полимери – БАН, с ръководител проф. д-р Оля Стоилова. Част от изследванията са проведени във връзка с изпълнението на договор КП-06-ОПР03/2, финансиран от Фонд “Научни изследвания”. Изследванията са част от системните изследвания в областта на иновативните електроовлаknени микро- и нанокомпозитни влакна с потенциални възможности за приложение за агрофармацевтични средства (АФС).

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

5-Cl8Q – 5-хлоро-8-хидроксихинолин

AFM - атомно силова микроскопия

CA - целулозен ацетат

CQ - 5-хлор-7-йод-8-хидроксихинолин

DCM - дихлорметан

DMF - диметилформамид

DSC - диференциална сканираща калориметрия

EtOH - етанол

FTIR - инфрачервена спектроскопия с преобразуване на Фурие

K5N8Q - калиев 5-нитро-8-хинолинолат

P. aleophilum - *Phaeoacremonium aleophilum*

P. chlamydospora - *Phaeomoniella chlamydospora*

PCL - поли(ε-капролактон)

PEG - полиетиленгликол

PEO - полиетиленоксид

PHA - полихидроксиалканоати

PHB - поли(3-хидроксибутират)

PLA - полилактид

PLLA - поли(L-лактид)

PP - полипропилен

PVA – поливинилов алкохол

PVP - поливинилпиролidon

T. viride - *Trichoderma viride*

UV-VIS - спектроскопия във видимата и ултравиолетовата области

XPS - рентгенова фотоелектронна спектроскопия

XRD - рентгеноструктурен анализ

АФС - агрофармацевтични средства

БАВ - биологично активно вещество

МИК - минимална инхибираща концентрация

СЕМ - сканираща електронна микроскопия

ТЕМ - трансмисионна електронна микроскопия

Научната литература, цитирана в дисертацията, е посочена с първи автор и година на публикуване. Трудовете на докторанта са посочени в средни скоби като горен индекс към всяка глава. Номерата на означенията съответстват на номерацията в списъка с публикациите и научните съобщения на докторанта, приложен в края на дисертацията.

[П №] - посочва публикацията на докторанта;

[ПС №] - посочва научно съобщение под формата на постерно съобщение с участието на докторанта;

[УС №] – посочва научно съобщение под формата на устно съобщение с участието на докторанта.

Номерацията на разделите и фигурите в автореферата съответства на тази в дисертационната работа.

I. УВОД

В последните 15-20 години, особен интерес се проявява към иновативните технологии наречени електрокинетични. Към тях спадат електроовлажняването из стопилка или разтвор на полимери, електроразпръскването, електроовлажняването в центробежно поле, коаксиалното електроовлажняване и други. С тези електрокинетични методи за получаване на микро- или нановлакнести материали се получава т.нар. нетъкан текстил, който се отличава с висока порьозност и с възможностите си за най-разнообразни приложения. Тези иновативни методи позволяват да бъдат получени влакнести материали, както от синтетични, така и от природни биологично поносими и биологично разградими полимери, безвредни за околната среда. В тези микро- или нановлакнести материали е възможно да бъдат включени различни по химична природа и състав нискомолекулни вещества с биологична активност (антимикробни или противогъбни). В Лаборатория “Биологично активни полимери” от 2002 година се провеждат системни изследвания в областта на получаването на микро- и нановлакнести полимерни материали с придадена биологична активност. Провеждат се и системни изследвания за усъвършенстване на тези електрокинетични методи за получаване на влакнести материали. Създаденото оборудване позволява да бъдат получени влакна с различен дизайн, където биологично активното вещество може да се намира “във” влакната или “върху” повърхността на влакната (електроовлажняване/електроразпръскване) при изработването на иновативни средства за растителна защита.

Използването на иновативни нанотехнологии за създаване на средства за растителна защита е изключително перспективно ново направление, което в повечето случаи използва прилагането на биологично поносими и биологично разградими полимери, щадящи околната среда. Прилагането на такива полимери повече от 20 години е основно направление в изследванията на сътрудниците от Лаборатория “Биологично активни полимери”. Между изследваните биопоносими и/или биоразградими полимерни материали са целулозен ацетат, поли(L-млечна киселина) и нейни съполимери, хитозан и други. Съвременна тенденция в развитието на иновативните средства за растителна защита е използването на полимерни материали със собствена

биологична активност като например хитозан, както и използването на синтетични биологично активни, нискомолекулни съединения, метални оксиди или полезни почвени микроорганизми.

Болестта еска е една от най-ранно познатите болести по лозовите насаждения. Разпространена е във всички лозаро-винарски държави и се среща в целия свят като предизвиква огромни икономически загуби. През последните три десетилетия вниманието към еска е изключително засилено в световен мащаб – случаите на проява на болестта нарастват значително. Болестта се разпространява бързо и представлява реална заплаха за лозовите масиви в Европа. В България до 90^{-те} години на 20^{-ти} век тя се среща предимно в стари лозови масиви и е в състояние да унищожи до 30% от лозите. В началото на 21^{-ви} век обаче еска се наблюдава и при млади 4-5 годишни насаждения.

Причинители на болестта са гъби най-често от видовете *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*. Получените при резитбата на лозите рани се считат за “главния вход” за проникване на гъбичните спори в растението.

За лечение и превенция на заболяването е използван натриев арсенит. През 2003 г. натриевият арсенит е обявен за силно токсичен и канцерогенен и от тогава до сега е забранен за употреба в Европа за целите на селското стопанство. В днешно време на практика не съществува лечебен подход за борба с еска. Ето защо, наложително е да се намерят нови подходи и средства за защита от еска.

За първи път през 2015 година от Sett и съавтори се докладва за създаването на копринени мембрани, върху които са електроовлакнени нановлакна от соев протеин/PVA и соев протеин/PCL, които се използват за защита на растения. Този материал има за цел да блокира физически проникването на гъбични спори. Авторите, обаче, изразяват мнение, че блокирането не се осъществява в достатъчна степен и има нужда да се включи противогъбичен компонент.

Получени са и електроовлакнени материали от поли(лактид-съ-гликолид) и поли(бутадиенадипат-съ-терефталат) с включен полихексаметиленгуанидин за възпрепятстване проникването на спори на *P. chlamydospora*. Електроовлакнените матове могат да бъдат директно прикрепени към резитбената рана и по този начин може да се осигури бариера срещу

проникването на гъбични спори, като не се възпрепятства навлизането на вода и въздух към растението. Авторите на това съобщение, обаче, отбелязват, че е необходимо да се търсят по-ефективни и устойчиви противогъбични добавки и по-добър подбор на използваните полимери.

В изследване, проведено в ЛБАП, е предложен метод за лесно получаване на влакнести мембрани, на основата на целулозен ацетат и PEG, съдържащи производно на 8-хидроксихинолина за активна защита срещу проникване на спори и предпазване на лозови насаждения от заболяването еска. Получените нови влакнести материали потискат напълно развитието на гъбичните щамове, причинители на заболяването еска.

Успешно са получени и екологични материали на основата на PNB, наноразмерен TiO_2 – анатаз и хитозанови олигомери чрез едновременно електроовлажняване и електроразпръскване. Декорирането на влакната от PNB с TiO_2 води до създаване на материали, които потискат растежа на *P. chlamydospora*.

Изследванията в настоящия дисертационен труд са насочени към получаването на нови еко-съобразни електроовлажнени полимерни материали с фунгицидна активност. Проследени бяха възможностите за електроовлажняване на разтвори на полиестер – PLLA, полихидроксиалканоат – PNB и производни на 8-хидроксихинолина, както и електроовлажняване на дисперсии на полизахарид – СА и наночастици от ZnO.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА

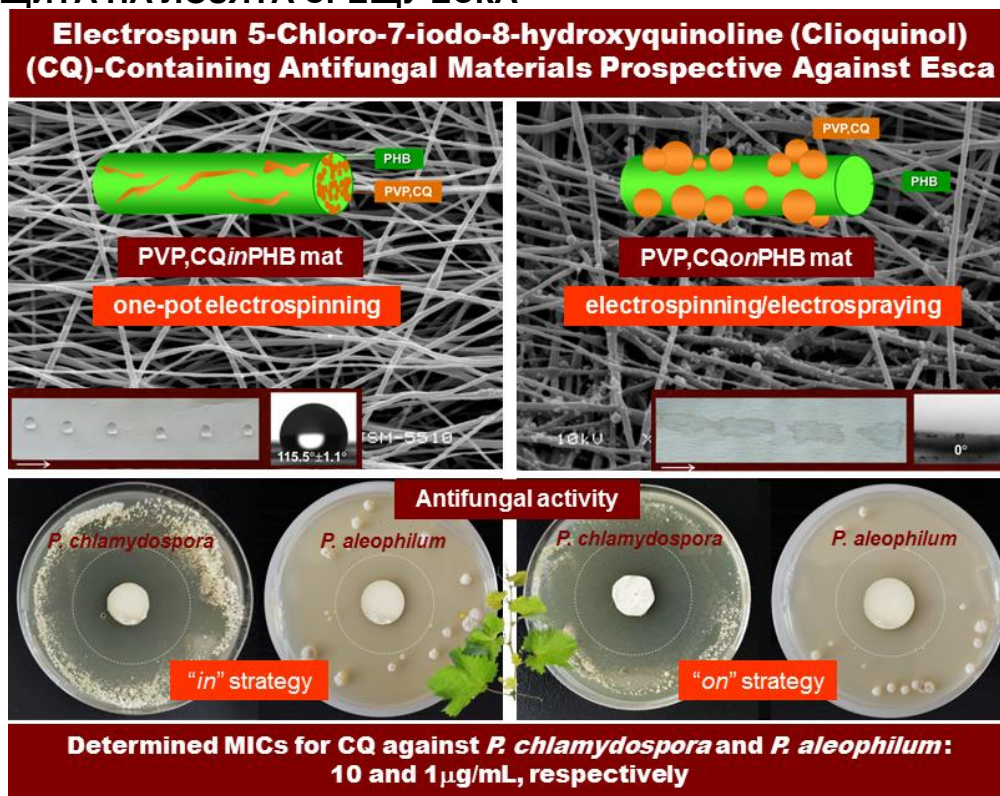
Целта на настоящата дисертационна работа е получаването чрез електроовлажняване/електроразпръскване и комплексното охарактеризиране на нови еко-съобразни полимерни материали с фунгицидна активност и изясняване на потенциалните възможности за тяхното приложение за целите на селското стопанство и по конкретно за предпазване на лозови насаждения от проникване и заразяване с гъбични спори, причинители на заболяването еска.

Във връзка с тази цел при разработването на дисертационната работа се оформиха следните задачи за разрешаване:

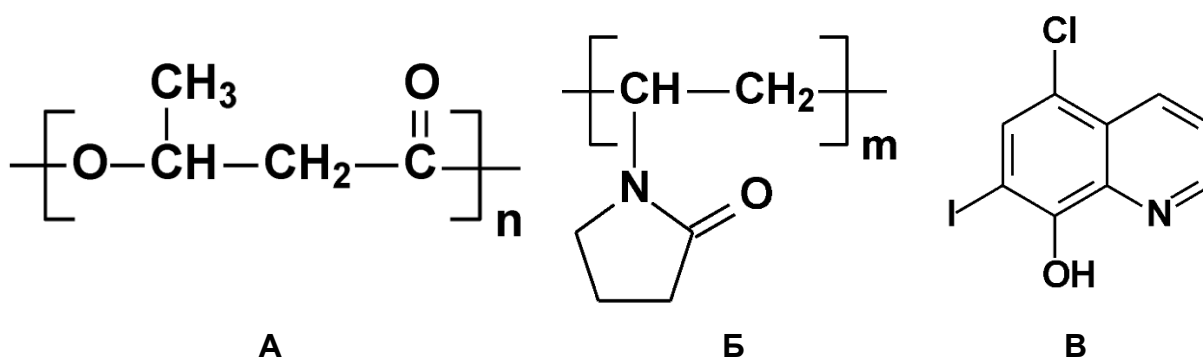
1. Създаване на нови влакнести материали от PHB, PVP и 5-хлор-7-йод-8-хидроксихинолин (клиохинол) (CQ) чрез електроовлакняване и електроразпръскване.
2. Проследяване на *in vitro* освобождаването на CQ в зависимост от дизайна на електроовлакнените материали и от техниките на получаването им.
3. Получаване и охарактеризиране на нови електроовлакнени полимерни композити на основата на PLLA и различни производни на 8-хидроксихинолина.
4. Изследване на фунгицидното действие на PLLA/K5N8Q и PLLA/5-Cl8Q спрямо гъбичните щамове *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*.
5. Получаване чрез електроовлакняване и охарактеризиране на нови влакнести материали от целулозен ацетат, които са декорирани с наночастици от ZnO.
6. Изследване и подобряване на водоотбъскващите и противогъбични свойства на получените иновативни материали от CA/ZnO.
7. Изследване на потенциала на получените нови материали да служат като активни покрития за предпазване на лозови растения от заболяването еска.

III. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Глава 1. ЕЛЕКТРООВЛАКНЕНИ ПРОТИВОГЪБИЧНИ МАТЕРИАЛИ ОТ ПОЛИ(3-ХИДРОКСИБУТИРАТ)/ПОЛИВИНИЛПИРОЛИДОН, СЪДЪРЖАЩИ CQ ЗА ЗАЩИТА НА ЛОЗЯТА СРЕЩУ ЕСКА^{[П 3] [ПС 4]}



В настоящата Глава са обобщени резултатите върху получаването и охарактеризирането на нови влакнести материали с противогъбични свойства от поли(3-хидроксибутират) (PHB), поливинилпиролон (PVP) и 5-хлор-7-йод-8-хидроксихинолин (CQ) (Фигура Г1-1). Тези материали са получени при прилагане на електроовлажняване или комбиниране на електроовлажняване и електроразпръскване. Морфологията на материалите и химичният състав на тяхната повърхност са изучени чрез сканираща електронна микроскопия (SEM), рентгенова фотоелектронна спектроскопия (XPS) и чрез FTIR спектроскопия. CQ включен в обема на влакната или в PVP частици отложени върху влакната е в аморфно състояние, което е потвърдено от диференциалната сканираща калориметрия (ДСК) и от рентгеноструктурния анализ (XRD). Проследен е профилът на освобождаване на CQ от различните по дизайн материали и е проведен микробиологичен скрининг спрямо гъбите *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*.



Фигура Г1-1. Формули на: А. поли(3-хидроксибутират) (PHB),
Б. поливинилпиролон (PVP) и В. 5-хлор-7-йод-8-хидроксихинолин (5Cl7I8Q)

1.1. Получаване и морфология на влакнестите материали от PHB, PVP и CQ

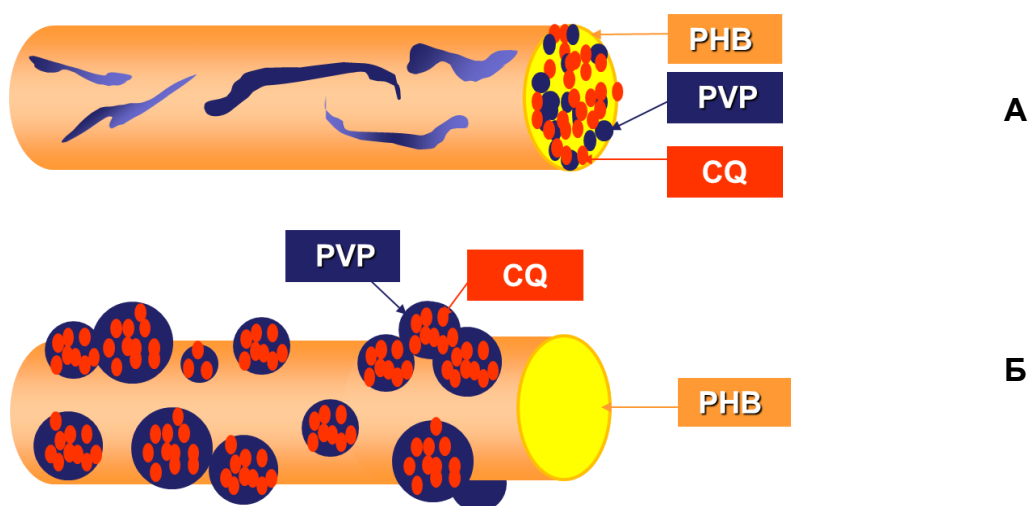
Поливинилпиролонът може да пластифицира определени полимери, както и образувайки водородни връзки да спомогне за отделянето на някои биологично активни вещества от микро- и нановлакнести материали.

Съчетаването на полезните свойства на алифатния полиестер PHB и ниската токсичност на водоразтворимия полимер PVP с противогъбичните свойства на CQ е обещаваща стратегия за получаването на нови влакнести материали, подходящи за приложение в селското стопанство.

За получаването на влакнести материали от PHB и PVP, съдържащи CQ с различен дизайн са разработени следните подходи: едноетапно

електроовлакняване на влакна от разтвор на PHB, PVP и CQ (стратегия "in", Фигура Г1-2 А) или електроовлакняване на разтвор на PHB, съчетано с електроразпръскване на разтвор на CQ и PVP (стратегия "on", Фигура Г1-2 Б).

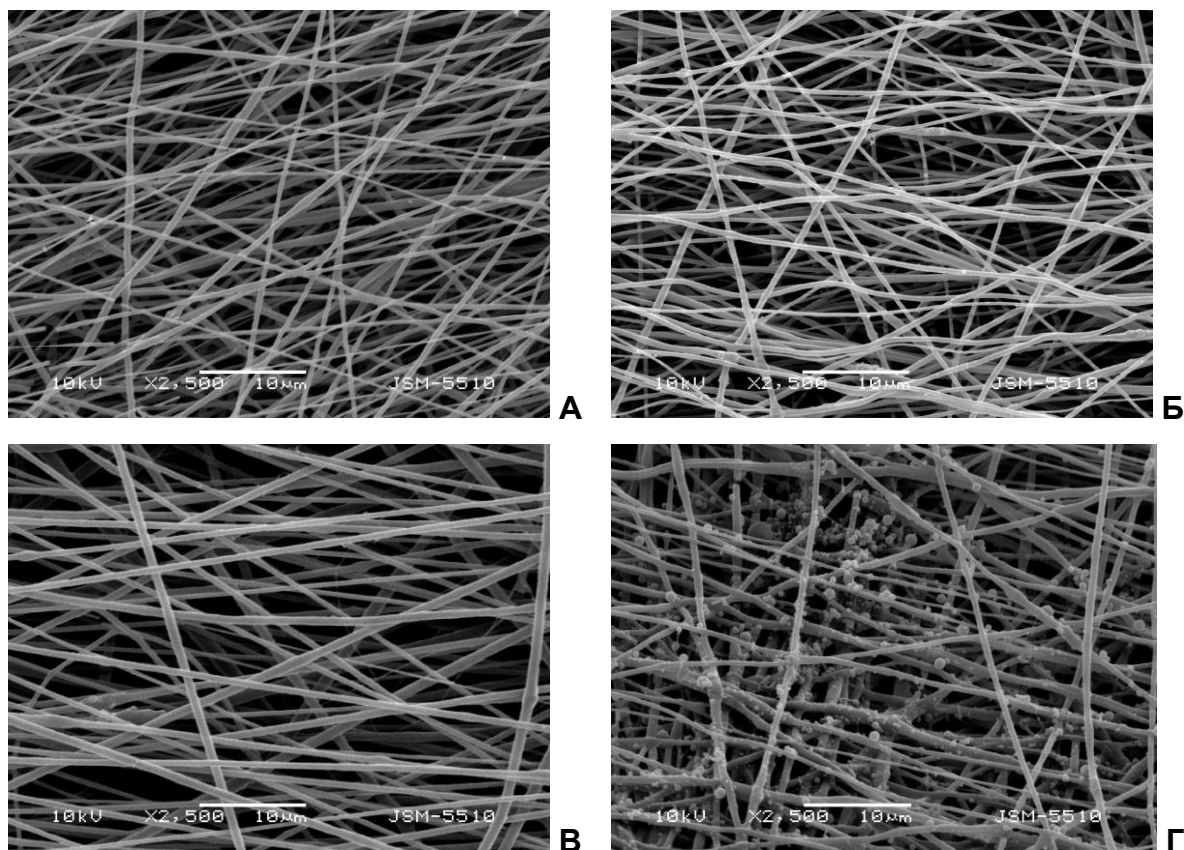
Електроовлакняването на разтвор от PHB, PVP и CQ в разтворителна система CHCl_3/DMF (4/1 v/v) при обща полимерна концентрация 10 тегл.% доведе до получаване на цилиндрични и бездефектни влакна (Фигура Г1-3 Б). При същите условия на електроовлакняване бяха получени и влакна от PHB (Фигура Г1-3 В) и PVP in PHB (90:10 w/w) (Фигура Г1-3 А). Средният диаметър на влакната от PHB беше 760 ± 200 nm. Добавянето на PVP към разтворите на PHB води до намаляване на средните диаметри на влакната до 480 ± 110 nm (Фигура Г1-3 А,В). Наблюдаваният ефект може да бъде обяснен с намаляване на вискозитета на разтвора на PHB от 180 cP на 110 cP при добавяне на нискомолекулен PVP. При добавяне на CQ (10 тегл.%) към предилния разтвор на PHB/PVP средният диаметър на влакната се изменя несъществено - от 480 ± 110 nm за PVP in PHB мат (Фигура Г1-3 А) на 470 ± 110 nm за PVP,CQ in PHB мат (Фигура Г1-3 Б). Този факт най-вероятно се дължи на слабото намаление на вискозитета на PHB/PVP разтвора от 110 cP на 100 cP при добавяне на CQ към разтвора.



Фигура Г1-2. Схематично представяне на: А. PVP in PHB влакна, съдържащи CQ включен в обема на влакната (PVP,CQ in PHB) и Б. PHB влакна, декорирани с CQ/PVP частици на повърхността (CQ/PVP-on-PHB).

За получаване на PHB влакна декорирани с CQ/PVP частици е използвано едновременното прилагане на електроовлакняване и електроразпръскване. На Фигура Г1-3 Г са представени СЕМ микрографии на PVP,CQ on PHB матове. Както се вижда, върху PHB влакната са отложени

частици от CQ и PVP. SEM микрографиите показват, че значителна част от получените частици се намират върху влакната от PNB, друга част от частиците са разположени в пространството между влакната или върху по-долните слоеве, изграждащи мата. От Фигура Г1-3 Г се вижда, че частици от CQ и PVP имат сферична форма. Средният размер на малките и големите частици на PVP,CQ on PNB матовете е съответно 490 ± 105 nm и 1050 ± 130 nm (Фигура Г1-3 Г).



Фигура Г1-3. SEM микрографии на влакна от: А. PVP *in* PNB, Б. PVP, CQ *in* PNB, В. PNB и Г. PVP, CQ *on* PNB. Увеличение на микрографиите $\times 2500$.

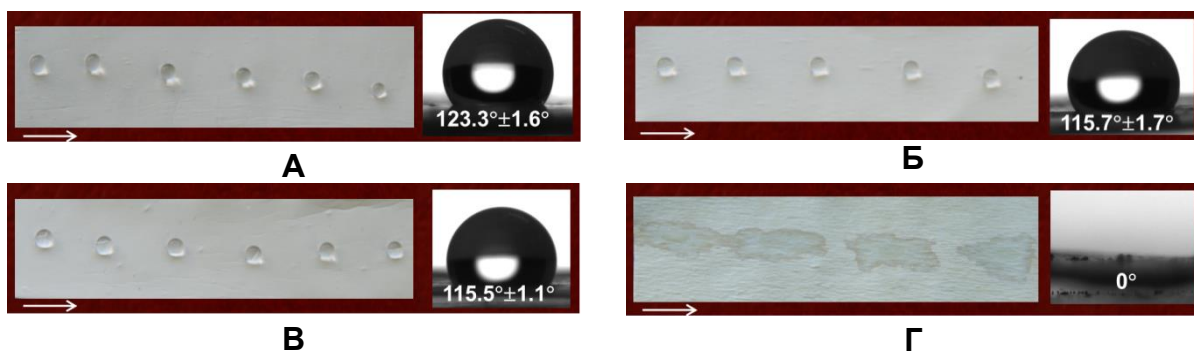
1.2. FTIR спектроскопия на влакнестите материали

Химичната структура на матовете, съдържащи CQ беше потвърдена чрез FTIR спектроскопия. В FTIR спектрите на PVP *in* PNB матовете в допълнение към ивиците за PNB (1721 cm^{-1} - $\nu\text{C=O}$, 1279 , 1229 , 1180 cm^{-1} - $\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}$ в кристална и в аморфна фази) се появява нова ивица при 1663 cm^{-1} , характерична за $\nu\text{C=O}$ трептене от PVP. В FTIR спектъра на PVP, CQ *in* PNB мата се наблюдава 5 cm^{-1} отместване на ивицата за C=O валетните трептения от PVP към по-високите дължини на вълните до 1668 cm^{-1} в сравнение със спектъра на изходния PVP *in* PNB мат (1663 cm^{-1}). Детектира се и появата на нови ивици за

C=C валентните трептения от CQ при 1576 cm^{-1} и 1489 cm^{-1} , както и две ивици при 808 cm^{-1} (за $\gamma\text{Ag-N}$, извънравнинни деформационни трептения) и при 783 cm^{-1} (за ароматните C-H връзки), което е указание за включването на CQ в PVP частиците по повърхността на PNB мата.

1.3. Контактен ъгъл на омокряне на влакнестите материали

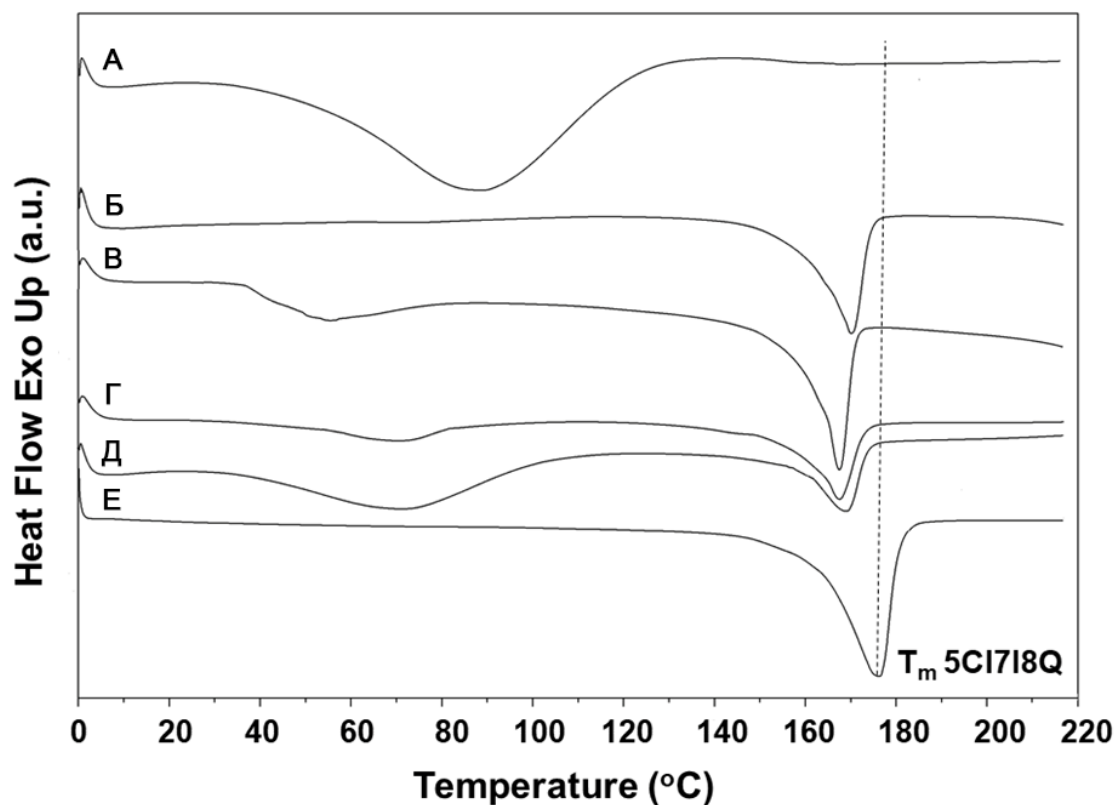
Хидрофилно/хидрофобните характеристики на влакнестите матове могат да повлияят в голяма степен адхезията и развитието на гъбичните патогени по растенията. Поради това от съществено значение е определянето на ъгъла на омокряне спрямо вода на получените влакнести матове, които ще бъдат в контакт с гъбите. Изходният PNB мат е хидрофобен и стойността на ъгъла му на омокряне спрямо вода е $123.3^\circ \pm 1.6^\circ$ (Фигура Г1-5 А). Водната капка запазва сферичната си форма върху повърхността на PNB мата. Експериментално определената стойност за ъгъла на омокряне на PNB влакнестия материал е близка до тази, съобщена от други автори. Включването на 10 тегл.% водоразтворим полимер PVP, води до слабо намаляване на хидрофобността на матовете (стойността на ъгъла на омокряне спрямо вода е $115.7^\circ \pm 1.7^\circ$, Фигура Г1-5 Б). Присъствието на CQ на повърхността на PVP,CQ in PNB влакната не води до промяна в хидрофобността на матовете (Фигура Г1-5 В). Матовете, получени чрез електроовлажняване на PNB, съчетано с електроразпръскване на CQ/PVP са хидрофилни. Капката вода веднага се абсорбира от PVP,CQ on PNB мата и техният ъгъл на омокряне спрямо вода е 0° (Фигура Г1-5 Г).



Фигура Г1-5. Дигитални изображения на капки вода ($10\text{ }\mu\text{l}$), накапани върху матове от: А. PNB, Б. PVP in PNB, В. PVP, CQ in PNB и Г. PVP, CQ on PNB. Посоката на въртене на колектора е обозначена със стрелка.

1.4. Диференциална сканираща калориметрия

Термичното поведение на PVP,CQ*in*PНВ и PVP,CQ*on*PНВ матовете е изучено чрез ДСК анализи (Фигура Г1-6). В ДСК термограмата на РНВ влакната се наблюдава ендотермичен пик за температурата на топене (T_m) при 170 °С (Фигура Г1-6 Б). В термограмите на матовете от PVP,CQ*in*PНВ пикът, съответстващ на T_m за РНВ се отмества към по-ниска температура – при 167 °С (Фигура Г1-6 Г). Степента на кристалност за РНВ в PVP,CQ*in*PНВ (37%) матовете не се променя значително в сравнение с тази на матовете от PVP*in*PНВ (42%). Може да се предположи, че при включване на СQ в обема на PVP*in*PНВ мата настъпват междумолекулни взаимодействия между РНВ, PVP и СQ, водещи до понижаване на T_m на РНВ. Ендотермичен пик с максимум при 170 °С, дължащ се на T_m на РНВ е детектиран и в термограмите на матовете, получени чрез едновременно електроовлакняване на РНВ и електроразпръскване на СQ и PVP (Фигура Г1-6 Д).



Фигура Г1-6. ДСК термограми (първо нагряване) на: А. PVP на прах, Б. РНВ мат, В. PVP*in*РНВ мат, Г. PVP,CQ*in*РНВ мат, Д. PVP,CQ*on*РНВ мат и Е. СQ на прах.

Степента на кристалност на РНВ в PVP,CQ*on*РНВ матовете е 36%, стойност, която е по-ниска от степента на кристалност на изходните РНВ влакна

(42%). В ДСК термограмите на прах от PVP (Фигура Г1-6 А) и на влакнестите матове, съдържащи PVP в обема на мата или по повърхността му, се наблюдава широк ендотермичен пик между 25°C и 100°C, съответстващ на загуба на влага (Фигура Г1-6 В-Д). В допълнение, в термограмите на PVP,CQinPHB матовете (Фигура Г1-6 Г) не се наблюдава пик, съответстващ на точката на топене за CQ (T_m на CQ е 176°C, Фигура Г1-6 Е). Това показва, че включеният във влакната CQ е в аморфно състояние. Може да се види, че CQ, включен в PVP, отложен под формата на частици върху PHB влакната е също в аморфно състояние (Фигура Г1-6 Д).

1.5. Рентгеноструктурен анализ

В дифрактограмите на изходните PHB и PVPinPHB матове се наблюдават само дифракционни пикове, характеристични за кристалната фаза на PHB ($2\theta = 13.6^\circ, 17.0^\circ, 20.1^\circ, 22.1^\circ, 25.6^\circ$ и 27.2°). В случаите на PVP,CQinPHB и PVP,CQonPHB матовете не се детектират основните дифракционни пикове, характеристични за кристалната фаза на CQ ($2\theta = 6.3^\circ, 12.8^\circ, 20.4^\circ, 21.7^\circ$ и 24.6°), което показва, че CQ, който е включен в обема на PVPinPHB матовете или е включен в частиците от PVP, електроразпръснати върху влакната от PHB е в аморфно състояние. Тези данни са в съответствие с резултатите от проведените ДСК анализи.

1.6. Определяне на химичния състав на повърхността

Потвърждение за успешното включване на CQ в повърхностния слой на матовете от PVPinPHB или в частици от PVP, отложени по повърхността на PHB матовете беше получено и от XPS анализите. Наблюдава се появата на N_{1s} пикове в спектъра на PVP,CQinPHB мата при 399.1 eV отнесен за $\underline{N}-C=O$ от PVP и при 400.0 eV характеристичен за $\underline{N}-C$ от CQ (Фигура Г1-8 В). В допълнение, спектърът показва появата на I_{3d} пик - при 620.7 eV ($I_{3d5/2}$) и при 632.2 eV ($I_{3d3/2}$), дължащи се на наличието на CQ в мата. Детектирани са и Cl_{2p} (при 201.8 eV ($Cl_{2p1/2}$) и при 200.2 eV ($Cl_{2p3/2}$) пикове потвърждаващи наличието на CQ в повърхностния слой на PVP,CQinPHB мата. В детайлния C_{1s} спектър на PVP,CQinPHB матовете се идентифицират пет пика. Сигналят при 285 eV беше отнесен за $\underline{C}-H$ или $\underline{C}-C-$ от PHB, PVP и от CQ, а този при 286.5 eV за $\underline{C}-O-C$, $\underline{C}-OH$ от PHB, за $\underline{C}-N-C=O$ от PVP и също за $\underline{C}-N$ и $\underline{C}-OH$ от CQ. Пикът при 287.4 eV беше отнесен за $\underline{N}-\underline{C}=O$ от PVP и при 288.9 eV за $\underline{O}-\underline{C}=O$ от PHB.

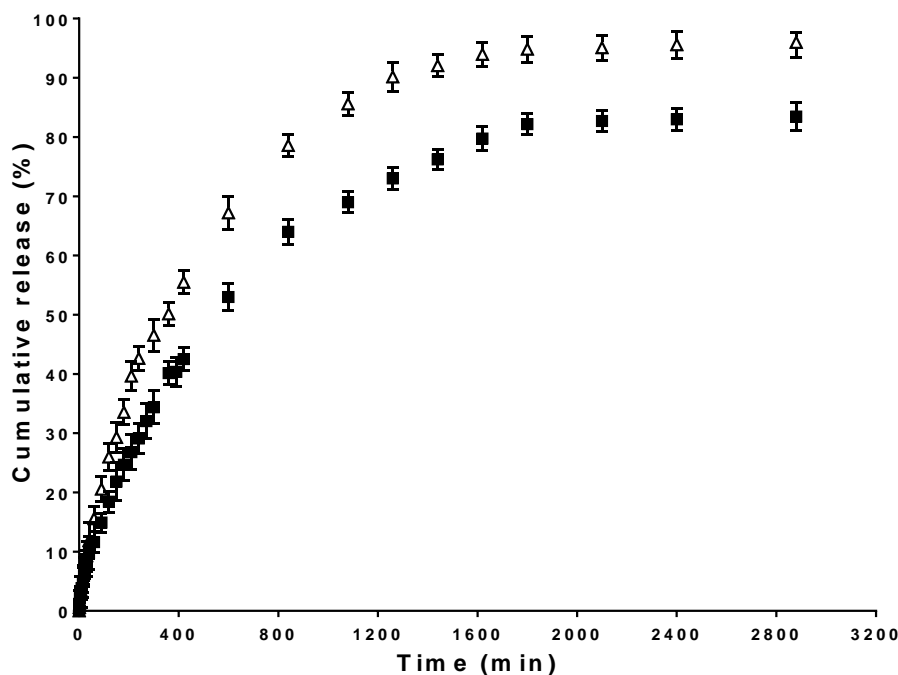
Наблюдава се появата на пик при 290.4 eV съответстващ на $\pi \rightarrow \pi^*$ сателит, характеристичен за ароматното ядро на включения CQ. Детайлният O_{1s} спектър показва четири компонента - при 531.5 eV отнесен за $-N-C=O$ от PVP, при 532.0 eV за $-C=O$ от PNB, при 532.5 eV за $-C-OH$ от CQ и при 533.2 за $-C-OH$ и $-C-O$ от PNB. Наблюдаваните пикове са в съгласие със структурата на PVP,CQ in PNB мата. Теоретично изчисленото отношение на площта на пиковете, която съответства на съответните въглеродни атоми е $[C-C/C-N]/[C-O/C-OH/C-N-C=O/C-N/C-OH]/[N-C=O]/[O-C=O][\pi \rightarrow \pi^*] = 50.3/27.2/1.3/20.2/1.0$, докато експериментално определеното отношение е $50.6/27.4/1.2/20.2/0.6$, т.е. пикът отнасящ се за въглеродните атоми, участващи в $C-C/C-N$ връзките се характеризира с най-голяма площ. Получените резултати са в съответствие с намерената хидрофобност на повърхността на PVP,CQ in PNB мата.

Бяха наблюдавани значителни разлики в детайлния C_{1s} спектър на PVP,CQ on PNB мата в сравнение със C_{1s} спектъра на PNB мата. Детектират се два нови пика при 287.3 eV, отнесен за $-N-C=O$ от PVP и при 290.4 eV отнесен към $\pi \rightarrow \pi^*$ сателит от ароматното ядро на CQ. Наблюдава се и нарастване на интензивността на пика при 286.4 eV, отнесен за $-C-O-C$ и $-C-OH$ от PNB, за $-C-N-C=O$ от PVP, както и за $-C-N$ и $-C-OH$ от CQ. В детайлния O_{1s} спектър на PVP,CQ on PNB мата се наблюдават появата на два нови пика - при 531.6 eV, съответстващ на $-N-C=O$ от PVP и при 532.6 eV, отнесен за $-C-OH$ от CQ. Детайлният N_{1s} спектър на тези матове в сравнение с този на PNB матовете, показва присъствие на два нови компонента – при 399.1 eV характеристичен за $-N-C=O$ от PVP и при 400.0 eV типичен за $-N-C$ от CQ. Присъствието на пиковете за N_{1s} , I_{3d} (при 620.7 eV ($I_{3d5/2}$) и при 632.2 eV ($I_{3d3/2}$)) и Cl_{2p} (при 201.6 eV ($Cl_{2p1/2}$) и при 200.0 eV ($Cl_{2p3/2}$)) потвърждава включването на CQ в PVP частиците, отложени по повърхностния слой на PNB мата.

1.7. Профил на освобождаване на CQ от влакнестите матове

In vitro профила на освобождаване на CQ от PVP,CQ in PNB и PVP,CQ on PNB матовете беше проследен спектрофотометрично за 48 ч в ацетатен буфер (pH 3.6), съдържащ Tween 80 (99/1 v/v), при 25°C. Тези влакнести материали, съдържащи водоразтворимия полимер PVP, показват първоначален бърз етап на освобождаване, последван от втори етап на постепенно освобождаване (Фигура Г1-11). От Фигура Г1-11 се вижда, че CQ се

освобожава по-бързо и в по-голямо количество, когато е включен в частици от PVP, които са отложени по повърхността на PNB влакната отколкото когато е включен в обема на влакна от PVP in PNB. Около 78,6% и 64% от натовареното количество се освобождават в началните 840 мин. при PVP,CQ on PNB и PVP,CQ in PNB матове, съответно (Фигура Г1-11).



Фигура Г1-11. Профили на освобождаване на CQ от: PVP,CQ in PNB мат (■) и PVP,CQ on PNB мат (Δ) в ацетатен буфер/Tween 80 (99/1 v/v) при 25°C, pH 3.6, йонна сила 0.1. Резултатите са представени като усреднени стойности от три отделни измервания със съответното стандартно отклонение.

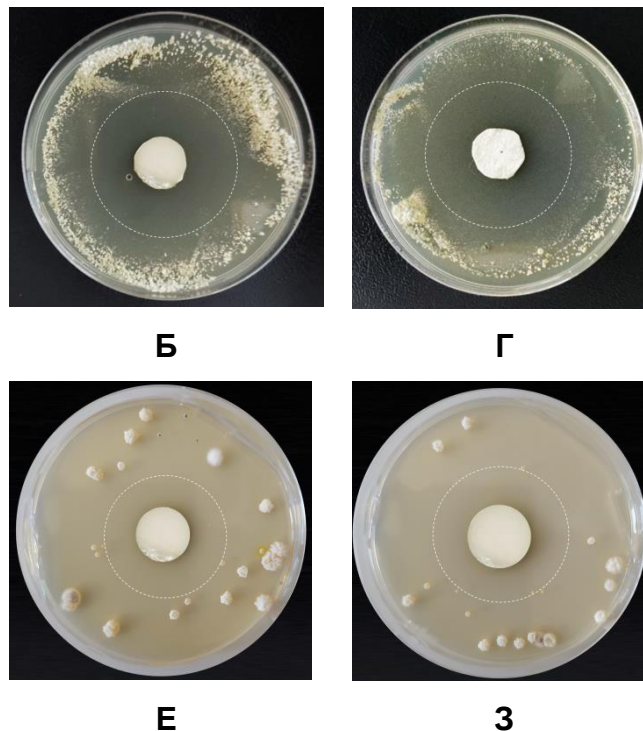
Количеството на освободен CQ от PVP,CQ in PNB матове за 2880 мин. е около 83,5%. При PVP,CQ on PNB матове общото количество освободен CQ за 2880 мин. е 96%. Това най-вероятно може да се обясни с разлика в дифузията на CQ, включен в обема на влакната и дифузията на CQ през частиците от PVP, отложени по повърхността на влакната или върху по-долните слоеве, изграждащи мата. Получените резултати от освобождаването на CQ от матовете показват, че присъствието на водоразтворим полимер PVP във влакнестите материали или по тяхната повърхност улеснява освобождаването на CQ. Тези резултати са в съответствие с данни от литературата за нарастване на скоростта на освобождаване на производни на 8-хидроксихинолина от други влакнести системи при включване на водоразтворим полимер в обема на влакната или по тяхната повърхност.

1.8. Изследване на противогъбичната активност на влакнестите материали

Производните на 8-хидроксихинолина са известни с техните добри антибактериални и противогъбични свойства. Сред производните, CQ притежава способността да потиска развитието на голям брой гъби, като *S. albicans* и др. Досега не са съобщени данни за противогъбичната активност на CQ, както и на влакнести материали, съдържащи това биологично активно вещество спрямо гъбните видове *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*, за които е известно, че са главните причинители на заболяването еска при лозови насаждения.

Ето защо първоначално, беше оценена противогъбичната активност на влакнестите материали, съдържащи CQ чрез провеждане на микробиологични тестове спрямо тези гъби. След провеждане на микробиологичните тестове бяха определени стойностите на MIC за CQ спрямо *P. chlamydospora* и *P. aleophilum* и те са съответно: 10 µg/ml и 1 µg/ml. Поради растежните характеристики на гъбите *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*, тяхното развитие беше проследено за 96 ч. Изходните PНВ и PVPinPНВ матове не проявяват никакъв значим антибактериален ефект спрямо гъбите. За разлика от тях, матовете, съдържащи CQ демонстрират противогъбична активност спрямо тези гъби, като се наблюдават добре дефинирани зони на инхибиране на растежа на гъбичните клетки (Фигура Г1-12 Б, Г, Е и З). Тези добре дефинирани зони показват, че профилът на освобождаване на CQ осигурява достатъчно количество от биологично активното вещество дори в началните етапи на експериментите. Стойностите на средният диаметър на зоните на инхибиране за PVP,CQinPНВ и PVP,CQonPНВ матове при тестовете спрямо *P. chlamydospora* не се различават значимо: 44.2 ± 1.1 мм и 45.0 ± 1.3 мм (Фигура Г1-12 Б и Г). Диаметрите на зоните на инхибиране около PVP,CQinPНВ и PVP,CQonPНВ влакнестите материали са съответно 36.7 ± 1.9 и 41.2 ± 3.0 мм спрямо *P. aleophilum* (Фигура Г-12 Е и З). Наличието на добре дефинирани зони на инхибиране показва, че включеният CQ придава на матовете добра противогъбична активност спрямо тези гъби. Действителният механизъм на действие на CQ в гъбичните клетки все още не е напълно изяснен. Счита се, че противогъбичната активност на CQ се дължи на увреждане на клетъчните стени и инхибиране образуването на псевдохифи в гъбичните клетки, което

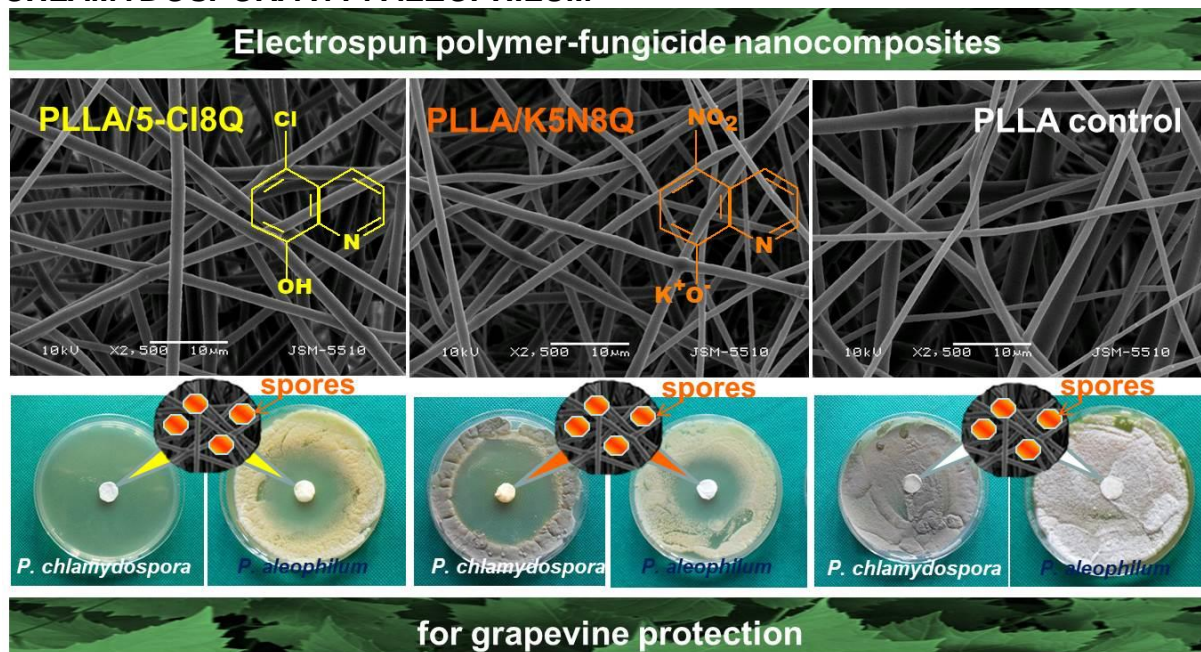
води до смърт на гъбичните клетки. Ние предполагаме, че наблюдаваната противогъбична активност на влакнестите материали, съдържащи CQ се дължи на увреждащия им ефект върху клетъчната стена на гъбите.



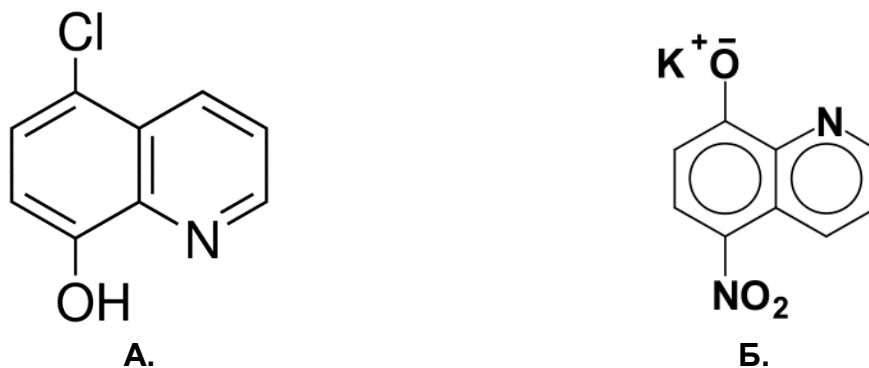
Фигура Г1-12. Дигитални снимки на зоните на инхибиране спрямо *P. chlamydospora* (Б и Г) и *P. aleophilum* (Е и З), регистрирани след 96-часов контакт с: Б и Е - PVP,CQinPHB мат, Г и З - PVP,CQonPHB мат.

С получените резултати показахме, че могат да бъдат получени влакнести материали, съдържащи CQ с различен дизайн чрез електроовлажняване (стратегия “in”) и чрез комбиниране на електроовлажняването и електроразпръскването (стратегия “on”). Установихме, че CQ, включен в обема на PVPinPHB влакната или в PVP частиците, отложени върху PHB влакната е в аморфно състояние и че влакнестите материали (тип “in” и “on”), съдържащи CQ проявяват значителна противогъбична активност. Тези свойства правят получените влакнести материали обещаващи кандидати като активни протектори за приложение в селското стопанство за предпазване на лозови растения от проникването и развитието на двата главни гъбични агента предизвикващи заболяването еска.

Глава 2. ЕЛЕКТРООВЛАКНЕНИ МИКРО- ВЛАКНЕНИ МАТЕРИАЛИ ОТ PLLA С ФУНГИЦИДНИ СВОЙСТВА. АКТИВНА ЗАЩИТА СПРЯМО *P. CHLAMYDOSPORA* И *P. ALEOPHILUM* [П 2] [УС 4]



В настоящата Глава са обобщени резултатите върху получаването и охарактеризирането на нови микровлакнести материали от PLLA и включени БАВ: 5-Cl8Q и K5N8Q (Фигура Г2-1) чрез метода електроовлакняване. Морфологията на влакнестите материали е оценена чрез сканираща електронна микроскопия. Получените материали са хидрофобни и с добри физико-механични свойства. *In vitro* изследвания показват, че фунгицидът се освобождава в по-голяма степен от PLLA/K5N8Q влакнестите матове, в сравнение с освободеното количество фунгицид от PLLA/5-Cl8Q материалите, което се дължи на по-добрата водоразтворимост на калиевия 5-нитро-8-хинолинолат.



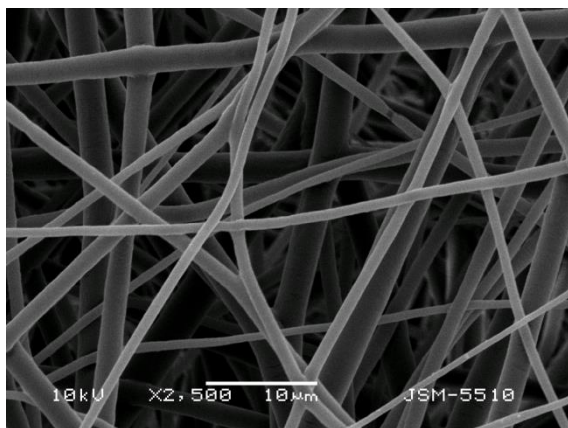
Фигура Г2-1. Формули на: А. 5-хлор-8-хидроксихинолин (5-Cl8Q) и Б. калиев 5-нитро-8-хинолинолат (K5N8Q).

Беше изследвана също така противогъбичната активност на влакнестите материали спрямо *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*. Включването на фунгицида в биоразградимите влакна доведе до потискане растежа на гъбите. Получените материали са перспективни кандидати за защита на лозята от проникването и развитието на гъбичните патогени.

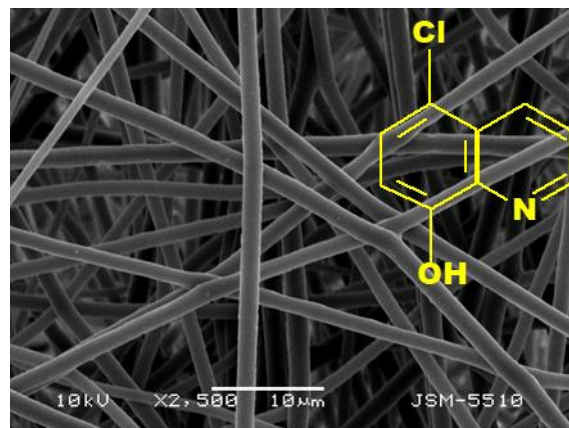
2.1. Получаване и морфология на влакнести материали от PLLA с включени производни на 8-хидроксихинолина

PLA е биоразградим, биосъвместим и термопластичен полимер, който се получава от ежегодно възобновяеми ресурси. В допълнение, този полимер притежава отлични физико-механични характеристики. Поради тези си ценни свойства PLA е особено подходящ носител за агро-фармацевтични средства (АФС).

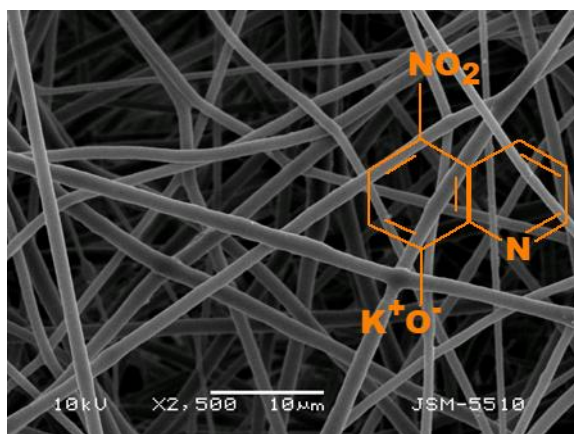
В предишни изследвания, проведени в ЛБАП е установено, че някои производни на 8-хидроксихинолина възпрепятстват развитието на *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*. С цел да проследим влиянието на разтворимостта на някои производни, ние използвахме: 5-хлор-8-хидроксихинолин (5-Cl8Q) и калиев 5-нитро-8-хинолинолат (K5N8Q). На Фигура Г2-2 са представени СЕМ микрографии на влакна получени чрез електроовлажняване на предилен разтвор на PLLA (концентрация 10 тегл.%) и БАВ 5-Cl8Q и K5N8Q (съдържание на веществата 10 тегл.% спрямо теглото на полимера) в смесен разтворител DCM/EtOH (DCM/EtOH = 90/10). Средните стойности на диаметрите на влакната от PLLA са 1045 ± 320 nm (Фигура Г2-2 А). Получените данни за диаметрите на влакната от PLLA са в съответствие с данни от литературата.



А 1045 ± 320 nm



Б 1125 ± 300 nm



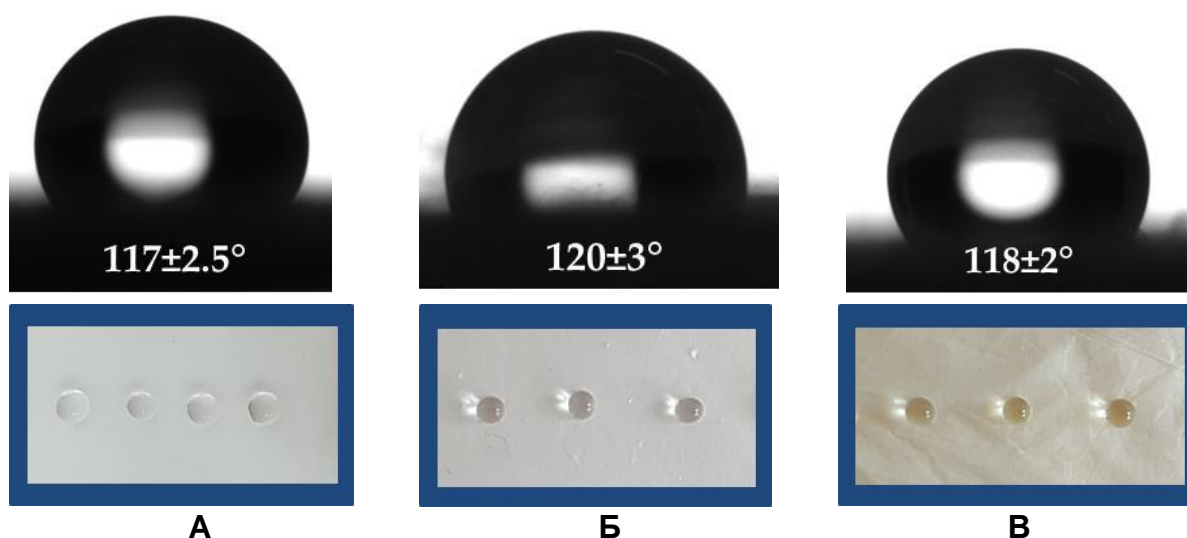
В 1065 ± 250 nm

Фигура Г2-2. SEM микрографии на влакна от А. PLLA, Б. PLLA/5-Cl8Q и В. PLLA/K5N8Q; увеличение x2 500.

Влакната са еднородни, с цилиндрична форма. Средният диаметър на PLLA/5-Cl8Q и PLLA/K5N8Q влакната е съответно 1125 ± 300 nm и 1065 ± 250 nm. Това е доказателство, че добавянето на нискомолекулни АФС (производни на 8-хидроксихинолина) не води до значителна промяна в морфологията и средните диаметри на влакната.

2.2. Контактен ъгъл на омокряне на влакнести материали

Определени са стойностите на контактните ъгли на омокряне спрямо вода на получените влакнести материали. Материалът от PLLA е хидрофобен, със стойност на контактния ъгъл $117^\circ \pm 2.5^\circ$ (Фигура Г2-3 А). Измерената стойност за мата от PLLA е близка до стойностите, които се срещат в литературата.

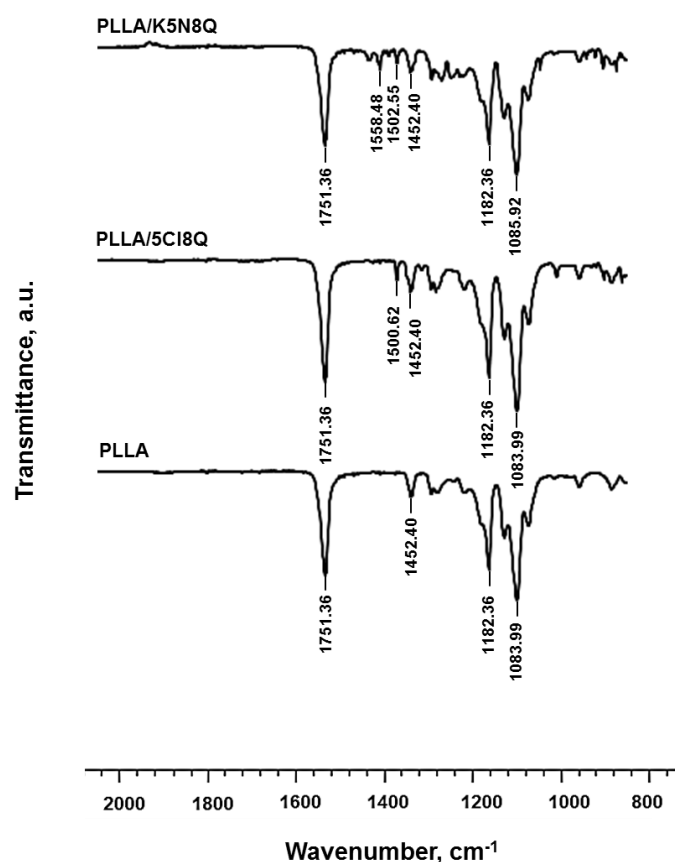


Фигура Г2-3. Изображения на водни капки върху повърхността на влакнести материали от: А. PLLA, Б. PLLA/5-Cl8Q и В. PLLA/K5N8Q.

Стойностите на контактните ъгли на композитните влакнести материали от PLLA/5-CI8Q и PLLA/K5N8Q са съответно $120^\circ \pm 3^\circ$ и $118 \pm 2^\circ$ (Фигура Г2-3 Б и В). Тези стойности са близки до стойностите измерени за електроовлакнените материали от PLLA.

2.3. ИЧ спектроскопия с Фурие трансформация (FTIR)

Съставът на получените влакнести материали беше охарактеризиран качествено чрез ИЧ спектроскопия с Фурие трансформация (FTIR). Снетите спектри са показани на Фигура Г2-4.



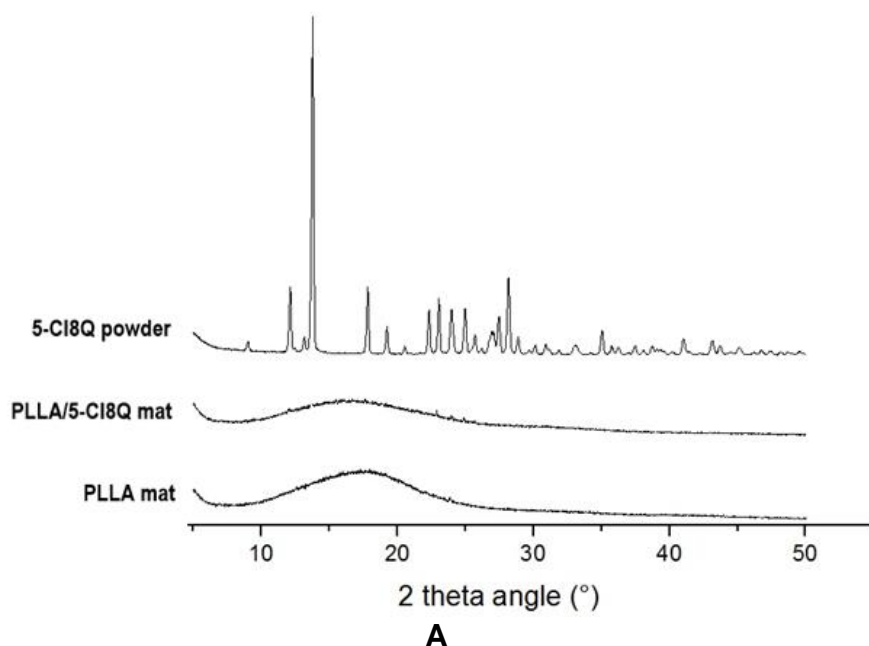
Фигура Г2-4. ИЧ спектри на електроовлакнени материали от PLLA, PLLA/5-CI8Q и PLLA/K5N8Q.

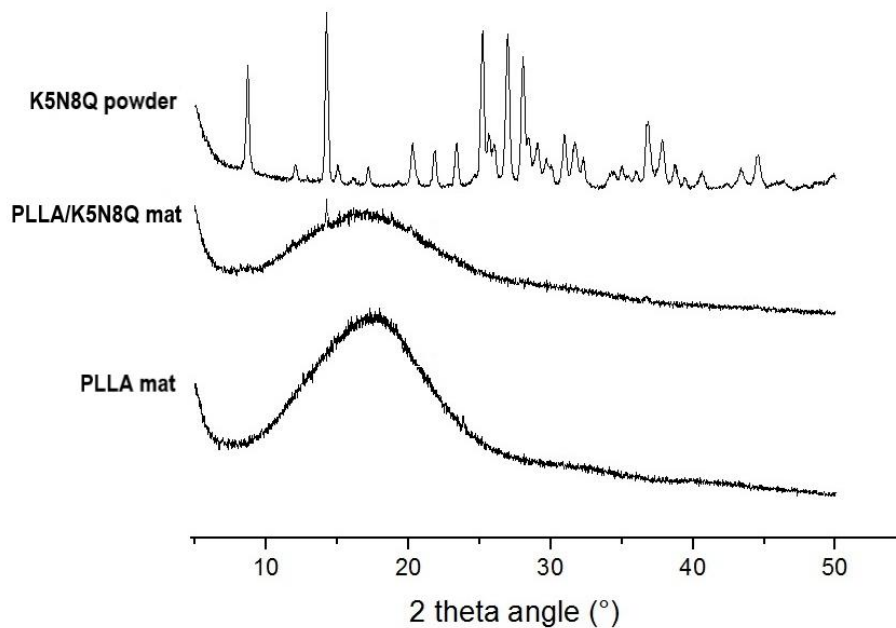
Характеристични ивици за PLLA се появяват при 1751 cm^{-1} за C=O групите и при 1182 cm^{-1} за C-O-C групите. Забелязват се също така характеристичните ивици за C-O групите при 1080 cm^{-1} и за -CH₃ групите при 1452 cm^{-1} и 1361 cm^{-1} , които са в съответствие с данни от литературата. При влакнестите материали от PLLA/5-CI8Q и PLLA/K5N8Q в допълнение към характеристичните ивици за PLLA се наблюдава появата на нова

характеристична ивица при 1500 cm^{-1} от ароматното ядро на химичния фунгицид (Фигура Г2-4).

2.4. Рентгеноструктурен анализ (XRD)

Кристалността на получените влакна е определена чрез рентгеноструктурен анализ (XRD) (Фигура Г2-5). На Фигура Г2-5 А и Г2-5 Б са представени съответно XRD спектрите на влакнестите материали от PLLA, PLLA/5-CI8Q и PLLA/K5N8Q, както и на изходните съединения 5-CI8Q и K5N8Q (на прах). В XRD спектрите бяха забелязани характеристични, остри дифракционни пикове на съединенията 5-CI8Q и K5N8Q, които са на прах. Тези пикове показват, че фунгицидите са в кристална форма. В XRD спектрите на влакната от PLLA се наблюдава наличие на широко аморфно хало, което е доказателство, че този материал притежава типично аморфна структура. Аморфно хало се наблюдава и в спектрите на композитните влакнести материали от PLLA/5-CI8Q и PLLA/K5N8Q. Това показва, че всички съединения, включени в композитните влакнести материали са в аморфно състояние.

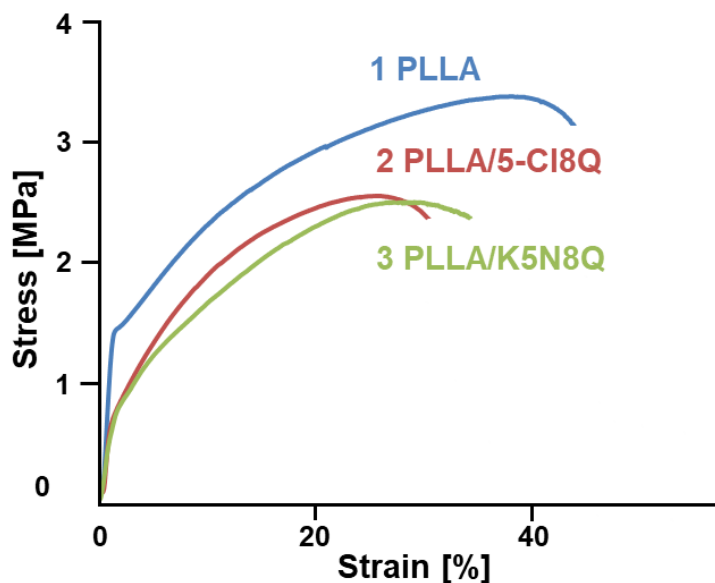




Фигура Г2-5. Рентгенограми на: А. 5-Cl8Q (прах), PLLA мат и PLLA/5-Cl8Q мат и Б. K5N8Q (прах), PLLA мат и PLLA/K5N8Q мат.

2.5. Механични свойства

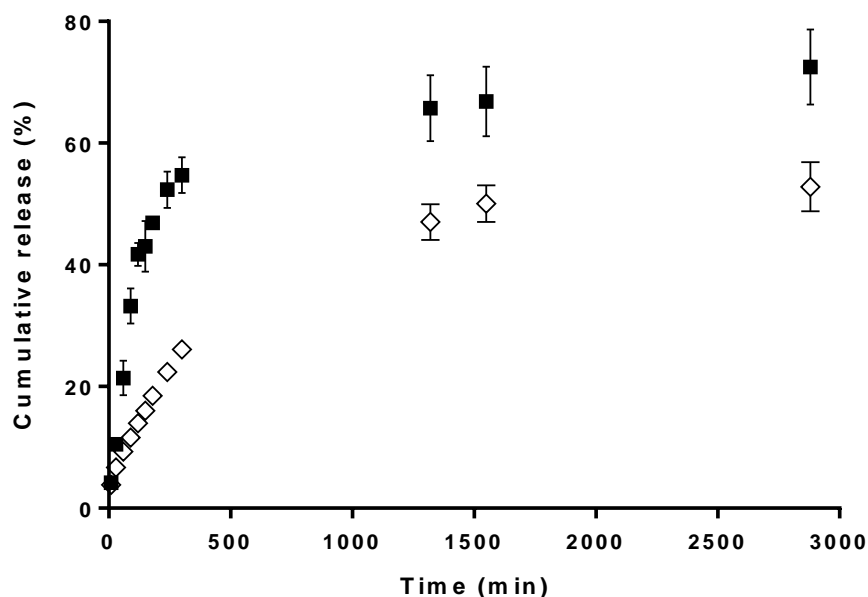
На Фигура Г2-6 са представени кривите напрежение-деформация на електроовлакнените материали от PLLA, PLLA/5-Cl8Q и PLLA/K5N8Q. Материалът от PLLA е с най-високи стойности на якостта на опън. Определянето на механичните характеристики на композитните влакна от PLLA/5-Cl8Q и PLLA/K5N8Q показва, че тези материали притежават сходни механични свойства, макар и малко по-ниски от тези на влакнестите материали от PLLA. От резултатите може да се направи извода, че включването на 5-Cl8Q или K5N8Q във влакнестите мембрани, не променя значително техните механични характеристики. Якостта на опън на композитните влакнести материали от PLLA/5-Cl8Q и PLLA/K5N8Q беше около 2.5 МПа, докато якостта на опън на PLLA влакнестите материали достигна 3.4 МПа. Лекото занижаване на механичните характеристики може да се дължи на включването на производните на 8-хидроксихинолина в полимерна матрица от PLLA, които могат да създадат слаби места (дефекти), които понижават якостните характеристики на композитните материали.



Фигура Г2-6. Криви напрежение-деформация на електроовлакнени материали от: (1) PLLA, (2) PLLA/5-Cl8Q и (3) PLLA/K5N8Q.

2.6. Профил на освобождаване

Профилът на освобождаване на 5-Cl8Q и K5N8Q от PLLA влакнест мат беше проследен спектрофотометрично при използване на ацетатен буфер ($\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$), съдържащ млечна киселина (ацетатен буфер/млечна киселина = 96/4 v/v) с рН 3 и йонна сила 0.1, при 37°C. На Фигура Г2-7 са представени профилите на освобождаване на двете съединения. Първоначално и двете АФС показаха относително бързо освобождаване от PLLA влакната. Въпреки това, K5N8Q се освободи в по-голяма степен в сравнение с 5-Cl8Q, за същия период от време. При същите времеви интервали, освободеното количество K5N8Q беше съответно 10.5% и 21.4% на 30^{-та} и 60^{-та} минута. За същото време, освободеният 5-Cl8Q беше съответно 6.7% и 9.3%. Тази разлика в профилите на освобождаване може да бъде отдадена на природата и водоразтворимостта на използваните вещества. K5N8Q е водоразтворимо съединение, което благоприятства неговото по-бързо освобождаване. Обратно на това, 5-Cl8Q е слабо разтворим във вода, което възпрепятства освобождаването му. След 50 часа, количествата на освободените 5-Cl8Q и K5N8Q бяха съответно 52.8% и 72.5%.



Фигура Г2-7. Профили на освобождаване на 5-CI8Q и K5N8Q от PLLA влакна: PLLA/5-CI8Q (\diamond) и PLLA/K5N8Q (\blacksquare). Резултатите са представени като осреднени стойности от три отделни измервания със съответното стандартно отклонение; ацетатен буфер/млечна киселина (96/4 v/v), pH 3.37°C, йонна сила 0.1.

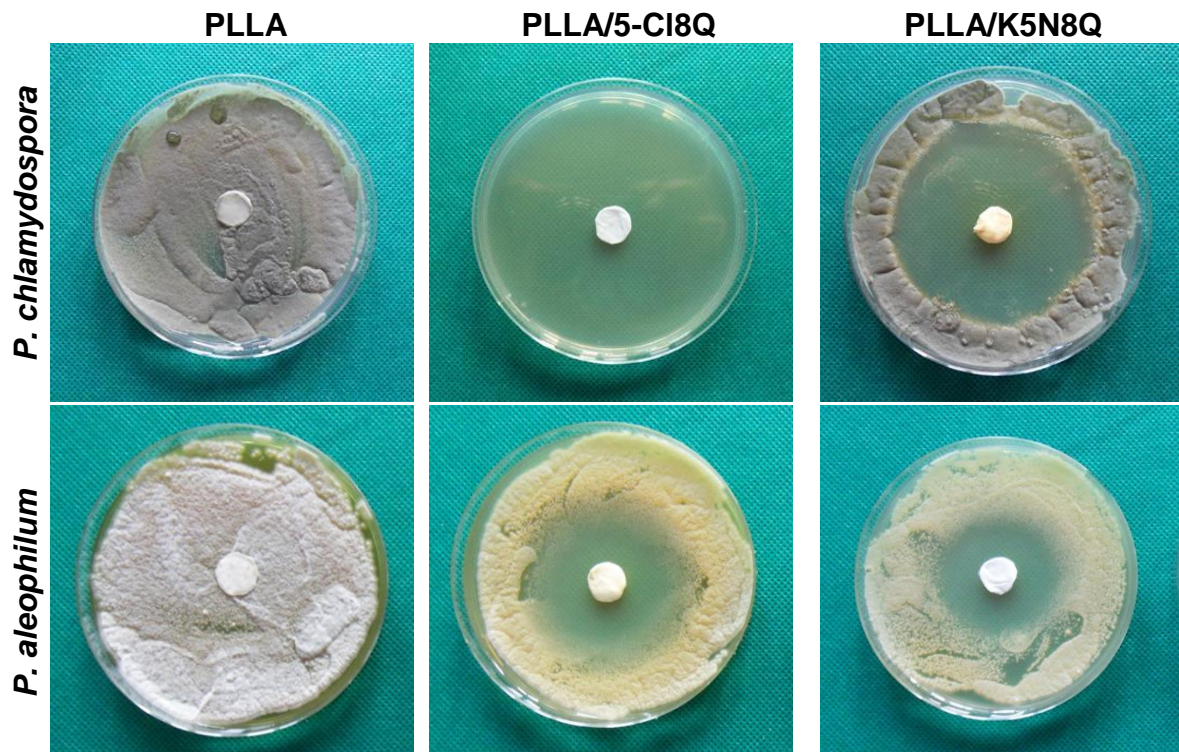
2.7. Микробиологични изследвания спрямо *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*

Беше оценена противогъбичната активност на получените чрез електроовлакняване матове от PLLA, PLLA/5-CI8Q и PLLA/K5N8Q чрез провеждане на тестове спрямо гъбите *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*.

Въпреки, че има данни по отношение на противогъбичната активност на производните на 8-хидроксихинолина срещу гъби от вида *Candida*, няма данни за въздействието им спрямо гъбите *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*, които са основните причинители на заболяването еска. Поради тази причина, първоначално определелихме минималната инхибираща концентрация (MIC) на 5-CI8Q спрямо двата вида гъби и тя е 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и за двата щама. За K5N8Q, определената MIC спрямо *P. chlamydospora* и *P. aleophilum* беше съответно 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

На Фигура Г2-8 са представени резултатите, получени при определяне на зоните на инхибиране при контакт на влакнестите материали с гъбичните спори. Пълно потискане на растежа на гъбите беше отчетено при композитните влакнести материали от PLLA/5-CI8Q, които са поставени в контакт с *P. chlamydospora*. Наблюдава се и широка зона на инхибиране около дисковете с

включени хидроксихинолинови производни, поставени в контакт с *P. aleophilum*, като в случая на PLLA/5-CI8Q, зоната на инхибиране е 4.7 cm. Включването на K5N8Q във влакната също доведе до появата на широки зони на инхибиране. Диаметрите на зоните са 6.2 cm и 4.0 cm съответно спрямо *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*. От получените резултати ясно се вижда, че *P. chlamydospora* е по-податлива към третирането с използваните производни на 8-хидроксихинолина.

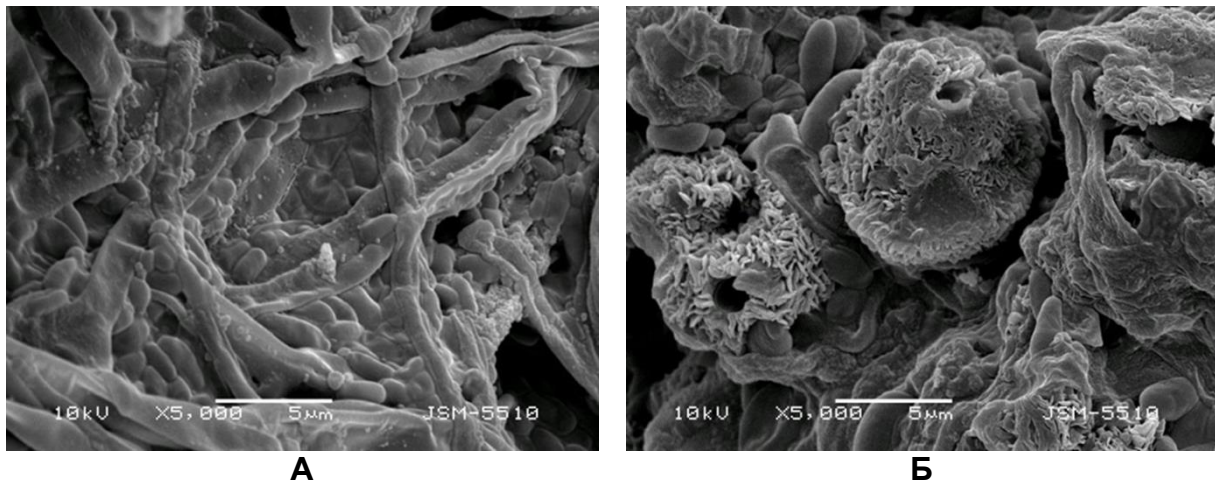


Фигура Г2-8. Дигитални изображения на зоните на инхибиране спрямо *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*, след поставяне на влакнестите материали в контакт с клетките на гъбите. Видът на материала е посочен в горната част на всяка колона. Типът на гъбите е отбелязан вляво на всеки ред.

Получените резултати показаха, че композитните влакнести материали, съдържащи хидроксихинолинови производни, притежават силна противогъбична активност, за разлика от влакнестите материали от PLLA, които не повлияват растежа на гъбите и не проявяват противогъбична активност.

Изследвани бяха и бариерните свойства на получените влакнести материали. За тази цел 20 mL суспензия на конидии беше пропусната през всеки влакнест материал (с диаметър 45 mm) с помощта на филтриращо устройство. Чрез използване на SEM анализ първоначално беше определен

размера на конидиите на *P. chlamydospora* и *P. aleophilum* в гъбната суспензия. На Фигура Г2-9 са представени изображения на двата вида конидии.

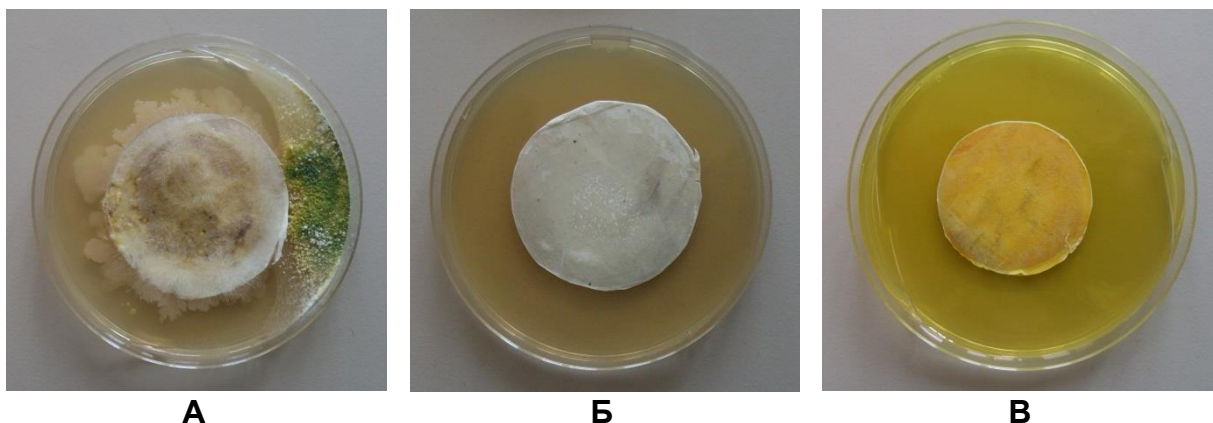


Фигура Г2-9. СЕМ микрографии на конидии на А. *P. chlamydospora* и Б. *P. aleophilum*.

Измерените диаметър и дължина на конидиите бяха съответно $\sim 0.75\text{--}1.2\ \mu\text{m}$ и $1.8\text{--}2.3\ \mu\text{m}$ за *P. chlamydospora* и $\sim 1.1\text{--}1.5\ \mu\text{m}$ и $2.5\text{--}3.5\ \mu\text{m}$ за *P. aleophilum*. Първоначалната концентрация при експериментите с филтрирането беше 1×10^7 конидии/mL за всеки един от двата щама. След преминаването през влакнестите дискове, беше определена следната концентрацията на спорите от 1.6×10^3 , 1.3×10^3 и 1.4×10^3 конидии/mL съответно за материалите от PLLA, PLLA/5-CI8Q и PLLA/K5N8Q. Тези резултати показват, че крайната концентрация на конидии е намаляла значително. Въпреки това, някои конидии са премили през влакнестите материали.

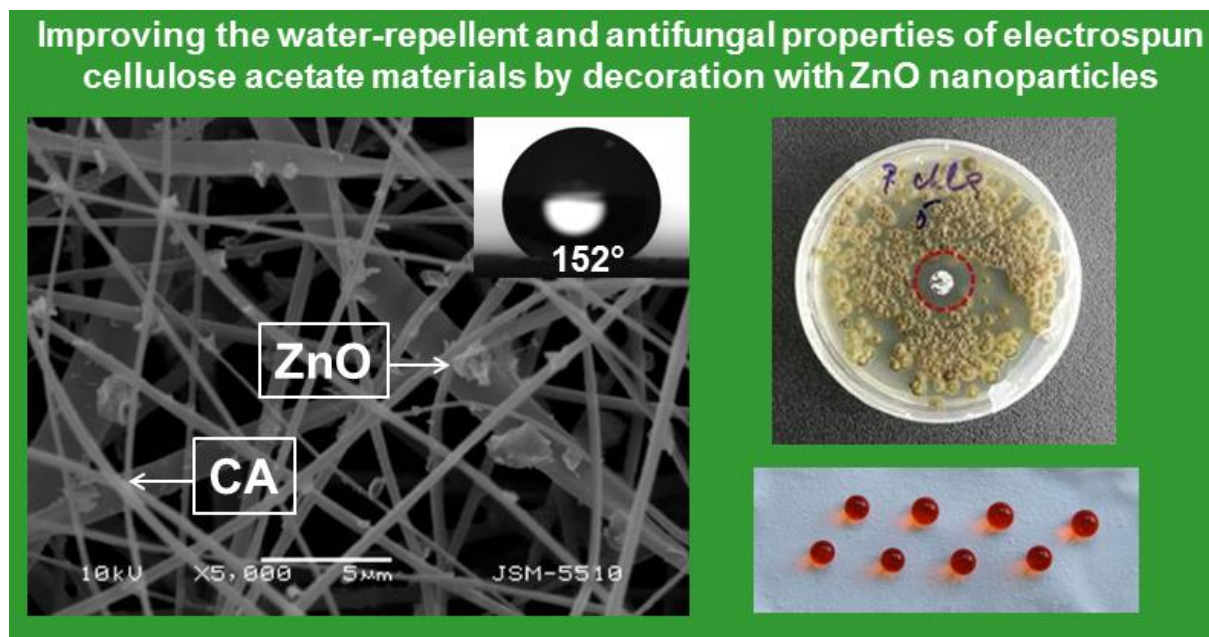
Представляваше интерес да се определи не само способността на материалите да възпрепятстват проникването на гъбичните спори, но и да се изследва дали влакнестите материали възпрепятстват растежа на патогенните гъби, останали в материала след филтруването. За целта, след филтруването, използваните дискове бяха поставени върху твърд агар, за да се определи растежа на останалите във влакнестите дискове спори. Петритата бяха поставени за 96 ч. при 28°C и после беше определен растежа на гъбите. Фигура Г2-10 представя растежа на *P. chlamydospora* върху повърхността на влакнестите материали. Беше установено, че влакнестият материал от PLLA, използван в експериментите за филтриране, развива колонии от *P. chlamydospora* (Фигура Г2-10 А). Развилите се колонии са доказателство, че този материал не притежава противогъбична активност. PLLA/5-CI8Q и

PLLA/K5N8Q матовете, които бяха поставени в подходящи условия за развитието на останалите спори в материалите, възпрепятстваха растежа им, което доведе до пълно потискане на гъбичния растеж (Фигура Г2-10 Б и Г2-10 В). Тези резултати показват, че гъбичните спори, останали в материалите от PLLA/5-C18Q и PLLA/K5N8Q, след филтруването, не могат да се развият поради противогъбичната активност на получените композитни материали.



Фигура Г2-10. Дигитални снимки на растежа на *P. chlamydospora* върху влакнестите материали: А. PLLA, Б. PLLA/5-C18Q и В. PLLA/K5N8Q, използвани след филтруване на спори.

Глава 3. ЕЛЕКТРООВЛАКНЕНИ МАТЕРИАЛИ ОТ ЦЕЛУЛОЗЕН АЦЕТАТ ДЕКОРИРАНИ С НАНОЧАСТИЦИ ОТ ZnO С ПОДОБРЕНИ ВОДООТБЛЪСКВАЩИ СВОЙСТВА [П 1] [ПС 1,2] [УС 1,2]



В Глава 1 и Глава 2 разгледахме получаването на нови иновативни материали с фунгицидни свойства. Те са получени с електрокинетичните методи на електроовлакняване или електроовлакняване с едновременно

електроразпръскване. Използвани бяха три производни на 8-хидроксихинолина – монозаместените 5-хлор- и 5-нитро- производни и дизаместеното 5-хлор-7-йод производно. За приготвяне на влакнестите материали използвахме биологично разградимите полимери PHB и PLLA. Интерес представлява да изследваме възможността за получаване на матове с фунгицидна активност от някои производни на целулозата и метален оксид (цинковия оксид).

В **Глава 3** е показана възможността за получаване на електроовлакнени материали (бездефектни влакна и влакна с дефекти) от целулозен ацетат или целулозен ацетат и ZnO. Бяха проведени редица проучвания, за да се установят оптималните условия за електроразпръскване или електроовлакняване на целулозен ацетат в ацетон/вода. Беше оценен ефектът от включването на наночастици от ZnO върху морфологията, омекрянето и противогъбичната активност спрямо *P. chlamydospora*, при вариране на концентрацията на СА. Получените влакнести материали от целулозен ацетат, декорирани с наночастици ZnO, могат да бъдат подходящи кандидати, които да намерят потенциални приложения в селското стопанство за растителна защита.

3.1. Получаване и морфология на влакнестите материали от СА и ZnO

Целулозният ацетат е един от най-важните естери на целулозата. Предимствата на СА са неговата ниска цена, добрата разтворимост в различни разтворители, подходящи за електроовлакняване, лесното му получаване и голямото разнообразие от приложения, които притежава. Установено е, обаче, че нито един от разтворителите - ацетон, оцетна киселина и диметилацетамид сам по себе си не позволява непрекъснато формиране на влакна от целулозен ацетат. Целулозният ацетат е неразтворим във вода, но при смесване на водата с ацетон и оцетна киселина, парното налягане на системата намалява като това води до значително подобряване на процеса на електроовлакняване.

ZnO е нетоксичен и проявява фотохимична и антибактериална активност. Това се дължи на факта, че наноструктурираният ZnO е много активен материал, поради неговата способност да генерира реактивни кислородни видове (ROS) и да освобождава Zn^{2+} йони. В предишни наши изследвания показахме възможността да декорираме флуор-съдържащи полимери с наночастици от ZnO чрез използване на метода електроовлакняване/електроразпръскване. Показахме, че получените хибридни

влакнести матове проявяват антибактериална активност срещу грам-положителната бактерия *Staphylococcus aureus*.

Бяха получени разтвори от целулозен ацетат с различна полимерна концентрация в смесен разтворител ацетон/вода. Бяха измерени стойностите на динамичния вискозитет на получените разтвори. Стойностите на вискозитета на разтворите от СА в разтворителна система ацетон/вода с концентрации 6, 8, 10 и 17 тегл.% бяха съответно 20 сР, 52 сР, 122 сР и 1120 сР. Беше установено, че при повишаване на полимерната концентрация, стойностите на вискозитета на разтвора нарастват. Повишаването на вискозитета на разтвора беше отдадено на по-високата степен на преплитания между веригите.

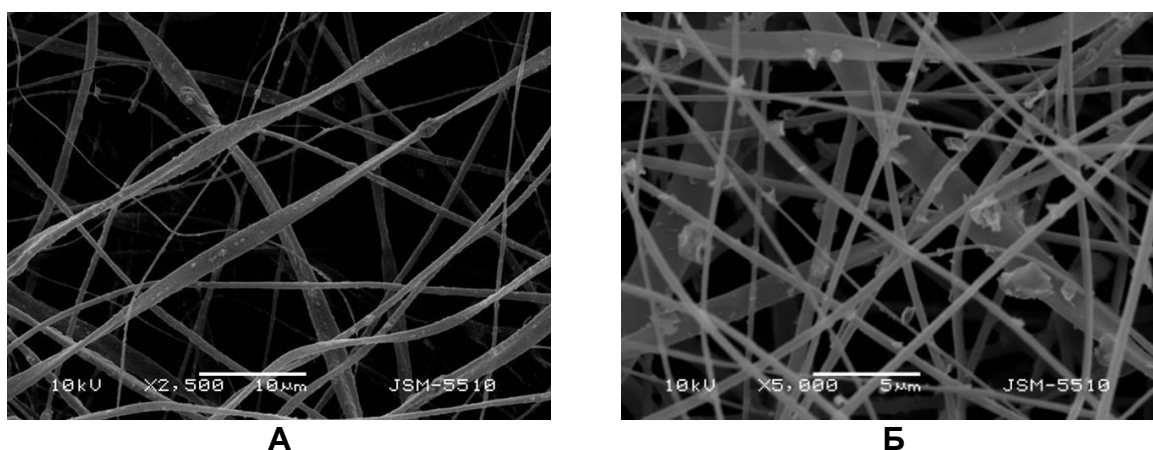
Морфологията на получените влакнести материали беше наблюдавана със сканираща електронна микроскопия. Електроовлажняването на разтвор на целулозен ацетат с концентрация 6 тегл.% и стойност на вискозитета 20 сР доведе до получаването на микрочастици свързани с фини влакна.

Наблюдава се преход от получаване на частици към образуване на влакна с дефекти, когато разтвор с концентрация 8 тегл.% и вискозитет 25 сР беше подложен на електроовлажняване. Средните диаметри на влакната от целулозен ацетат, получени от разтвори с концентрации 8 и 10 тегл.% бяха съответно 680 ± 119 nm и 780 ± 110 nm. При повишаване на концентрацията на целулозен ацетат, броя на дефектите намалява. Беше установено, че влакната получени от разтвор на целулозен ацетат с концентрация 10 тегл.% и стойност на вискозитета на разтвора 122 сР, бяха еднородни, бездефектни и с лентовидна структура. Получаването на лентовидни влакна чрез електроовлажняване на целулозен ацетат е в съответствие с литературните данни. Лентовидната структура се обяснява с образуването на тънък полимерен слой върху струята. След като слой се образува, разтворителят от вътрешността на струята се изпарява по-трудно. Атмосферното налягане деформира струята и така сечението става елипсовидно, а след това плоско, образувайки лента.

При по-нататъшно увеличаване на концентрацията до 17 тегл.%, обаче, стойността на вискозитета нарасна до 1120 сР, което води до неравномерно изтичане на струята от капиллярата и нестабилност на процеса, поради което се образуват нееднородни влакна. Средният диаметър на тънките влакна е 580 ± 180 nm, а на по-дебелите - 5.9 ± 1.2 μ m. Беше установено, че

концентрацията на целулозния ацетат оказва съществено влияние върху морфологията на влакната. Бездефектни и равномерни влакна се получават при електроовлажняване на разтвори на целулозен ацетат с концентрация 10 тегл.%.

На Фигура Г3-2 са показани СЕМ изображенията на получените хибридни влакна от СА (10 тегл.%) и наночастици от ZnO (30 тегл.%) с дизайн тип “in” (Фигура Г3-2 А) и “on” (Фигура Г3-2 Б). Включването на ZnO (30 тегл.%) доведе до морфологични изменения в получените влакна и също така до увеличаване на средния диаметър на влакната. Това се дължи на увеличаване на стойността на вискозитета на суспензията СА/ZnO до 2010 сР.



Фигура Г3-2. СЕМ микрографии на електроовлажнени хибридни материали от А. ZnO-*in*-СА и Б. ZnO-*on*-СА. Увеличение на микрографиите x 5 000.

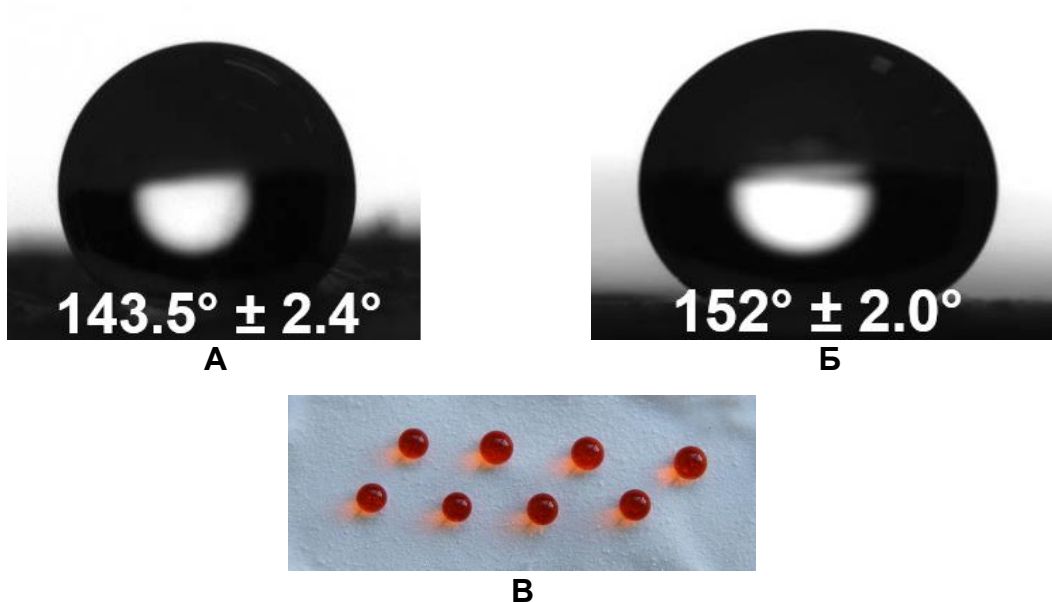
Добре известно е от литературата, че увеличаването на молекулната маса на използваните полимери, полимерна концентрация и вискозитета на разтвора/суспензията води до увеличаване и на средния диаметър на влакната, които се получават. Средният диаметър на хибридните ZnO-*in*-СА влакна е 1150 ± 285 nm. Беше установено, че включването на наночастици от ZnO води до получаване на влакна, в които цинковият оксид е включен главно във вътрешността на влакната, но се забелязва и образуването на агрегати от ZnO по повърхността на влакната. Може да се допусне, че една от възможните причини за наличието на агрегати във влакната е бързото изпаряване на разтворителя по време на полета на струята от дюзата към колектора.

На Фигура Г3-2 Б са представени СЕМ микрографии на влакнестите матове от ZnO-*on*-СА. Както ясно се вижда, влакната от СА са равномерно декорирани с частици от ZnO.

3.2. Контактен ъгъл на омокряне на влакнестите материали

Беше измерен контактният ъгъл на омокряне спрямо вода на получените матове от СА. Беше установено, че електроовлакнените матове от СА са хидрофобни със стойности на контактния ъгъл на омокряне $120^{\circ} \pm 4^{\circ}$.

Изследвано е влиянието на частиците от ZnO върху омокрянето на хибридни влакна на основата на целулозен ацетат. На Фигура Г3-3 А и Г3-3 Б са показани изображения на капка дестилирана вода ($10 \mu\text{l}$), отложена върху повърхността на матове от ZnO-*in*-СА и ZnO-*on*-СА. Включването на частици от ZnO със силанизирана повърхност доведе до хидрофобизиране на влакнестите материали от СА. Средната стойност на контактния ъгъл на омокряне спрямо вода на мата ZnO-*in*-СА е $143.5 \pm 2.4^{\circ}$ (Фигура Г3-3 А). Получаването на нови влакнести хибридни материали на основата на СА и наночастици от ZnO с дизайн тип "on" доведе до допълнително увеличаване на стойностите на контактния ъгъл и получаването на материали със суперхидрофобни свойства и с контактни ъгли $152^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (Фигура Г3-3 Б). За улесняване на визуализацията, водата беше оцветена с реактивно червено, беше накапана върху мата и капките бяха заснети (Фигура Г3-3 В). Както ясно може да се види, водните капки запазват своята кръгла и сферична форма и не се разстилат по повърхността.

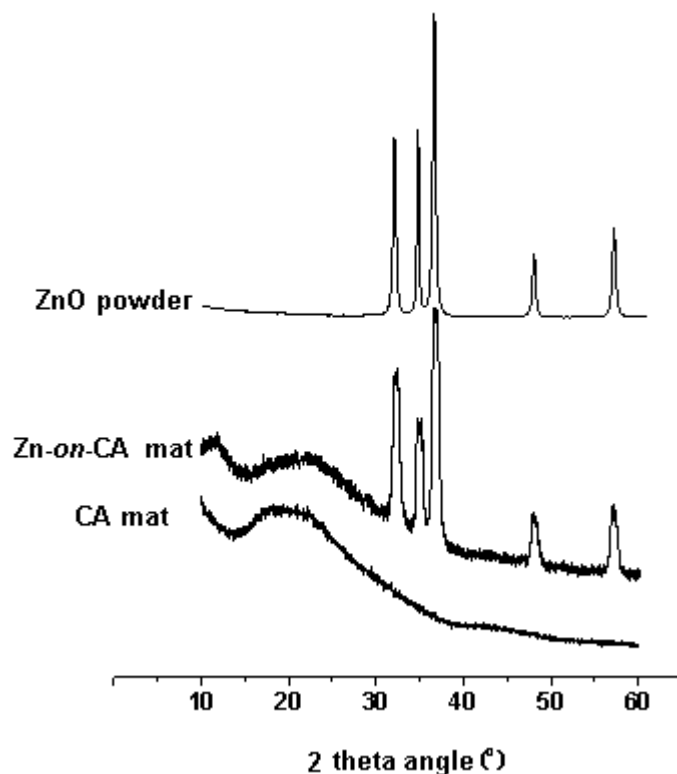


Фигура Г3-3. Дигитални снимки на капки, отложени на повърхността на матове от: А. ZnO-*in*-СА и Б. ZnO-*on*-СА. В. оцветени с реактивно червено капки, отложени върху ZnO-*on*-СА мат.

Декорирането на влакна от СА с частици от ZnO доведе до създаването на материали с неравна структура, голяма специфична повърхност и суперхидрофобни свойства.

3.3. Рентгеноструктурен анализ

На Фигура Г3-4 са представени рентгенограми на ZnO на прах, СА и ZnO-on-CA матове, които са записани в обхват 2θ от 10° до 60° .



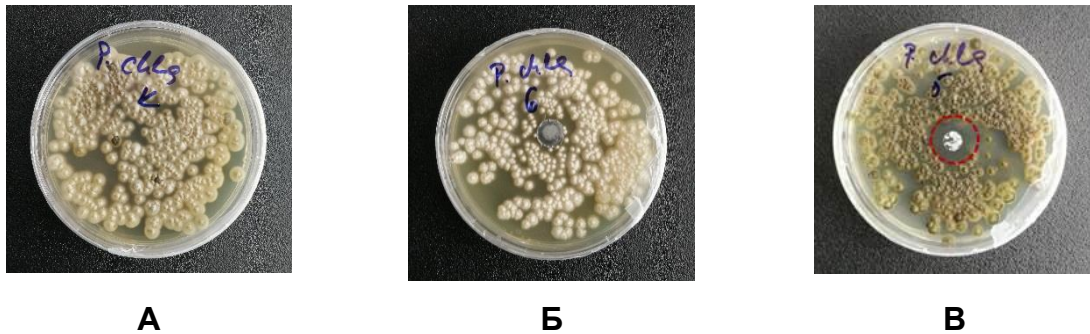
Фигура Г3-4. Рентгенограми на ZnO на прах, ZnO-on-CA мат и СА мат.

Беше установено наличието на основните дифракционни пикове на шестоъгълния вюрцит ZnO, (100) (002) (101) (102) и (110), разположени при $2\theta = 34.5^\circ$, 36.3° , 47.7° и 56.7° . Два широки пика при $2\theta = 10.3^\circ$ и 21.7° присъстват в рентгенограмата на мата от СА, което показва, че матът е в аморфно състояние. В хибридните влакнести материали на основата на СА и ZnO, рентгеноструктурния анализ показва наличието на два широки пика характерни за СА и остри пикове характерни за ZnO. Това потвърждава, че всички хибридни матове съдържат както СА, така и ZnO.

3.4. Противогъбична активност на влакнестите материали

Беше оценена противогъбичната активност на електроовлакнените материали на основата на СА и СА/ZnO. На Фигура Г3-5 са представени

резултатите получени при определяне на зоните на инхибиране след контакта на влакнестите материали с гъбичните клетки.



Фигура Г3-5. Дигитални изображения на зоните на инхибиране спрямо *P. chlamydospora* след поставяне на влакнестите материали в контакт с гъбичните клетки: А. контрола, Б. СА мат и В. ZnO-on-CA мат.

Влакнестите материали от СА не възпрепятстват гъбичния растеж и не проявяват никаква противогъбична активност (Фигура Г3-5 Б). Матът от ZnO-*in*-СА показва незначителен подтискащ ефект. Декорирането на повърхността на влакната от СА с частици ZnO доведе до потискане растежа на гъбите и формиране на зона на инхибиране (Фигура Г3-5 В). Диаметърът на зоната на инхибиране беше 16 мм. Наличието на зона на инхибиране около ZnO-*on*-СА мата е доказателство, че декорирането на влакна от СА с ZnO придава противогъбична активност на получените хибридни материали. Тези свойства показват, че влакнестите материали на основата на целулоза и нейни производни, декорирани с ZnO, могат да намерят приложение в селското стопанство за растителна защита срещу адхезия и растеж на патогенните гъби.

IV. ИЗВОДИ

Създадени са нови еко-съобразни електроовлаknени полимерни материали с фунгицидна активност и са показани възможности за тяхното приложение за целите на селското стопанство. От проведените изследвания могат да бъдат направени следните изводи:

1. Бяха получени влакнести материали, съдържащи CQ с различен дизайн чрез електроовлаknяване (стратегия “*in*”) и чрез комбиниране на електроовлаknяването и електроразпръскването (стратегия “*on*”).
2. CQ включен в обема на PVP*in*PHB влакната или в PVP частиците отложени върху PHB влакната е в аморфно състояние.

3. Съдържащите CQ влакнести матове проявяват значителна противогъбична активност спрямо гъбите *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*.

4. Намерени бяха оптимални условия за получаване на нови микро- и нановлакнести материали от PLLA и включени БАВ: 5-Cl8Q и K5N8Q чрез метода електроовлакняване.

5. *In vitro* изследванията показваха, че фунгицидът се освобождава в по-голяма степен от PLLA/K5N8Q влакнестите матове, в сравнение с освободеното количество фунгицид от PLLA/5-Cl8Q материалите, което се дължи на по-добрата водоразтворимост на калиевия 5-нитро-8-хинолинолат.

6. Получените PLLA/5-Cl8Q и PLLA/K5N8Q влакнести материали са хидрофобни, с добри физико-механични свойства и притежават противогъбичната активност спрямо *P. chlamydospora* и *P. aleophilum*.

7. Бяха намерени подходящи условия за получаване на влакнести материали от целулозен ацетат (CA) или CA и наночастици от ZnO чрез електроовлакняване и едновременно електроовлакняване с електроразпръскване.

8. Декорирането на повърхността на влакната от CA с наночастици от ZnO доведе до получаването на влакна със суперхидрофобни и противогъбични свойства.

9. Получените нови еко-съобразни електроовлакнени полимерни материали са обещаващи кандидати като активни протектори за приложение в селското стопанство за предпазване на лозови растения от проникването и развитието на двата главни гъбични агента предизвикващи заболяването еска.

V. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Създадени са иновативни средства за растителна защита на основата на полимери с фунгицидно действие спрямо гъбите *P. chlamydospora* и *P. aleophilum* – причинители на заболяването еска.

Установено е, че на материали от нетоксични, биоразградими и екологично безвредни полимери - поли(L-лактид), поли(3-хидроксибутират), поливинилпиролон, целулозен ацетат, могат да бъдат придадени фунгицидни свойства посредством приготвяне на смесени разтвори с производни на 8-хидроксихинолина (5-хлор-7-йод-8-хидроксихинолин, калиев 5-

нитро-8-хинолинолат и 5-хлор-8-хидроксихинолин) и на суспензии, съдържащи цинков оксид, и превръщането им в микровлакнести материали.

Разработени са методи за приготвяне на матове с различен състав, архитектура и противогъбична активност при използването на техниките електроовлажняване и електроразпръскване.

Биологично активните вещества, производни на 8-хидроксихинолина, включени във влакнестите матове са в аморфно състояние.

Показано е, че при използване на наночастици от цинков оксид със силанизирана повърхност и целулозен ацетат могат успешно да се получат суперхидрофобни материали (влакнести материали тип "on").

VI. НАСОКИ ЗА БЪДЕЩИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

В бъдещи изследвания ще се работи по създаването на нови агрофармацевтични средства, щадящи околната среда, при които в биологично поносими и биологично разградими полимерни матрици ще бъде включен биологичен агент. В системите, които предстои да се получат, полимерният носител ще играе активна роля като осигурява жизнеспособността на биологичния агент при съхранение, а поставен в контакт с водна среда ще осигурява нормалното му развитие. Като биологичен агент ще бъде използван полезен почвен микроорганизъм – антагонист на растителни патогенни микроорганизми.

По този начин чрез съчетаване на полезните и ценни свойства на биополимерите с тези на биоагента ще се създадат иновативни еко-съобразни средства за целите на селското стопанство, чрез които ще се постигне опазване на околната среда, ще се преодолеят вредните последици от широко прилаганите пестициди и ще се осигури предпазване на културните растения от болести, причинени от различни фитопатогени.

Списък на публикациите и на научните съобщения

Резултатите от дисертационната работа са представени в следните публикации и научни съобщения:

ПУБЛИКАЦИИ:

[П 1] Nachev N., Spasova M., Manolova N., Rashkov I., Naydenov M, Improving the water-repellent and antifungal properties of electrospun cellulose acetate materials by decoration with ZnO nanoparticles, *FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe*, 29, 3(147), 40-45 (2021).

[П 2] Nachev N., Spasova M., Tsekova P., Manolova N., Rashkov I., Naydenov M., Electrospun polymer-fungicide nanocomposites for grapevine protection, *Polymers*, 13(21), 3673, 1-14 (2021).

[П 3] Ignatova M., Nachev N., Spasova M., Manolova N., Rashkov I., Naydenov M., Electrospun 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline (Clioquinol)-containing poly(3-hydroxybutyrate)/polyvinylpyrrolidone antifungal materials prospective as active dressings against esca, *Polymers*, 14(3), 367, 1-17 (2022).

НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ (името на докладващия автор е подчертано):

Устни съобщения:

[УС 1] Н. Начев, М. Спасова, Н. Манолова, И. Рашков, От електроразпръскване към електроовлажняване на целулозен ацетат – влияние на концентрацията му в предилния разтвор, Дванадесети пролетен семинар на докторантите и младите учени от БАН “ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНА ХИМИЯ”, организиран от Българската академия на науките и Института по оптически материали и технологии – БАН, 19-21 април 2019 г., Творчески дом на БАН, Витоша, България.

[УС 2] Н. Начев, М. Спасова, Н. Манолова, И. Рашков, Композитни влакнести материали на основата на целулозен ацетат и наноразмерен ZnO с потенциални приложения в селското стопанство, Втори интердисциплинарен докторантски форум посветен на 150^{та} годишнина на Българската академия на науките, 29-31 август 2019 г., хотел „Самоков”, Боровец, България.

[УС 3] N. Nachev, M. Spasova, N. Manolova, I. Rashkov, M. Naydenov, Polymer membranes from biodegradable polymer and chemical fungicide prepared by electrospinning, XXII Национална текстилна конференция, 12-14 ноември 2020 г., НТС, гр. София, България.

[УС 4] N. Nachev, M. Spasova, N. Manolova, I. Rashkov, M. Naydenov, Polymer fibrous biomaterials with imparted antifungal activity, Трета младежка научна сесия „Биомедицина и качество на живот“, 2-3 декември 2021 г., ИБФБМИ, гр. София, България, онлайн участие.

Постерни съобщения:

[ПС 1] N. Nachev, M. Spasova, O. Stoilova, N. Manolova, I. Rashkov, Bio-based composite membranes by combining electrospinning with electrospraying, 19th Symposium POLYMERS 2019, September 9-12, 2019, Pomorie, Bulgaria.

[ПС 2] N. Nachev, M. Spasova, N. Manolova, I. Rashkov, M. Naydenov, Improving the water-repellent and antifungal properties of electrospun cellulose acetate materials by decoration with ZnO nanoparticles, Единадесета научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, организирана от Института по полимери – БАН, 10 септември 2020 г., София, България.

[ПС 3] N. Nachev, M. Spasova, N. Manolova, I. Rashkov, M. Naydenov, Polymer composite fibrous materials with imparted biological activity, Дванадесета научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, организирана от Института по полимери – БАН, 3 юни 2021 г., София, България.

[ПС 4] М. Игнатова, Н. Начев, М. Спасова, Н. Манолова, И. Рашков, М. Найденов, Получаване, охарактеризиране и противогъбична активност на нови електроовлаknени материали от поли(3-хидроксибутират) и поливинилпиролон, с включено производно на 8-хидроксихинолина, Дванадесета научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, организирана от Института по полимери – БАН, 3 юни 2021 г., София, България.

[ПС 5] N. Nachev, M. Spasova, N. Manolova, I. Rashkov, M. Naydenov, Preparation and characterization of electrospun 5-chloro-8-hydroxyquinoline-loaded polyester membranes against Esca, Materials, Methods & Technologies, 23rd International Conference 19-22 Aug 2021 Burgas, Bulgaria.

[ПС 6] N. Nachev, M. Spasova, N. Manolova, I. Rashkov, M. Naydenov, Fibrous polymer materials with antifungal activity for grapevine protection, Научна конференция ИНФРАМАТ 2021, 8-10 септември 2021 г., хотел Риу, Правец, България.

НАГРАДА

За най-добър постер на Дванадесета научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, 2021 година.

ЗАБЕЛЯЗАН ЦИТАТ НА ПУБЛИКАЦИЯ, ВКЛЮЧЕНА В ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА:

[П1] Nachev N., Spasova M., Manolova N., Rashkov I., Naydenov M, Improving the water-repellent and antifungal properties of electrospun cellulose acetate materials by decoration with ZnO nanoparticles, *FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe*, 29, 3(147), 40-45 (2021), *забелязан 1 цитат*.

1. Aguda O., Lateef A., Recent advances in functionalization of nanotextiles: A strategy to combat harmful microorganisms and emerging pathogens in the 21st century (review), *Heliyon* 8(6) e09761, 1-17 (2022).

[П 3] Ignatova M., Nachev N., Spasova M., Manolova N., Rashkov I., Naydenov M., Electrospun 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline (Clioquinol)-containing poly(3-hydroxybutyrate)/polyvinylpyrrolidone antifungal materials prospective as active dressings against esca, *Polymers*, 14(3), 367, 1-17 (2022), *забелязан 1 цитат*.

1. Liu H., Jiang W., Yang Z., Chen X., Yu D.-G., Shao J., Hybrid films prepared from a combination of electrospinning and casting for offering a dual-phase drug release, *Polymers*, 14(11), 2132, 1-15 (2022).

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ:

Договор ФНИ, **КП-06-ОПР03/2** “Дизайн и методи за получаване на иновативни полимерни композити с фунгицидно действие спрямо *Phaeothoniella chlamydospora* и *Phaeoacremonium aleophilum*” от 14.12.2018 г. <https://lbaproject2018.wordpress.com/>

Договор ФНИ, **КП-06-Н39/13** “Получаване на иновативни антимицробни и противотуморни електроовлаknени материали от мукоадхезивни и биосъвместими полимери и хелатиращи агенти от групата на 8-хинолинола” от 09.12.2019 г. <https://electropunchelating.wordpress.com/>