



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Vidmantas Stučka**

**FENOLINĖMIS RŪGŠTIMIS MODIFIKUOTO CHITIZANO  
DANGŲ GAVIMAS IR SAVYBĖS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovė**

dr. Ramunė Rutkaitė

**KAUNAS, 2017**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**FENOLINĖMIS RŪGŠTIMIS MODIFIKUOTO CHITAZANO**  
**DANGŲ GAVIMAS IR SAVYBĖS**

Baigiamasis magistro projektas

Studijų programa Chemijos inžinerija (kodas 621H81004)

**Vadovas**

dr. Ramunė Rutkaitė

**Recenzentas**

dr. Edita Mažonienė

**Darbą atliko**

Vidmantas Stučka

**KAUNAS, 2017**



## KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

Vidmantas Stučka

Studijų programa Chemijos inžinerija (kodas 621H81004)

„Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozано dangų gavimas ir savybės“

### AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2017 m. gegužės mėn. 31 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Vidmanto Stučkos**, baigiamasis projektas tema „Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano dangų gavimas ir savybės“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena darbo dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymu nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

---

(studento vardas ir pavardė)

---

(parašas)

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Tvirtinu:

Cheminės technologijos fakulteto dekanas  
Prof. E.Valatka

Suderinta:

Polimerų chemijos ir technologijos katedros  
vedėjas prof. J. V. Gražulevičius

Dekano įsakymas Nr. ST18-F-02-1  
2017 m. gegužės 2 d.

2017 m. gegužės 2 d.

**MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS**

Išduota studentui Vidmantui Stučkai

1. Darbo tema: **Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano dangų gavimas ir savybės.**
2. Darbo tikslas ir uždaviniai:  
Susintetinti fenolinėmis rūgštimis modifikuotus chitozano darinius, iširti jų savybes ir bioaktyvių savybių dangų formavimo galimybes.
3. Darbo sudėtinės dalys:
  1. Literatūros apžvalga:
    - 1.1 Chitozanas.
    - 1.2 Flavonoidai ir fenolinės rūgštys.
    - 1.3 Antioksidacinių savybių pakavimo medžiagos.
  2. Tiriamoji (eksperimentinė) dalis:
    - 2.1 Naudotos medžiagos.
  3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas:
    - 3.1 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano sintezė ir sandara.
    - 3.2 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano rentgeno spindulių difrakcinė analizė.
    - 3.3 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano terminės savybės.
    - 3.4 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano antioksidacinės savybės.
    - 3.5 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano antibakterinės savybės.
    - 3.6 Chitozano ir fenolinių rūgščių dangos ir jų savybės.
  4. Rekomendacijos (inžinerinė dalis).
  5. Darbuotojų sauga ir sveikata.
  6. Išvados.
  7. Bibliografinių nuorodų sąrašas.

Užduoties išdavimo data 2015 m. rugsėjo 1 d.

Užbaigto darbo pateikimo terminas 2017 m. gegužės 29 d.

Vadovas: dr. Ramunė Rutkaitė  
(vardas, pavardė)

\_\_\_\_\_  
(parašas, data)

Užduotį gavau: Vidmantas Stučka  
(vardas, pavardė)

\_\_\_\_\_  
(parašas, data)

# Turinys

SANTRAUKA .....	4
SUMMARY .....	5
Santrumpos.....	6
IŽANGA .....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	11
1.1 Chitozanas .....	11
1.1.1 Chitozano gavimas ir savybės .....	11
1.1.2 Chitino ir chitozano taikymas pramonėje.....	12
1.2 Flavonoidai ir fenolinės rūgštys.....	17
1.2.1 Fenolinės rūgštys.....	18
1.2.2 Flavonoidai .....	20
1.2.3 Flavonoidų ir fenolinių rūgščių antioksidacinės savybės .....	22
1.3 Antioksidacinių savybių pakavimo medžiagos .....	23
1.3.1 Chitozano modifikavimas fenolinėmis rūgštimis.....	24
2. TIRIAMOJI (EKSPERIMENTINĖ) DALIS .....	26
2.1 Naudotos medžiagos.....	26
2.2 Tyrimų metodai .....	28
2.2.1 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano gavimas.....	28
2.2.2 Fenolinių rūgščių kiekio nustatymas modifikuotame chitozane .....	28
2.2.3 Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas Folin – Ciocalteu metodu.....	30
2.2.4 Sausų medžiagų kiekio nustatymas.....	30
2.2.5 UV spektroskopija.....	31
2.2.6 FT – IR spektroskopija .....	31
2.2.7 Termogravimetrinė analizė .....	31
2.2.8 Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija.....	31
2.2.9 Rentgeno spindulių difrakcija .....	31

2.2.10	Antioksidacinių savybių tyrimas.....	32
2.2.11	Antibakterinių savybių tyrimas .....	32
2.2.12	Chitozano ir fenolinių rūgščių dangų ant filtrinio popieriaus formavimas .....	33
2.2.13	Fenolinių rūgščių atpalaidavimo iš dangų vandenyje tyrimas .....	33
2.2.14	Chitozano ir fenolinių rūgščių dangų antioksidacinių savybių tyrimas .....	34
2.2.15	Rezultatų tikslumo ir patikimumo tyrimas.....	34
3.	TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	35
3.1	Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano sintezė ir sandara .....	35
3.2	Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano rentgeno spindulių difrakcinė analizė.....	42
3.3	Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano terminės savybės.....	44
3.4	Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano antioksidacinės savybės .....	48
3.5	Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano antibakterinės savybės .....	51
3.6	Chitozano ir fenolinių rūgščių dangos ir jų savybės.....	54
4.	REKOMENDACIJOS (INŽINERINĖ DALIS) .....	58
5.	DARBUOTOJŲ SAUGA IR SVEIKATA .....	61
	IŠVADOS .....	65
	LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	67

Stučka, Vidmantas. Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano dangų gavimas ir savybės. Magistro baigiamasis projektas / dr. vadovė Ramunė Rutkaitė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Chemijos inžinerija.

Reikšminiai žodžiai: *modifikuotas chitozanas, chitozano ir fenolinių rūgščių dangos, antioksidacinių savybių pakavimo medžiagos.*

Kaunas, 2017. 68 p.

## SANTRAUKA

Skirtingos molekulinės masės chitozaną modifikuojant atitinkamais chlorogeno ir galo rūgšties kiekiais, gauti fenolinėmis rūgštimis modifikuoti chitozano dariniai. Terminės analizės metodais nustatyta, kad skirtingos molekulinės masės chitozano modifikavimas galo ar chlorogeno rūgštimis susilpnino vandenilius ryšius chitozano dariniuose ir sumažino jų terminį stabilumą bei gebą surišti vandenį. Nustatyta, kad fenolinėmis rūgštimis modifikuoti chitozanoi pasižymi prailgintu antioksidaciniu veikimu, lyginant su atitinkamų fenolinių rūgščių antioksidaciniu veikimu. Ištirtos chlorogeno ir galo rūgštimis modifikuotų skirtingos molekulinės masės chitozano antibakterinės savybės. Nustatyta, kad chitozano molekulinė masė įtakoja antibakterinį efektyvumą ir mažos molekulinės masės chitozanas pasižymi geresniu baktericidiniu poveikiu negu vidutinės molekulinės masės chitozanas. Ant filtrinio popieriaus suformotos fenolinių rūgščių ir skirtingos molekulinės masės chitozano dangos bei ištirtos šių dangų antioksidacinės savybės. Pateiktos fenoline rūgštimi modifikuoto chitozano dangos gamybos technologijos, pagal kurią galima pagaminti 177,1 kg produkto per parą, rekomendacijos.

Stučka, Vidmantas. Preparation and properties of phenolic acid modified chitosan coatings. Master's thesis in Technological science / supervisor assoc. Ramunė Rutkaitė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Technological Science, Chemical Engineering.

Key words: modified chitosan, chitosan and phenolic acid coatings, packing material with antioxidative features.

Kaunas, 2017. 68 p.

## **SUMMARY**

Chitosan derivatives modified by phenolic acids were obtained treating different molar mass chitosan with appropriate amounts of chlorogenic and gallic acids. Using thermal analysis methods, it was determined that modifying different molar mass chitosan with gallic or chlorogenic acids hydrogen bonds were weakened in chitosan derivatives and thus the ability to bond hydrogen and the overall thermal stability weakened. It was determined that chitosan modified with phenolic acids has a prolonged antioxidative effect when compared to phenolic acids alone. Antibacterial features of different molar mass chitosan treated with chlorogenic and gallic acid were analyzed. It was determined that the molar mass of chitosan plays a role in its antibacterial effect and a low molecular mass chitosan exhibits a better bacteriocidal effect compared to an average molar mass chitosan. Chitosan antioxidative features were assayed by coating filter papers with different molecular mass chitosan modified with phenolic acids. The recommendation, for a manufacturing process by which a total of 177.1 kg of chitosan coating modified with phenolic acid can be obtained per day were prepared.



## Santrumpos

MMMC – mažos molekulinės masės chitozanas

VMMC – vidutinės molekulinės masės chitozanas

CLR – chlorogeno rūgštis

GAR – galo rūgštis

MMMC-CLR – chlorogeno rūgštimi modifikuotas mažos molekulinės masės chitozanas

VMMC-CLR – chlorogeno rūgštimi modifikuotas vidutinės molekulinės masės chitozanas

MMMC-GAR – galo rūgštimi modifikuotas mažos molekulinės masės chitozanas

VMMC-GAR – galo rūgštimi modifikuotas vidutinės molekulinės masės chitozanas

PL – pakeitimo laipsnis

XRD – rentgeno difrakcijos tyrimas

AOEF – antioksidacinis efektyvumas

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas

EDAC – N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas

MSK – minimali slopinamoji koncentracija

MBK – minimali baktericidinė koncentracija

## IŽANGA

Didėjant ekologinėms problemoms vis dažniau pakavimo medžiagoms gaminti naudojamos atsinaujinančios žaliavos – biopolimerai. Vienas iš tokių biopolimerų – chitozanas, kuris vis plačiau naudojamas dėl gero biologinio suderinamumo, bioskaidumo, gerų antibakterinių savybių bei giminingumo daugumai baltymų. Šis polisacharidas taipogi gali būti naudojamas vandens gryninime, antimikrobinių maisto pakuočių gamybai bei kuriant vaistus. Kaip vienas iš chitozано privalumų yra jo tirpumas praskiestuose rūgščių tirpaluose, tokiu būdu iš chitozано galima formuoti valgomas dangas ir maistines plėveles. Chitozано panaudojimo galimybes galima praplėsti jį chemiškai modifikuojant, panaudojant jo amino grupes. Pastaruoju metu yra ieškoma būdų chitozанui modifikuoti fenolinėmis rūgštimis, norint suteikti šiam polisacharidui ir kitas, pvz. antioksidacines savybes.

Fenolinės rūgštys – svarbi bioaktyvių junginių grupė, kelianti didelį susidomėjimą dėl savo antioksidacinio, priešopinio, priešuždegiminio, antivirusinio, antivėžinio poveikio bei antimikrobino efektyvumo, kuris leidžia padidinti maisto produktų stabilumą ir saugumą. Jų naudojimą riboja nedidelis jų stabilumas bei nemalonus skonis. Vienas iš būdų nemaloniam fenolinių rūgščių skoniui sušvelninti ir stabilumui bei biologiniam prieinamumui padidinti galėtų būti šių bioaktyvių junginių prijungimas prie katijoninių grupių turinčio biopolimero, pavyzdžiui, chitozано.

**Darbo tikslas:** Susintetinti fenolinėmis rūgštimis modifikuotus chitozано darinius, ištirti jų savybes ir bioaktyvių savybių dangų formavimo galimybes.

Šiam tikslui pasiekti buvo keliami tokie **uždaviniai**:

- Susintetinti ir charakterizuoti chlorogeno rūgštimi modifikuotus mažos ir vidutinės molekulinės masės chitozано darinius.
- Susintetinti ir charakterizuoti galo rūgštimi modifikuotus mažos ir vidutinės molekulinės masės chitozано darinius.
- Ištirti chlorogeno ir galo rūgštimis modifikuoto skirtingos molekulinės masės chitozано antioksidacines ir antibakterines savybes.
- Suformuoti chitozано ir fenolinių rūgščių dangas ir ištirti jų savybes.
- Pateikti fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozано dangų gamybos technologijos rekomendacijas.

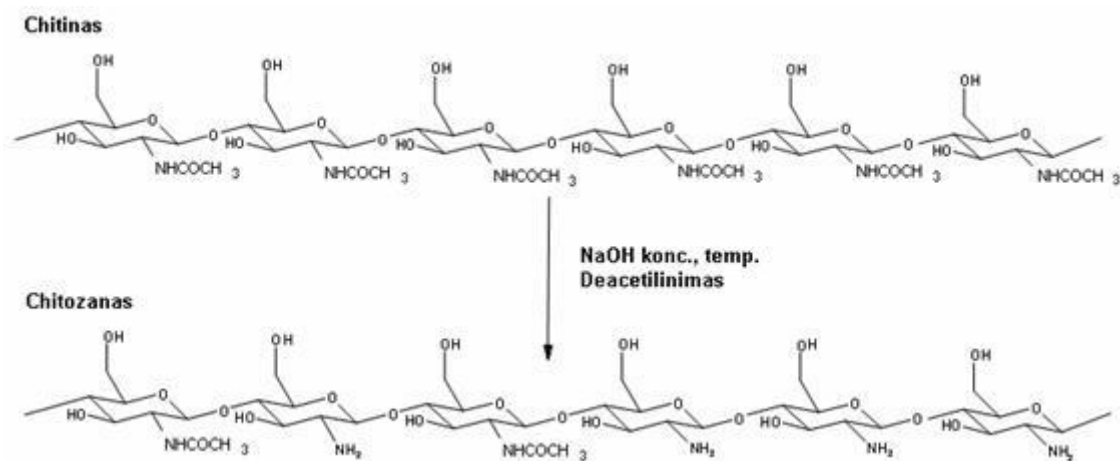
# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Chitozanas

### 1.1.1 Chitozано gavimas ir savybės

Chitozanas – vienas iš labiausiai paplitusių linijinės struktūros polisacharidų žemėje, sudarytas iš atsiktinių būdu  $\beta$ -(1-4) ryšiu sujungtų D-gliukozamino (deacetilintos grandies) ir N-acetil-D-gliukozamino (acetilintos grandies) fragmentų. Jis gaunamas krevečių ar kitų vėžiagyvių kiautus apdorojant natrio hidroksidu. Chitozано poreikis kasmet didėja dėl gero biologinio suderinamumo, bioskaidumo, gerų antibakterinių savybių ir giminingumo daugumai baltymų. Jis taipogi naudojamas vandens gryninime, antimikrobinių maisto pakuočių gamybai bei kuriant vaistus. Chitozane esančios amino grupės adsorbuoja metalo katijonus ir veikiant elektrostatinėms jėgoms pritraukia metalo anijonus. Tokiu būdu rūgščiame tirpale protonizuotos amino grupės gali būti chemiškai modifikuojamos. Vienas iš chitozано privalumų yra jo tirpumas praskiestuose rūgščių tirpaluose, kas leidžia iš chitozано formuoti maistines plėveles. Chitozано plėvelės pasižymi mažu dujų pralaidumu, geromis mechaninėmis savybėmis ir antimikrobiniu efektyvumu [4].

Chitozanas yra gaunamas N-deacetilinant chitiną (1.1 pav.). Norint pašalinti acetilo grupes yra vykdoma chitino šarminė hidrolizė. Gautas produktas yra tirpus praskiestose acto, pieno, obuolių, skruzdžių bei gintaro rūgštyse. Chitozanas gali būti visiškai arba iš dalies N-deacetilintas, bet dažniausiai acetilinimo laipsnis yra mažesnis nei 0,35. Acetilinimo laipsnis gali būti nustatomas dujų chromatografijos, gelfiltracijos, UV spektroskopijos ar titravimo metodais. Pramonėje naudojamo chitozано deacetilinimo laipsnis yra didesnis nei 70 %, o molekulinė masė siekia nuo 100000 iki 1200000 daltonų. Lyginant celiuliozę ir chitozaną, pastarasis sulaukia vis didesnio pritaikymo pramonėje, kadangi jo molekulėse yra procentiškai didelis azoto kiekis. Įprastai azoto kiekis chitozane svyruoja nuo 5 % iki 8 % ir priklauso nuo diacetilinimo laipsnio. Didžioji dalis azoto yra randama alifatinėse amino grupėse. Kuo didesnis azoto kiekis yra chitozane, tuo paprasčiau yra gauti bioaktyvias dangas. Esant terpės  $\text{pH} < 6$ , chitozanas gali reaguoti su neigiamo krūvio molekulėmis, tokiomis kaip, baltymai, anijoniniai polisacharidai (alginatai, karagenanai), riebiosios rūgštys bei fosfolipidai [5].



1.1 pav. Chitozano gavimo iš chitino schema.

Chitozanas gali būti lengvai modifikuojamas naudojant reaktingas pirmines amino grupes bei pirmines ir antrines hidroksigrupes. Nemodifikuotas chitozanas daugiausiai yra naudojamas gydyti žaizdoms dėl to, kad netirpsta vandenyje, pasižymi didele klampa ir polinkiu koaguluoti su baltymais esant dideliam terpės pH. Prijungus prie chitozano molekulių šonines grandines chitozanui galima suteikti pageidaujamų savybių bei išplėsti jo praktinio panaudojimo sritis. Mažėjant chitozano molekulinei masei, jis geriau tirpsta, pvz. chitozanui iš dalies depolimerizavus ir diacetilinio laisviniui esant bent 50 %. Pašalinus baltymų, karotinoidų ir neorganinių medžiagų priemaišas, grynintą chitozaną galima naudoti maisto pramonėje, medicinoje bei farmacijoje. Chitozanas pasikartojančiame gliukozamino fragmente turi vieną amino ir dvi hidroksigrupes. Vykdamt regeneravimo reakciją, šios grupės yra modifikuojamos ir susidaro visiškai naujos cheminės struktūros stambiomolekuliniai junginiai. Šie bioaktyvūs produktai kartu su įvairiais vaistais gali turėti dvigubą gydomąjį poveikį. Kristalinės formos chitozanas yra tirpus tik rūgštinėje vandeninėje terpėje (pH<6), pavyzdžiui, praskietose acto, skruzdžių bei pieno rūgštyse, protonizuojantis gliukozamine esančioms laisvosioms amino grupėms [4].

### 1.1.2 Chitino ir chitozano taikymas pramonėje

Susidomėti chitinu paskatino žmogaus skysčiuose randamo fermento lizocimo cheminių savybių tyrimai. Šis fermentas tirpdo kai kurių bakterijų išorinę sienelę ardydamas chitininę jos struktūrą. Per pastaruosius tris dešimtmečius chitinas ir daugelis jo darinių buvo bandytas pritaikyti medicinoje. Manoma, kad chitozanas gali skatinti audinių augimą ir ląstelių diferenciaciją audinių kultūrose. Ištirta, kad chitinas prastai tirpsta. Nepaisant to įvairios gamtinio ir modifikuoto chitino panaudojimo galimybės yra aprašomos literatūroje, pvz. jo kaip dirbtinio pluošto medžiagos panaudojimas. Toks dirbtinis pluoštas galėtų būti panaudojamas kaip netirpstantys siūlai ar kaip žaizdų tvarstymo medžiaga. Tokie siūlai būtų atsparūs tulžies rūgštis,

šlapimo ir kasos sulčių poveikiui. Yra teigiama, jog tvarsčiai pagaminti iš chitino ir chitozono pluošto apie 75 proc. pagreitina žaizdų gyjimą. Be pritaikymo medicinoje, chitino ir chitozono pluoštai dėl savo gebėjimo sujungti sunkiuosius metalus galėtų būti pritaikyti ir vandens valymo įrenginiuose. Šias medžiagas panaudoti tik platesniu spektru norėtų ir drabužių pramonė [4].

Dėl savo fizinių ir cheminių savybių chitozono pritaikymo galimybės yra labai plačios, pradedant vaistų ir kosmetikos pramone, baigiant pritaikymu vandenvalyje. Skirtingoms panaudojimo sritims reikia skirtingų savybių, kurios priklauso nuo acetilinimo laipsnio ir molekulinės masės [4].

**Kosmetikos priemonės.** Kosmetikoje dažnai kaip komponentai yra naudojamos organinės rūgštys. Gamtinis polisacharidas chitozanas gali būti priskiriamas hidrokoloidų klasei. Tačiau ne taip kaip visi hidrokoloidai, kurie yra polianijonai, chitozanas yra natūraliai randama katijoninė derva, kuri tampa klampi, kai ją bandoma neutralizuoti su rūgštimis. Chitozanas sudaro palankias sąlygas komponentų sąveikai su išoriniais apsauginiais odos sluoksniais, pasižymi natūraliomis fungicidinėmis ir fungistatinėmis savybėmis [20]. Be to, chitozanas yra suderinamas su daugeliu biologiškai aktyvių sudedamųjų kosmetikos produktų dalių. Chitozono ir alginato dalelės yra mažos (1 – 10 μm) ir kaip mikrokapsulės su įvairiais hidrofobiniais užpildais gali būti plačiai panaudojamos kosmetikos pramonėje. Verta paminėti, jog medžiagos gebančios sugerti žalingus UV spindulius, gali būti lengvai kovalentiškai prijungiamos prie chitozono amino grupių. Chitinas, chitozanas ir jų dariniai lengvai pritaikomi trijose pagrindinėse kosmetikos pramonės srityse: plaukų, odos ir burnos priežiūros priemonių. Chitozanas ir plaukai yra lengvai suderinami, nes jų paviršius yra skirtingo krūvio: plaukų – teigiamo, chitozono – neigiamo. Chitozono tirpalas ant plaukų suformuoja bespalvę, elastinę plėvelę, taip suteikdamas jiems mechaninį stiprumą, švelnumą ir purumą. Pridėjus chitozono į alkoholio ir vandens mišinį susiformuoja gelis. Chitozanas gali būti naudojamas šampūnuose, skalavimo skysčiuose, plaukų dažuose, losjonuose, ilgalaikio plaukų formavimo produktuose [4]. Keletas chitino ir chitozono darinių, tokių kaip glicerilchitozanas, n-hidroksipropilchitozanas, polioksiakilenchitozanas, chitozono oligosacharidai, chitino sulfatas, karboksimetilchitinas yra taikomi plaukų priežiūros priemonių pramonėje. Kai kurie chitozono dariniai gali formuoti putas ir sukurti emulsuojantį poveikį, o chitino dulkės gali būti tiesiogiai naudojamos šampūnuose. Chitozanas ir jo dariniai kaip odos priežiūros priemonių komponentai turi du pagrindinius pranašumus. Pirma, jie yra teigiamo krūvio, antra – dėl savo didelio molekulinės dydžio negali prasiskverbti į odą. Dėl šios priežasties chitozanas gali būti panaudojamas kaip odos drėkinimo priemonė. Dėl savo mažos kainos jis galėtų konkuruoti su hialurono rūgštimi. Jau dabar chitiną ir chitozaną galima rasti kremų, pakavimo medžiagų, losjonų, nagų lako, lūpdažių, valymo priemonių, šešėlių, makiažo pagrindo

sudėtyje. Acetilintas chitozanas kartu su smulkiais chitozano ir chitino dalelėmis yra naudojamas odos priežiūros produktuose [5]. Tiek chitinas, tiek chitozanas gali būti naudojami dantų pastos, skalavimo skysčio ir kramtomosios gumos sudėtyje. Šios medžiagos neleidžia formotis apnašoms ir ėduoniui. Chitozano druskos maskuoja dantų pastoje esančio silikono oksido nemalonų skonį, bei išlaiko tinkamą konsistenciją.

**Vandenvala.** Dėl savo teigiamo krūvio chitozanas gali būti naudojamas kaip flokuliantas. Jis taip pat gali būti naudojamas ir sunkiesiems metalams surišti. Nemažas kiekis pasaulyje pagaminamų chitino, chitozano bei jų darinių yra naudojami vandeniui valyti [5]. Chitozano molekulės aglomeruoja anijonines atliekas suformuodamos nuosėdas, dėl to chitozanas veikia kaip flokuliantas perdirbant maisto pramonės nuotekas. Chitozanas savo gebėjimu surišti sunkiuosius metalus valant vandenį gali prilygti sintetintoms dervoms. Chitinas yra naudojamas dezaktyvuoti plutonio ar gyvsidabrio metilacetato turintį vandenį. Chitozano ir chitino mišinys taip pat naudojamas geriamojo vandens valymui nuo arseno. Buvo nustatyta, jog chitozanas efektyviai pašalina naftą ir naftos produktus iš nuotekų. Rūgštį neutralizuojančios chitino savybės yra panaudojamos kavos pramonėje, taip pat nuskaidrinti tokius gėrimus kaip vyną, alų ir vaisių sultis [4]. Regeneruotos chitino, chitozano ir kitos chitininės membranos galėtų būti pritaikytos tokiems procesams kaip osmozė, atvirkštinė osmozė, mikrofiltravimas, nudruskinimas, dializė ir hemodializė.

**Popieriaus pramonė.** Kadangi chitinas ir chitozanas yra bioskaidžios medžiagos, jos gali būti panaudojamos perdirbto popieriaus gamyboje suteikiant jam mechaninį stiprumą. Chitozanas dėl savo molekulių panašumo į celiulozės molekules jau dabar yra naudojamas popieriaus gamyboje. Taip pat naudojant chitozaną padidinama popieriaus išeiga ir sutaupoma cheminių priedų. Toks popierius yra lygesnio paviršiaus ir yra atsparesnis drėgmei. Chitozanas yra vertinamas kartono, pakavimo bei tualetinio popieriaus gamyboje. Hidroksimetilchitinas ir kiti vandenyje tirpūs chitino dariniai galėtų būti naudojami kaip bioskaidžios pakavimo medžiagos [4].

**Tekstilės pramonė.** Chitino dariniai yra naudojami suteikiant antistatines savybes tekstilei. Tekstilės pramonėje chitinas gali būti naudojamas marginant ir galutiniam paruošimui, o chitozanas – pašalinant dažus iš dažymo nuotekų. Tiek chitinas, tiek chitozanas naudojamas medicininės tekstilės siūlų ir pluoštų gamyboje [4].

**Maisto ir pašarų pramonė.** Chitozanas naudojamas maisto pramonėje. Mikrokristalinis chitinas (MCC) pasižymi emulsuojančiomis savybėmis, bei kaip geras tirštiklis ir gelį sudaranti medžiaga. Jis taip pat naudojamas kaip skaidulinė medžiaga keptuose gaminiuose. Naudojant MCC kaip skaidulinę medžiagą galima ilgiau išlaikyti gerą produktų skonį, kvapą ir pan. Jis taip

pat gali būti naudojamas baltymais praturtintos duonos gamyboje vietoj dabar naudojamų emulsiklių. Chitinas ir chitozanas veikia kaip bakterijų, gyvūnų ir augalų ląstelių surišikliai. Chitinas gali būti panaudojamas ir fermentams imobilizuoti. Jis taip pat gali būti panaudotas kaip koncentruotų medžiagų nešiklis (pvz. maisto dažų ar maistinių medžiagų) [5]. Indijoje nustatyta, kad paukščių lesale esant 0,5 % chitino, sumažėjo pašaro suvartojimas ir 12 % padidėjo priaugamas svoris, palyginus su paukščiais šertais lesalu, kuriame nebuvo chitino. JAV buvo taip pat atliktas panašus eksperimentas, kurio metu buvo tirta viščiukų gebėjimas priaugti svorio, kuomet viena grupė buvo šerta džiovintais išrūgų milteliais ir chitinu, kita grupė panašiu lesalu tik be chitino [4]. Rezultatai parodė, jog chitinu praturtintu lesalu lesinti viščiukai greičiau priaugo svorio, nei kontrolinė grupė. Kiti tyrimai parodė, jog viščiukai ir veršeliai šerti ėdalu, kuris buvo praturtintas chitinu pasižymėjo geresnėmis laktozės skaidymo savybėmis dėl padidėjusių specifinių žarnyno bakterijų augimo. Šios chitino savybės galėtų būti pritaikytos ir žmonių mityboje, nes dauguma žmonių laktozės netoleruoja. Šiuo metu dar nėra pakankamai duomenų apie chitino ir chitozono metabolizmą žmogaus organizme, todėl norint pritaikyti šias medžiagas maisto pramonėje reikia papildomų tyrimų [5].

**Chromatografija.** Chitinas ir chitozanas plačiai pritaikomas chromatografijoje. Dėl chitozono struktūroje esančių laisvųjų  $-NH_2$  grupių, pirminių bei antrinių  $-OH$  grupių, jis gali būti naudojamas kaip pagalbinė chromatografijos medžiaga. Chitozanas taip pat panaudojamas plonasluoksnyje chromatografijoje atskiriant nukleorūgštis. Chitinas ir chitozanas gali būti naudojamas kaip kietos fazės sorbentas atskiriant fenolius ir chlorfenolius aukšto našumo skysčių chromatografijoje (HPLC) [4].

**Kietafazės baterijos.** Dėl chitozono netirpumo vandenyje jo negalima naudoti kietafazėse teigiamą krūvį kaupiančiuose polimerinėse baterijose. Todėl chitozanas yra tirpinamas acto rūgštyje ir taip sukuriamas joninis laidumas. Laidumas atsiranda dėl rūgštiniame tirpiklyje esančių protonų. Šių protonų perneša, kaip manoma, vyksta polimere esančiuose mikroertmėse. Toks chitozono panaudojimas gali leisti gaminti efektyvesnes baterijas [5].

**Chitozanas biomedicinoje.** Dirbtiniai inkstai, gebantys atlikti pakartotinę hemodializę yra vienintelis išsigelbėjimo šaltinis žmonėms, turintiems lėtinį inkstų nepakankamumą. Chitozono membranas siūloma naudoti dirbtiniuose inkstuose dėl jų laidumo ir tvirtumo. Pati svarbiausia tokių inkstų dalis yra iš dalies laidži membrana, kuri yra gaminama iš komerciškai regeneruotos celiuliozės ir kuprofano [20]. Tokia celiuliozinė membrana veikia kaip sietas, todėl pasižymi labai prastu dviejų panašių molekulių atskyrimu. Naujos kartos membranoms yra keliamas reikalavimas, jog jos gebėtų geriau reguliuoti pernašą, būtų lengvai formuojamos ir būtų suderinamos su krauju. Membranos pagamintos iš chitino ir jo darinių pasižymi geresnėmis

dializės savybėmis. Pati opiausia problema susijusi su dirbtinėmis membranomis yra paviršiaus sukeliama trombozė, tuomet reikalinga kraujo heparizaciją stabdanti krešėjimą, todėl pacientams, kuriems galimas vidinis kraujavimas toks gydymas netaikomas, o jei taikomas, tai tik esant išskirtiniams atvejams. Todėl tai yra pati svarbiausia problema, kurią reiktų išspręsti, kuriant naujas membranas [4].

**Audinių inžinerija.** Audinių inžinerija yra laboratorijoje užaugintų ląstelių, audinių ar organų kūrimas ir manipuliavimas siekiant pakeisti ar atstatyti pažeistas ar neveiksnius kūno dalis. Audinių inžinerija gali revoliucionuoti dabartines klubo ir kelio sąnarių, sausgyslių, kremzlių ir kraujagyslių keitimo technologijas. Dabar, daugumoje tokių procedūrų reikalingas autologinis arba sintetinis transplantas. Toks implantas turi atitikti daug reikalavimų susijusių su biosuderinamumu, funkcionalumu ir mechaniniu stabilumu. Yra daug medžiagų, kurios yra suderinamos su mūsų organizmu, tačiau jos neatitinka ilgalaikių mechaninių, geometrinių ir funkcinių reikalavimų. Dėl šios priežasties vis kuriami nauji dirbtiniai audiniai, kurie vis geriau atitinka natūralius. Tai bandoma pasiekti ir auginant ląsteles ant skirtingų pamatinių medžiagų, kurios gali būti tiek sintetiniai tiek gamtiniai polimerai. Tarp tokių medžiagų: polipieno rūgštis, poliglikolidas ir jo kopolimerai, pastaruoju metu susilaukia vis daugiau dėmesio dėl savo gero biosuderinamumo ir biologinio skaidumo [4]. Chitozanas ir kai kurie jo dariniai dažniausiai tyrinėjami kaip tvarsčiai žaizdoms perrišti, vaistų pernašos sistemose ir kaip užpildai. Chitozanas dėl savo polikatijoninės prigimties pasižymi augimą skatinančiomis savybėmis. Taip pat nustatyta, jog prisitvirtinusių ląstelių kiekis priklauso nuo chitozано deacetilinimo laipsnio. Chitozanas gali būti lengvai transformuojamas į poringą pamatinę medžiagą, plėvelę ir rutuliukus. Chitozано-tioglikolio rūgštis darinys yra potenciali pamatinė medžiaga audinių inžinerijoje. Ypatingo dėmesio susilaukė chitozано pritaikomumas sąnarių kremzlių atkūrimo [5]. Sąnarių kremzlės yra labai jautrios traumoms, ligoms bei įgimties pažeidimams. Juos pažeidus vidinis atkūrimas yra minimalus. Nors per pastaruosius keturis dešimtmečius buvo išbandyta daug atkūrimo metodų, tačiau nei vienas neleidžia ilgam atkurti hialino kremzlinį audinį. Chitozanas ir jo dariniai yra plačiai naudojami kaulinio audinio inžinerijoje.

**Žaizdų priežiūra.** Chitinas ir jo dariniai pagreitina žaizdų gyjimą. Žinoma, kad regeneruoti chitino pluoštai, plėvelės ir kempinės gali iki 30 % pagreitinti žaizdų gyjimą. Chitinas taip pat gali būti panaudotas ir kaip biomedicininis medžiagų dangas. Įprastinės šilkinės ar kačių žarnų siūlės padengtos regeneruotu chitinu pasižymi tik truputį prastesnėmis gyjimo savybėmis nei vien iš chitino pagaminti siūlai [4].

**Nudegimų gydymas.** Chitozanas yra potenciali medžiaga gydant nudegimus. Vienas iš chitozано privalumų yra gebėjimas suformuoti tvirtą, vandenį sugeriančią plėvelę. Šios plėvelės



gali būti tiesiogiai suformuotos ant nudegimo vietos ją padengiant chitozano acetato tirpalu. Kitas tokio gydymo pranašumas yra geras deguonies pralaidumas [5]. Taip pat chitozanas yra organizmo fermentų natūraliai suardomas, o tai reiškia jog chitozano nereikia pašalinti. Tuo tarpu daugumoje atvejų perrišinėjant žaizdas sukeliama papildomi pažeidimai [4].

**Oftalmologijoje** chitozanas pakeitė anksčiau naudotus sintetinius polimerus. Chitozanas pasižymi visomis charakteristikomis reikalingomis kontaktinių lęšių gamybai: optiniu skaidrumu, mechaniniu stabilumu, pakankamomis optinės korekcijos galimybėmis, dujų pralaidumu ir imunologiniu suderinamumu [4]. Kontaktiniai lęšiai yra gaminami iš dalies depolimerizuoto ir išgryninto chitozano. Tokie kontaktiniai lęšiai yra skaidrūs, tvirti ir pasižymi kitomis tinkamomis fizinėmis savybėmis tokiomis, kaip atsparumas tempimui, plyšimui, tinkamas deguonies pralaidumas ir kt. Antimikrobinės ir žaizdų gyjimą skatinančios chitozano savybės suteikia galimybes kurti specialius akių tvarsčius.

**Vaistų pernašos sistemos.** Tokių gamtinių polisacharidų kaip agaras ar pektinas panaudojimas nepertraukiamo atpalaidavimo vaistų pernašos sistemose jau yra žinomas. Kadangi chitinas ir chitozanas nesukelia jokio biologinio pavojaus ir yra nebrangūs, jie taip galėtų būti naudojami vaistų dozavimo sistemose. Kontroliuojamo atpalaidavimo technologija atsirado dar praėjusio amžiaus aštuntajame dešimtmetyje. Toks nuspėjamas ir atkartojamas veikliosios medžiagos išskyrimas į aplinką per prailgintą laiką turi savo privalumų. Vienas iš pagrindinių privalumų yra galimybė sukurti norimą aplinką su optimaliu atsaku ir minimaliu šalutiniu poveikiu, bei prailginti veikimo laiką. Ši technologija yra palyginti dar nauja. Chitino/chitozano kontroliuojamo atpalaidavimo sistemos yra dar kūrimo stadijoje ir yra išbandomos naudojant įvairias vaistines medžiagas ir skirtingas terpes [4].

## 1.2 Flavanoidai ir fenolinės rūgštys

Antioksidantai kaip visuma yra medžiagos gebančios apsaugoti ląsteles nuo reaktyviųjų deguonies formų (ROS) ir laisvųjų radikalų. Laisvieji radikalai atsakingi už eilę sveikatos problemų, tokių kaip vėžio susirgimai, širdies ir žarnyno ligos ir kt. Pastaruoju metu padidėjo susidomėjimas kaip užkirsti kelią įvairioms ligoms kaip antioksidantus naudojant naujus metodus ir medžiagas, tokias kaip flavanoidai ir fenolinės rūgštys. Šios medžiagos yra svarbiausia augaluose sutinkamų antrinių metabolitų grupė ir geras natūralių antioksidantų šaltinis žmonių maiste. Flavanoidai ir fenolinės rūgštys gerai neutralizuoja laisvuosius superoksidų radikalus, taip mažindamos vėžio susirgimų riziką, bei apsaugodamos biologines sistemas nuo kenksmingo oksidacinio poveikio. Flavanoidai ir fenolinės rūgštys kartu su kitais antioksidantais ir fermentais prisideda prie bendros žmogaus organizmo antioksidacinės gynybos sistemos, nors ir flavanoidų

ir fenolinių rūgščių biologinis aktyvumas skiriasi. Šios medžiagos gali veikti kaip priešopinės, priešuždegiminės, apsaugančios nuo diabeto, antivirusinės, antioksidacinės, citotoksiškos ir priešvėžinės [1].

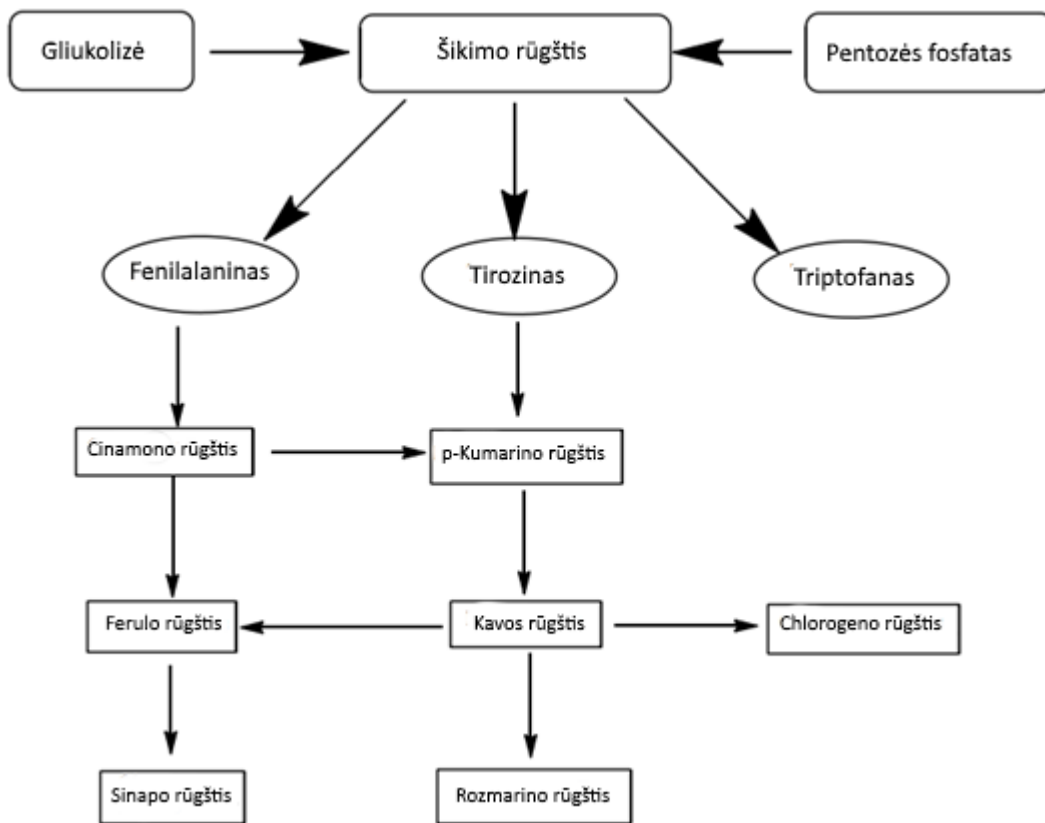
### 1.2.1 Fenolinės rūgštys

Fenolinės rūgštys yra antriniai aromatiniai augalų metabolitai, plačiai paplitę visoje augalų karalystėje. Jau pats „fenolinės rūgštys“ terminas pasako, kad šiam junginiui yra būdingas fenolinis fragmentas ir karboksirūgšties liekana. Fenoliniai junginiai yra pradinė polifenolių medžiaga. Gamtoje randamos fenolinėms rūgštims dažniausiai būdinga viena iš šių dviejų rūgščių struktūrų: hidroksicinamono arba hidroksibenzoinės rūgštys. Hidroksicinamono rūgštys yra gaunamos kaip paprastieji esteriai iš gliukozės ir hidroksikarboksirūgščių. Augalų fenoliniai junginiai skiriasi savo molekuline struktūra ir yra charakterizuojami pagal hidrolizuotų aromatinių žiedų kiekį. Šie junginiai yra tyrinėjami kaip galintys apsaugoti nuo oksidacinių pažeidimų, sukeliančių eilę degeneratyvinių ligų, tokių kaip širdies ir kraujagyslių ligos, uždegimai ir vėžys [17]. Auglių ląstelėse yra padidėjęs ROS kiekis lyginant su sveikomis ląstelėmis. Daugelyje mokslinių straipsnių yra aprašomas fenolinių rūgščių biologinis prieinamumas, analizuojant tiek tiesioginius tiek netiesioginius šių junginių patekimo į organizmą kelius, kaip kad per virškinamąjį traktą ar dėl kepenų metabolizmo [1]. Fenolinės rūgštys sulaukia susidomėjimo ne tik iš medicininės pusės, bet ir iš žemės ūkio ir chemijos sričių. Pastaruoju metu yra padidėjęs susidomėjimas fenolinių rūgščių antioksidacinėmis savybėmis ir jų kaip natūralaus antioksidantų šaltinio panaudojimu maisto pramonėje [5].

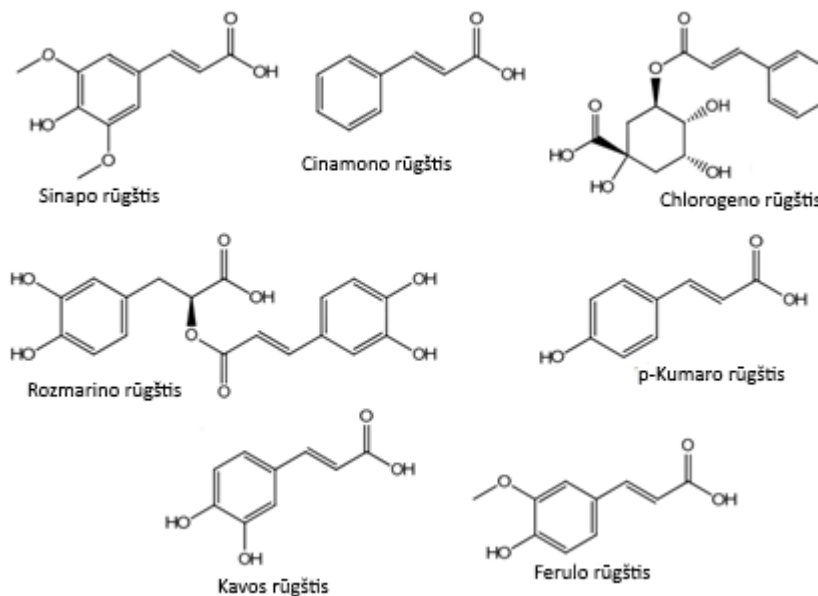
#### 1.2.1.1 Hidroksicinamono rūgštys

Fenolinės rūgštys sintetamos šikimato keliu, kuris susideda iš kelių fermentinių reakcijų, atsakingų už tarpinių pentozės ir glikolizės kelių medžiagų virtimą į tris pagrindines aromatinės amino rūgštis (fenilalaniną, tiroziną ir triptofaną) (1.1 pav.). Iš fenilalanino ir tirozino formuojasi dvi didžiausios fenolinių rūgščių grupės: hidroksicinamono rūgščių grupė ir hidroksibenzoinių rūgščių grupė. Hidroksicinamono rūgštims (1.2 pav.) būdingos struktūros turinčios tris šonines (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) anglies grupes, pvz.: kavos, ferulo, p-kumaro, sinapo rūgštys. Tuo tarpu hidroksibenzoinės rūgštims būdingos C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> struktūros, o į šią grupę įeina galo, p-hidroksibenzoinė, protokatechino, vanilino ir siringo rūgštys. Hidroksicinamono rūgštys gali būti randamos amidų (junginių su amino rūgštimis ar peptidais) arba esterių (junginių su hidroksirūgštimis ar glikozidais) pavidalu [3, 14]. Literatūros duomenų apie šių formų hidroksicinamono rūgščių potencialų taikymą biomedicinos ir kitose pramonės srityse yra, tačiau yra mažai duomenų, kurie jų svarstyti, kaip kosmetikos

priedo, panaudojimo galimybes. Šie junginiai pasižymi antikoksidaciniu, priešūždegiminiu, antimikrobiniu, antikolageniniu ar antimelanogeniniu poveikiu, todėl hidroksicinamono rūgštis ir jos darinių panaudojimas odos kosmetinių priemonių gamyboje vis didėja. Farmakologinis fenolinių rūgščių ir jos darinių potencialas yra aiškinamas tuo jog jų sudėtyje esančios hidroksigrupės gali neutralizuoti laisvuosius radikalus. P-kumaro rūgštis yra gaunama iš tirozino ir fenilalanino. Ji pagrindinė medžiaga kitoms fenolinėms rūgštims sintetinti, tokioms kaip kavos, chlorogeno, rozmarinų ir ferulo rūgštys. P-kumaro rūgštis yra plačiai paplitusi vaisiuose, daržovėse, grūduose ir grybuose. Tiriant šią rūgštį ir jos konjuguotas formas mokslininkai atskleidė tokias savybes kaip: antioksidacines, antimikrobines, priešvėžines, priešūžegimines, antitrombocitinės agregacijos, bei kitas sveikatai naudingas savybes [14]. Iš anksčiau išvardintų savybių šios rūgštis antipigmentacinės, antioksidacinės, antikolagenazinės, antimikrobinės ir priešūždegiminės savybės, yra pačios svarbiausios naudojant ją kaip kosmetikos priedą. Tuo tarpu kavos rūgštis yra viena iš dažniausiai vaisiuose, daržovėse, grybuose ir vaistažolėse randamų fenolinių rūgščių. Ji yra gaunama biosintezės būdu hidroksilinant p-kumaro rūgštį. Kavos rūgštis pasižymi tokiomis medicininėms savybėmis, kaip antioksidacinės, priešvėžinės, priešūždegiminės, antimikrobinės ir apsaugančios nuo diabeto. Ferulo (4-hidroksi-3-metoksicinamono) rūgštis yra plačiai paplitusi gėrimuose (kavoje, aluje) vaisiuose (kopūstuose, bulvėse, morkose), daržovėse (brokoliuose, špinatuose, pomidoruose), javuose (kviečiuose, kukurūzuose), gėlėse ir riešutuose. Ferulo rūgštis yra kavos rūgštis darinys gaunamas veikiant fermentui kofeatai (O-metiltransferazei). Šios rūgštis antioksidacinės, priešvėžinės savybės bei UV spindulių absorbcijos ir priešūždegimis poveikiai yra gerai aprašyti literatūroje [9]. Šiuo metu daug dėmesio yra skiriama norint panaudoti ferulo rūgštį kosmetinių tepalų gamybai. Rozmarino rūgštis yra randama įvairiuose augaluose, tokiuose kaip *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Mentha piperita* L. ir *Thymus vulgaris* L. Ji gaunama esterinant kavos rūgštį 3,4-dihidroksifenilpieno rūgštimi. Rozmarino rūgščiai būdingos antioksidacinės, priešvėžinės, priešūždegiminės ir antimikrobinės savybės. Dėl didelės laisvųjų radikalų neutralizavimo gebos bei kitų vertingų medicininių savybių šiam junginiui didelį dėmesį skiria farmacijos bei kosmetikos pramonė. Chlorogeno rūgštis gaunama esterinant kavos ir L-kvino rūgštis. Ji yra plačiai paplitusi kavoje, obuoliuose ir kriaušėse, bei yra vienas iš svarbiausių hidroksicinamono rūgštis darinių augaluose. Sinapo rūgštis pasižymi antioksidacinėmis ir priešūždegiminėmis savybėmis ir dažniausiai randama vaisiuose ir daržovėse. Ji yra gaunama pakeitus kavos rūgštis hidroksi- ir metoksigrupes taip gaunant ferulo rūgštį, kuri toliau yra metilinama susiformuojant sinapo rūgščiai. Dėl sudėtyje esančių metoksi- ir hidroksigrupių sinapo rūgštis yra geras laisvųjų radikalų neutralizatorius [3].



1.1 pav. Hidroksicinamono rūgščių gavimo schema [3].



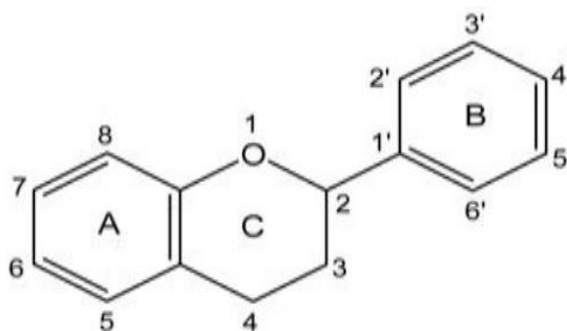
1.2 pav. Hidroksicinamono rūgščių ir jų darinių struktūrinės formulės [3].

### 1.2.2 Flavanoidai

Kaip ir fenolinės rūgštys flavanoidai yra antriniai augalų metabolitai, kuriems būdinga polifenolinė struktūra. Flavanoidų grupės junginiai pasižymi mažu toksiškumu žinduoliams ir yra plačiai paplitę augaluose. Pagrindiniai flavanoidai yra flavanoliai, flavonai, izoflavonai,

flavononai. Jie yra randami arbatoje, raudonajame vyne, pomidoruose, vyšniose, svogūnuose, čiobreluose, petražolėse, sojų pupelėse ir kituose ankštiniuose, vynuogėse, apelsinuose, citrinose, ginkmedyje ir nimamedyje. Susidomėjimas flavanoidais pastaruoju metu padidėjo dėl jų biologinio ir farmakologinio aktyvumo. Mokslinėje literatūroje randama informacijos apie jų antimikrobinį, citotoksinį, priešuždegiminį, priešnavikinį aktyvumą [1]. Tačiau svarbiausia flavanoidų savybė yra jų gebėjimas veikti kaip antioksidantai, kurie saugo žmogaus organizmą nuo laisvųjų radikalų ir reaktyviųjų deguonies formų. Antioksidacinis flavanoidų aktyvumas priklauso nuo jų molekulinės struktūros. Būtent nuo hidroksigrupių pozicijos priklauso flavanoido antioksidacinės savybės ir gebėjimas neutralizuoti laisvuosius radikalus. Kvercitas, labiausiai maiste paplitęs flavanolis, yra stiprus antioksidantas. Pripažinti ir maiste paplitę antioksidantai yra vitaminas C, vitaminas E, selenas ir karotenoidai. Flavanoidai, kurie yra randami vaisiuose ir daržovėse gali taip pat veikti kaip antioksidantai. Flavanoidai luteolinai ir katechinai yra geresni antioksidantai nei vitaminas C, vitaminas E ir beta-karotenas. Pagrindinė antioksidantų funkcija sujungti laisvuosius radikalus greičiau nei tai padaro substratas. Kadangi laisvieji radikalai gali reaguoti su daugeliu objektų, tokių kaip lipidai, riebalai ir baltymai, yra manoma, jog gali tai sukelti apsinuodijimus ir ligas [1].

Flavanoidams būdinga  $C_{15}$  atomų pagrindinė struktūra ir kita  $C_{15}$  struktūra, kurią sudaro du per heterociklinį pireno žiedą sujungti aromatiniai žiedai. Visi flavanoidai turi vienodą bazinę  $C_6-C_3-C_6$  struktūrą, kurią sudaro du aromatiniai  $C_6$  žiedai (A ir B) bei heterociklinis (C) žiedas, kuris savo sudėtyje turi vieną deguonies atomą (1.3 pav.) [1]. Flavanoidai augalams suteikia spalvą dėl kurios jie geba privilioti apdulkingojo bei apsaugo lapus nuo įvairių grybelių ir žalingo UV spindulių poveikio. Flavanoidai taip pat dalyvauja fotosensibilizacijos reakcijose, energijos pernašoje, veikia kaip augalo augimo reguliatoriai, reguliuoja kvėpavimą ir fotosintezę, bei morfogenezę. Nors flavanoidai suteikia augalams skonį ir kvapą, jie taip pat veikia kaip atraktantas apdulkingojo ir repelentas parazitams. Netirpūs fenoliai yra pasiskirstę ląstelės sienelėje, o tirpūs – ląstelės vakuolėje. Priklausomai nuo brandos laikotarpio ir aplinkos, kurioje auga augalas jame randami skirtingi fenoliniai junginiai. Dauguma fenolinių rūgščių darinių yra randama augaliniame maiste (pvz. vaisiuose, daržovėse ir grūduose). Nors dar nėra visiškai aišku koks fenolių junginių vaidmuo yra augaluose, tačiau jie yra siejami su daugeliu skirtingų funkcijų, tokių kaip maistinių medžiagų pasisavinimas, baltymų sintezė, fermentinė veikla, fotosintezė, alelopatija ir kt. [1].



1.3 pav. Flavanoidų struktūrinė formulė [1].

### 1.2.3 Flavanoidų ir fenolinių rūgščių antioksidacinės savybės

Flavanoidai ir fenoliai yra gerai žinomi dėl savo antioksidacinių funkcijų. Kaip žinoma, antioksidantai yra specifiniai junginiai, galintys augalų ir gyvūnų ląsteles apsaugoti nuo laisvųjų radikalų. Disbalansas tarp antioksidantų ir laisvųjų radikalų kiekio sukelia oksidacinį stresą, dėl kurio yra pažeidžiamos ląstelės. Toks disbalansas gali sukelti audinių pažeidimus ir įvairias ligas [9]. Moksliniai tyrimai parodė, jog augalinės kilmės antioksidantai dėl savo laisvųjų radikalų neutralizavimo savybių gali būti naudojami kaip terapeutiniai preparatai saugojantis nuo ligų, kurias sukelia oksidacinis stresas [1].

Augalai yra neįkainojamas antioksidantų šaltinis. Natūralūs ar fitocheminiai antioksidantai yra antriniai augalų metabolitai gaminami tam, kad augalas gebėtų išgyventi. Moksliniais tyrimais įrodyta, jog flavanoidai ir fenolinės rūgštys yra geresni oksidantai nei vitaminai C ir E ar karotenoidai [1]. Flavonai ir katechinai yra vieni iš efektyviausių flavanoidų skirtų apsaugoti žmogaus organizmą nuo ROS. Kvercetas, kamferolis, morinas, miricetas ir rutinas veikia ne tik kaip antioksidantai, bet kaip ir priešuždegiminės, antialerginės, antivirusinės ir priešvėžinės medžiagos. Spėjama, jog šios medžiagos turi įtakos apsisaugant nuo kepenų, širdies ir kraujagyslių ligų. Fenolių ir flavanoidų redukcijos potencialas priklauso nuo hidroksigrupių skaičiaus molekulėje. Rutinas ir apigeninas yra stiprūs lipidų peroksidazės ir beta karotenų oksidacijos inhibitoriai. Epikatechino galatas, galo rūgštis, kvercino-3-gliukozidas, kurie yra randami mūsų maiste taip pat pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Didžiausią reikšmę farmacijos sričiai šie junginiai turi dėl savo antioksidacinių savybių [8]. Jie ne tik naudojami medicinos srityje kaip antioksidantai, bet ir pridedami į maisto produktus, tam kad būtų galima pratęsti maisto galiojimo laiką ir sustabdyti oksidaciją, kurią sukelia laisvieji radikalai susiformavę maistui reaguojant į tokius aplinkos veiksnius kaip šviesa, oras ir temperatūra [13].

Galo rūgštis yra gamtoje randamas antioksidantas. Galo rūgštis ir jos dariniai sudaro didelę antrinių polifenolinių augalų metabolitų šeimą. Jie dažniausiai randami vaisiuose, daržovėse, riešutuose, arbatoje ir pan. Galo rūgšties dariniai, tokie kaip propilgalatas ir epigalokatechino

galatas yra plačiai naudojami kaip maisto priedai neleidžiantys aliejui tapti aitriu. Jų kaip antioksidantų veikla paremta tiesioginiu laisvųjų radikalų pašalinimu atiduodant vandenilio atomus arba elektronus, todėl jie yra klasifikuojami kaip pirminiai natūraliai atsirandantys antioksidantai. Dėl savo sudėtyje turimų trijų fenolinių hidroksigrupių galo rūgštis yra stiprus antioksidantas [2, 13].

Indijoje yra daug laboratorijų, kuriose vykdomi iš natūralių šaltinių išskirtų antioksidantų tyrimai, daugiausiai dėmesį kreipiant į jų gebėjimą apsaugoti ląsteles nuo pažeidimų ir įvairių ligų. Tokių tyrimų metu buvo parodyta, jog ilgosios ciberžolės karotenoidai ir kurkuminas pasižymi stipriu antioksidaciniu poveikiu. Indijoje paplitusi Ajurvedos sistema yra geras naujų medicininių augalų ir preparatų paieškos šaltinis. Be savo fiziologinės reikšmės augalams flavanoidai ir fenoliai yra taip pat laikomi svarbia žmonių mitybos dalimi ir jau nuo seno buvo naudojami įvairioms ligoms gydyti. Širdies ir kraujagyslių ligos yra pagrindinė mirties priežastis ne tik trečio pasaulio bet ir išsivysčiusiose šalyse. Širdies ir kraujagyslių ligos apima tokius susirgimus, kaip arteosklerozė, arterijų hipertenzija, koronarinės širdies ligos ir širdies nepakankamumas. Pagrindinė širdies ir kraujagyslių ligų priežastis yra oksidacinis stresas, kuris gali būti sumažintas naudojant antioksidantus. Visuotinai pripažinta, jog flavanoidų poveikis sveikatai priklausomas nuo jų antioksidacinių ir chelatinių savybių. Fenolių antioksidacinės savybės nėra visiškai ištirtos, todėl jie yra aktyviai tyrinėjami. Tačiau jau dabar aišku, jog jie turi įtakos stabdant lėtinių ligų, tokių kaip vėžys, žarnyno uždegimas, Alzheimerio liga vystymąsi. Epidemiologiniai tyrimai kelia prielaidą, jog flavanoidai ir fenoliai gali turėti įtakos apsisaugant nuo širdies ir kraujagyslių ligų. Flavanoidai ir fenoliai sąveikaudami su esminiais fermentais ir signalizavimo keliais į kuriuos įeina citokinai ir tranksripcijos faktoriai taip prisideda prie organizmo apsaugos [1].

### 1.3 Antioksidacinių savybių pakavimo medžiagos

Lipidai yra labai svarbūs maisto produktų kokybei ir įtakoja jų maistinę vertę, skonio ir sotumo pojūčius. Tačiau lipidų oksidacija yra opi problema apdorojant ir sandėliuojant maistą dėl nemalonaus kvapo, pakitusio skonio, tekstūros ir spalvos pokyčių, sumažėjusios maistinės vertės. Dėl šitų faktorių sutrumpėja produktų galiojimo trukmė, o galiausiai prarandama produkcija. Siekiant apsaugoti maistą nuo lipidų oksidacijos yra naudojami antioksidantai, tokie kaip butilintas hidroksianisolas (BHA) arba butilintas hidroksitoluenas (BHT) ir etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) [8, 13]. Tačiau šių sintetinių antioksidantų naudojimas yra vertinamas prieštaringai. Tuo tarpu natūralūs maisto produktai yra vis labiau vertinami ir pageidaujami vartotojų. Nors natūralūs antioksidantai tokie kaip vitaminas C ir tokoferolis yra labiau priimtini, tačiau siekiant pasiekti tokį pat efektą kaip kad naudojant sintetinius antioksidantus reikia didesnio natūralių oksidantų

kiekio. Tiek natūralūs tiek sintetiniai antioksidantai, kaip konservantai gali įtakoti maisto kokybę. Pavyzdžiui, kaip konservantą naudojant ferulo rūgštį šildant vyksta ferulo rūgšties dekarboksilinimo reakcija susidarant 4-vinilguaiakoliui, kuris keičiant maistą stipriai keičia jo skonį [9]. Dėl to pakuotės pasižyminčios antioksidacinėmis savybėmis tampa vis patrauklesnė alternatyva maisto konservavimui. Įterpiant antioksidantus į pakuotę, pakuotė ne tik atlieka tradicinę paskirtį – suteikia inertišką barjerą nuo aplinkos, bet ir atlieka antioksidanto funkciją. Pagrindiniai aktyvių pakuočių gavimo būdai yra šie: paketėlių su antioksidantais patalpinimas pakuotės viduje, antioksidanto dangos formavimas ant pakuotės vidinėje pusėje, antioksidanto inkorporavimas į pačią pakavimo medžiagos kompoziciją arba antioksidanto prijungimas prie pakavimo medžiagos kovalentiniais ryšiais [2]. Tačiau paketėliai netinka pakuojant skysčius ar daug drėgmės turinčius maisto produktus, nes paketėlio turinys gali patekti į skystą produktą. Tuo tarpu antioksidantų įmaišymas į polimerų matricą yra paprastas ir greitas būdas, tačiau antioksidantų migracija nuo iš pakavimo medžiagos į maistą gali paveikti maisto kokybę. Kovalentiškai prijungus antioksidantus prie polimerinės medžiagos gaunamos stabiliausios pakavimo medžiagos [8]. Susidarius tokiam ryšiui, antioksidanto molekulės negali migruoti iš pakavimo medžiagos į maistą.

### 1.3.1 Chitozano modifikavimas fenolinėmis rūgštimis

Keletas pakavimo medžiagų paviršiaus modifikavimo metodų buvo sukurta tam, kad būtų galima šiems paviršiams suteikti naujas funkcijas [2]. Daugiausia tokių metodų yra realizuojama naudojant jonizuojančias dujas, švitinant UV spinduliais arba cheminiais metodais. Naudojant plazmą padidėja aktyvių grupių kiekis esantis plėvelių paviršiuje, dėl to padidėja plėvelės paviršiaus energija, tuo pačiu ir plėvelės paviršiaus reakingumas. Paviršiaus modifikavimas naudojant UV spindulius buvo pritaikytas keletui polimerų. UV spinduliai gali suformuoti funkcines grupes arba laisvuosius radikalus, kurie padeda inicijuoti funkcinių monomerų polimerizaciją. Tuo tarpu naudojant cheminius metodus polimerai yra veikiami cheminiais reagentais prijungiant funkcines grupes [8].

Pastaruoju metu yra ieškoma būdų modifikuoti chitozaną fenolinėmis rūgštimis, norint suteikti chitozanui antioksidacines savybes [2]. Chitozano modifikavimas gali būti atliktas paprastai sumaišant komponentus, padengiant chitozano plėveles aktyvia danga, švitinant arba vykdant fermentines reakcijas.

Sumaišymo būdas yra paprastas ir greitas, tačiau yra didelė tikimybė, kad antioksidantai gali išgaruoti iš plėvelės. Radiacinis poveikis gali inicijuoti kovalentinių ryšių formavimąsi tarp



antioksidantų ir chitozano, tačiau dažnai sukelia polimero arba fenolinių rūgščių destrukciją. Švitinant vyksta polimerų grandinių destrukcija ir blogėja polimerų mechaninės savybės. Tačiau fenolinės rūgštys suyra reaguodamos su hidroksiradikalais susidariusiais vandens radiolizės metu. Fermentiniai metodai, naudojant laktazę, tirozinazę ir krienų peroksidazę, yra naudojami prijungiant fenolinius darinius prie chitozano, bet šie fermentai taip pat gali katalizuoti fenolinių junginių oksidaciją taip pablogindami jų antioksidacines savybes.

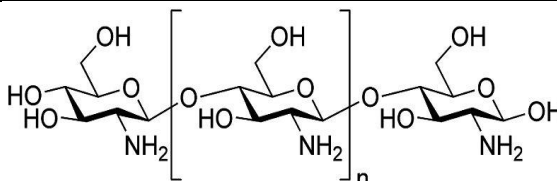
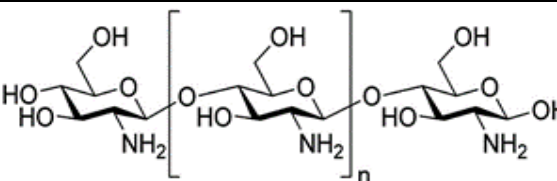
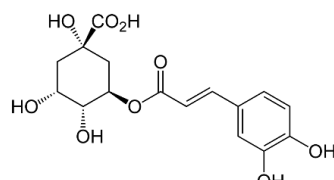
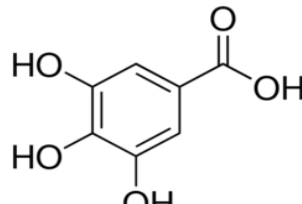
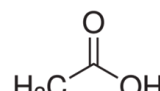
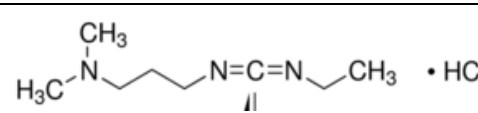
Chitozaną modifikuoti galima ir naudojant karbodiimido reagentus. Karbodiimido reagentai yra plačiai naudojami peptidų sintezėje ir biomolekulių atskyrimui. Jie leidžia suformuoti amidines jungtis tarp amino ir karboksigrupių esant švelnioms sąlygoms [2]. N-etil-N-(dimetilaminopropil)-karbodiimidas (EDC) yra vienas iš populiariausių karbodiimido reagentų dėl palyginti mažos savo kainos, netoksiškumo, gero tirpumo, o reakcijos metu išsiskiriantis karbamidas gali būti lengvai pašalinamas. EDC reaguojant su karboksirūgštimi susidaro O-acilo karbamidas, kuris staigiai hidrolizuojasi arba persitvarko į stabilesnį N-acilo karbamidą. Pridėjus į reakcijos mišinį N-hidroksisukcinimido (NHS) esant švelniomis sąlygomis, susiformuoja stabilūs tarpiniai produktai – aktyvūs hidrofiliniai aminoacilo esteriai, kurie reaguoja su chitozano amino grupėmis ir prijungia fenolinės rūgšties fragmentą prie chitozano. Tokiu būdu prie chitozano galima prijungti įvairias fenolines rūgštis, tame tarpe ir galo rūgštį [2]. Šiuo atveju efektyviam fenolinių rūgščių fragmentų prijungimui reikia pakankamai didelio EDC kiekio. EDC gali būti suaktyvinamos ne tik karboksi- bet ir hidroksigrupės, kurios toliau gali jungtis su amino grupėmis vykstant polimero tinklinimo reakcijai, dėl ko sumažėja modifikuoto chitozano tirpumas acto rūgštyje. Dėl šios priežasties vėliau negalima gauti homogeniškus tirpalus ir suformuoti plėvelę. Žinant tai, gali būti naudojamas ir alternatyvus metodas, iš pradžių suformuojant chitozano plėveles ir tik vėliau jas modifikuojant [2].

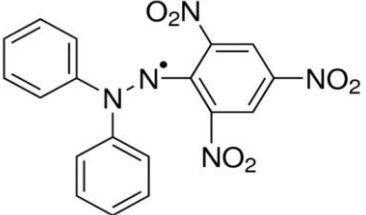
## 2. TIRIAMOJI (EKSPERIMENTINĖ) DALIS

### 2.1 Naudotos medžiagos

Darbe naudotos medžiagos ir reagentai pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Naudotos cheminės medžiagos ir reagentai

Cheminės medžiagos ar priemonės pavadinimas, santrumpa	Formulė	Charakteristikos, gamintojas arba tiekėjas
Mažos molekulinės masės chitozanas, (MMMC)		Deacetilimo laipsnis 75–85 %, Sigma Aldrich
Vidutinės molekulinės masės, (VMMC)		Deacetilimo laipsnis 75–85 %, Sigma–Aldrich
Chlorogeno rūgštis (CLR)		Grynumas 95 %, Sigma–Aldrich
Galo rūgštis (GAR)		Grynumas 99,4 %, Sigma–Aldrich
Etilo alkoholis	$C_2H_5OH$	96,3 %, AB „Stumbras“
Acto rūgštis		Grynumas 99,5 %, Sigma–Aldrich
Druskos rūgštis	HCl	Koncentruota, 35%, Penta
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas (EDAC)		Chemiškai švarus, Sigma–Aldrich

Folin-Ciocalteau reagentas	-	2N koncentracija, Sigma–Aldrich
2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH)		Grynumas 95 %, Sigma–Aldrich
Modifikuotos celiuliozės dializės membrana <i>Zellu Trans</i>	-	MWCO 12000–14000, porų dydis 25–30 Å, Carl Roth
Arbatos pakeliams skirtas filtrinis popierius	-	265 mm pločio, gautas iš UAB „Acorus Calamus“

## 2.2 Tyrimų metodai

### 2.2.1 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano gavimas

1 % chitozano vandeninis tirpalas buvo paruoštas ištirpinant chitozano (mažos molekulinės masės arba vidutinės molekulinės masės) miltelius 50 ml 1 % acto rūgšties vandeninio tirpalo, pastoviai maišant ir šildant 3 val. 60-70 °C temperatūroje. Tuo tarpu fenolinė rūgštis (chlorogeno arba galo) ir EDAC buvo ištirpinti 10 ml etilo alkoholio. Paruoštas chitozano tirpalas buvo supiltas į trigurklę apvaliadugnę kolbą, prijungtas grįžtamasis kondensatorius, o kolba patalpinta į vandens vonelę. Reakcijos tirpalas buvo šildomas, o pasiekus 60 °C temperatūrą, fenolinės rūgšties ir EDAC etanolinis tirpalas buvo supiltas į chitozano tirpalą ir maišomas magnetine maišykle. Reakcija šioje temperatūroje vykdyta 3 val. Fenoline rūgštimi (chlorogeno arba galo) modifikuotas chitozanas (mažos molekulinės masės arba vidutinės molekulinės masės) buvo gautas esant moliniam santykiui chitozanas : fenolinė rūgštis : EDAC = 0,98 : 1 : 1. Acto rūgščiai ir kitiems šalutiniams reakcijos produktams pašalinti po reakcijos gautas modifikuotas chitozanas buvo grynintas distiliuotame vandenyje, naudojant modifikuotos celiuliozės dializės membraną *Zellu Trans*. Po gryninimo modifikuoto polimero tirpalas buvo nufiltruotas per stiklinį filtrą, sukonzentruotas iki pradinio mišinio tūrio (~ 50 ml) nugarinant vandenį. Tada tirpalas buvo užšaldytas šaldymo kameroje ir išdžiovintas naudojant *SP Scientific VirTis BenchTop 2K* liofilizatorių.

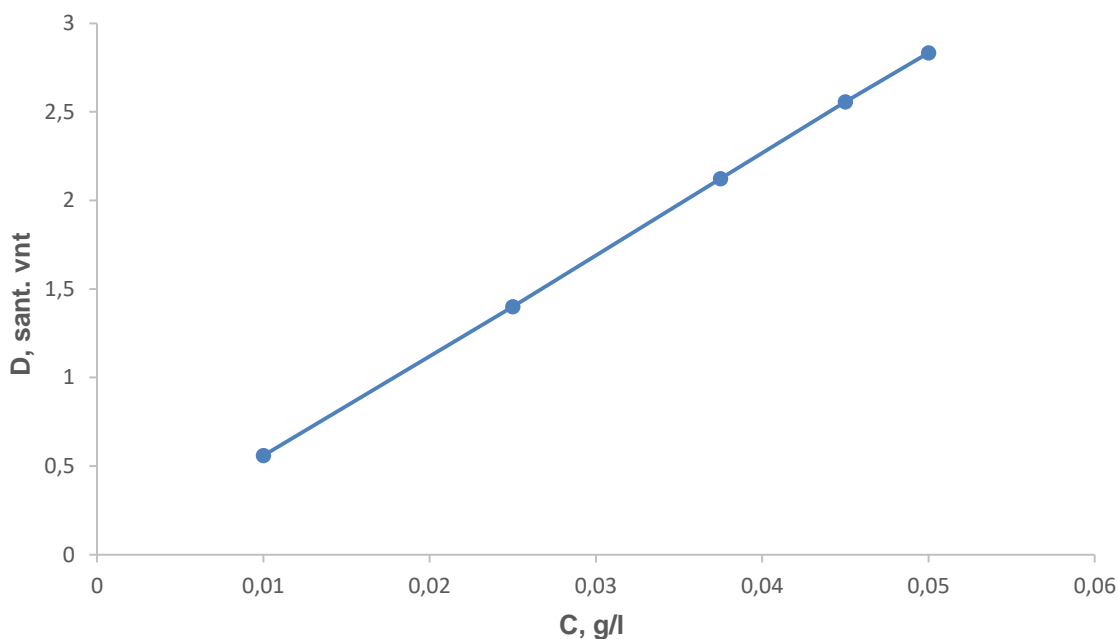
### 2.2.2 Fenolinių rūgščių kiekio nustatymas modifikuotame chitozane

Prie chitozano prijungtų fenolinių rūgščių kiekis buvos nustatytas UV spektroskopijos metodu, prieš tai sudarius chlorogeno rūgšties vandeninio tirpalo 325 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumo priklausomybės nuo tirpalo koncentracijos (2.1 pav.) bei galo rūgšties vandeninio tirpalo 266 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumo priklausomybės nuo tirpalo koncentracijos (2.2 pav.) kalibracines kreives. Modifikuoti chitozanoi buvo ištirpinti acto rūgšties vandeniniame tirpale ir *Jenway 6715 UV/vis* spektrofotometru užrašyti šių tirpalų UV spektrai.

Pasinaudojus kalibracine kreive (2.1 pav.) ir 2.1 lygtimi buvo įvertinta chlorogeno rūgšties koncentracija (C) chlorogeno rūgštimi modifikuoto chitozano tirpale, taip pat apskaičiuotas chlorogeno rūgšties kiekis (CLR %) modifikuotame polimere.

$$C = \frac{D + 0.0015}{57.004} \quad (2.1)$$

čia: D – chlorogeno rūgštimi modifikuoto chitozano vandeninio tirpalo 325 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumas.



**2.1 pav.** Chlorogeno rūgšties vandeninio tirpalo 325 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumo priklausomybės nuo tirpalo koncentracijos kreivė.

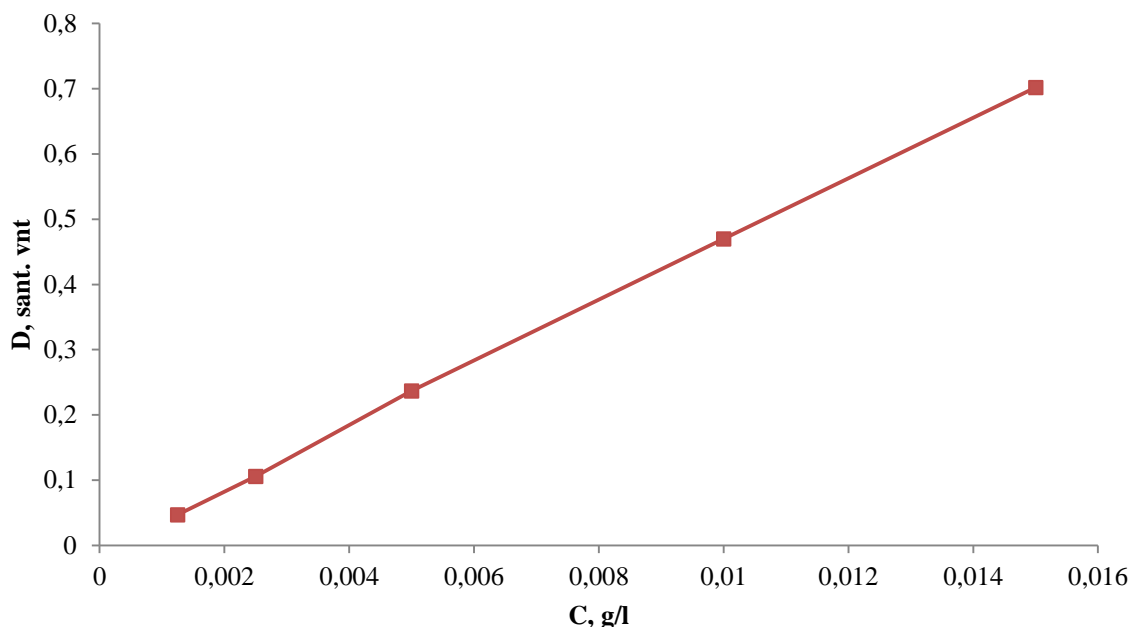
CLR pakeitimo laipsnis (PL) apskaičiuotas pagal formulę:

$$PL = \frac{161,17 \cdot CLR\%}{33700 - 337 \cdot CLR\%} \quad (2.2)$$

Pasinaudojus kalibracine kreive (2.2 pav) ir 2.3 lygtimi buvo įvertinta galo rūgšties koncentracija (C) galo rūgštinti modifikuoto chitozono tirpale bei paskaičiuotas procentinis galo rūgšties kiekis (GAR %) modifikuotame polimere.

$$C = \frac{D + 0.0093}{47.656} \quad (2.3)$$

čia: D – galo rūgštinti modifikuoto chitozono vandeninio tirpalo 266 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumas.



**2.2 pav.** Galo rūgšties vandeninio tirpalo 266 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumo priklausomybės nuo tirpalo koncentracijos kreivė.

GAR pakeitimo laipsnis (PL) apskaičiuotas pagal formulę:

$$PL = \frac{161,17 \cdot GAR\%}{15300 - 153 \cdot GAR\%} \quad (2.4)$$

### 2.2.3 Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas Folin – Ciocalteu metodu

Tiriamas bandinys 0,01 g buvo ištirpinamas 1 proc. acto r. vandeniniame tirpale 1 ml. Tada 1 ml tiriamo bandinio tirpalo sumaišoma su 5 ml Folin – Ciocalteu reagento (praskiesto vandeniui santykiu 1 : 10). Po 5 min įpilama 5 ml 7,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  vandeninio tirpalo ir gautas mišinys 2 val laikomas kambario temperatūroje. Išmatuojama bandinio 640 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumas ir palyginama su tuščio bandinio 640 nm šviesos sugerties intensyvumu. Bendras fenolinių junginių kiekis apskaičiuojamas naudojant atitinkamos fenolinės rūgšties (chlorogeno ar galo) kalibracinę kreivę.

### 2.2.4 Sausų medžiagų kiekio nustatymas

Sausų medžiagų kiekis medžiagoje buvo nustatytas, naudojant drėgnomatį *Kern MRS 120-3* (Vokietija). Medžiagoje esantis drėgmės kiekis ( $\omega$ ) procentais apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\omega = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \cdot 100\%, \quad (2.5)$$

čia  $m_0$  – medžiagos masė prieš džiovinimą, g;  $m_1$  – medžiagos masė po džiovinimo, g.

Sausų medžiagų kiekis, esantis medžiagoje, randamas pagal formulę:

$$\omega_s = 100 - \omega,$$

čia  $\omega_s$  – sausų medžiagų kiekis medžiagoje, %.

### 2.2.5 UV spektroskopija

Bandinių vandeninių tirpalų UV spektrai buvo užrašyti naudojant Jenway 6715 UV/vis spektrofotometrą.

### 2.2.6 FT – IR spektroskopija

Skirtingos molekulinės masės chitozanų ir fenolinėmis rūgštimis modifikuotų chitozanų spektrai buvo užrašyti naudojant *Perkin Elmer FT-IR* spektrometrą *Frontier* (JAV) atspindžio režime. Šio prietaiso skiriamoji geba yra  $1 \text{ cm}^{-1}$ , skenavimo greitis  $0,2 \text{ cm/s}$ , skenavimų skaičius – 16 kartų. Bandinių pralaidumo spektrams užrašyti naudoti sausi bandiniai, kurių masė  $\sim 0,1 - 0,2$  g. Prieš matavimą bandiniai buvo išdžiovinti iki sausos masės, kaitinimo krosnyje  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje.

### 2.2.7 Termogravimetrinė analizė

Bandinių termogravimetrinė analizė (TGA) buvo atlikta naudojantis *Perkin Elmer TGA 4000* terminiu analizatoriumi azoto aplinkoje. Tyrimas buvo vykdomas šiomis sąlygomis: mėginys (apie 10 mg) buvo kaitinamas temperatūros intervale nuo  $35$  iki  $600 \text{ }^\circ\text{C}$ , keliant temperatūrą  $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$  greičiu, azoto atmosferoje. Etalonas – tuščia aliuminio kapsulė.

### 2.2.8 Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija

Bandinių diferencinės skenuojamosios kalorimetrijos (DSK) kreivės buvo užrašytos *Perkin Elmer DSC 8500* terminiu analizatoriumi. Mėginiai (apie 10 mg) buvo patalpinti į aliuminio kapsules, uždaryti ir kaitinami temperatūros intervale nuo  $30$  iki  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ , keliant temperatūrą  $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$  greičiu, azoto atmosferoje (tekėjimo greitis –  $20 \text{ ml/min}$ ).

### 2.2.9 Rentgeno spindulių difrakcija

Bandinių rentgeno spindulių difrakcijos spektrai buvo užrašyti naudojant *Bruker D8 Discover* difraktometrą.

### 2.2.10 Antioksidacinių savybių tyrimas

Skirtingos molekulinės masės chitozanų ir fenolinėmis rūgštimis modifikuotų chitozanų antioksidacinės savybės buvo įvertintos DPPH metodu. Stiklinėje tiriamoji medžiaga užpilama 30 ml (tiriant chlorogeno r. modifikuotus chitozanas) arba 15 ml (tiriant galo r. modifikuotus chitozanas) 0,075 g/l koncentracijos etanolinio 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) tirpalo ir mišinys pastoviai maišant buvo laikomas kambario temperatūroje. Kas dvi minutes išmatuojama 517 nm monochromatinio spindulio sugerties intensyvumas tiriamuoju tirpalu regimosios šviesos spektrofotometru PG Instruments T60. Kaip palyginamasis bandinys buvo naudojamas tirpalas be polimero („tuščias“ bandinys). Kai sugerties intensyvumas nebekinta, antioksidacinis efektyvumas (AOEF, %) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$AOEF = \frac{A_K - A_B}{A_K} \cdot 100\% \quad (2.6)$$

čia:  $A_K$  – palyginamojo bandinio šviesos sugertis,  $A_B$  – tiriamojo bandinio šviesos sugertis.

### 2.2.11 Antibakterinių savybių tyrimas

Fenolinių rūgščių, chitozono ir fenolinėmis rūgštimis modifikuotų chitozono darinių antibakterinis poveikis trijų rūšių bakterijoms: gramneigiamoms *Escherichia coli* (ATCC 8739) ir *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 6750) bei gramteigiamoms *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) įvertintas mikroskiedimo ir difuzijos į agarą metodais.

Tiriamos bakterijos Petri lėkštelėje buvo paskleistos TSA (tryptic soy broth) terpėje ir augintos 24 h 37 °C temperatūroje. Tada reprezentacinės kiekvienos kultūros kolonijos buvo patalpintos į 5 ml TSB (tryptic soy agar) terpės ir augintos 24 h 37 °C temperatūroje. Po to, skiedžiant TSB buvo paruošti  $10^{-7}$  KSV/ml kiekvienos bakterijų kultūros turintys tirpalai ir naudoti antibakteriniams tyrimams. Paruošti bandinių (fenolinių rūgščių, chitozono, fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozono) vandeniniai tirpalai, kurių koncentracija siekė nuo 0,6 iki 1000 µg/ml. 100 µl paruošto bakterijų tirpalo buvo pridėta į bandinių mėgintuvėlius ir laikoma 24 h 37 °C temperatūroje. Minimali slopinamojo koncentracija (MSK) nustatyta mikroskiedimo metodu yra mažiausia tiriamos medžiagos koncentracija, kuriai esant tirpalai mėgintuvėlyje nesusidrumstė. Tada iš kiekvieno mėgintuvėlio nedidelė tirpalo dalis buvo patalpinta į Petri lėkštelę su TSA, ten laikoma 48 h 37 °C temperatūroje ir stebimas bakterijų kultūrų augimas. Minimali baktericidinė koncentracija (MBK) nustatyta difuzijos į agarą metodu yra ta tiriamojo bandinio koncentracija, kuriai esant bakterijų kultūra agaro sluoksnyje neišaugo.



### 2.2.12 Chitozano ir fenolinių rūgščių dangų ant filtrinio popieriaus formavimas

MMMC-GAR, VMMC-GAR, MMMC-CLR, VMMC-CLR arba chitozano ir atitinkamų fenolinių rūgščių mišiniai buvo ištirpinti acto rūgštimi parūgštintame vandenyje, maišant magnetine maišykle 350 aps/min dažniu apie 15 minučių, kambario temperatūroje.

Arbatos pakeliams skirtas filtrinis popierius buvo įtvirtintas ant dangos liejimo stalo (*RK Print Coat Instruments Ltd*), liejimo kompozicija naudojant 5 ml pipetę užnešama ant filtrinio popieriaus paviršiaus ir naudojant dangos liejimo lazdelę išliejama 6 μm (neišdžiūvusios dangos storis) storio danga (žr. 2.3 pav.). Dangą liejant ir jai išdžiūvus buvo vizualiai įvertinamas jos homogeniškumas ir kokybė.



2.3 pav. Dangos liejimo stalas su filtriniu popieriumi (a) ir dangos liejimo lazdelės (b).

### 2.2.13 Fenolinių rūgščių atpalaidavimo iš dangų vandenyje tyrimas

Fenolinių rūgščių atpalaidavimas iš dangų į vandenį buvo tiriamas, naudojant Jenway 6715 *UV/vis* spektrofotometrą. 0,1 g masės bandiniai buvo patalpinti į 40 ml tūrio 1 proc. acto r. tirpalo ir kas dvi minutės buvo matuojamas 266 nm (tiriant galo r. ir chitozano dangas) arba 325 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumas (tiriant chlorogeno r. ir chitozano dangas).

#### 2.2.14 Chitozano ir fenolinių rūgščių dangų antioksidacinių savybių tyrimas

Gautų dangų ant filtrinio popieriaus antioksidacinės savybės buvo įvertintos DPPH metodu. Po 0,1 g tiriamojo bandinio (filtrinio popieriaus su danga) buvo sudėta į šešias stiklines ir užpilta 40 ml 1 proc. acto r. vandeninio tirpalo ir maišant magnetine maišykle 350 aps/min sukimosi dažniu, skirtingais laiko tarpais t.y. po 10, 20, 30, 40, 50, 60 min paimta po 1 ml tiriamojo vandeninio tirpalo. Mėgintuvėliuose tiriamasis tirpalas buvo užpilamas 3 ml 0,075 g/l koncentracijos etanolinio DPPH tirpalo ir mišinys pastoviai maišant buvo laikomas kambario temperatūroje 30 min. Po to, išmatuojamas 517 nm monochromatinio spindulio sugerties tiriamuoju tirpalu intensyvumas regimosios šviesos spektrofotometru PG Instruments T60. Kaip palyginamasis bandinys buvo naudojamas tirpalas be polimero („tuščias“ bandinys). Kai sugerties intensyvumas nebekinta, antioksidacinis efektyvumas (AOEF, %) apskaičiuojamas pagal (2.6) formulę.

#### 2.2.15 Rezultatų tikslumo ir patikimumo tyrimas

Tyrimų rezultatų aritmetinis vidurkis  $\bar{x}$  ir vidutinis kvadratinis nuokrypis  $s$ , apskaičiuojami pagal formules:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (2.7)$$

čia:  $x_i$  – tiriamasis atsitiktinis dydis;

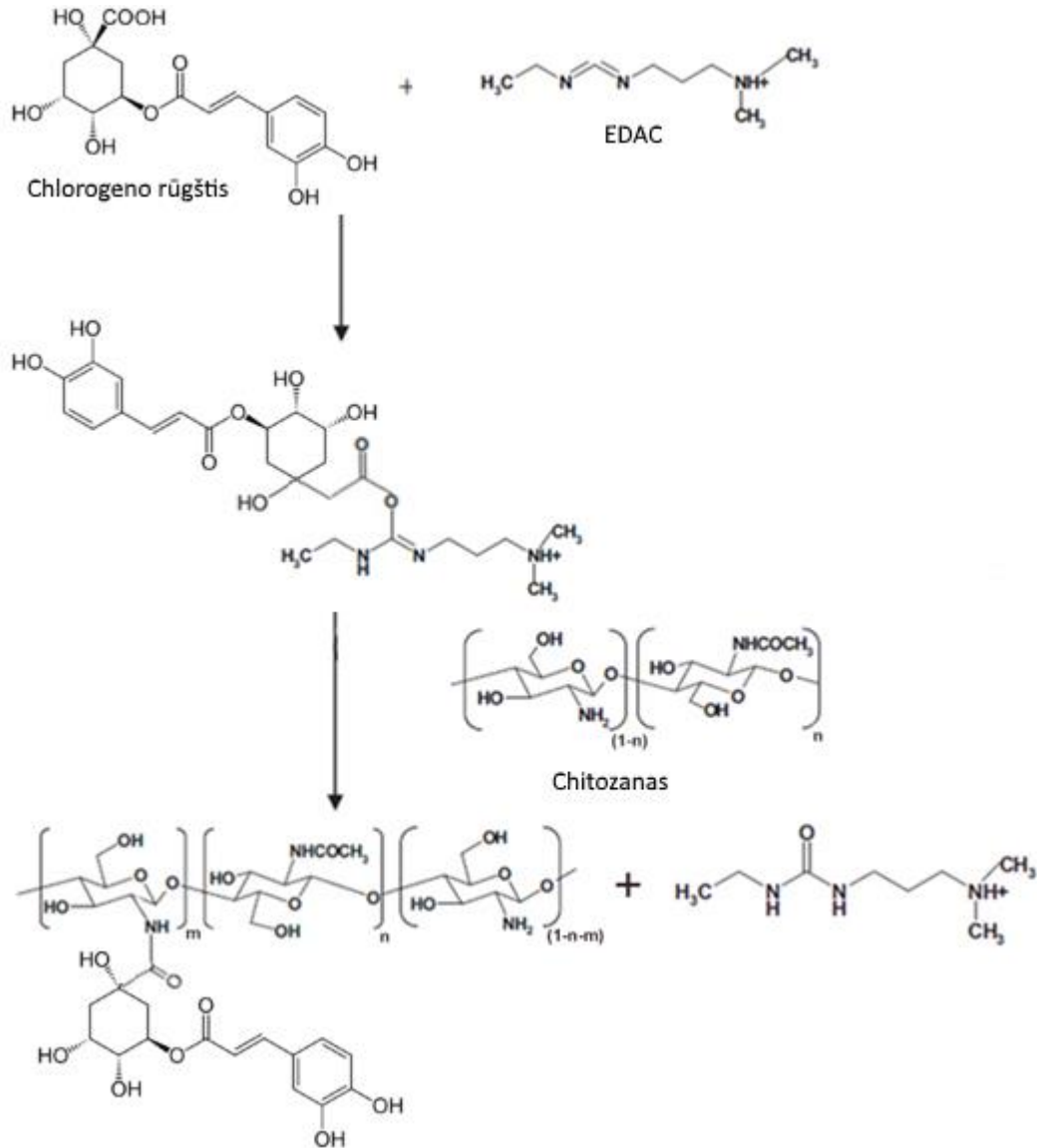
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot n}}, \quad (2.8)$$

čia:  $x_i - \bar{x}$  – atsitiktinio rezultato nuokrypis nuo aritmetinio vidurkio;  $n$  – rezultatų skaičius.

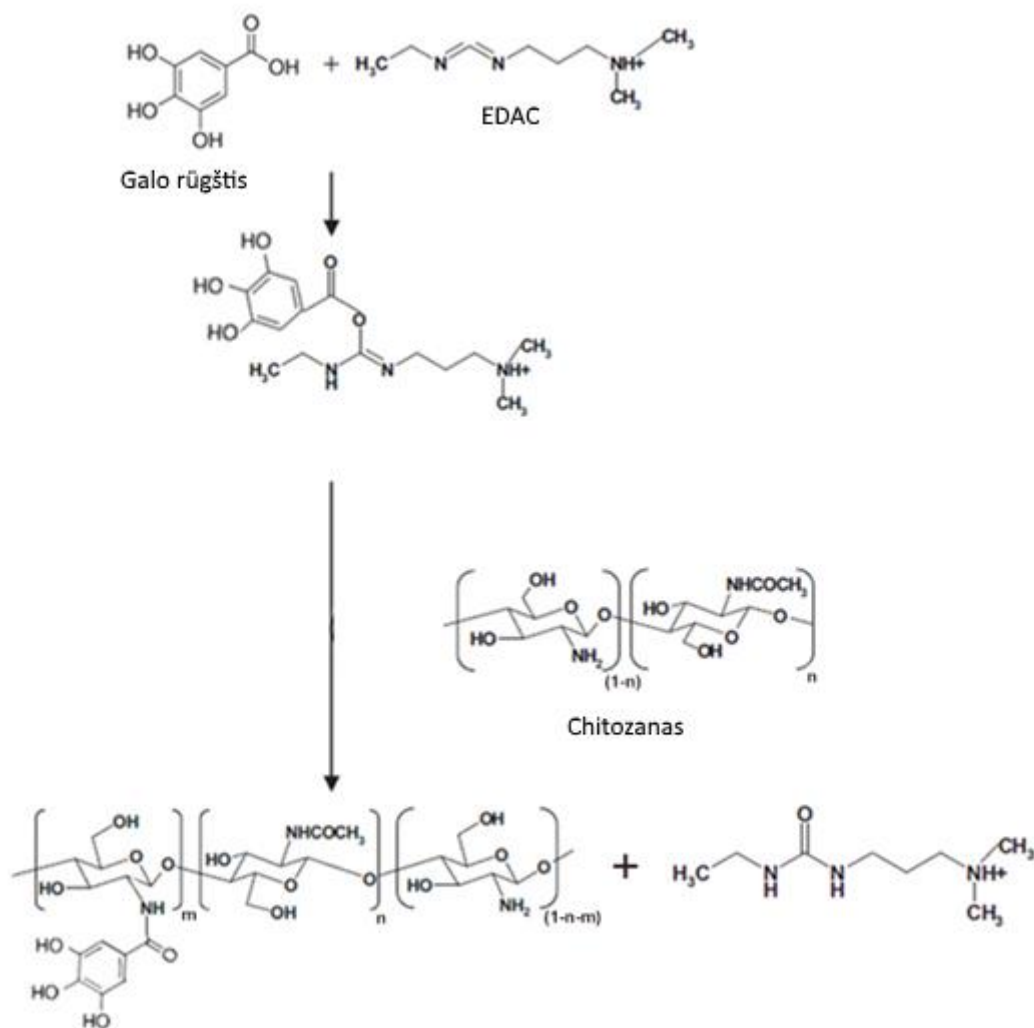
### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano sintezė ir sandara

Skirtingos molekulinės masės chitozanai buvo modifikuojami fenolinėmis rūgštimis vykdant sintezės reakcijas pagal 3.1 ir 3.2 pav. pateiktas schemas.



3.1 pav. Chlorogeno rūgštimi modifikuoto chitozano (MMMC-CLR arba VMMC-CLR) sintezės schema.

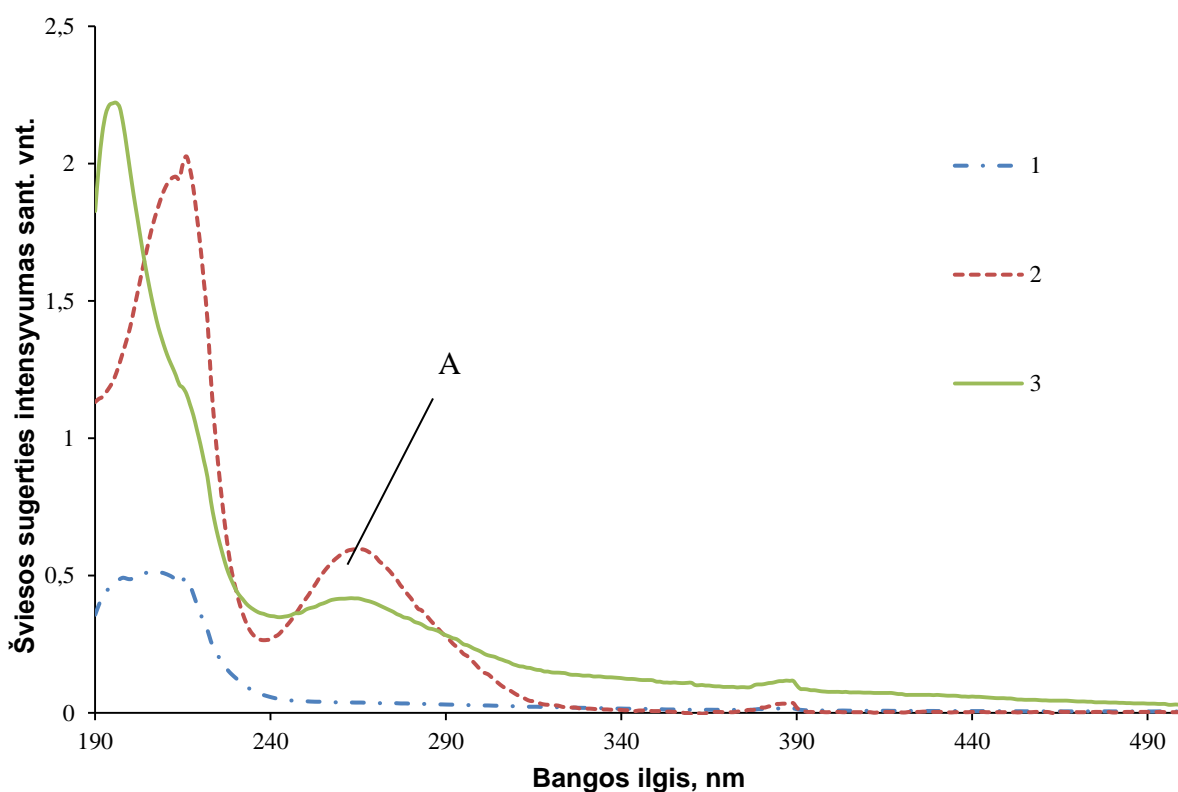


3.2 pav. Galo rūgštimi modifikuoto chitozано (MMMC-GAR arba VMMC-GAR) sintezės schema.

Mažos molekulinės masės chitozanas (MMMC) arba vidutinės molekulinės masės chitozanas (VMMC) buvo modifikuotas chlorogeno rūgštimi (CLR), vykdant chitozано, chlorogeno rūgšties ir N-(3-dimetilaminopropil)–N'-etilkarbodiimido hidrochlorido (EDAC) reakciją vandens ir etanolio mišinyje (3.1 pav.). Tuo tarpu mažos molekulinės masės chitozanas arba vidutinės molekulinės masės chitozanas buvo modifikuotas galo rūgštimi (GAR), vykdant chitozано, galo rūgšties ir N-(3-dimetilaminopropil)–N'-etilkarbodiimido hidrochlorido reakciją vandens ir etanolio mišinyje (3.2 pav.). Cheminė reakcija vykdyta 3 val. 60 °C temperatūroje. Ši cheminio modifikavimo reakcija vyksta dviem stadijomis: iš pradžių fenolinės rūgšties (CLR arba GAR) karboksigrupės reaguoja su EDAC, susidarant tarpiniam junginiui. Pastarasis antroje stadijoje reaguoja su chitozано amino grupėmis, susidarant amidiniam ryšiui. Gauti produktai buvo pilkos spalvos modifikuoto chitozано vandeniniai tirpalai. Jie gryninti dializuojant vandeniu, o tada modifikuoto chitozано dariniai buvo liofilizuoti. Reakcijoje naudojant skirtingas fenolines

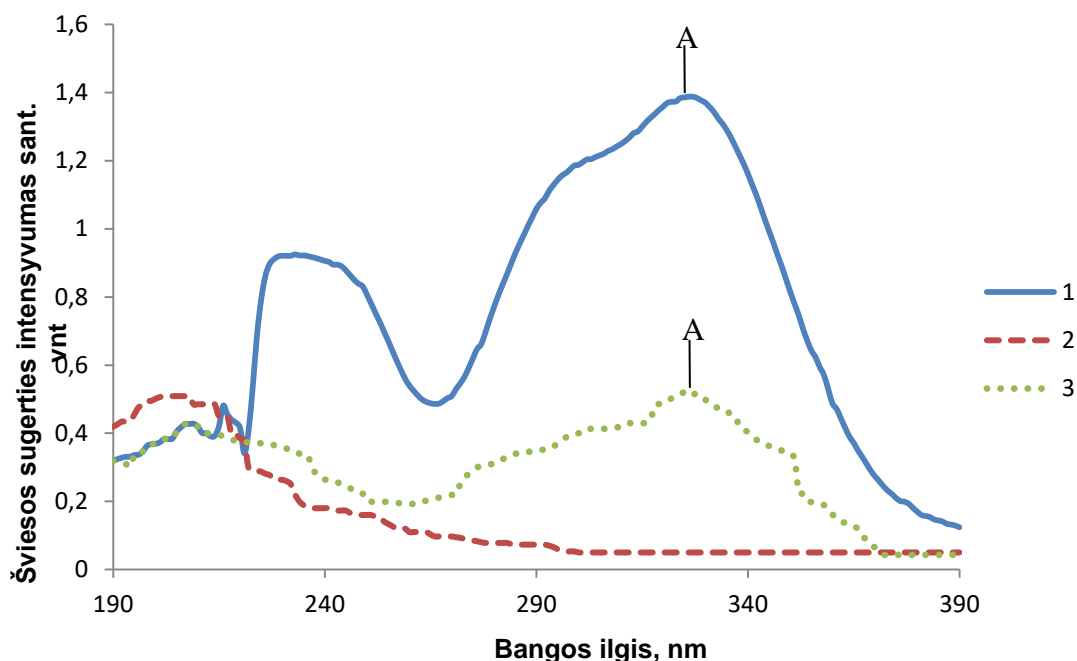
rūgštis (CLR arba GAR), bei skirtingos molekulinės masės chitozaną (MMMC arba VMMC) buvo gauti skirtingomis fenolinėmis rūgštimis modifikuoti, skirtingos molekulinės masės, chitozanai. Gauti modifikuoti chitozanai atitinkamai pažymėti MMMC-CLR, MMMC-GAR, VMMC-CLR, VMMC-GAR.

Fenolinėmis rūgštimis modifikuotų skirtingos molekulinės masės chitozanų cheminei sandarai patvirtinti buvo užrašyti jų vandeninių tirpalų šviesos sugerties spektrai, prieš ir po modifikavimo reakcijų (3.3 ir 3.4 pav.). Paveikslėliuose matyti kaip pakinta chitozano šviesos sugerties spektrai, prijungus fenolines rūgštis.



**3.3 pav.** VMMC (1), GAR (2) ir VMMC-GAR (3) šviesos sugerties spektrai. A – 266 nm bangos ilgio šviesos sugerties smailė.

Galo rūgštimi modifikuoto VMMC (VMMC–GAR) spektre (3.3 pav., 3 kreivė) matyti galo rūgščiai (3.3 pav., 2 kreivė) būdinga 266 nm bangos ilgio šviesos sugerties smailė. Ši smailė nėra būdinga VMMC (3.3 pav., 1 kreivė) ir MMMC vandeninių tirpalų sugerties spektrams. Tuo tarpu chlorogeno rūgštimi modifikuoto VMMC (VMMC-CLR) spektre (3.4 pav., 1 kreivė) matyti chlorogeno rūgščiai (3.4 pav., 3 kreivė) būdinga šviesos sugerties smailė su maksimumu ties 325nm. Ši smailė nėra būdinga VMMC (3.4 pav., 2 kreivė) ir MMMC vandeninių tirpalų sugerties spektrams.



**3.4 pav.** VMMC-CLR (1), VMMC (2) ir CLR (3) šviesos sugerties spektrai. A – 325 nm bangos ilgio šviesos sugerties smailė.

Prie skirtingos molekulinės masės chitozano prijungtos galo rūgšties kiekis buvo nustatytas UV spektroskopijos metodu, prieš tai sudarius galo rūgšties tirpalo 266 nm bangos ilgio šviesos sugerties smailės intensyvumo priklausomybės nuo tirpalo koncentracijos kalibracinę kreivę. Tuo tarpu prie skirtingos molekulinės masės chitozano prijungtos chlorogeno rūgšties kiekis buvo nustatytas UV spektroskopijos metodu, prieš tai sudarius chlorogeno rūgšties tirpalo 325 nm bangos ilgio šviesos sugerties smailės intensyvumo priklausomybės nuo tirpalo koncentracijos kalibracinę kreivę. Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto skirtingos molekulinės masės chitozano cheminė sudėtis pateikta 3.1 lentelėje.

**3.1 lentelė.** Galo ir chlorogeno rūgštimis modifikuoto chitozano cheminė sudėtis, nustatyta UV spektroskopijos metodu

<b>Modifikuotas chitozanas</b>	<b>Chitozano kiekis, %</b>	<b>Fenolinės rūgšties kiekis, %</b>	<b>Fenolinės rūgšties pakeitimo laipsnis</b>
MMMC-GAR	96,48	3,52	0,038
VMMC-GAR	96,03	3,97	0,044
MMMC-CLR	39,60	60,40	0,73
VMMC-CLR	51,00	49,00	0,46

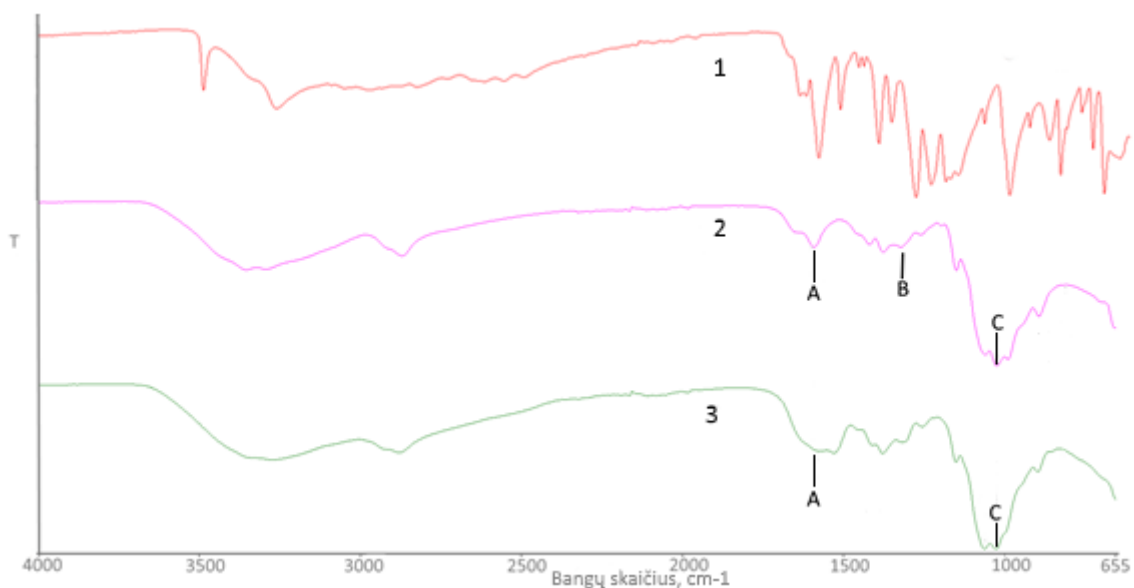
Prie chitozano prijungtų fenolinių rūgščių kiekis taipogi buvo nustatytas naudojant Folin – Ciocalteu metodą. Panaudojant galo ir chlorogeno rūgščių kalibracines kreives buvo

apskaičiuotas fenolinių junginių kiekis modifikuoto chitozano dariniuose (žr. 3.2 lentelę). Palyginus 3.1 ir 3.2 lentelėse pateiktas reikšmes, matyti, kad nustatytų fenolinių rūgščių kiekis panašus, nors UV spektroskopijos metodu ir buvo nustatytos šiek tiek didesnės reikšmės.

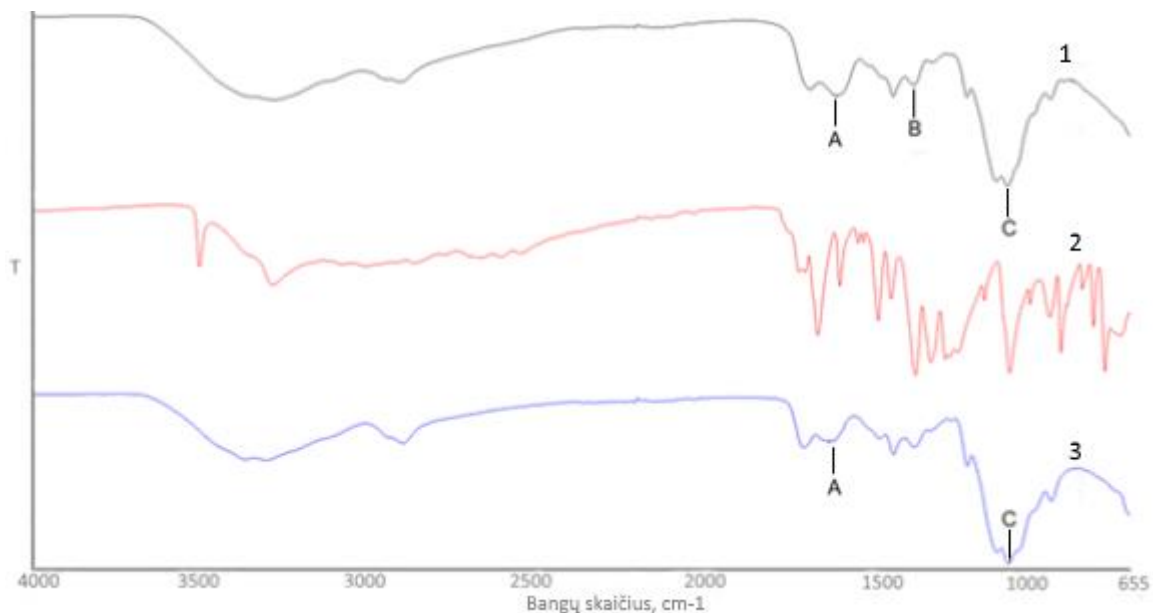
**3.2 lentelė.** Galo ir chlorogeno rūgštimis modifikuoto chitozano cheminė sudėtis, nustatyta Folin – Ciocalteu metodu

<b>Modifikuotas chitozanas</b>	<b>Chitozano kiekis, %</b>	<b>Fenolinių junginių kiekis, %</b>	<b>Fenolinių junginių pakeitimo laipsnis</b>
MMMC-GAR	98,61	1,39	0,015
VMMC-GAR	97,99	2,01	0,022
MMMC-CLR	44,55	54,45	0,57
VMMC-CLR	53,70	46,30	0,41

Chlorogeno ir galo rūgštimis modifikuotų chitozanų cheminei sandarai patvirtinti buvo užrašyti jų FT-IR spektrai ir atitinkamai palyginti su CLR, GAR, MMMC ir VMMC spektrais (3.5 - 3.8 pav.). Chlorogeno ir galo rūgščių spektrams buvo būdingos tipinės fenoliniams junginiams smailės: plati absorbcijos juosta esanti ties 3000 — 3550  $\text{cm}^{-1}$  priskiriama prie fenolinio žiedo prijungtai -OH grupei, -OH plokštumos linkimo smailė prie 1365  $\text{cm}^{-1}$ , aromatinio žiedo C=C ryšio virpesių smailė prie 1450-1600  $\text{cm}^{-1}$ , C-O ir C-C ryšių virpesių smailės 1200-1300  $\text{cm}^{-1}$  srityje.



3.5 pav. GAR (1), MMMC-GAR (2) ir MMMC (3) FT-IR spektrai.

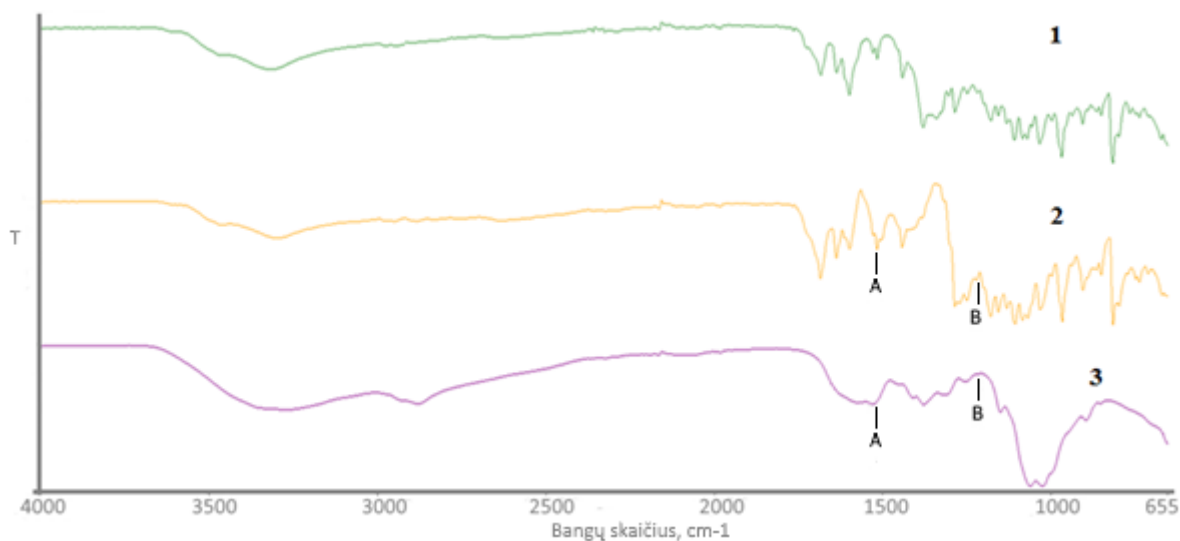


3.6 pav. VMMC-GAR (1), GAR (2) ir VMMC (3) FT-IR spektrai.

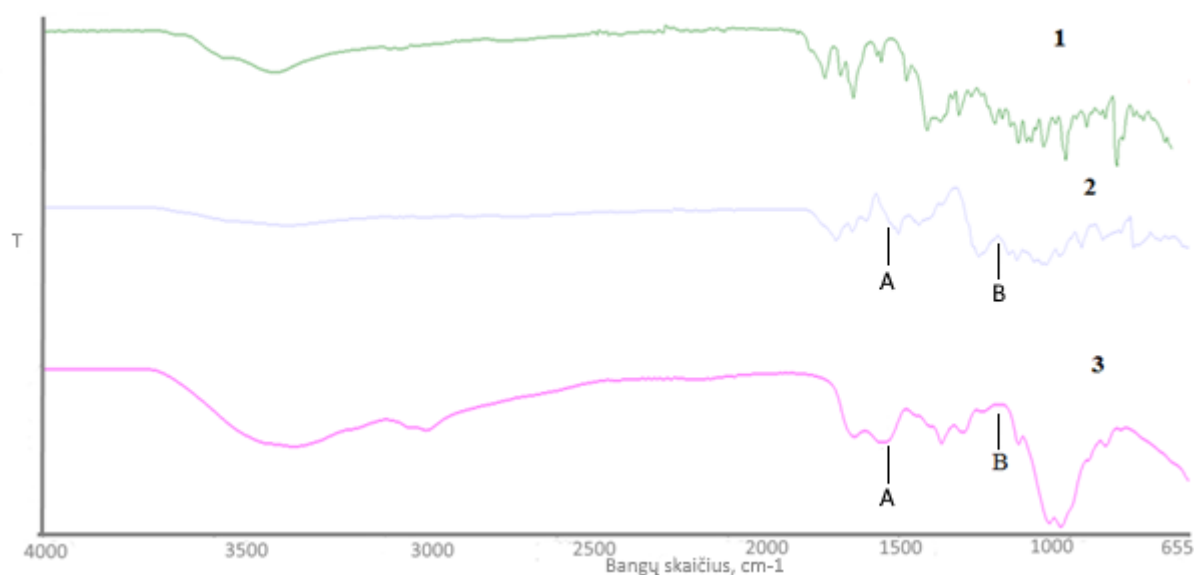
Galo rūgštimi modifikuoto chitozano ir jo pradinių medžiagų FT-IR spektrai pateikti 3.5 - 3.6 pav. Kaip matyti iš 3.5 paveikslėlio, mažos molekulinės masės chitozaną modifikavus galo rūgštimi (3.5 pav., 2 kreivė) pakinta jam būdingos smailės (A ir C). Smailė (A) prie  $1515\text{ cm}^{-1}$  parodo fenolinėms rūgštims būdingus aromatinio žiedo C=C ryšio virpesius. Atsiranda nauja smailė (B) prie  $1298\text{ cm}^{-1}$ , kuri priskiriama amidinėms chitozano grupėms. Smailių (A, B) pokyčiai yra panašūs, tik skiriasi jų intensyvumas. Taip pat padidėja smailės (C) prie  $1025\text{ cm}^{-1}$



intensyvumas, ir tai yra siejama su C-O-C tiltelio antisimetrinės srities pokyčiais, dėl prisijungusios galo rūgšties.



3.7 pav. CLR (1), MMMC-CLR (2) ir MMMC (3) FT-IR spektrai.

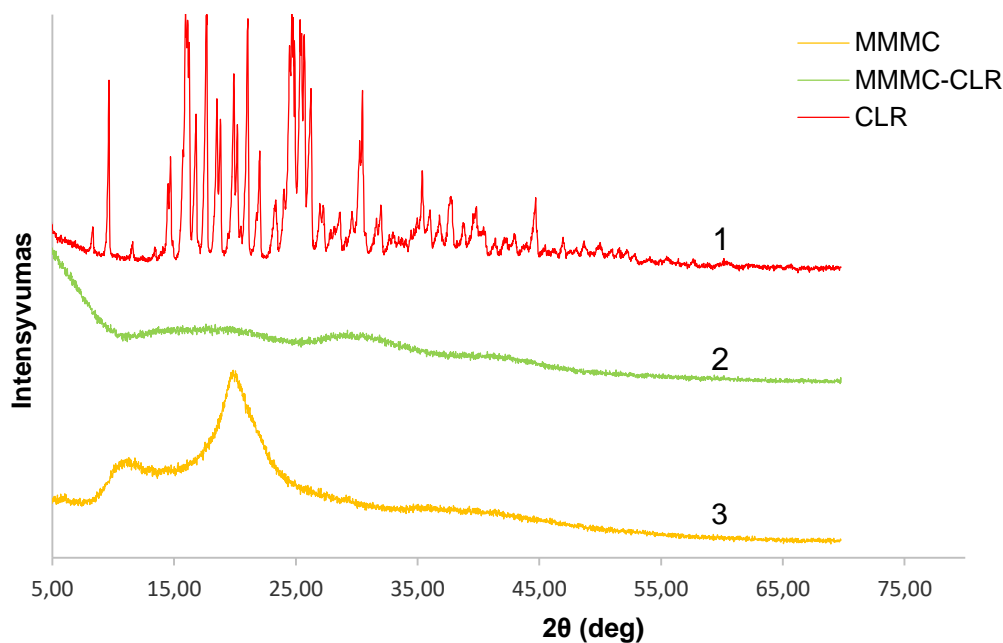


3.8 pav. CLR (1), VMMC-CLR (2) ir VMMC (3) FT-IR spektrai.

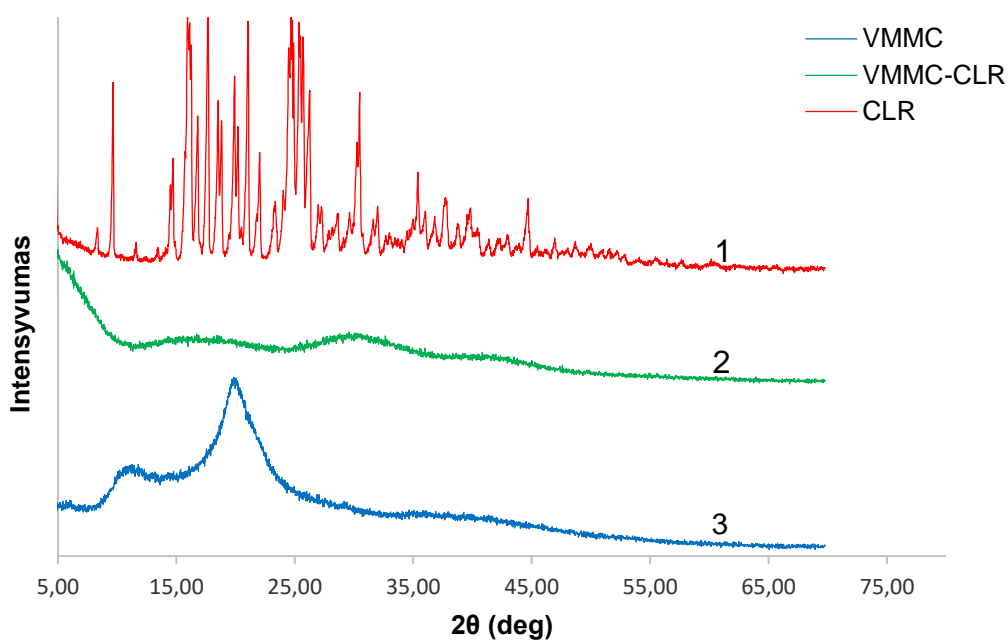
Chlorogeno rūgštimi modifikuoto chitozano ir jo pradinių medžiagų FT-IR spektrai pateikti 3.7 – 3.8 pav. Kaip matyti 3.7 paveiksle, mažos molekulinės masės chitozaną modifikavus CLR (3.7 pav., 2 kreivė) pasikeičia MMMC būdingos smailės (A, B). Smailė (A) prie  $1515\text{ cm}^{-1}$  parodo fenolinėms rūgštims būdingus aromatinio žiedo C=C ryšio virpesius. Smailės (B) prie  $1260\text{ cm}^{-1}$  intensyvumas pakito dėl padidėjusių C-O ryšio virpesių. Chlorogeno rūgštimi modifikuoto VMMC atveju, FT-IR spektro pokyčiai yra aiškesni (3.8 pav.). Smailė (A) prie  $1565\text{ cm}^{-1}$  ir smailė (B) prie  $1300\text{ cm}^{-1}$  kinta kaip ir 3.7 pav., tik pokytis intensyvesnis.

### 3.2 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano rentgeno spindulių difrakcinė analizė

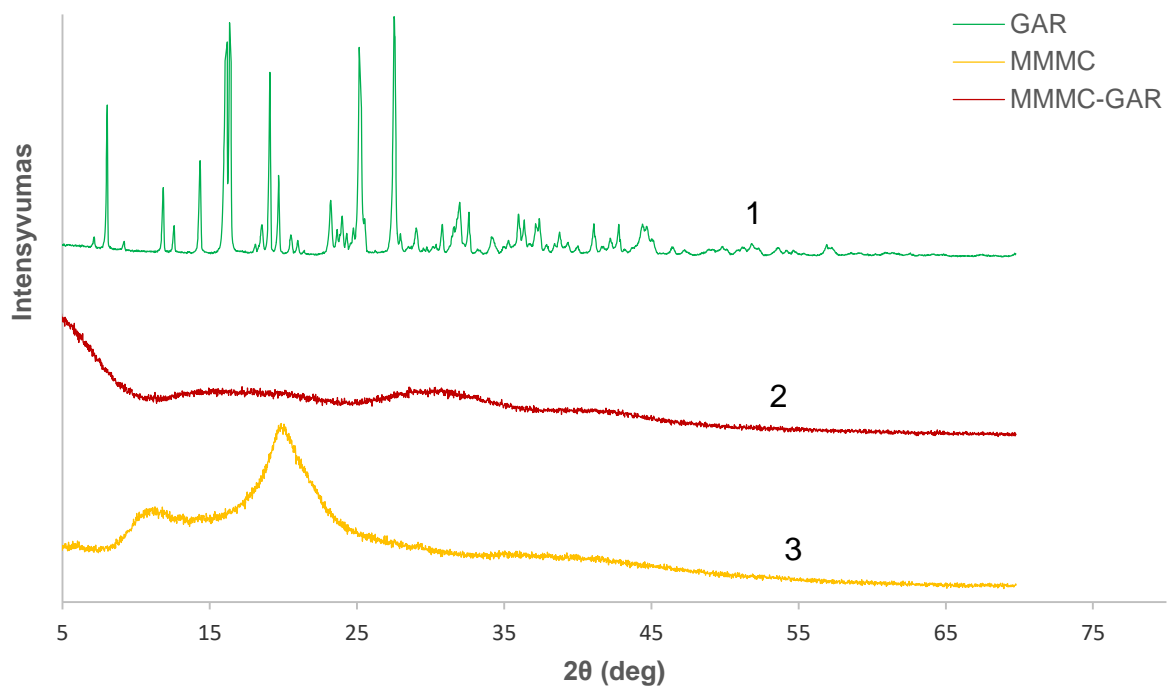
Fenolinėmis rūgštimis modifikuotų chitozanų struktūrai patvirtinti taipogi buvo užrašyti ir jų rentgeno spindulių difrakcijos (XRD) spektrai (3.9 – 3.12 pav., 2 kreivė) ir atitinkamai palyginti su CLR, GAR, MMMC ir VMMC rentgeno difrakcijos spektrais.



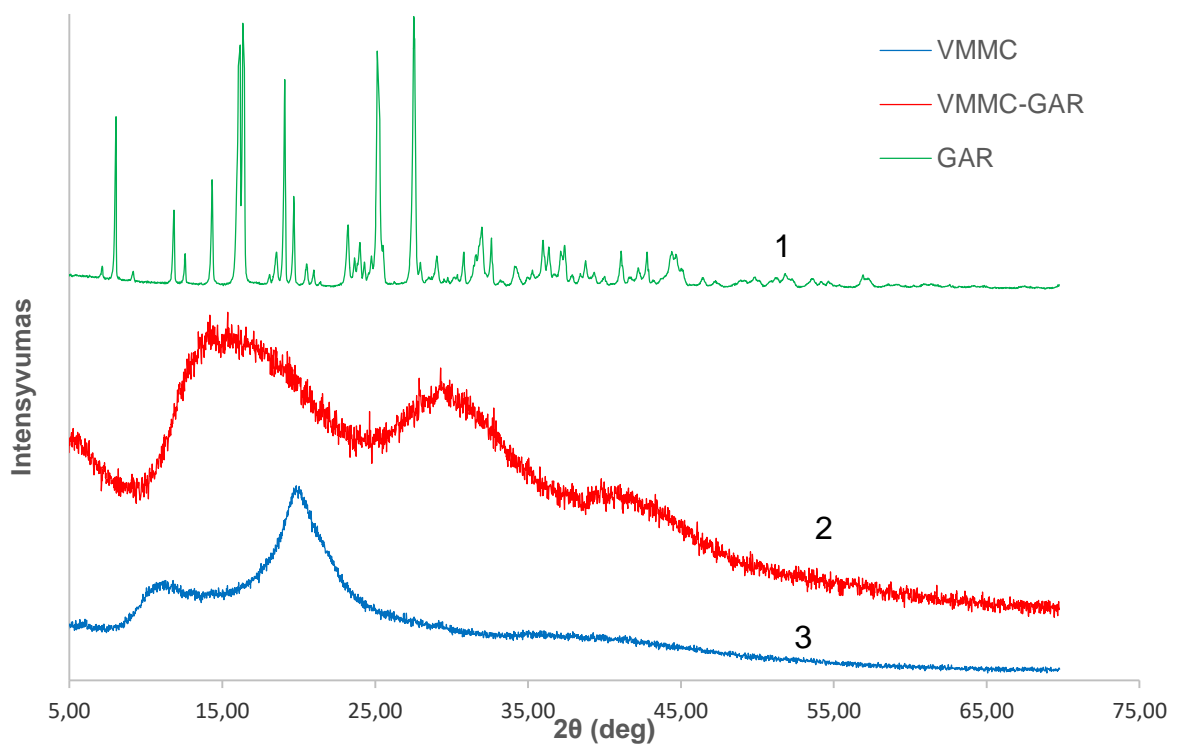
3.9 pav. CLR (1), MMMC-CLR (2) ir MMMC (3) rentgeno spindulių difrakcijos spektrai.



3.10 pav. CLR (1), VMMC-CLR (2) ir VMMC (3) rentgeno spindulių difrakcijos spektrai.



3.11 pav. GAR (1), MMMC-GAR (2) ir MMMC (3) rentgeno spindulių difrakcijos spektrai.



3.12 pav. GAR (1), VMMC-GAR (2) ir VMMC (3) rentgeno spindulių difrakcijos spektrai.

Chlorogeno ir galo rūgščių spektruose (3.9 – 3.12 pav., 1 kreivė) galime matyti fenoliniams junginiams būdingas smailes, plačiai pasiskirsčiusias visame spektre, patvirtinančias jų kristalinę struktūrą.

Mažos molekulinės masės ir vidutinės molekulinės masės chitozanų rentgeno spindulių difrakcijos spektrai pateikti 3.9 – 3.12 pav. (3 kreivė). 3.9 ir 3.11 pav. pateiktuose spektruose galime matyti MMMC būdingas smailes, kurių intensyviausia yra  $2\theta=20^\circ$  pozicijoje ir yra priskiriama II tipo kristalinės struktūros chitozanui. Kaip galime pastebėti iš CLR ir GAR rūgštimi modifikuotų MMMC spektrų (3.9, 3.11 pav., 2 kreivė), šios smailės išplatėja, jų intensyvumas sumažėja, o smailių  $2\theta=15^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $40^\circ$  pozicijos patvirtina chitozano ir fenolinių rūgščių rūgščių sąveiką ir buvimą modifikuotuose MMMC dariniuose.

3.10 ir 3.12 pav. pateiktuose spektruose galime matyti VMMC būdingas smailes, kurių intensyviausia yra  $2\theta=20^\circ$  pozicijoje ir yra priskiriama chitozano II tipo kristalinei struktūrai. Kaip galime pastebėti iš CLR ir GAR rūgštimi modifikuotų VMMC spektrų (3.10, 3.12 pav., 2 kreivė), šios smailės taip yra platesnės, jų intensyvumas mažesnis, o smailių  $2\theta=15^\circ$ ,  $29^\circ$ ,  $40^\circ$  pozicijos patvirtina chitozano ir fenolinių rūgščių rūgščių sąveiką ir buvimą VMMC chitozano dariniuose.

Rentgeno spindulių difrakcijos tyrimo rezultatai parodė, kad galo ar chlorogeno rūgšties prijungimas prie chitozano molekulių sumažino gautų kopolimerų kristališkumą. Taip pat galima manyti, kad intermolekuliniai ir tarpmolekuliniai vandeniliniai ryšiai šiuose kopolimeruose lyginant su MMMC ar VMMC yra žymiai silpnesni.

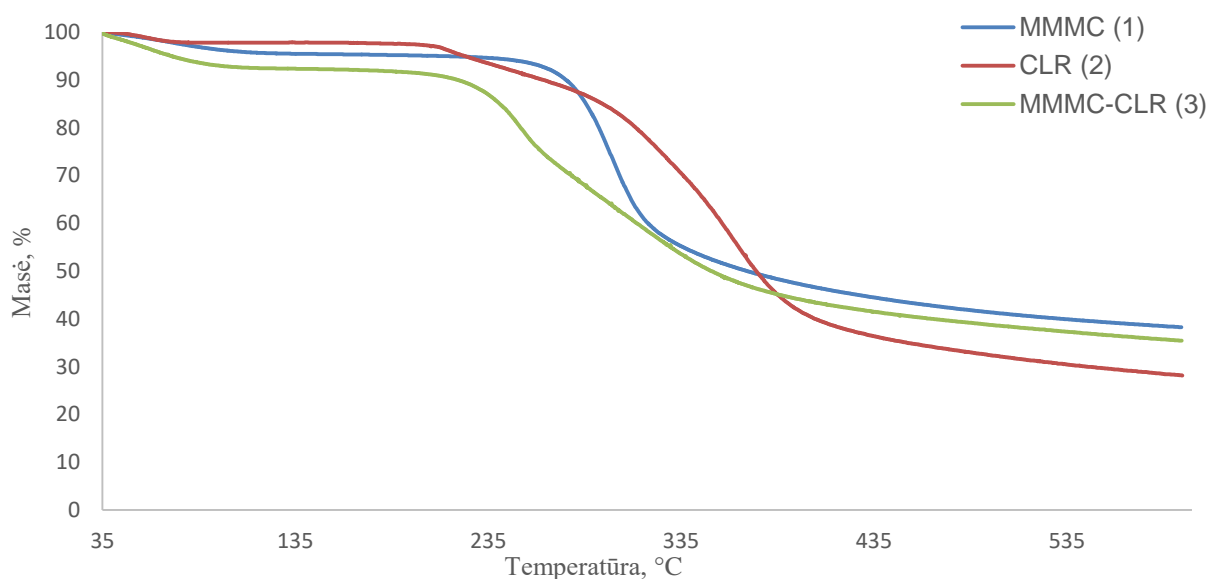
### **3.3 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano terminės savybės**

Skirtingos molekulinės masės chitozanui, fenolinėms rūgštims ir fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano dariniams buvo atlikta termogravimetrinė analizė (3.13 – 3.16 pav.).

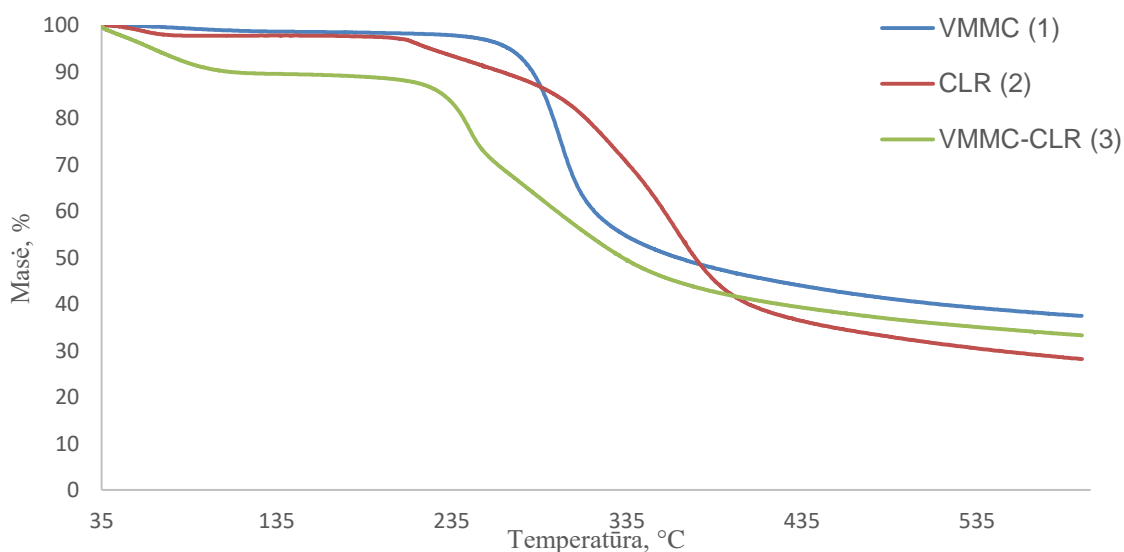
Kaip matyti iš MMMC ir VMMC termogramų (3.13 – 3.16 pav., 1 kreivė), chitozano terminiam skilimui buvo būdingos stadijos. Iš pradžių  $25 - 130^\circ\text{C}$  temperatūrų intervale vyko vandens pašalinimas iš bandinio. Pasišalinus vandens molekulems, toliau kaitinant bandinius, jų masė išliko stabili iki  $\sim 250^\circ\text{C}$  temperatūros, kurią pasiekus prasidėjo antroji masės pokyčių stadija ( $250 - 500^\circ\text{C}$ ), priskiriama destrukcijai. Masės nuostoliai šioje stadijoje siekė  $65 - 75\%$ .

Panašias tendencijas matome ir fenolinių rūgščių termogramose (3.13 – 3.16 pav., 2 kreivė). Iš pradžių  $25 - 100^\circ\text{C}$  temperatūrų intervale vyko vandens pašalinimas iš bandinio. Toliau kaitinant CLR, jos masė išliko stabili iki  $\sim 210^\circ\text{C}$  temperatūros, kurią pasiekus prasidėjo antroji masės pokyčių stadija ( $210 - 500^\circ\text{C}$ ), priskiriama destrukcijai. Masės nuostoliai šioje stadijoje siekė apie  $70\%$ . Tuo tarpu kaitinant GAR, jos masė išliko stabili iki  $\sim 235^\circ\text{C}$  temperatūros, kurią pasiekus prasidėjo antroji masės pokyčių stadija ( $235 - 500^\circ\text{C}$ ). Masės nuostoliai šioje stadijoje siekė apie  $80\%$ .

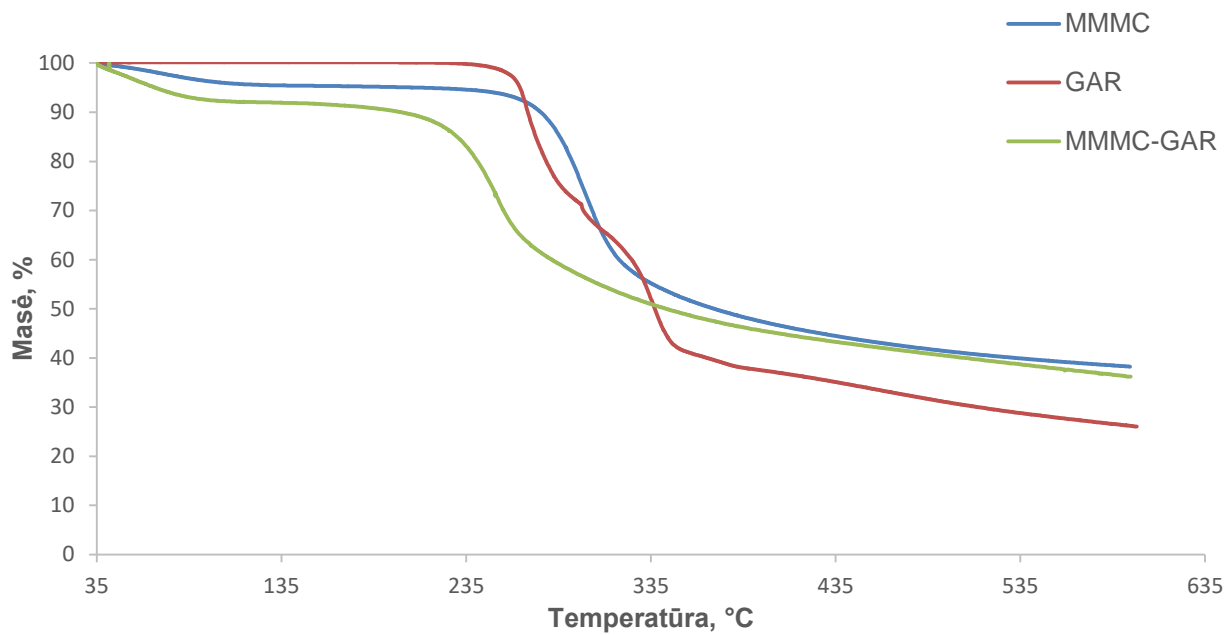
Fenolinėmis rūgštimis modifikuotų chitozanų (3.13 – 3.16 pav., 3 kreivė) termogramose taip pat matomos du masės pokyčių etapai: 35 – 135 °C ir 210 – 500 °C temperatūrų intervale. Fenolinių rūgščių prijungimas prie chitozano lėmė antrosios stadijos pradžios temperatūros sumažėjimą lyginant su chitozanu. Akivaizdu, kad chitozaną modifikavus fenolinėmis rūgštimis jo terminis stabilumas sumažėjo. Tai galima aiškinti tuo, kad prijungti substituentai suardo tvarkingą chitozano molekulių išsidėstymą („susipakavimą“), dėl ko sumažėja jo terminis stabilumas. Galima pažymėti, kad GAR modifikuotų chitozanų (MMMC-GAR, VMMC-GAR) terminis stabilumas yra mažesnis negu MMMC-CLR ir VMMC-CLR.



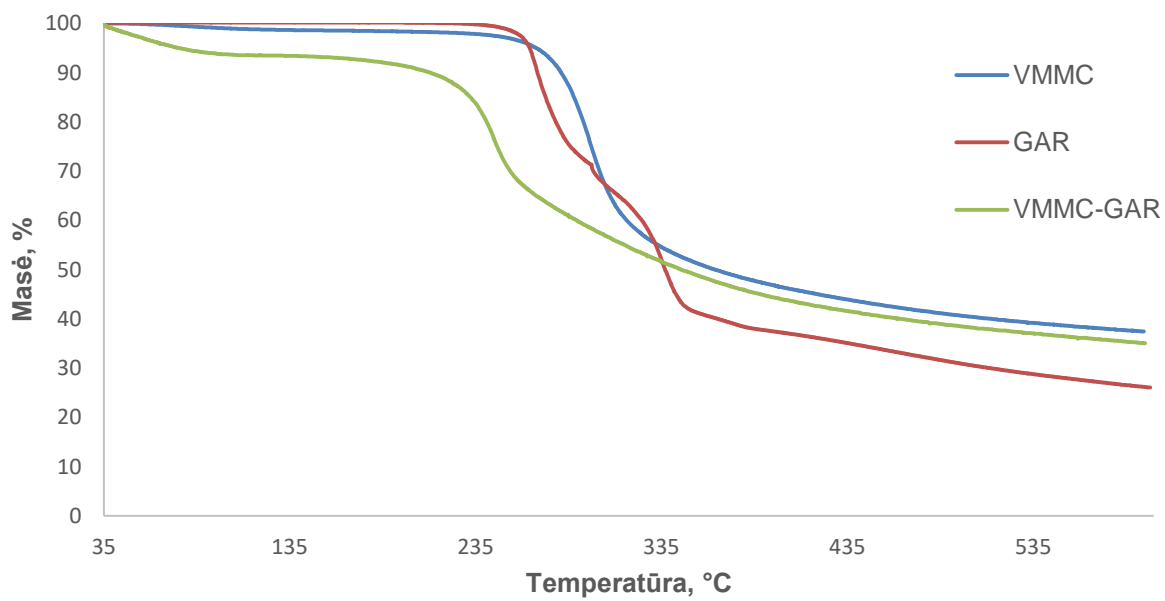
3.13 pav. MMMC (1), CLR (2) ir MMMC-CLR (3) termogramos.



3.14 pav. VMMC (1), CLR (2) ir VMMC-CLR (3) termogramos.

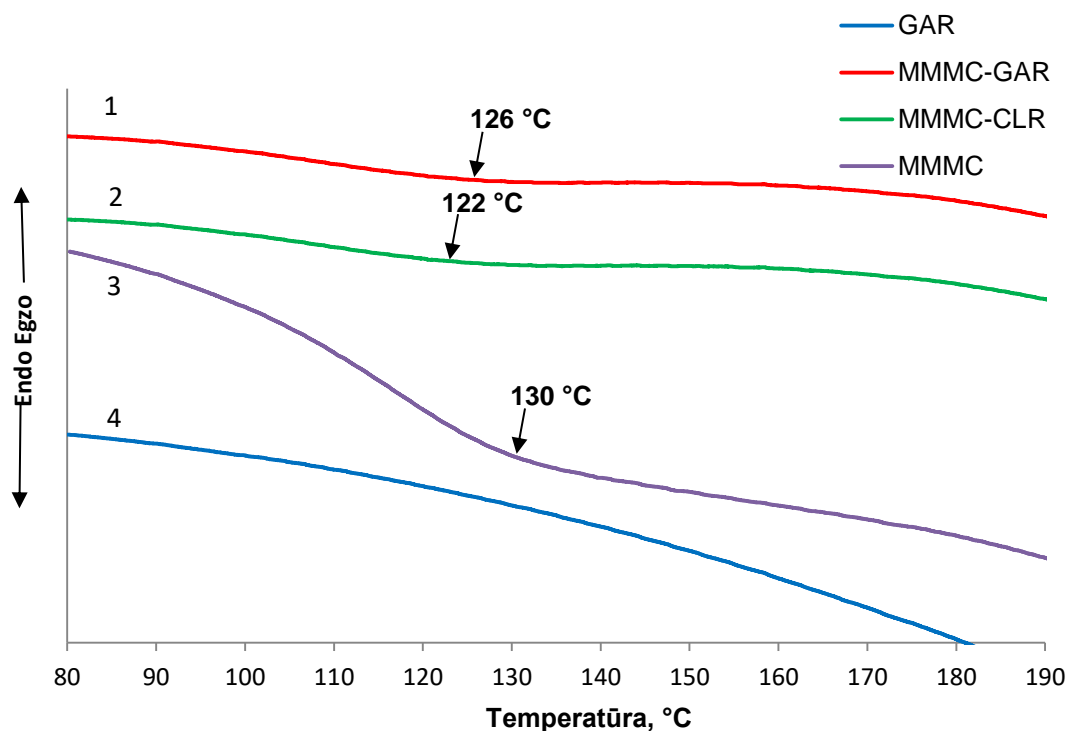


3.15 pav. MMMC (1), GAR (2) ir MMMC-GAR (3) termogramos.

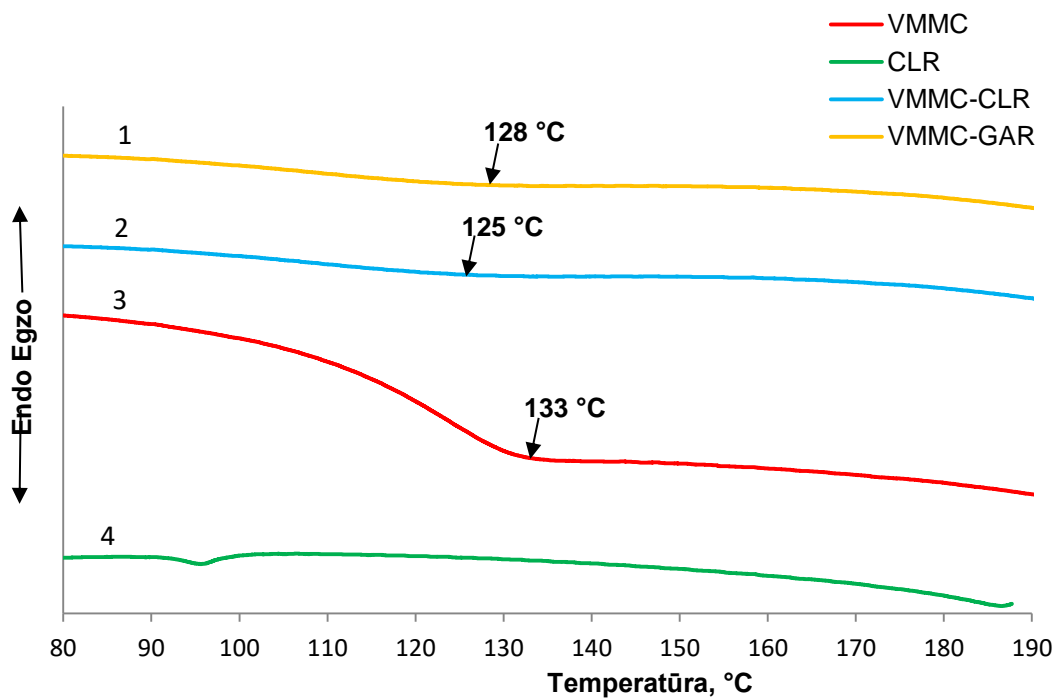


3.16 pav. VMMC (1), GAR (2) ir VMMC-GAR (3) termogramos.

Skirtingos molekulinės masės chitozanoi, fenolinėms rūgštims ir fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozано dariniams buvo atlikta diferencinė skenuojamosios kalorimetrijos (DSK) analizė 30 – 200 °C intervale (3.17, 3.18 pav.).



3.17 pav. MMMC-GAR (1), MMMC-CLR (2), MMMC (3) ir GAR (4) DSK kreivės.



3.18 pav. VMMC-GAR (1), VMMC-CLR (2), VMMC (3) ir CLR (4) DSK kreivės.

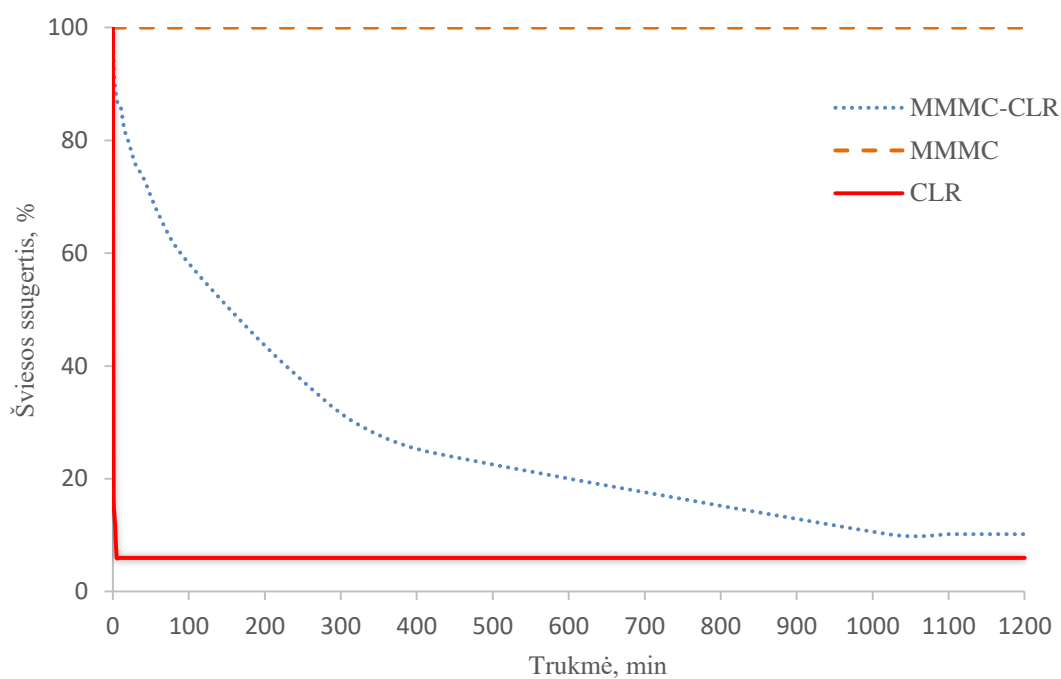
Kaip matyti iš DSK kreivių, chitozanui ir fenolinėmis rūgštimis modifikuotam chitozanui buvo būdingas plati nedidelio intensyvumo endoterminė smailė, būdinga vandens išgarinimui kaitinant bandinį. Vykstant chitozano modifikavimui šios smailės pozicija keitėsi. MMMC DSK endoterminė smailė buvo prie ~ 130 °C temperatūros, o tuo tarpu MMMC-GAR ir MMMC-CLR termogramose ši smailė buvo atitinkamai prie 126 ir 122 °C. VMMC DSK endoterminė smailė buvo prie ~ 133 °C temperatūros, tuo tarpu VMMC-GAR ir VMMC-CLR termogramose ši smailė buvo atitinkamai prie 128 ir 125 °C. Tai rodo, kad kad chitozano modifikavimas GAR ir CLR fragmentais susilpnino vandenilius ryšius chitozano darinyje ir sumažino jo gebą surišti vandenį.

### **3.4 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano antioksidacinės savybės**

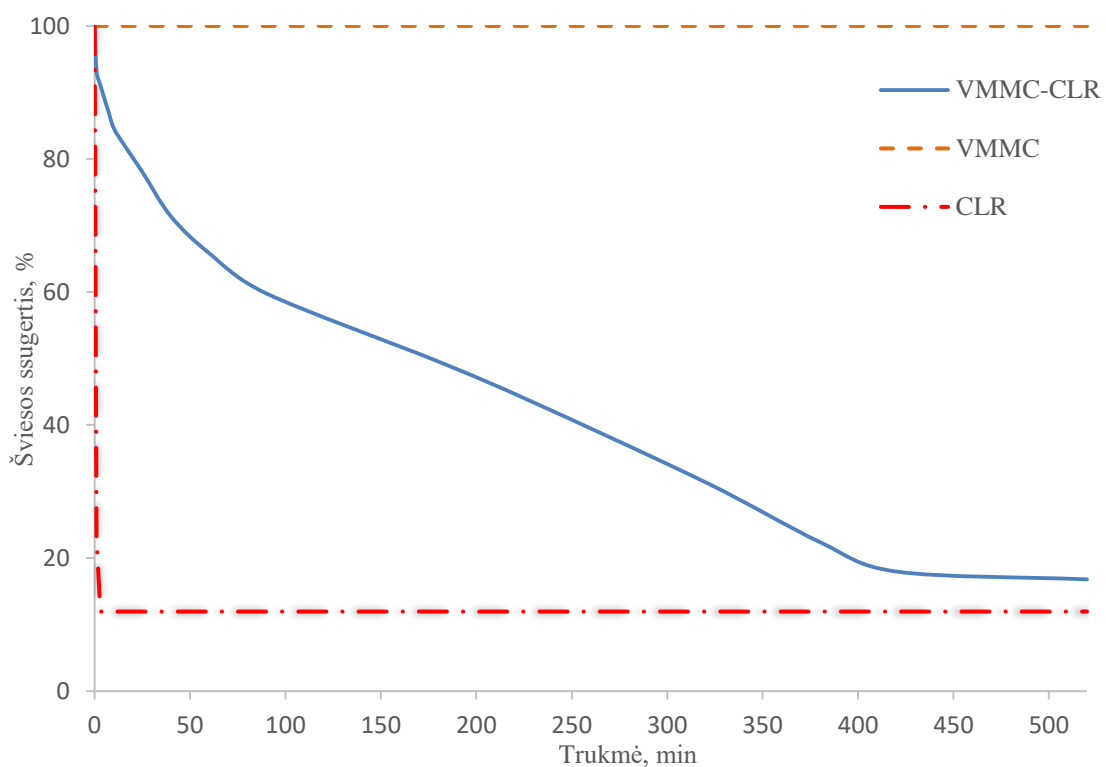
Fenolinės rūgštys pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, todėl buvo tikslinga iširti ir jomis modifikuoto chitozano antioksidacines savybės. Apie gautų chitozano darinių antioksidacinį efektyvumą (AOEF) buvo sprendžiama iš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) tirpalo, turinčio tiriamosios medžiagos, spalvos pasikeitimo. Kiekybiškai šis pasikeitimas yra įvertinamas nustatant 517 nm monochromatinio spindulio sugerties DPPH tirpalu su tiriamąją medžiaga intensyvumo sumažėjimą. Kuo daugiau sumažėja šviesos sugerties intensyvumo vertė lyginant su pradinio DPPH tirpalo šviesos sugerties intensyvumo verte, tuo didesnis yra tiriamosios medžiagos AOEf. Šviesos sugerties intensyvumas yra matuojamas praėjus 30 min nuo DPPH tirpalo ir tiriamosios medžiagos sumaišymo, tačiau skirtingos medžiagos reaguoja su DPPH skirtingu greičiu, o tuo pačiu skirtingai mažėja šviesos sugerties intensyvumas DPPH tirpalu.

Kaip matyti iš 3.19 – 3.21 paveiksluose pateiktų duomenų, fenolinėmis rūgštimis modifikuoti chitozanai pasižymi prailguotu antioksidaciniu veikimu, lyginant su atitinkamų fenolinių rūgščių antioksidaciniu veikimu.





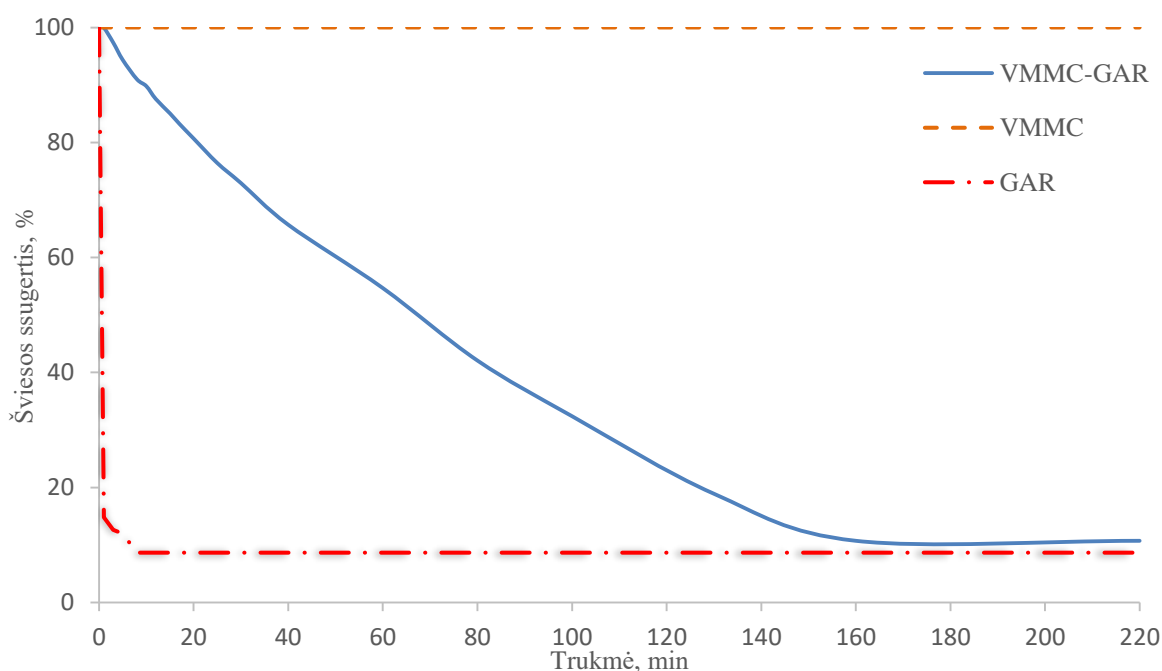
**3.19 pav.** MMMC-CLR, MMMC ir CLR DPPH tirpalų 517 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio šviesos sugerties DPPH tirpalu intensyvumo (%) priklausomybė nuo trukmės.



**3.20 pav.** VMMC-CLR, VMMC ir CLR DPPH tirpalų 517 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio šviesos sugerties DPPH tirpalu intensyvumo (%) priklausomybė nuo trukmės.

Nustatyta, kad MMMC, VMMC ir nepasižymi antioksidaciniu efektyvumu (3.19 – 3.21 pav. ir 3.3 lentelė). Prijungus chlorogeno rūgštį prie MMMC (MMMC-CLR), jos antioksidacinis efektyvumas sumažėjo nežymiai nuo 94,41 % iki 89,83 % (3.3 lentelė), tačiau antioksidacinis veikimas buvo pastebimai prailgintas. 3.16 paveiksle yra pateikta 517 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugerties DPPH tirpalu, turinčio CLR arba MMMC-CLR, intensyvumo priklausomybė nuo eksperimento trukmės. Ženklus šviesos sugerties intensyvumo sumažėjimas DPPH tirpalu, turinčiu CLR, vyksta per pirmas penkias minutes. Tuo tarpu šviesos sugerties intensyvumas DPPH tirpalu, turinčiu MMMC-CLR, mažėja ne taip staigiai ir pusiausvyrą pasiekia tik po 1020 min. t.y. 17 val.

Prijungus chlorogeno rūgštį prie VMMC (VMMC-CLR), jos antioksidacinis efektyvumas sumažėjo nuo 94,41 % iki 83,21 % (3.3 lentelė). Chlorogeno rūgštimi modifikuoti chitozanai (MMMC-CLR ir VMMC-CLR) pasižymi panašiu antioksidaciniu veikimu, tačiau jų aktyvaus veikimo laikas žymiai skiriasi. 3.19 paveiksle yra palygintas 517 nm monochromatinio spindulio sugerties intensyvumo kitimas DPPH tirpalu, turinčiu laisvos CLR ir prijungtos prie VMMC. Kaip matyti iš paveiksle pateiktų duomenų, šviesos sugerties intensyvumas VMMC-CLR atveju mažėja greičiau negu MMC-CLR atveju ir pusiausvyrą pasiekia tik per ~8 val. Taigi, MMMC-CLR pasižymi didesniu prailguotu antioksidaciniu efektyvumu negu VMMC-CLR. Tokiu būdu nustatyta, kad antioksidacinio veikimo laikas priklauso nuo fenolinėmis rūgštimis modifikuotų chitozanų molekulinės masės.



**3.21 pav.** VMMC-GAR, VMMC ir GAR DPPH tirpalų 517 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio šviesos sugerties DPPH tirpalu intensyvumo (%) priklausomybė nuo trukmės.

**3.3 lentelė.** Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano ir fenolinių rūgščių antioksidacinės savybės

<b>Bandinys</b>	<b>Fenolinės rūgšties koncentracija bandinio tirpale, g/l</b>	<b>AOEF, %</b>
MMM	-	0
VMM	-	0
GAR	0,149	91,33
CLR	0,149	94,41
VMM-GAR	0,149	89,27
MMM-CLR	0,149	89,83
VMM-CLR	0,149	83,21

Prijungus prie VMM galo rūgštį (VMM-GAR), jos antioksidacinis efektyvumas sumažėjo visai nežymiai nuo 91,33 % iki 89,27 % (3.21 pav., 3.3 lentelė), tačiau antioksidacinis veikimas vėlgi buvo pastebimai prailgintas (3.18 pav.). Šviesos sugerties intensyvumas DPPH tirpalu, turinčiu VMM-GAR, mažėja ne taip staigiai, kaip neprijungtos GAR atveju, ir pusiausvyrą pasiekia praėjus 3 val. Galo rūgštį prijungus prie MMM (MMM-GAR), gautas junginys visiškai nepasižymėjo antioksidacinėmis savybėmis. Šiam reiškiniui paaiškinti reikia papildomų tyrimų.

Apibendrinant šiame skyriuje pateiktus duomenis galime padaryti išvadą, kad fenolinėmis rūgštimis modifikuoti chitozanoi pasižymi prailgintu antioksidaciniu veikimu lyginant su laisvomis fenolinėmis rūgštimis. Taip pat galima pažymėti, kad VMM-CLR kaip antioksidantas veikia 5,7 karto ilgiau negu VMM-GAR.

### **3.5 Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano antibakterinės savybės**

Modifikuoto chitozano antimikrobiniam veiksmingumui įvertinti buvo pasirinktos gramneigiamos *Escherichia coli* ir *Pseudomonas aeruginosa* bei gramteigiamos *Listeria monocytogenes*. Antibakteriniam efektyvumui įvertinti tirpalai. Pradžioje mikroskiedimo metodu buvo nustatyta MMM, VMM, GAR, CLR, MMM-GAR, VMM-GAR, MMM-CLR ir VMM-CLR minimali slopinamoji koncentracija (MSK), t.y. mažiausia medžiagos koncentracija, kuriai esant tirpalai mėgintuvėlyje nesidrumstė. Po to, difuzijos į agarą metodu buvo nustatyta minimali baktericidinė koncentracija (MBK), t.y. mažiausia koncentracija, kuriai esant bakterijų kultūra agaro sluoksnyje neaugo. Rezultatai pateikti 3.4 – 3.5 lentelėse.

**3.4 lentelė.** MMMC, VMMC, GAR, CLR, MMMC-GAR, VMMC-GAR, MMMC-CLR ir VMMC-CLR minimali slopinamoji koncentracija (MSK) įvairių bakterijų kultūrų atžvilgiu

Bandinys	Minimali slopinamoji koncentracija (MSK), µg/ml		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
VMMC	156	313	4,9
MMMC	0,6	0,6	0,6
GAR	313	313	19,5
CLR	19,5	19,5	19,5
VMMC-GAR	156	78	19,5
MMMC-GAR	156	156	39
VMMC-CLR	78	78	78
MMMC-CLR	9,8	19,5	9,8

Nustatyta, kad didžiausiu bakterijų slopinamuoju poveikiu pasižymėjo MMMC, CLR ir MMMC-CLR (3.4 ir 3.5 lentelės). Jeigu palyginti MMMC ir MMMC-CLR slopinamąjį poveikį, tai esant 0,6 µg/ml MMMC koncentracijai bandinyje buvo nuslopintas *E. coli*, *L. monocytogenes* ir *P. aeruginosa* augimas, o esant 9,8 µg/ml ir 19,5 µg/ml MMMC-CLR koncentracijai buvo atitinkamai nuslopintas *L. monocytogenes*, *E. coli* ir *P. aeruginosa* augimas.

Lyginant VMMC ir VMMC-CLR slopinamąjį poveikį, nustatyta, kad esant 4,9 µg/ml VMMC koncentracijai bandinyje buvo nuslopintas *L. monocytogenes* augimas, o esant 156 ir 313 µg/ml koncentracijai atitinkamai buvo nuslopintas *E. coli* ir *P. aeruginosa* augimas. Prijungus chlorogeno rūgštį prie VMMC, MSK vertės žymiai pasikeitė. Esant 78 µg/ml VMMC-CLR koncentracijai buvo nuslopintas *E. coli*, *L. monocytogenes* ir *P. aeruginosa* augimas. Tik *L. monocytogenes* atveju nustatyta didesnė MSK, o *P. aeruginosa*, *E. coli* atveju - mažesnė MSK. Nustatyta, kad prie VMMC prijungta chlorogeno rūgštis pagerina slopinamąjį poveikį tirtų bakterijų atžvilgiu.

Lyginant MMMC ir MMMC-GAR baktericidines savybes, nustatyta, kad prijungta galo rūgštis stipriai padidina MSK vertes. Esant 0,6 µg/ml MMMC koncentracijai bandinyje buvo nuslopintas *E. coli*, *L. monocytogenes* ir *P. aeruginosa* augimas. Esant 156 µg/ml ir 39 µg/ml MMMC-GAR koncentracijai atitinkamai buvo nuslopintas *E. coli*, *P. aeruginosa* ir *L. monocytogenes* augimas.

**3.5 lentelė.** MMMC, VMMC, GAR, CLR, MMMC-GAR, VMMC-GAR, MMMC-CLR ir VMMC-CLR įvairių bakterijų kultūrų minimali baktericidinė koncentracija (MBK)

Bandinys	Minimali baktericidinė koncentracija (MBK), µg/ml		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
VMMC	625	313	9,8
MMMC	0,6	1,2	1,2
GAR	313	313	39
CLR	19,5	19,5	19,5
VMMC-GAR	156	156	19,5
MMMC-GAR	313	156	78
VMMC-CLR	156	156	156
MMMC-CLR	15	39	19,5

Lyginant VMMC ir VMMC-GAR nustatytas MSK, matyti, kad MSK vertės nelabai pakito. Esant 4,9 µg/ml VMMC koncentracijai bandinyje buvo nuslopintas *L. monocytogenes* augimas, o esant 156 ir 313 µg/ml koncentracijai, atitinkamai buvo nuslopintas *E. coli* ir *P. aeruginosa* augimas. Tuo tarpu esant 156 µg/ml, 78 µg/ml ir 19,5 µg/ml VMMC-GAR koncentracijai buvo atitinkamai nuslopintas *E. coli*, *P. aeruginosa* ir *L. monocytogenes* augimas. Nustatyta, kad prie VMMC prijungta galo rūgštis lyginant su VMMC šiek tiek sumažino MSK vertę *P. aeruginosa* atveju ir šiek tiek ją padidino *L. monocytogenes* atveju.

Antibakterinis medžiagų efektyvumas buvo įvertintas ir nustatant MBK ( žr. 3.5 lent.) reikšmes. Kaip ir buvo galima tikėtis, mažiausios MBK vertės gautos bandymuose su MMMC, kuris pasižymi stipriu antibakteriniu poveikiu. Modifikuotų chitozanų antibakterinis veiksmingumas priklausė tiek nuo prijungtos fenolinės rūgšties, tiek nuo bakterijų kultūros. Nustatyta, kad chitozano molekulinė masė taip pat įtakoja antibakterinį efektyvumą. Nustatytos galo ir chlorogeno rūgštimis modifikuoto chitozano MBK vertės panašios į literatūroje pateikiamas ferulo rūgštimi modifikuoto chitozano vertes [8, 9, 12].

Lyginant skirtingų chlorogeno rūgštimi modifikuotų chitozanų antibakterinį efektyvumą, matyti, kad esant 15, 39 ir 19,5 µg/ml MMMC-CLR koncentracijai atitinkamai visiškai neaugo *E. coli*, *L. monocytogenes* ir *P. aeruginosa* bakterijos, o esant 313, 156 ir 19,5 µg/ml MMMC-GAR koncentracijai bandinyje buvo atitinkamai eliminuotos *E. coli*, *L. monocytogenes* ir *P. aeruginosa* bakterijos. Nustatyta, kad geresniu antibakteriniu poveikiu pasižymi MMMC-CLR.

Skirtingas tendencijas matome prie VMMC prijungus GAR ir CLR rūgštis. Esant 156 µg/ml VMMC-CLR koncentracijai, pasireiškė šios medžiagos baktericidinis poveikis visų tirtų bakterijų

atžvilgiu. Tuo tarpu 156 µg/ml VMMC-GAR koncentracija buvo efektyvi *E. coli*, *P. aeruginosa* atžvilgiu, o 19,5 µg/ml koncentracija - *L. monocytogenes* atžvilgiu.

Visi tirti bandiniai pasižymėjo geriausiu baktericidiniu poveikiu prieš *L. monocytogenes* bakterijas, MBK buvo 1,2 – 156 µg/ml intervale. Didžiausios MBK vertės (nuo 0,6 iki 625 µg/ml) nustatytos bandymuose su *E. coli* bakterijomis, kurios turi savybę sudaryti atsparias išoriniams poveikiams sporas. Nustatyta, kad chitozano molekulinė masė įtakoja antibakterinį efektyvumą. MMMC MBK vertės buvo nuo intervale nuo 0,6 iki 1,2 µg/ml, o VMMC MBK vertės buvo intervale nuo 9,8 iki 625 µg/ml. Modifikuotų chitozanų antibakterinis veiksmingumas priklausė nuo prijungtos fenolinės rūgšties. GAR MBK vertės siekė nuo 39 iki 313 µg/ml, o CLR MBK vertės buvo 19,5 µg/ml. Taigi galime daryti išvadą, kad chlorogeno rūgštis ir ja modifikuoti chitozano dariniai pasižymi stipresniu antibakteriniu poveikiu.

### 3.6 Chitozano ir fenolinių rūgščių dangos ir jų savybės

Fenolinių rūgščių ir skirtingos molekulinės masės chitozano dangos buvo suformuotos ant arbatos pakeliams skirto filtrinio popieriaus. Chitozanas yra leistinas vartoti kaip maisto priedas E 464 [10], todėl puikiai galėtų būti naudojamas ir kaip arbatos pakelio sudedamoji dalis. Kaip aktyvios šios dangos komponentės buvo panaudotos antimikrobinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčios fenolinės rūgštys (CLR ir GAR) [11].

Siekiant nustatyti skirtingos molekulinės masės chitozano ir fenolinių rūgščių dangų savybes, buvo paruoštos skirtingos kiekybinės sudėties kompozicijos (žr. 3.6 lentelę). Pirmiausiai buvo siekiama gautas homogeniškas šių komponentų mišinys, o tada liejimo būdu gautos homogeniškos dangos ant filtrinio popieriaus.

3.6 lentelė. Dangų kompozicijų sudėtis

Chitozano ir fenolinės rūgšties kompozicija	Chitozano kiekis, %	Fenolinės rūgšties kiekis, %
MMMC-GAR	96,48	3,52
VMMC-GAR	96,03	3,97
MMMC-CLR	39,60	60,40
VMMC-CLR	51,00	49,00

Fenolinių rūgščių atpalaidavimui iš dangos į vandeninį tirpalą ištirti buvo užrašyti šių tirpalų šviesos sugerties spektrai skirtingais laiko momentais (3.22 ir 3.23 pav.). Paveikslėliuose matyti kaip keičiasi į vandeninį tirpalą atpalaiduotų fenolinių rūgščių sugerties smailių intensyvumas bėgant laikui. Nustatyta, kad chlorogeno rūgštis iš MMMC ir VMMC dangų maksimaliai atpalaiduojama per 6 – 8 min. (3.22 pav.). Tuo tarpu galo rūgštis iš MMMC ir VMMC dangų maksimaliai atsipalaiduojama per 10 – 15 min. (3.23 pav.). Kaip matyti iš paveikslų daugiau fenolinių rūgščių atpalaiduojama iš dangų, kurios buvo suformuotos naudojant mažos molekulinės masės chitozaną. Tokia tendencija labai tikėtina, nes mažesnės molekulinės masės chitozanas geriau tirpsta vandenyje.

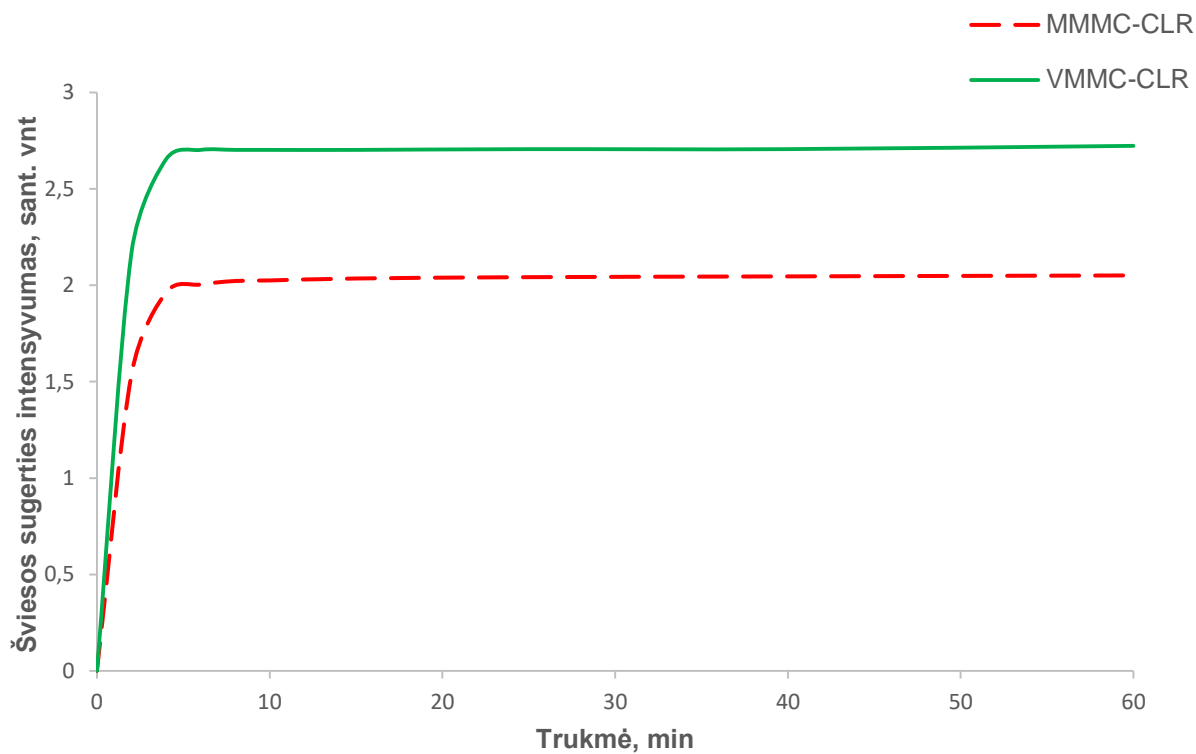
Tai pat buvo ištirtos ir gautų dangų ant filtrinio popieriaus antioksidacines savybės. Apie gautos dangos AOEF buvo sprendžiama iš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) tirpalo, turinčio tiriamojo bandinio (filtrinio popieriaus su danga), spalvos pasikeitimo. Apie kiekybinį spalvos pasikeitimą sprendžiama iš 517 nm monochromatinio spindulio sugerties DPPH tirpalu su tiriamuoju bandiniu intensyvumo pasikeitimo (3.24, 3.25 pav.)

Galo rūgšties ir chitozanų (MMMC-GAR ir VMMC-GAR) dangos pasižymi panašiu antioksidaciniu veikimu (žr. 3.24 pav. ir 3.7 lentelę), o maksimalus poveikis pasiekiamas per ~2 min. MMMC-GAR dangos kiekiui tiriamajame tirpale esant 0,145 g/l, buvo nustatytas antioksidacinis efektyvumas lygus 68,00 proc. Tuo tarpu VMMC-GAR dangos kiekiui tiriamajame tirpale esant 0,225 g/l, buvo nustatytas antioksidacinis efektyvumas lygus 68,05 proc.

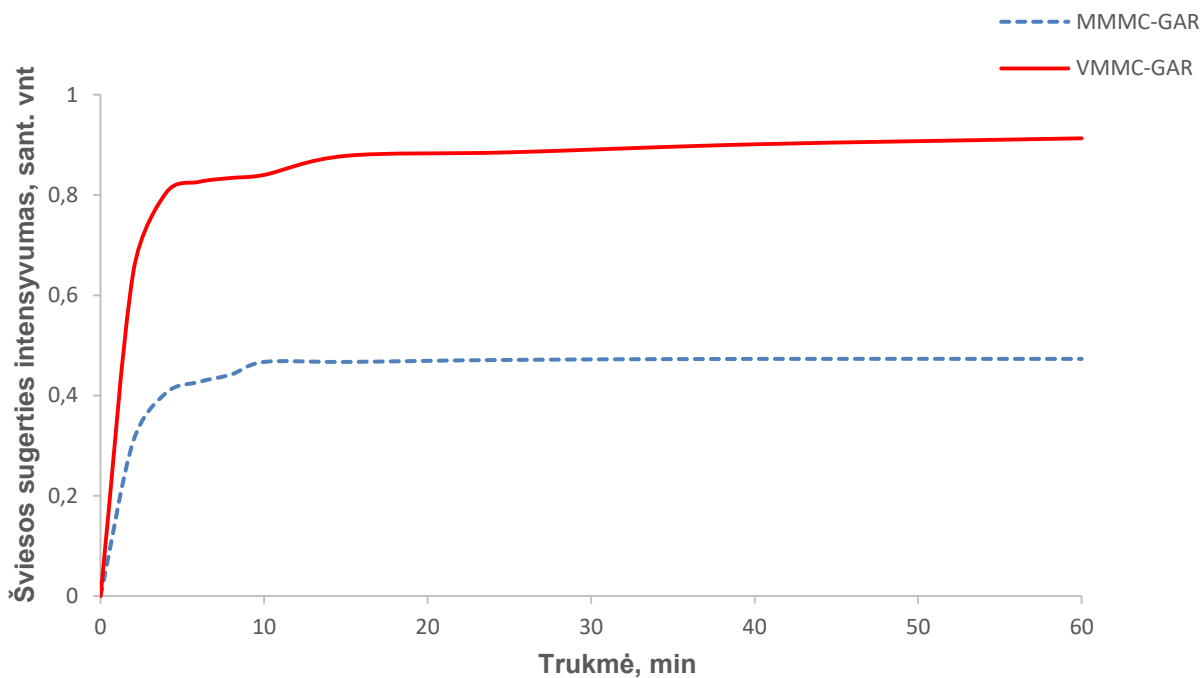
**3.7 lentelė.** Chitozano ir fenolinių rūgščių dangų ant filtrinio popieriaus antioksidacinės savybės

<b>Bandinys</b>	<b>Bandinio kiekis tirpale, g/l</b>	<b>Dangos kiekis tirpale, g/l</b>	<b>AOEF, %</b>
MMMC-GAR	2,5	0,145	68,00
VMMC-GAR	2,5	0,225	68,05
MMMC-CLR	2,5	0,142	61,90
VMMC-CLR	2,5	0,156	68,37

Chlorogeno rūgšties ir chitozanų (MMMC-CLR ir VMMC-CLR) dangos pasižymi šiek tiek skirtingu antioksidaciniu efektyvumu (žr. 3.25 pav. ir 3.7 lentelę). Maksimalus poveikis pasiekiamas per ~10 min. MMMC-CLR dangos kiekiui tiriamajame tirpale esant 0,142 g/l, buvo nustatytas antioksidacinis efektyvumas lygus 61,90 proc. Tuo tarpu VMMC-CLR dangos kiekiui tiriamajame tirpale esant 0,156 g/l, buvo nustatytas antioksidacinis efektyvumas lygus 68,37 proc.

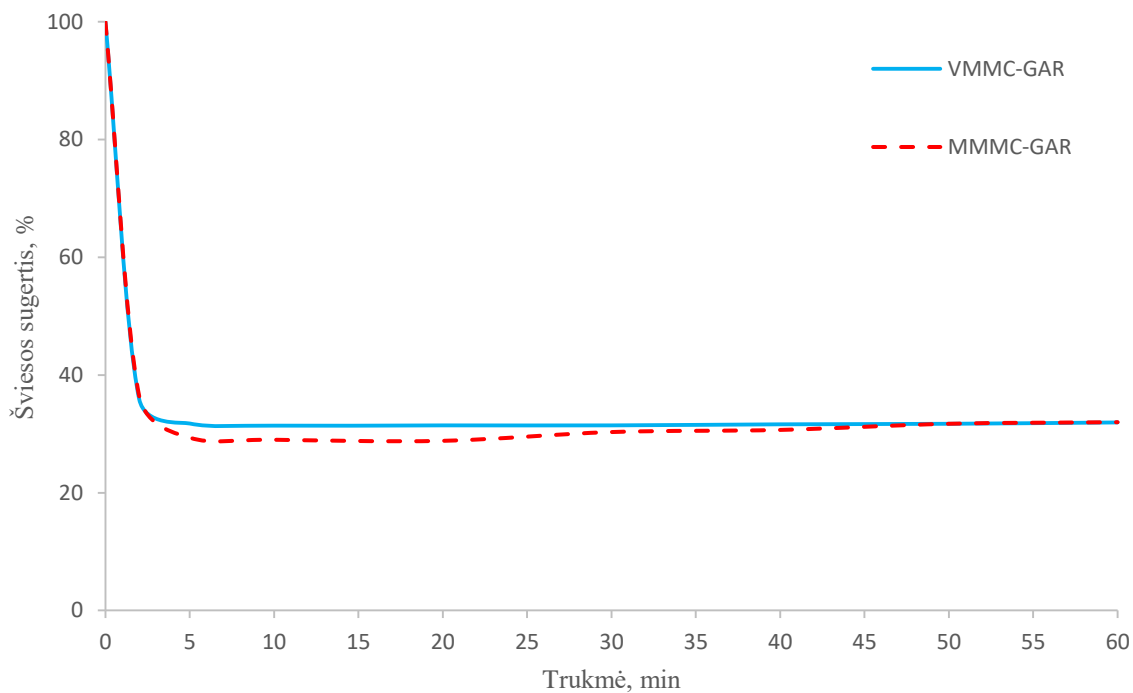


**3.22 pav.** Iš dangos į 1 proc. acto rūgšties vandeninį tirpalą atpalaiduotos CLR 325 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumo priklausomybė nuo trukmės.

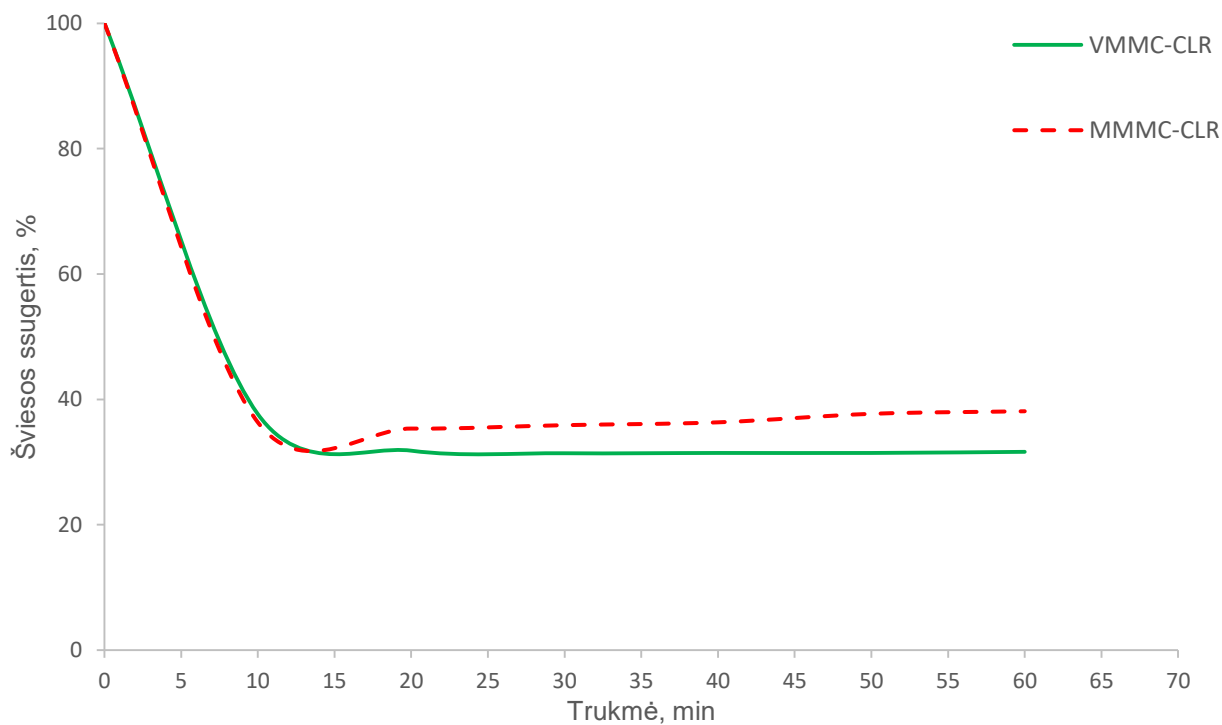


**3.23 pav.** Iš dangos į 1 proc. acto rūgšties vandeninį tirpalą atpalaiduotos GAR 266 nm bangos ilgio šviesos sugerties intensyvumo priklausomybė nuo trukmės.





**3.24 pav.** MMMC-GAR, VMMC-GAR DPPH tirpalų 517 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio šviesos sugerties DPPH tirpalu intensyvumo (%) priklausomybė nuo trukmės.



**3.25 pav.** MMMC-CLR, VMMC-CLR DPPH tirpalų 517 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio šviesos sugerties DPPH tirpalu intensyvumo (%) priklausomybė nuo trukmės.

## 4. REKOMENDACIJOS (INŽINERINĖ DALIS)

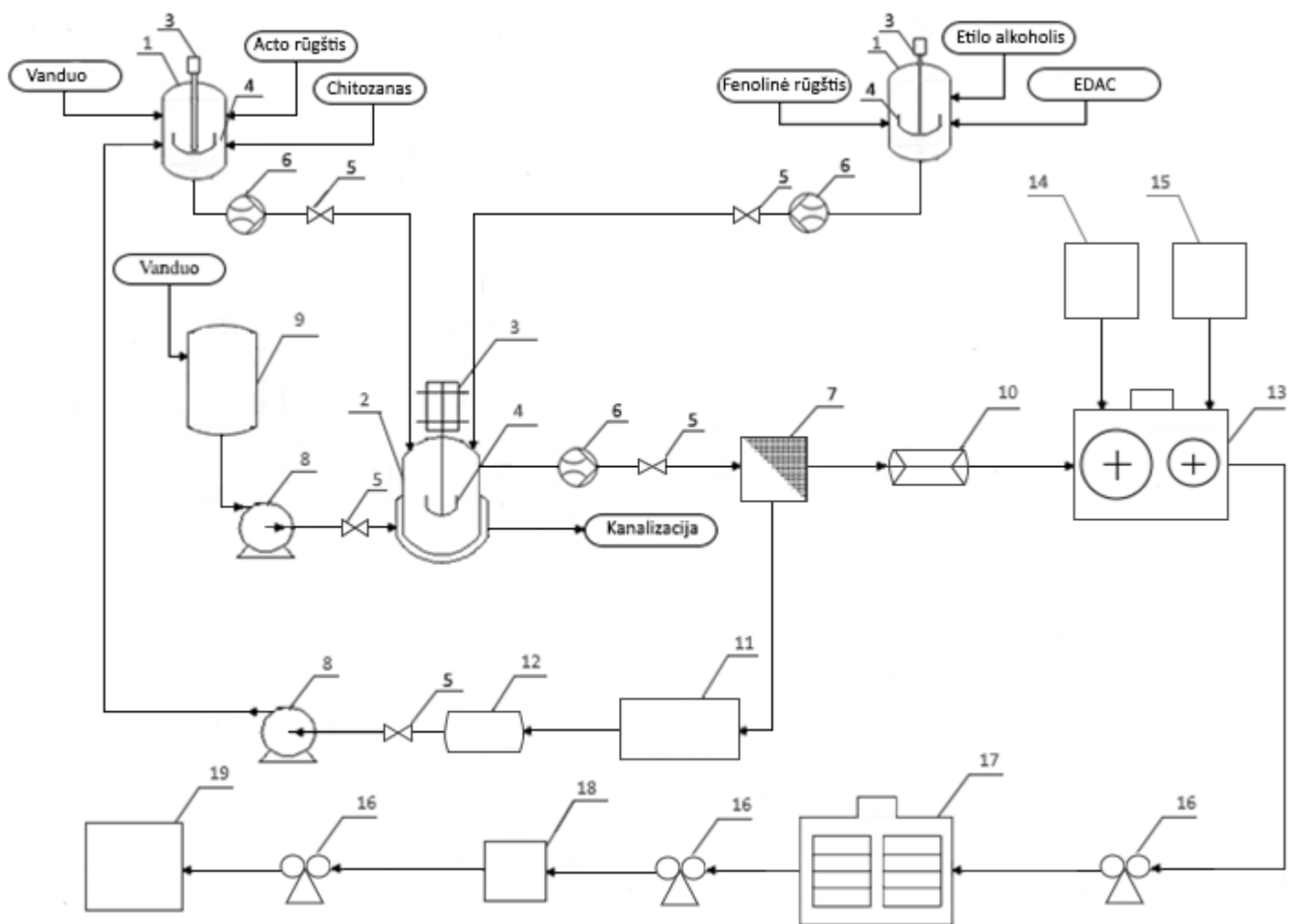
Apibendrinus gautus eksperimentinius rezultatus buvo parinktos fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano dangų gamybos sąlygos. Bioaktyvios dangos ant filtrinio popieriaus gamybos technologinė schema yra pateikta 4.1 pav., o gamybai (177,1 kg produkto per parą, dirbant dviem pamainomis) reikalingi žaliavų kiekiai bei technologinio režimo parametrai nurodyti 4.1 lentelėje. Modifikuoto chitozano dangos gamyba vykdoma dviem stadijomis. Pirmoje stadijoje vykdoma fenoline rūgštimi modifikuoto chitozano sintezė, o antroje stadijoje ant filtrinio popieriaus juostos yra formuojama modifikuoto chitozano danga.

1000 litrų periodinio veikimo sumaišymo reaktoriuje 1 yra ruošiamas 1 % acto rūgšties tirpalas ir tirpinamas chitozanas. Norint užtikrinti pakankamus šilumos ir masės mainus, suspensija yra maišoma inkarine maišykle 4, kurią suka variklis 3. Membraniniu siurbliu 6 paruoštas tirpalas yra transportuojamas į reaktorių 2. Kitame sumaišymo reaktoriuje yra ruošiamas fenolinės rūgšties ir EDAC etanolinis tirpalas. Paruoštas tirpalas taipogi membraniniu siurbliu 6 transportuojamas į reaktorių 2. Reaktorius 2 yra katilas su dvigubomis sienelėmis: išorinėmis špižinėmis sienelėmis ir nerūdijančio plieno vidinėmis sienelėmis. Tarp išorinės ir vidinės sienelės esančia talpa teka karštas vandens šildytuve 9 pašildytas vanduo. Atidavęs šilumą reaktoriui, vanduo išleidžiamas į kanalizaciją. Chitozano modifikavimo reakcija vykdoma 3 val. 60 °C temperatūroje. Gautas produktas yra atvėsintas ir membraniniu siurbliu 6 transportuojamas į filtravimo įrenginį 7, kur ultrafiltravimo metodu stambiamolekuliniai junginiai (produktas) yra atskiriami nuo mažamolekulinių (nesureagavusios fenolinės rūgštys ir susidarę šalutiniai reakcijos produktai). Reakcijos produktas diafragminiu siurbliu 10 tiekiamas į fleksografinės spaudos mašiną 13. Tirpiklis, likęs po šio proceso yra išvalomas panaudojant regeneravimo įrangą 11. Po to transportuojamas į tirpiklio talpyklą ir išcentrinio siurblio pagalba grąžinamas į sumaišymo reaktorių 1. Įrenginyje 14 yra gaminamos spausdinimo formos. Naudojant fleksografinės spaudos technologiją dangos formavimui ant filtrinio popieriaus yra naudojami spausdinimo velenai. Spausdinimo velenas sudarytas iš tūtos ant kurios užklijuota polimerinė spausdinimo forma. Žaliavų saugojimo vietoje 15 gamintojo pakuotėse yra laikomi filtrinio popieriaus rulonai. Gautas reakcijos produktas spausdinimo veleno pagalba užnešamas ant filtrinio popieriaus juostos, kuri transportavimo velenais 16 yra tiekiamas į konvekcinę džiovyklę 17, kurioje džiovinimo agentas perduoda dalį savo šilumos bioaktyviai dangai, todėl suintensyvėja skysčių garavimo procesas, o susidarę garai su tuo pačiu srautu pašalinami į aplinką. Po to, bioaktyvia danga padengta pakavimo medžiaga transportavimo velenais 16 tiekiamas į pjaustymo įrenginį 18, kuriame mišriuojama pjaustymo būdu pjaustoma skersai ir išilgai vyniojimo kryptimi. Gaunama siauresnė pakavimo

medžiaga nei pradiniame rulone. Supjaustyta pakavimo medžiaga transportavimo velenais 16 tiekama į pakavimo įrenginį 19, kur yra pakuojama ir ruošiama sandėliavimui.

**4.1 lentelė.** Fenoline rūgštimi modifikuoto chitozono dangos ant filtrinio popieriaus gamybos žaliavų kiekiai ir proceso režimo parametrai [18, 15]

Eil. Nr.	Žaliavos	Kiekis, kg	Technologinio režimo parametrai			
			Maišymo greitis, aps/min	Temperatūra, °C	Trukmė, min	Spaudos mašinos greitis, m/min
1	Chitozanas	50	300 – 450	60	180	–
2	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	69				
3	CH <sub>3</sub> COOH	50				
4	Fenolinė rūgštis	51				
5	EDAC	51				
6	H <sub>2</sub> O	500				
7	Filtrinis popierius	1000	–	–	–	160



**4.1 pav.** Fenolinėmis rūgštimis modifikuoto chitozano dangos gamybos technologinė schema: 1 – sumaišymo reaktorius, 2 – reaktorius, 3 – variklis, 4 – inkarinė maišyklė, 5 – sklendė, 6 – membraninis siurblys, 7 – filtravimo įranga, 8 – išcentrinis siurblys, 9 – vandens šildytuvas, 10 – diafragminis siurblys, 11 – tirpiklio regeneravimo įranga, 12 – tirpiklio talpykla, 13 – fleksografinės spaudos mašina, 14 – spausdinimo formų gamyba, 15 – žaliavų (filtrinio popieriaus) saugojimas, 16 – transportavimo velenai, 17 – konvekcinė džiovykla, 18 – bioaktyvių savybių filtrinio popieriaus pjaustymas, 19 – pakavimo įrenginys.

## 5. DARBUOTOJŲ SAUGA IR SVEIKATA

Profesinės rizikos įvertinimo tikslas yra įvertinti esamą arba galimą riziką darbe, ją pašalinti, ar numatyti prevencijos ar mažinimo priemonės. Rizika – trauma ar kitokia sveikatos sutrikdymo galimybė dėl pavojingo ir (ar) kenksmingo darbo aplinkos veiksnio poveikio [6].

Biologiniai veiksniai – mikroorganizmai, lastelių kultūros sukeliančios žmogaus organizmui alergijas, apsinuodijimus ar net infekcijas. Cheminiai veiksniai – cheminiai elementai ar junginiai, egzistuojantys natūraliai arba susintetinami, naudojami aplinkoje, bet kokio proceso metu, susintetinti tikslingai arba ne, naudojami rinkoje arba ne. Ergonominiai veiksniai – veiksniai, kurių pagrindą sudaro fizinis darbo krūvis ir darbo vietos pritaikomumas dirbančiajam. Fizikiniai veiksniai – veiksniai, kurių pagrindą sudaro fizikiniai kitimai aplinkoje. Fiziniai veiksniai – veiksniai, kurie sukelia pavojus dėl darbo priemonių, transporto priemonių, judančių daiktų fizinio poveikio bei dėl galimo gaisro, sprogimo bei statinių stabilumo ir tvirtumo neužtikrinimo [6].

Rizikos vertinimas atliekamas visose darbo vietose (lauke ar viduje, laikinose ar nuolatinėse ir kitose įmonėse), kuriose darbuotojas atlieka savo darbą. Atliekant rizikos vertinimą, darbdavys būtinai turi užtikrinti įprastinę darbo proceso eigą, darbo priemonių naudojimą pagal jų gamintojų nurodytas sąlygas. Būtina atsižvelgti į visų asmenų, esančių ar galinčių būti įmonės patalpose, jos teritorijoje, jos padaliniuose ar laikinuose objektuose: nuolat ir laikinai dirbančių, subrangovų, rangovų, atliekančių praktiką, trečiųjų asmenų ir lankytojų veiklą [19].

Atliekant rizikos vertinimą būtina, kad dalyvautų visi darbuotojai ar jų įgalioti atstovai bei darbuotojų atstovai saugai ir sveikatai. Iš darbuotojų yra surenkama visa informacija apie pavojingus įvykius bei rizikos veiksnius, esamus ar galinčius atsirasti. Su darbuotojais arba jų atstovais saugai ir sveikatai aptariamos rizikos šalinimo ir prevencinės priemonės bei nustatomas šių priemonių veiksmingumas[6].

Šiame tiriamajame darbe naudotos pagrindinės medžiagos yra nepavojingos žmogaus sveikatai. Visos šios medžiagos yra ir gali būti naudojamos kuriant bioaktyvių savybių pakavimo medžiagas. Galimi rizikos veiksniai, pavojingumo ir atsargumo frazės, įspėjamieji ženklai, pirmosios pagalbos ir priešgaisrinės priemonės yra pateiktos į 5.1 lentelę.






5.1 lentelė. Rizikos veiksnių identifikavimas ir jų kiekybinis vertinimas [7].

Rizikos veiksnys, keliantis pavojų profesinei saugai ir sveikatai	Įspėjamieji ženklai	Pirmosios pagalbos ir priešgaisrinės priemonės	Prevencijos priemonių būtinumas
Mažos molekulinės masės chitozanas	Nepavojinga medžiaga ar mišinys pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008.	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Bendroji pagalba: kreiptis į gydytoją. Lankantis pas gydytoją, parodyti saugos duomenų lapą.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.
Vidutinės molekulinės masės chitozanas	Nepavojinga medžiaga ar mišinys pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008.	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Bendroji pagalba: kreiptis į gydytoją. Lankantis pas gydytoją, parodyti saugos duomenų lapą.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.
Galo rūgštis	Nepavojinga medžiaga ar mišinys pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008.	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Bendroji pagalba: kreiptis į gydytoją. Lankantis pas gydytoją, parodyti saugos duomenų lapą.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.
Chlorogeno rūgštis	Nepavojinga medžiaga ar mišinys pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008.	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Bendroji pagalba: kreiptis į gydytoją. Lankantis pas gydytoją, parodyti saugos duomenų lapą.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.

5.1 lentelė. Tęsinys [7].

<p>Etilo alkoholis</p>	<p>Degus skystis ir garai:</p>  <p>Sukelia smarkų akių dirginimą:</p>  <p>Kenksminga prarijus:</p> 	<p>Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą.</p> <p>Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją.</p> <p>Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją.</p> <p>Prarijus: asmeniui, neturinčiam sąmonės, nieko neduoti. Praskalauti burną vandeniu. Kreiptis į gydytoją.</p>	<p>Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.</p>
<p>Acto rūgštis</p>	<p>Degus skystis ir garai:</p>  <p>Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis:</p> 	<p>Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą.</p> <p>Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją.</p> <p>Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją.</p>	<p>Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.</p>

5.1 lentelė. Tęsinys [7].

<p>Druskos rūgštis</p>	<p>Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis:</p>  <p>Sukelia smarkų akių dirginimą:</p> 	<p>Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą.</p> <p>Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją.</p> <p>Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją.</p>	<p>Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.</p>
<p>N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas</p>	<p>Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis:</p>  <p>Sukelia smarkų akių dirginimą:</p> 	<p>Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą.</p> <p>Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją.</p> <p>Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją.</p>	<p>Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.</p>
<p>2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas</p>	<p>Kenksminga prarijus:</p> 	<p>Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą.</p> <p>Prarijus: asmeniui, neturinčiam sąmonės, nieko neduoti. Praskalauti burną vandeniu. Kreiptis į gydytoją.</p>	<p>Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.</p>



## IŠVADOS

1. Skirtingos molekulinės masės chitozaną modifikuojant atitinkamais chlorogeno ir galo rūgšties kiekiais, gauti fenolinėmis rūgštimis modifikuoti chitozano dariniai: chlorogeno rūgštimi modifikuotas mažos molekulinės masės chitozanas su pakeitimo laipsniu 0,73, chlorogeno rūgštimi modifikuotas vidutinės molekulinės masės chitozanas su pakeitimo laipsniu 0,46, galo rūgštimi modifikuotas mažos molekulinės masės chitozanas su pakeitimo laipsniu 0,038 ir galo rūgštimi modifikuotas vidutinės molekulinės masės chitozanas su pakeitimo laipsniu 0,044.

2. Terminės analizės metodais nustatyta, kad skirtingos molekulinės masės chitozano modifikavimas galo ar chlorogeno rūgštimis susilpnino vandenilius ryšius chitozano dariniuose ir sumažino jų terminį stabilumą bei gebą surišti vandenį. Be to, rentgeno spindulių difrakcijos tyrimo rezultatai parodė, kad galo ar chlorogeno rūgšties prijungimas prie chitozano molekulių sumažino gautų darinių kristališkumą.

3. Ištirtos chlorogeno ir galo rūgštimis modifikuotų chitozanų antioksidacinės savybės. Nustatyta, kad fenolinėmis rūgštimis modifikuoti chitozanoi pasižymi prailgintu antioksidaciniu veikimu, lyginant su atitinkamų fenolinių rūgščių antioksidaciniu veikimu. Be to, nustatyta, kad antioksidacinio veikimo laikas priklauso nuo fenolinėmis rūgštimis modifikuotų chitozanų molekulinės masės. Chlorogeno rūgštimi modifikuotas mažos molekulinės masės chitozanas antioksidaciniu veikimu pasižymėjo 17 val, o chlorogeno rūgštimi modifikuotas vidutinės molekulinės masės chitozanas – 8 val. Tuo tarpu, VMCC-GAR antioksidaciniu veikimu pasižymėjo 3 val.

4. Ištirtos chlorogeno ir galo rūgštimis modifikuotų skirtingos molekulinės masės chitozano antibakterinės savybės. Nustatyta, kad chitozano molekulinė masė įtakoja antibakterinį efektyvumą ir mažos molekulinės masės chitozanas pasižymi geresniu baktericidiniu poveikiu negu vidutinės molekulinės masės chitozanas. Visi tirti bandiniai pasižymėjo geriausiu baktericidiniu poveikiu prieš *L. monocytogenes* bakterijas, kai minimali baktericidinė koncentracija buvo 1,2 – 156 µg/ml intervale. Didžiausios minimalios baktericidinės koncentracijos vertės (nuo 0,6 iki 625 µg/ml) nustatytos bandymuose su *E. coli* bakterijomis. Modifikuotų chitozanų antibakterinis veiksmingumas priklausė nuo prijungtos fenolinės rūgšties, kuris buvo didžiausias chlorogeno rūgštimi modifikuotų chitozano darinių.

5. Ant filtrinio popieriaus suformotos fenolinių rūgščių ir skirtingos molekulinės masės chitozano dangos bei ištirtos šių dangų antioksidacinės savybės. Mažos ar vidutinės molekulinės

masės chitozano ir galo rūgšties dangos kiekiui vandenyje esant apie 0,185 g/l, šių dangų antoksidacinis efektyvumas buvo lygus 68 proc. Mažos ar vidutinės molekulinės masės chitozano ir chlorogeno rūgšties dangos kiekiui vandenyje esant apie 0,149 g/l, šių dangų antoksidacinis efektyvumas buvo lygus 61,90 – 68,37 proc.

6. Pateiktos fenoline rūgštimi modifikuoto chitozano dangos gamybos technologijos, pagal kurią galima pagaminti 177,1 kg produkto per parą, rekomendacijos.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Saxena M., Saxena J., Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2012, vol. 28, p. 130 – 134.
2. Gallic acid – grafted chitosan films as antioxidant food packaging. Guo, Ping. Master's Thesis, University of Tennessee, 2015, 124 p.
3. Taofiq O., Gonzalez-Paramas A. M., Barreiro M. F., Ferreira I. C. F. R. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules Review*, 2017, vol. 22, p. 281.
4. Dutta P. K., Dutta J., Tripathi V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 2004, vol. 53, p. 20 – 31.
5. William, A. Handbook of biopolymers and biodegradable plastics. *Properties, processing and applications*. [žiūrėta 2017-03-04]. Prieiga per internetą: [https://books.google.lt/books?id=2ICjqmDWVQMC&printsec=frontcover&hl=lt&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=true](https://books.google.lt/books?id=2ICjqmDWVQMC&printsec=frontcover&hl=lt&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true)
6. Profesinės rizikos vertinimo bendrieji nuostatai Nr. A1-457/V-961. Vilnius. Lietuvos Respublikos socialinės apsaugos ir darbo ministerija ir Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministerija. [žiūrėta 2017-04-29]. Prieiga per internetą: <https://www.e-tar.lt/portal/lt/legalAct/TAR.5B121E9A63FD>
7. Sigma – Aldrich. [žiūrėta 2017-04-29]. Prieiga per internetą: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>
8. Woranuch S., Yoksan R. Preparation, characterization and antioxidant property of water – soluble ferullic acid grafted chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 2013, vol. 96, p. 495 – 502.
9. Woranuch S., Yoksan R., Akashi M. Thermal stability and utilization as an antioxidant for biodegradable active packaging film. *Carbohydrate Polymers*, 2015, vol. 115, p. 744 – 751.
10. Organic facts. [žiūrėta 2017-05-21]. Prieiga per internetą: <https://www.organicfacts.net/>
11. European food safety authority. [žiūrėta 2017-05-21]. Prieiga per internetą: <http://www.efsa.europa.eu/en/publications>

12. Cheng S. Y., Wang B. J., Weng Y.M. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. *Food Science and Technology*, 2015, vol. 63, p. 115 – 121.
13. Guo P., Anderson J.D., Bozell J. J., Zivanovic S. The effect of solvent composition on grafting gallic acid onto chitosan via carbodiimide. *Carbohydrate Polymers*, 2016, vol. 140, p. 171 – 180.
14. Liu J., Wu H. T., Lu J. F., Wen X. Y., Kan J., Jin C. H. Preparation and characterization of novel phenolic acid (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives) grafted chitosan microspheres with enhanced adsorption properties for Fe(II). *Chemical Engineering Journal*, 2015, vol. 262, p. 803 – 812.
15. Chemijos inžinerija. Balandis, A., Leskauskas B., Šinkūnas S., Vaickelionis G., Valančius Z. KTU leidykla „Technologija“, Kaunas, 2008, 536 p.
16. Etnoarbata. [žiūrėta 2017-05-21]. Prieiga per internetą: <https://www.etnoarbata.lt/lt/produktai.html>
17. Mandal S. M., Chakraborty D., Dey S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, vol. 54, p. 359 – 368.
18. Pakavimo įrenginiai. [žiūrėta 2017-05-21]. Prieiga per internetą: <http://www.pakmarkas.lt/irenginiai.html>
19. Profesinės rizikos vertinimas. [žiūrėta 2017-05-21]. Prieiga per internetą: <http://www.verslopagreitis.lt/?lang=lt&page=pages&id=26>
20. Biopolymers. [žiūrėta 2017-05-21]. Prieiga per internetą: [https://www.researchgate.net/publication/233748738\\_Biopolymers](https://www.researchgate.net/publication/233748738_Biopolymers)