



**KAUNO TECHNOLOGIJOS  
UNIVERSITETAS**  
**Cheminės technologijos  
fakultetas**



**LIETUVOS SVEIKATOS  
MOKSLŲ UNIVERSITETAS**  
**Farmacijos fakultetas**

**Greta Zambžickaitė**

**KAVOS RŪGŠTIES ADSORBCIJA CHITAZANO MILTELIAIS IR  
GAUTŲ KOMPLEKSŲ SAVYBĖS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**  
Doc. dr. Rima Klimavičiūtė

**KAUNAS, 2018**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS  
UNIVERSITETAS**

**Cheminės technologijos fakultetas**

**LIETUVOS SVEIKATOS  
MOKSLŲ UNIVERSITETAS**

**Farmacijos fakultetas**

**Kavos rūgšties adsorbcija chitozano milteliais ir gautų  
kompleksų savybės**

Baigiamasis magistro projektas

Medicininė chemija (kodas 628F10001)

**Vadovas**

Doc. dr. Rima Klimavičiūtė

**Recenzentas**

Doc. dr. Ramunė Rutkaitė

**Projektą atliko**

Greta Zambžickaitė

**KAUNAS, 2018**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS  
UNIVERSITETAS**

**Cheminės technologijos  
fakultetas**

**LIETUVOS SVEIKATOS  
MOKSLŲ UNIVERSITETAS**

**Farmacijos fakultetas**

Greta Zambžickaitė

Studijų programa Medicininė chemija (kodas 628F10001)

„Kavos rūgšties adsorbicija chitozano milteliais ir gautų kompleksų savybės“

**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

20\_\_ m. \_\_\_\_\_ mėn. \_\_ d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Greta Zambžickaitė** Baigiamasis projektas tema „Kavos rūgšties adsorbicija chitozano milteliais ir gautų kompleksų savybės“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o 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.

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

## Turinys

<b>Įvadas</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Literatūros apžvalga</b> .....	<b>9</b>
1.1. Jonogeniniai polisacharidai vaistų pernašos sistemose.....	9
1.1.1. Chitozanas.....	11
1.2. Fenolinės rūgštys.....	13
1.2.1. Kavos rūgštis .....	14
1.3. Chitozano ir fenolinių rūgšių konjūgatai .....	15
1.4. Chitozano kompleksų susidarymas su anijoniniais junginiais .....	20
1.5. Baigiamojo projekto temos parinkimas .....	21
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai</b> .....	<b>22</b>
2.1. Medžiagos .....	22
2.2. Tyrimų metodai.....	23
2.2.1. Kavos rūgšties ir chitozano kompleksų gavimas .....	23
2.2.2. Adsorbcijos kinetikos tyrimai.....	23
2.2.3. Adsorbcijos pusiausvyros tyrimai.....	24
2.2.4. Kavos rūgšties koncentracijos nustatymas .....	24
2.2.5. Drėgmės kiekio nustatymas .....	24
2.2.6. Furje transformacijos infraraudonoji (FT-IR) spektroskopija .....	24
2.2.7. Skenuojamosios elektroninės mikroskopijos (SEM) tyrimas.....	25
2.2.8. Termogravimetrinė (TG) analizė .....	25
2.2.9. Kavos rūgšties desorbcijos iš KVR-CH miltelių tyrimas .....	25
2.2.10. KVR-CH kompleksų antioksidacinio efektyvumo įvertinimas .....	25
2.2.11. Vandens garų sugerties KVR-CH milteliais arba plėvelėmis nustatymas.....	26
2.2.12. Arbatžolių apdorojimas KVR-CH komplekso tirpalais.....	27
2.2.13. KVR-CH kompleksų plėvelių gavimas .....	27
2.2.14. Rezultatų patikimumo įvertinimas.....	27
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas</b> .....	<b>28</b>
3.1. KVR kiekis komplekse nuo reagentų santykio, nuo CH molinės masės, polielektrolininis titravimas .....	28
3.2. Kavos rūgšties adsorbcijos chitozano milteliais tyrimas pusiausvyros sąlygomis .....	31
3.3. Kavos rūgšties adsorbcijos chitozano milteliais termodinamika .....	36
3.4. KVR-CH kompleksų FT-IR analizė.....	37
3.5. KVR-CH kompleksų TG analizė .....	38

3.6. Vandens garų sugertis KVR-CH milteliais arba plėvelėmis.....	41
3.7. Kavos rūgšties desorbcija iš KVR-CH kompleksų miltelių.....	42
3.8. KVR-CH kompleksų ir jais apdorotų arbatžolių antioksidacinis efektyvumas .....	43
<b>Išvados .....</b>	<b>46</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>47</b>

Zambžickaitė, Greta. Kavos rūgšties adsorbicija chitozano milteliais ir gautų kompleksų savybės .  
*Chemijos magistro* Baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Rima Klimavičiūtė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Polimerų chemijos ir technologijos katedra.

Mokslo kryptis ir sritis: Fiziniai mokslai, chemija

Reikšminiai žodžiai: *kavos rūgštis, chitozanas, kompleksai, adsorbicija.*

Kaunas, 2018. 55 p.

## SANTRAUKA

Chitozano (CH) ir kavos rūgšties (KVR) kompleksai (KVR-CH) gauti adsorbuojant KVR iš tirpalų pradiniais CH milteliais. Pseudo-antrojo laispnio kinetinis modelis pritaikytas aprašyti adsorbicijos duomenims. Ištirtas KVR pusiausvrios adsorbicijos mechanizmas CH miltelių paviršiuje.

Nustatytas KVR-CH komplekso optimalus santykis 0,47–0,49 KVR mol 1 mol CH. Kompleksų sudėtis patvirtinta FT-IR spektroskopija. CH molekulinė masė neturi įtakos gaunamų kompleksų sudėčiai. KVR adsorbicija CH milteliais aprašo Lengmiuro, Freundlichio ir Dubinino-Radushevichiaus adsorbicijos modeliai, kurių parametrai tvirtina, kad adsorbicija vyksta dėl elektrostatinės sąveikos tarp rūgštinėje terpėje jonizuotų CH aminogrupių ir KVR karboksigrupių. Apskaičiuoti termodinaminiai rodiklių vertės rodo, kad KVR adsorbicija CH milteliais vyksta spontaniškai. Tačiau neigiamos Gibso laisvosios energijos vertės mažėja didėjant temperatūrai. Neigiamos entalpijos ir entropijos pokyčių vertės rodo, kad adsorbicija yra egzoterminis procesas ir sistemos tvarka adsorbicijos metu didėja. KVR-CH kompleksų destrukcija vyksta trimis stadijomis: pirmoje stadijoje pasišalina iš komplekso drėgmė, antroje stadijoje atskykla apie 25 % komplekse sujungtos KVR ir trečioje stadijoje vyksta polimero destrukcija. KVR iš KVR-CH kompleksų yra desorbuojama iš fosfatinio buferinio tirpalo, kurio pH vertė yra 6,8. KVR-CH kompleksų antioksidacinis efektyvumas, apskaičiuotas pagal ABTS metodą, didėja didėjant adsorbuotos KVR kiekiui.

Zambžickaitė, Greta. *Caffeic acid adsorption onto chitosan powder and properties of obtained complexes: Master's thesis in Chemistry / supervisor assoc. prof. Rima Klimavičiūtė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technologies.*

Research area in: Physical Sciences, Chemistry.

Key words: caffeic acid, chitosan, complexes, adsorption.

Kaunas, 2018, 55 p.

## SUMMARY

Chitosan (CH) and caffeic acid (KVR) complexes (KVR-CH) of different composition were obtained by adsorbing KVR from aqueous solutions on CH powder. The pseudo-second kinetic model was fitted to the data of adsorption. The mechanism of KVR equilibrium adsorption on the surface of CH powder was elaborated.

The KVR-CH with KVR to CH optimal molar ratio of 0.47–0.49 were obtained. FT-IR spectra confirmed the composition of KVR-CH complexes. The molecular weight of CH no influence composition of the complex were obtained. Analysis of the Langmuir, Freundlich and Dubinin-Radushkevich adsorption models parameters demonstrated that KVR is adsorbed on the ionized amino groups of CH due to electrostatic interactions between the latter groups and the carboxylic group of KVR. Analysis of thermodynamic parameters of adsorption showed that KVR adsorption on CH was spontaneous. However, the negative values of changes in Gibbs free energy decreased with an increase of adsorption temperature. The negative values of the changes of enthalpy and entropy implied that adsorption was exothermic process, and the order of systems during the course of adsorption increased. The thermal destruction of KVR-CH complexes occurred in three steps: release of physically retained water (first step), release ~ 25 % KVR from KVR-CH complex (second step) and decomposition of complex (third step). KVR can be released from KVR-CH complexes into solution of phosphate buffer (pH=6.8). The antioxidant activity estimated by ABTS assay showed that KVR-CH complexes containing higher amount of adsorbed KVR demonstrated prolonged antioxidant activity.

## Įvadas

**Darbo aktualumas.** Fenoliniai junginiai yra sudėtingų organinių medžiagų dalis plačiai paplitusi augalų karalystėje. Viena iš jų pagrindinių jų grupių yra hidroksicinamono rūgšties (HCA) dariniai. Tai antriniai metabolitai, gauti iš fenilalanino ir tirozino, sudaryti iš 9 anglies atomų, turintys hidroksigrupę, dvigubą jungtį šoninėje grandinėje, gali turėti *cis*- arba *trans*-konfigūraciją [1]. Per pastarąjį dešimtmetį HCA dariniams yra skiriamas didelis dėmesys dėl jų gausos kasdieninėje mityboje bei dėl didėjančio susidomėjimo jų kaip antioksidantų biologiniu poveikiu [2, 3]. Kavos rūgštis (3,4-dihidroksicinamoninė rūgštis) ne tik pasižymi antioksidaciniu poveikiu, bet gali slopinti bakterijų ar mielių augimą [4].

Chitozanas yra vienintelis gamtoje randamas katijoninis polimeras, gaunamas iš chitino šarminio deacetilinimo būdu. Chitozано makromolekulės struktūra yra linijinė, sudaryta iš atsitiktinai pasikartojančių *d*-gliukozamino ir *N*-acetil-*d*-gliukozamino likučių, sujungtų  $\beta$ -(1-4)-glikozidinėmis jungtimis. Chitozanas yra netirpus vandenyje ar organiniuose tirpikliuose. Parūgštintuose tirpaluose chitozane esančios pirminės aminogrupės yra protonizuojamos. Chitozано pK<sub>a</sub> vertė yra 6,5. Jonizuotų aminogrupių skaičius priklauso nuo chitino deacetilinimo laipsnio [5]. Be to, dėl teigiamo krūvio ženklo jonizuotų aminogrupių chitozanas gali sudaryti kompleksus su neigiamo krūvio ženklo grupių turinčiais polimerais arba mažamolekuliais junginiais [6], o jo platų taikymą [7] sąlygoja biologinis suderinamumas ir bioskaidumas.

Turėdamas teigiamo krūvio ženklo grupių chitozanas gali sudaryti joninius kompleksus su anijoninių grupių turinčiais mažamolekuliais junginiais, kurių viena yra kavos rūgštis. Paprastai kavos rūgšties ir chitozано kompleksai yra gaunami nusodinant juos iš tirpalų, prieš tai chitozaną ištirpinus acto rūgšties tirpale. Paprastesnis būdas tokiems kompleksams gauti būti chitozано miltelius iškart bandyti tirpinti kavos rūgšties tirpale. Tačiau literatūroje nėra aprašyta tokių tyrimų.

**Darbo tikslas** – gauti netirpius miltelių pavidalo kavos rūgšties ir chitozано (KVR-CH) kompleksus bei įvertinti jų savybes.

Darbo tikslui pasiekti yra išskelti šie uždaviniai:

1. Ištirti chitozано molekulinės masės ir chitozано bei kavos rūgšties masių santykio įtaką KVR-CH kompleksų sudėčiai.
2. Ištirti kavos rūgšties adsorbiciją chitozано milteliais pusiausvirosios adsorbicijos sąlygomis.
3. Įvertinti KVR kompleksų termines ir antioksidacines savybes.
4. Ištirti kavos rūgšties desorbicija iš KVR-CH kompleksų.
5. Įvertinti KVR-CH kompleksų panaudojimo arbatžolių antioksidacinių savybių pagerinimui galimybes.



## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Jonogeniniai polisacharidai vaistų pernašos sistemose

Vis daugiau dėmesio yra skiriama jonogeninių gamtinių ir modifikuotų gamtinių polisacharidų taikymui bioaktyvių junginių pernašos sistemose. Polisacharidai yra išgaunami iš gamtinių atsinaujinančių šaltinių. Jonogeninių polisacharidų savybės labai priklauso nuo aplinkos veiksnių, tokių kaip terpės pH vertė, tirpale esančių kitų elektrolitų, elektrinio ir magnetinio lauko stiprio, apšvietos, temperatūros, redokso potencialo ar tam tikros struktūros molekulių (pvz., fermentai, žymenys), todėl lengva modeliuoti bioaktyvios medžiagos atsipalaidavimą [6].

Ypač plačiai gamtiniai polimeriniai nešikliai yra taikomi farmacijos pramonėje [10, 11]. Dėl spartaus organinės chemijos ir polimerų mokslo plėtros, XX a. antrojoje pusėje buvo susintetinta daug įvairių savybių turinčių pagalbinių medžiagų ir ištirtas jų panaudojimas farmacijos pramonėje [12]. Tačiau dėl toksiškų, biologiškai neskaidžių tirpiklių ar pradinių komponentų panaudojimo, iškilo aplinkos taršos problemų, pasireiškiančių cheminių medžiagų kaupimusi dirvožemyje ar vandens telkiniuose [13]. Šis trūkumas paskatino natūralių pagalbinių medžiagų panaudojimo farmacijos pramonėje paieškas. Tam reikia žinių apie jų sudėtį ir struktūrą, nuo kurių priklauso tiek panaudojimo funkcionalumas, tiek sauga [14].

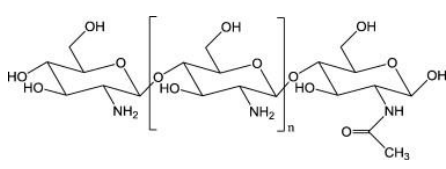
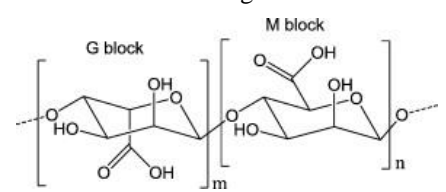
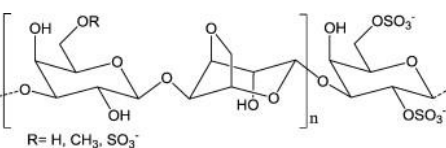
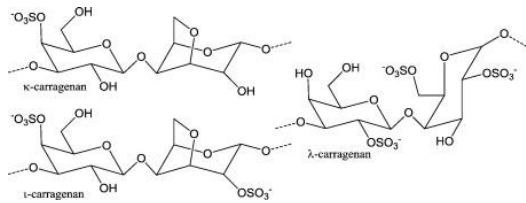
Polisacharidai išgaunami iš įvairių šaltinių: jūros dumblių, augalų, bakterijų, grybų, vabzdžių, vėžiagyvių, gyvūnų ar net žmonių, taip pat gali būti struktūriškai sudaryti taikant genų inžineriją [15]. Be to, dažnai gamtinės polimerinės medžiagos yra išgaunamos iš maisto pramonės atliekų, taip siekiant sumažinti tokių atliekų kiekius [16]. Dėl tinkamo suderinamumo su žmogaus organizmu bei nesudėtingo gavimo būdo, polisacharidai farmacijoje yra naudojami kaip rišamosios medžiagos, užpildai, tirštikliai, kietų / skystų preparatų sudėtinės dalys [17]. Be to, jie lengvai suskaidomi dirvožemyje ir paviršiniuose vandenyse esančiais mikroorganizmais.

Polisacharidai, kurie susidaryti iš vieno pasikartojančio monomero, vadinami monopolisacharidais (pvz. krakmolas, celiuliozė), o iš dviejų ar daugiau monomerų, vadinami heteropolisacharidais (pvz., agaras, alginatas, karageninas). Taip pat polisacharidai skirstomi į nejonogeninius ir polielektrolitus, turinčius teigiamo arba / ir neigiamo krūvio ženklų grupių [18]. Polisacharidų makromolekulės konformacijai įtakos turi tiek terpės pH vertė ir joninė tirpalo jėga, tiek temperatūra ar kitų junginių molekulių koncentracija [19]. Cheminių ir fizikinių dirgiklių įtaka polisacharidų makromolekulių konformacijai gali būti panaudota jų modifikacijai. Dirgikliai gali ne tik tiesiogiai veikti polisacharidą (pvz., šiluma ar elektrinis laukas), bet ir per tarpininką (pvz., veikiant polimere įkapsuliuotas aukso nanodaleles šviesa ar superparamagnetines geležies oksido daleles magnetiniu lauku, polimeras išsyla) [20]. Modifikuoti polisacharidai, galintys reaguoti į

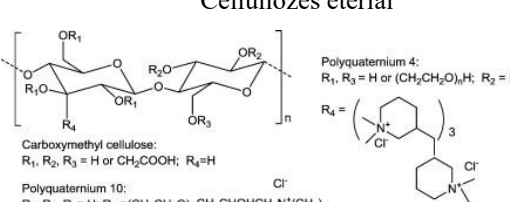
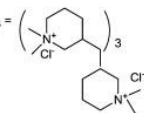
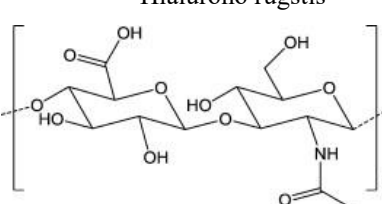
įvairius terpės dirgiklius, tampa ypač patraukliais kuriant vaistų pernašos sistemas (*angl.* drug delivery system (DDS)). Skirtingai nuo įprastų, atpalaiduojančių vaistinius preparatus į bet kokią terpę, sistemų naudojant DDS yra atpalaiduojami vaistiniai preparatai esant tam tikroms aplinkos sąlygoms, t. y. tam tikrose audinių ar ląstelės vietose sukelti norimą fiziologinį atsaką [21]. Viena iš unikalių polisacharidų savybių yra gebėjimas sudaryti nanodaleles su specifinių savybių paviršiumi, galinčiu imobilizuoti biologiškai aktyvias medžiagas ir atpalaiduoti jas per gleivinę į kraują ar konkrečią ląstelę. Todėl polisacharidai yra labai patrauklūs kuriant naujas, biologiškai suderinamas, jautresnes bei tikslesnes vaistų pernašos sistemas [5].

Dalis gamtinių polisacharidų jau turi savo makromolekulėje jonogeninių grupių, pvz., alginatai, karageninai, kiti tokių įgyja išgaudami iš gamtinių žaliavų, pvz., diacetilinant chitiną, gaunamas jonogeninių aminogrupių turintis chitozanas. Jonogeninių, gamtoje sutinkamų polisacharidų elementarios grandies sudėtis ir gamtinis šaltinis yra pateikti 1.1 lentelėje. Prie nejonogeninių polisacharidų jonogeninės grupės yra prijungiamos modifikuojant, pvz., tokiose reakcijoje aktyviai dalyvauja krakmolo ar celiuliozės hidroksigrupės.

1.1 lentelė. Gamtoje sutinkamų jonogeninių polisacharidų struktūrinės formulės [6]

Polisacharidas	Gavimo šaltinis
<p style="text-align: center;"><b>Chitozanas</b></p> 	Vėžiagyvių kiaurai ir bakterijų, grybų ląstelės sienelės
<p style="text-align: center;"><b>Alginatas</b></p> 	Jūros rudieji dumbliai ir kiti organizmai
<p style="text-align: center;"><b>Agaras</b></p> 	Dumblių <i>Gelidium</i> , <i>Eucheama</i> , <i>Gracilaria</i> ir kt. genai
<p style="text-align: center;"><b>Karageninas</b></p> 	Raudonųjų dumblių <i>Rhodophyceae</i> genai

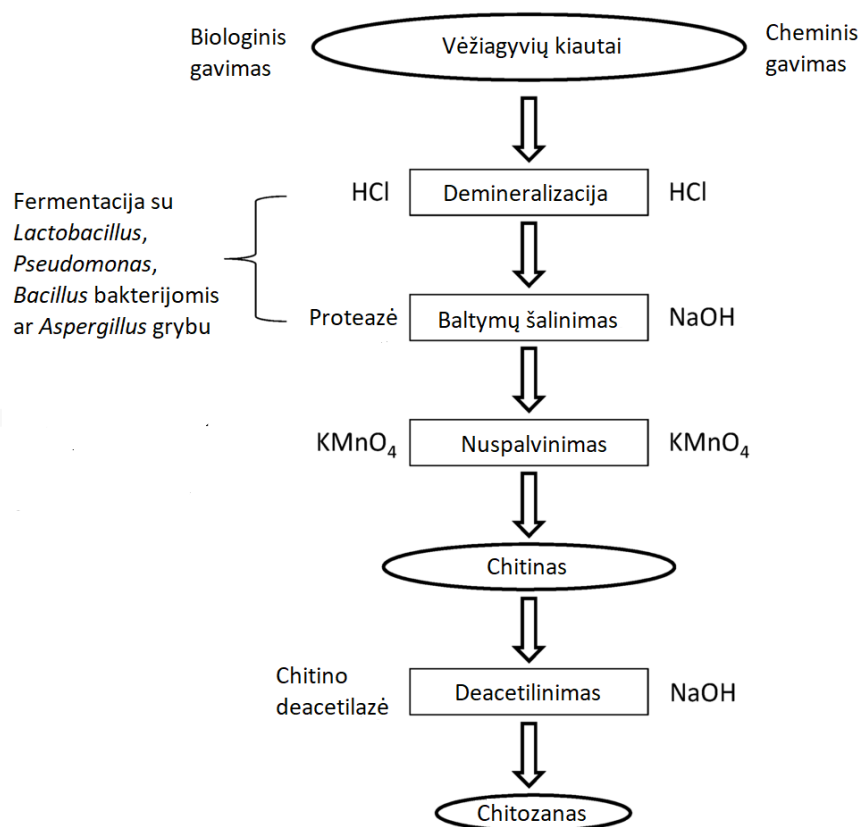
## 1.1 lentelės tęsinys

<p style="text-align: center;"><b>Celiuliozės eteriai</b></p>  <p>Carboxymethyl cellulose: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H or CH<sub>2</sub>COOH; R<sub>4</sub> = H</p> <p>Polyquaternium 10: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> = H; R<sub>3</sub> = (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub></p> <p>Polyquaternium 4: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> = H or (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H; R<sub>2</sub> = H</p> <p>R<sub>4</sub> = </p>	<p style="text-align: center;">Aukštesniųjų augalų ląstelės sienelė su po to sekančiomis substitucijos reakcijomis</p>
<p style="text-align: center;"><b>Hialurono rūgštis</b></p> 	<p style="text-align: center;">Aukštesniųjų gyvūnų ekstraląstelinis skystis</p>

### 1.1.1. Chitozanas

Chitozanas išgaunamas iš chitino, kuris randamas vėžiagyvių, daugiausiai krabų ar krevečių kiautuose, ir yra antras, labiausiai paplitęs polisacharidas po celiuliozės [22]. Lengviau chitiną išgauti iš krevečių kiautų, kurie yra plonesni nei kitų vėžiagyvių. Paprastai tos pačios rūšies vėžiagyvių kiautai yra surūšiuojami, išvalomi, išdžiovinami bei susmulkinami [23]. Chitozanas iš chitino yra išgaunamas deacetilinant. Chitozano išgavimo iš chitino būdai priklauso chitino žaliavos, tačiau, paprastai, susideda iš tokių etapų: demineralizacijos, baltymų šalinimo ir nuspalvinimo. Šias stadijas galima atlikti tiek cheminiu [24], tiek biologiniu (fermentacijos) [25] būdais (žr. 1.1 pav.). Dėl mažesnių išlaidų pramonėje naudojamas cheminis chitino diacetilimas. Biomedicininiam ir farmaciniam tikslams skirtas chitozanas turi būti itin kruopščiai išgrynintas, nes likę baltymai, mineralai ar pigmentai gali sukelti žmogaus organizme šalutinių poveikių. Nepriklausomai nuo chitozano deacetilavimo būdo neišvengiamai vyksta chitino makromolekulių destrukcija [26].

Chitozano kokybė priklauso nuo chitino šaltinio, jo išskyrimo metodo [27], o chitozano taikymas nuo savybių, tokių kaip deacetilavimo laipsnis bei molekulinė masė [28]. Deacetilavimo laipsnį galima nustatyti įvairiais būdais: infraraudonųjų spindulių spektroskopija, potenciometrinis titravimu ar pažangesniais metodais, tokiais kaip branduolio magnetinis rezonansas (BMR) [23]. Chitozano rodikliai ir jų nustatymo būdai yra pateikti 1.2 lentelėje.



1.1 pav. Biologinis ir cheminis chitozано gavimas [22]

1.2 lentelė. Chitozано fiziko-cheminiai rodikliai ir jų nustatymo metodai [22]

Rodiklis	Nustatymo metodas
Molekulinis svoris	Viskozimetrija, gelchromatyografija, šviesos sklaida, HPLC chromatografija, lazerinis desorbcijos / jonizacijos masių spektrometras
Deacetilinimo laipsnis	IR spektroskopija, UV spektrofotometrija, BMR spektroskopija, konduktmetrinis titravimas, potenciometrinis titravimas, diferencinė skenuojamoji kalorimetrija
Kristališkumas	Rentgeno spindulių difrakcija

Chitozanas, gautas iš chitino deacetilinimo būdu, tirpsta rūgštiniuose vandeniniuose tirpaluose, kai vidutinis deacetilinimo laipsnis yra didesnis nei 0,5. Chitozано fizikinės savybės vandeniniame tirpale priklauso nuo deacetilinimo laipsnio ir acetilgrupių pasiskirstymo polimero grandinėje. Nelyginis acetilgrupių skaičius mažina jo tirpumą ir skatina makromolekulių agregatų susidarymą [29]. Acetilino laipsnis turi įtakos chitozано reaktyvumui, bioskaidumui bei ląstelių atsakui [11].

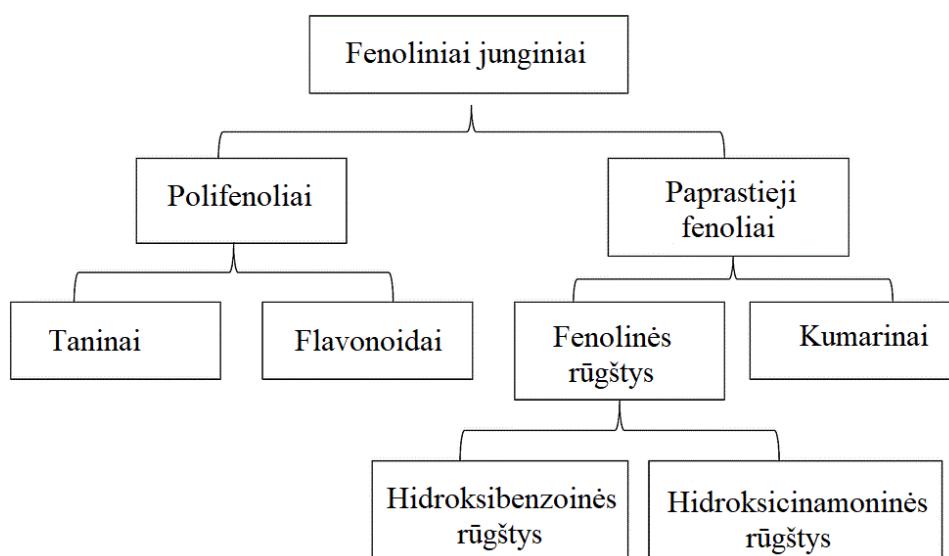
Chitozanas yra vienintelis gamtoje randamas katijoninis polimeras, gaunamas iš chitino šarminio deacetilinimo būdu. Chitozано makromolekulės struktūra yra linijinė, sudaryta iš atsitiktinai pasikartojančių *d*-gliukozamino ir *N*-acetil-*d*-gliukozamino likučių, sujungtų  $\beta$ -(1-4)-glikozidinėmis jungtimis. Chitozanas yra netirpus vandenyje ar organiniuose tirpikliuose. Parūgštintuose tirpaluose chitozane esančios pirminės aminogrupės yra protonizuojamos. Chitozано  $pK_a$  vertė yra 6,5.

Jonizuotų aminogrupių skaičius priklauso nuo chitino deacetilinimo laipsnio ir lemia chitozano savybes: reakciją į terpės pH pasikeitimą, giminiškumą žinduolių ląstelių komponentams, suteikia antimikrobinių savybių [5, 30]. Be to, dėl teigiamo krūvio ženklo jonizuotų aminogrupių chitozanas gali sudaryti kompleksus su neigiamo krūvio ženklo grupių turinčiais polimerais arba mažamolekuliais junginiais [6].

Platų chitozano taikymą [7] sąlygoja jo biologinis suderinamumas ir bioskaidumas. Chitozanas pasižymi priešvėžinėmis [31], antimikrobinėmis [32], antioksidacinėmis [33] savybėmis. Nustatyta, kad tokioms savybėms įtaką daro deacetilinimo laipsnis bei molekulinė masė [34]. Todėl chitozanas yra naudojamas įvairiems biologiniams ar biomedicininiais tikslams: vandeniui valyti [35], žaizdoms gydyti [36], vaistų pernašos sistemoms [37], nutukimui gydyti [38], audinių inžinerijoje [39].

## 1.2. Fenolinės rūgštys

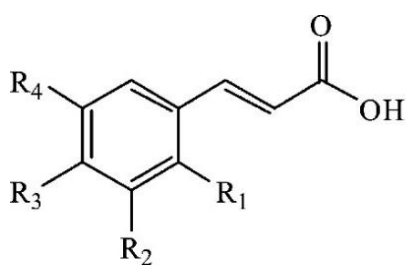
Fenoliniai junginiai yra sudėtingų organinių medžiagų dalis plačiai paplitusi augalų karalystėje. Aukštesnieji augalai sintetina bei kaupia daugybę fenolinių junginių, kurie apsaugo nuo fotosintezės metu susidariusių laisvųjų radikalų poveikio, taip užkirsdami kelią audinių pažeidimui. Fenolinių junginių klasifikavimas pateiktas 1.2 paveiksle [1].



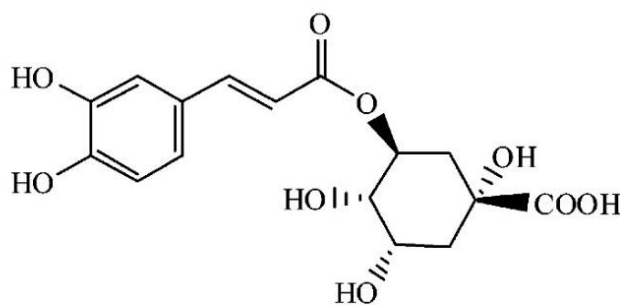
1.2 pav. Fenolinių junginių klasifikavimas [1]

Hidroksicinamono rūgšties (HCA) dariniai yra viena pagrindinė, gamtoje randamų fenolinių junginių, klasė [40, 41]. Tai antriniai metabolitai, gauti iš fenilalanino ir tirozino, sudaryti iš 9 anglies atomų, turintys dvigubą jungtį šoninėje grandinėje, gali turėti *cis*- arba *trans*-konfigūraciją. Tarp dažniausiai sutinkamų HCA darinių yra cinamono rūgštis, *o*-, *m*- ir *p*-kumaro rūgštys, kavos, ferulo

ir sinapo rūgštys (žr. 1.3 pav.) [42]. Pastarosios rūgštys randamos kaip laisvos karboksirūgštys arba esteriai, susidarę kondensuojantis fenolinėms rūgštims su flavonoidais ar angliavandeniais. Taip pat HCA gali būti randamos, kaip amido dariniai, kurie susidaro kondensuojantis fenolinėms rūgštims su aminorūgštimi arba aminu. Chlorogeninė rūgštis (žr. 1.3 pav.), kuri yra kavos ir chino rūgšties esteris, yra labiausiai gamtoje paplitęs HCA darinys, randamas vaisiuose, daržovėse, kavoje bei tabake [43, 44].



*o*-kumaro rūgštis, R1=OH  
*m*-kumaro rūgštis, R2=OH  
*p*-kumaro rūgštis, R3=OH  
 Kavos rūgštis, R2=R3=OH  
 Ferulo rūgštis, R2=OCH<sub>3</sub>; R3=OH  
 Cinamoninė rūgštis, R1=R2=R3=R4=H  
 Sinapo rūgštis, R2=R4=OCH<sub>3</sub>; R3=OH



Chlorogeninė rūgštis

### 1.3 pav. Cinamoninių rūgščių bendroji struktūrinė formulė [42]

Per pastarąjį dešimtmetį HCA dariniams yra skiriamas didelis dėmesys dėl jų gausos kasdieninėje mityboje bei dėl didėjančio susidomėjimo jų kaip antioksidantų biologiniu poveikiu [40,41]. Taip pat buvo įrodyta, kad HCA dariniai turi teigiamą poveikį žmogaus sveikatai, ypač sergant ateroskleroze ir vėžiu [45, 46]. Ankstyvojoje žmogaus gaubtinės žarnos vėžio stadijoje būdinga epitelio hiperproliferacija, dėl ko susidaro adenomos [47]. HCA dariniais yra slopinama reguliuojamos ląstelės ciklo kontrolė bei apoptozė. Apsauginis poveikis prieš gaubtinės žarnos vėžio vystymąsi turėtų būti siejamas su ląstelių proliferacijos slopinimu ir (arba) apoptozinio kelio iniciavimu, siekiant pašalinti mutacijas turinčias ląsteles ir išlaikyti normalią ląstelių populiaciją [48].

#### 1.2.1. Kavos rūgštis

Kavos rūgštis (3,4-dihidroksicinamoninė rūgštis) yra viena iš hidroksicinamato ir fenilpropanoidinių metabolitų, kurie kaupiasi augalų audiniuose. Ji randama daugelyje augalinės kilmės maisto šaltinių tokių kaip kavos gėrimai, mėlynės, obuoliai ar sidras [45]. Be maisto produktų, kavos rūgštis plačiai naudojama ir medikamentinių preparatų gamyboje kartu su propoliu ir veikia kaip kancerogeninis inhibitorius [49]. Kavos rūgštis taip pat pasižymi antioksidaciniu bei

antibakteriniu poveikiu *in vitro*, tai pat gali prisidėti prie aterosklerozės ir kitų širdies, kraujagyslių ligų kontrolės [50].

Antioksidantai – tai junginiai, kurie slopina arba mažina laisvųjų radikalų bei oksiduojančių junginių sukeltą poveikį. Jie veikia kaip iniciatoriai skatindami oksidacijos procesą. Stabilumą tokiems junginiams suteikia benzeno žiedas. Fenilpropanoidai veikia kaip antioksidantai pašalinant laisvuosius deguonies radikalus [51] ir metalo jonus, ypač geležį [52]. Šių molekulių hidroksigrupės pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Junginio stabilumas bei antioksidacinis aktyvumas stiprumas priklausomai nuo hiroksigrupių skaičiaus ir jų padėties (*orto*, *para*, *meta* benzeno žiede). Žinoma, kad antra *orto*-padėtyje esanti hidroksigrupė padidina antioksidacinį aktyvumą [53]. Tai paaiškina, kodėl kavos rūgšties antioksidacinis efektyvumas yra didesnis nei ferulo rūgšties.

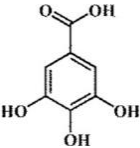
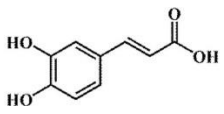
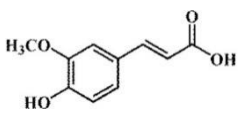
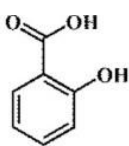
Kavos rūgštis, taip pat ir kiti fenilpropanoidai, pvz., *p*-kumaro rūgštis ar ferulo rūgštis, gali slopinti bakterijų (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) ar mielių augimą [4]. Kavos rūgšties antimikrobinis aktyvumas priklauso ne tik nuo jos struktūros, bet ir nuo aplinkos: terpės pH vertės, NaCl koncentracijos ir pan. Pastarieji veiksniai yra svarbūs, nes sukelia tam tikrus fiziologinius pokyčius mikroorganizmuose [54]. Kai terpės pH vertė yra 3–5, kavos rūgšties antimikrobinis poveikis pasireiškia prieš daugelį mikroorganizmų (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Kokuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*) [55].

### 1.3. Chitozano ir fenolinių rūgšių konjūgatai

Chitozanas vienintelis gamtinis teigiamo krūvio ženklo grupių turintis polisacharidas, naudojamas maisto, vaistų ir farmacijos reikmėms dėl jo unikalių savybių, tokių kaip netoksiškumas, bioskaidumas, biologinis suderinamumas, lengvas prieinamumas bei mažos išlaidos pramonėje. Pastaraisiais metais sintezuojami įvairūs polifenolių-chitozano konjūgatai chitozano tirpumui vandenyje padidinti ir taip praplėsti panaudojimą [56].

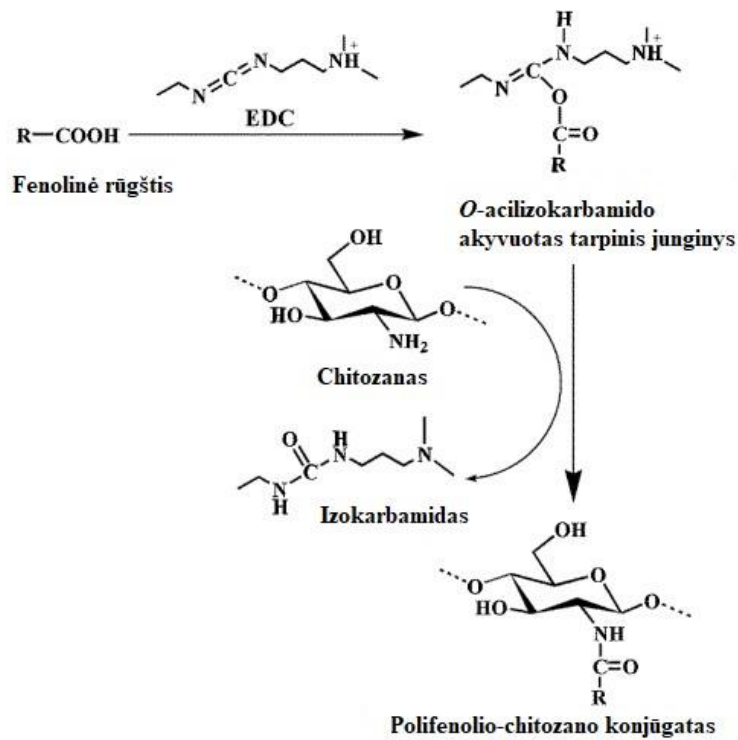
Fenoliniai junginiai, kaip minėta, pasižymi itin stipriu bioaktyvumu bei geru tirpimu vandenyje. Dėl šių priežasčių fenoliniai junginiai yra naudojami vandenyje tirpiems chitozano konjūgatams gauti. 1.3 lentelėje yra pateikti kai kurie fenoliniai junginiai, kurie yra naudojami konjūgatams su chitozanu sudaryti. Gauti naujomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis pasižymintys polifenolinių junginių-chitozano konjūgatai, kurie praplėtė modifikuotų chitozano darinių taikymo bei panaudojimo sritį [56].

1.3 lentelė. Fenolinių rūgščių struktūra, gavimo šaltiniai, konjūgato sudarymo būdas bei pritaikymas [56]

Fenolinė rūgštis	Struktūra	Gavimo šaltiniai	Konjūgato sudarymo būdas	Taikymas
Galo rūgštis		Žalioji arbata, želatina, lazdyno ar ąžuolo žievė	Cheminė modifikacija su EDC/NHS; fermento laktazės katalizuojama reakcija; laisvųjų radikalų inicijuota skiepijamoji kopolimerizacija	Antioksidacinis priedas, antidiabetinis agentas, biologiškai aktyvus junginys, maisto pakuotėms, vaistų pernašai
Kavos rūgštis		Kava, argano aliejus, miežių grūdai, eukalipto žievė	Cheminė modifikacija su EDC; fermento laktazės, tirozinazės katalizuojama reakcija; laisvųjų radikalų inicijuota skiepijamoji kopolimerizacija	Antioksidacinis priedas, audinių inžinerijoje
Ferulo rūgštis		Ryžiai, kviečiai, avižos	Cheminė modifikacija su EDC; fermento laktazės katalizuojama reakcija; laisvųjų radikalų inicijuota skiepijamoji kopolimerizacija	Maišto priedas ir maisto pakavimui
Salicilo rūgštis		Baltasis gluosnis, kaštonas, žemės riešutai	Cheminė modifikacija su EDC	Antitrombocitų agregacija, vaistų pernašai, maisto konservantas

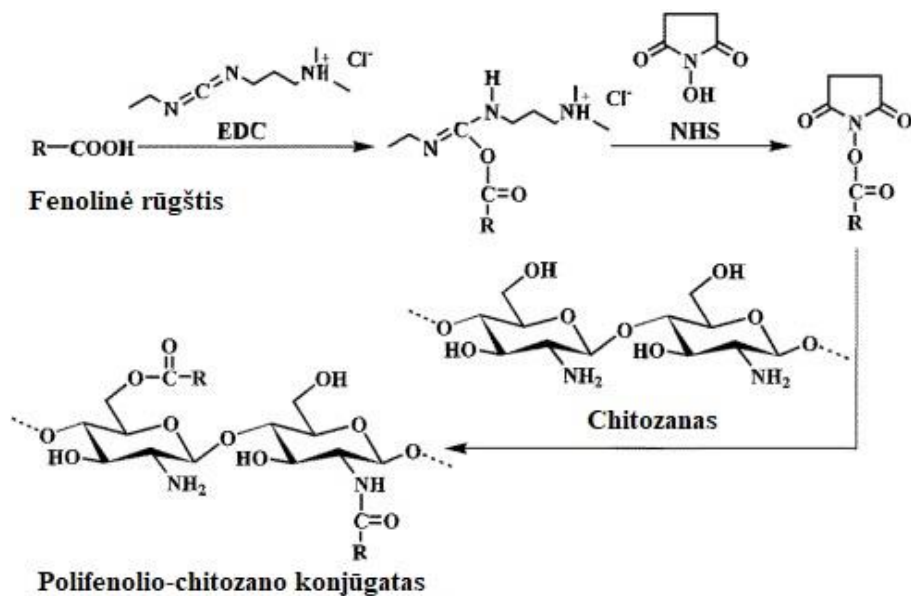
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidazolas (EDC) yra vandenyje tirpus junginys, kuris sudarant polifenolio-chitozono konjūgatus aktyvuoja fenolinės rūgšties karboksigrupę, susidarant tarpiniam junginiui *O*-acilizokarbamidą, po to, susidaro amidinis ryšys per pirminę chitozono aminogrupę (žr. 1.4 pav.). Cheminei modifikacijai įvykti taip pat svarbūs veiksniai yra temperatūra, reakcijos trukmė, terpės pH vertė, chitozono molekulinė masė bei chitozono ir fenolinės rūgšties molinis santykis [56].





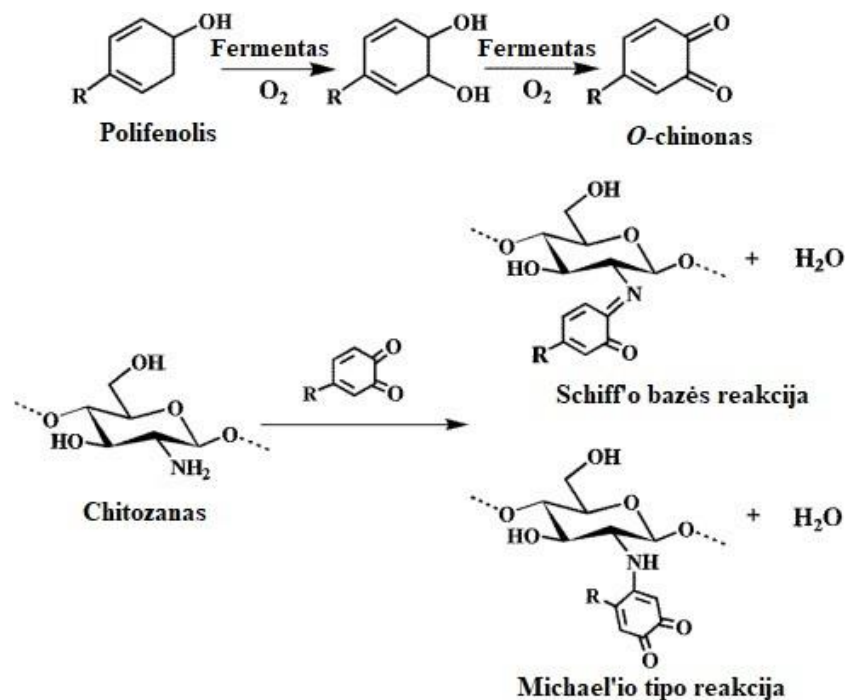
1.4 pav. Cheminės modifikacijos su EDC mechanizmas [56]

Vykdamt cheminę modifikaciją dalinai su EDC bei dalinai su *N*-hidroksisukcinimidu (NHS) gaunamas stabilesnis tarpinis junginys. Reakcijos mechanizmas pateiktas 1.5 paveiksle [56].



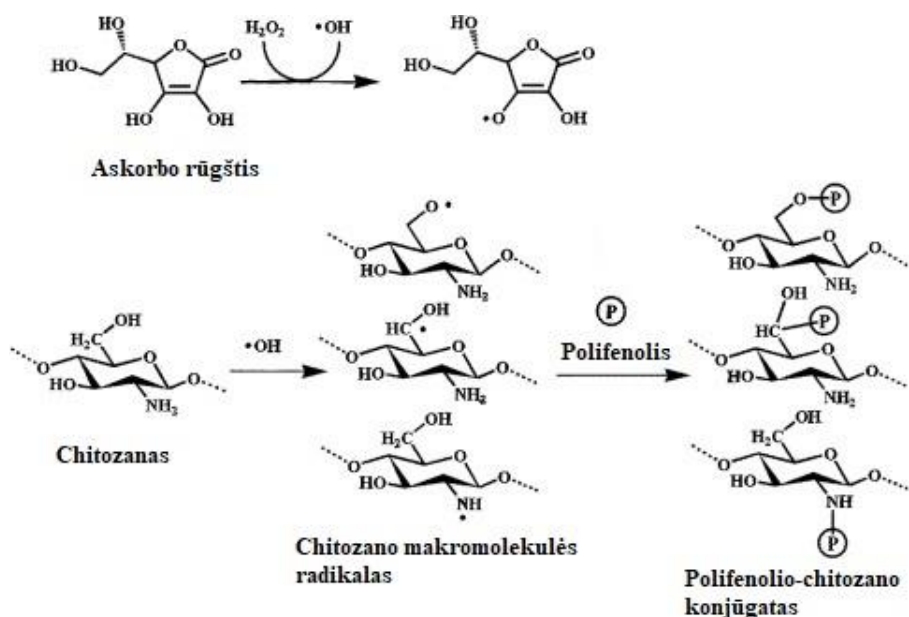
1.5 pav. Cheminės modifikacijos su EDC ir NHS mechanizmas [56]

Fermentais katalizuojamos reakcijos yra priskiriamos ekologiškiems procesams gaunant chitozано darinius. Dėl su fermentais susijusių tarpinių reakcijų, nenaudojant rūgštinės terpės ar organinio tirpiklio, susidaro polifenolio-chitozано konjūgatai (žr. 1.6 pav.) [56].



1.6 pav. Fermento katalizuojamos reakcijos mechanizmas [56]

Laisvųjų radikalų inicijuota skiepijamoji kopolimerizacija yra viena naujausių sintezės strategijų, kuri priklauso „žaliems“ procesams, nes nėra naudojami toksiški junginiai. Naudojamas vandenilio peroksidas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ir askorbo rūgštis inicijuoja kopolimerizaciją (žr. 1.7 pav.), dėl ko sužadinama chitozono makromolekulė, o vėliau kovalentiniu ryšiu prisijungia fenolinė rūgštis [56]



1.7 pav. Laisvųjų radikalų inicijuotos skiepijamosios kopolimerizacijos mechanizmas[56]

Skirtingų tipų polifenolio-chitozono konjūgatai turi keletą bendrų fizikinių, cheminių bei biologinių savybių gerinimo kaip tirpumas vandenyje, antioksidacinis aktyvumas [57]. Polifenolio-chitozono konjūgato tirpumas vandenyje didinamas mažinant chitozono kristališkumą [58]. Rentgeno spindulių difrakcijos analizė parodė, kad chitozanas pasižymi aukštu kristališkumu dėl stiprių vandelininių ryšių. Susidarant konjūgatui fenoliniai junginiai kovalentiškai jungiasi su chitozono aminogrupe, todėl išauga atstumas tarp chitozono grandinių, silpnina vandenilinius ryšius, dėl ko sumažėja kristališkumas. Polifenolio-chitozono konjūgatų antioksidacinis aktyvumas pagrįstas laisvųjų radikalų mažinimu ir redukciniu poveikiu lyginant su vienu chitozanu [59]. Antioksidacinis chitozono-fenolinių junginių aktyvumas taip pat susijęs su fenolinio junginio hidroksigrupių išsidėstymu chitozono makromolekulės grandinėje. Kitaip tariant komplekso antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo mažamolekulinio junginio molekulinės struktūros, t. y. nuo molekulėje esančių hidroksigrupių skaičiaus bei jų padėties [60]. Dėl šių priežasčių yra teigiama, kad polifenolio-chitozono konjūgatų fizikinės ir cheminės savybės, jų pritaikymas priklauso nuo konkretaus prijungto fenolinio junginio.

Galo rūgštis prijungimas prie chitozono molekulės mažina kristališkumą, silpnina tarpmolekulinius vandenilinius ryšius, padidina paviršiaus plotą. Be padidinto tirpumo vandenyje galo rūgštis ir chitozono darinys pasižymi geresniu antioksidaciniu aktyvumu, taip pat biologiniu aktyvumu, tokiu kaip oksidacinio streso žalos mažinimas ar antimikrobinis poveikis. Ferulo rūgštis ir chitozono konjūgatas pasižymi ne tokiu dideliu antioksidaciniu poveikiu kaip chitozono darinys su kavos rūgštimi, tačiau suteikia ląstelėms gyvybingumo dėl susirpintos adsorbcijos adhezijos baltymo vitronektino. Salicilo rūgštis prijungimas prie chitozono padidina tirpumą vandenyje, antioksidacinį bei antibakterinį aktyvumą, mažina trombocitų adheziją jau esant 50 mg/l salicilo rūgšties chitozane [56].

Daugybė tyrimų parodė, kad kavos rūgštis yra stiprus terapinis agentas, kuris slopina vėžinių ląstelių poliferaciją kaip burnos vėžio [61], krūties vėžio [62], prostatos vėžio [63] ir storosios žarnos vėžio [64]. Be to, yra aprašytas kavos rūgšties *in vitro* ir *in vivo* antiuždegiminis poveikis [65] ir antioksidacinis aktyvumas [66]. Dėl to paskutiniu metu atsiranda vis didesnis susidomėjimas chitozono modifikavimu kavos rūgštimi, o konjūgacija įrodyta termogravimetrine analize, FT-IR spektroskopija, magnetiniu branduolių rezonansu bei UV spektroskopija [67]. Sudaryti konjūgatai su kavos rūgštimi pasižymi pagerintomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, tokiomis kaip sumažėjusi klampa, padidėjęs tirpumas vandenyje, sustiprėjęs antioksidacinis aktyvumas. Svarbu ir tai, kad kavos rūgštis prijungimas prie chitozono makromolekulės suteikia jam naujų biologinio poveikio savybių kaip antimikrobinis bei priešvėžinis poveikiai [67, 68], dėl ko chitozanas vis plačiau taikomas biomedicinos srityje.

#### 1.4. Chitozano kompleksų susidarymas su anijoniniais junginiais

Turėdamas teigiamo krūvio ženklą grupių chitozanas gali sudaryti joninius kompleksus su anijoniniais mažamolekuliniais junginiais (pvz., kavos, galo, ferulo, salicilo rūgštimis ar neorganiniais junginiais) arba sudaryti polielektrolininius kompleksus su polimerais, turinčiais anijonines grupes (pvz., dekstrano sulfatu, poliakriamidu, karageninu). Kompleksai susidaro dėl elektrostatinės sąveikos tarp priešingo krūvio ženklų grupių. Susidarant kompleksams taip pat veikia Van der Waalso bei hidrofobinės sąveikos jėgos, vandeniliniai ryšiai. Kadangi polielektrolitinių kompleksų susidarymas vyksta vandenyje kambario temperatūroje, be organinių tirpiklių jis yra priskiriamas „žaliesiems procesams“ [69].

Polielektrolitinių kompleksų formavimas keičia jų sudarančių junginių savybes. Pvz., chitozano kompleksai su anijoniniais poliakrilamido dariniais pasižymi geresnėmis flokuliacinėmis savybėmis nei atskirai paimtas polimeras [70]. Chitozano kompleksai su dekstrano sulfatu [71–74], karboksimetilkrakmolu [75], karageninu [76] yra naudojami bioaktyvių junginių pernašai. Dekstrano sulfatas (DeSu) yra dažniausiai naudojamas atsižvelgiant į jo pigumą bei paprastą gavimą. Priklausomai nuo DeSu ir chitozano molekulinės masės, jų molinio santykio, bendros koncentracijos, terpės pH vertės ir tirpalo joninės jėgos galima gauti tiek nuosėdų pavidalo, tiek tirpius kompleksus [69]. Pastaruoju metu daugiausia dėmesio yra skiriama chitozano ir DeSu (CH-DeSu) kompleksams nanodalelių pavidale gauti [73, 74]. Kontroliuojamo dydžio kompleksų nanodalelėms gauti autoriai darbe [72] naudojo NaCl. Pradžioje gaunamas tirpus CH-DeSu kompleksas, pašalinus iš tirpalo NaCl, susidaro stabilus, netirpus nanodydžio dalelių polielektrolitinio kompleksų koloidas. CH-DeSu nanodalelės buvo panaudotos bioaktyvios medžiagos kurkumino imobilizacijai [73]: gautos neigiamo krūvio ženklą 200-220 nm dydžio kurkumino turinčios nanodalelės. Išėiga, sujungto kurkumino, buvo apie 74 %. Iš pastarųjų nanodalelių po 120 h kurkumino buvo atpalaiduota 70 %. Kurkuminas taip pat buvo imobilizuotas sudarant nanodalelių pavidalo kompleksą su vienu chitozanu [74]. Eterinis raudonėlio aliejus taip pat buvo imobilizuotas chitozano nanodalelėse [77]. Pradžioje buvo ruošama eterinio aliejaus emulsija chitozano tirpale, vėliau tarp chitozano makromolekulių buvo sudaromi skersiniai ryšiai natrio tripolifosfatu (NaTPF). Chitozano ir karagenino kompleksų nanodalelėms gauti, suformuotas kompleksas taip pat buvo tinklinamas NaTPF, o pridėjus NaTPF gaunamas mažesnio dydžio kompleksų nanodalelės, padidėja išėiga [76].

Metalo ir chitozano kompleksui gauti chitozanas sumaišomas su metilo alkoholio ir vandens mišiniu, kad pagerintų sąveiką su metalo jonais [79]. Po to, į gautą mišinį yra pilami metalų druskų tirpalai, pvz.,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  ir  $\text{ZnCl}_2$ , mišinys maišomas kambario temperatūroje apie 3-12 h, po to, plaunamas vandeniui ir džiovinamas ore [78].

Neorganinių rūgščių chitozano kompleksams gauti chitozanas užpilamas kambario temperatūros 7 M HNO<sub>3</sub> vandeniniu tirpalu, vėliau plaunamas vandeniu ir džiovinamas ore [80]. Taip pat neorganinės rūgšties ir chitozano kompleksas gautas 3 dienas laikant chitozaną HNO<sub>3</sub> garų aplinkoje [78].

Organinės rūgšties ir chitozano kompleksas gautas chitozaną užpilus 4 M acto rūgšties ir izopropanolio tirpalu ir laikant 3 valandas kambario temperatūroje arba chitozaną keletą dienų laikant acto rūgšties garų aplinkoje. Komplexo susidarymas tirtas rentgeno spinduliuotės difrakcijos analize [78, 81].

### **1.5. Baigiamojo projekto temos parinkimas**

Kavos rūgštis (KVR) plačiai taikoma medicinoje dėl savo antioksidacinių savybių, susijusių su laisvųjų radikalų slopinimu. Literatūroje aprašytas KVR antibakterinis, antiuždegiminis, antimutageninis poveikiai [1]. Praktika parodė, kad kavos rūgšties fizikines ir chemines savybes pagerinti galima sudarant konjūgatus su kitais organiniais junginiais tokiais kaip polimerai. KVR antioksidacinę, antimikrobinę bei antivėžinę poveikį galima padidinti imobilizuojant įvairiuose polimeriniuose nešikliuose, pvz., chitozane [56].

Dėl priešvėžinių, antimikrobinių, antioksidacinių savybių, o ypač dėl biologinio suderinamumo bei bioskaidumo, chitozanas (CH) plačiai naudojamas bioaktyvių junginių pernašai farmacijoje ir biomedicinoje [22]. Chitozanas netirpus vandenyje, tirpsta parūgštintuose tirpaluose, kuriuose CH pirminės aminogrupės protonizuojasi. Nuo CH deacetilavimo laipsnio priklausančių jonizuotų aminogrupių skaičius apsprendžia CH savybes: reakciją į terpės pH pasikeitimą, giminiškumą žinduolių ląstelių komponentams, suteikia antimikrobines savybes. Be to, dėl jonizuotų aminogrupių teigiamo krūvio ženklo chitozanas gali sudaryti kompleksus su neigiamo krūvio ženklo grupių turinčiais polimerais arba mažamolekuliais junginiais [6].

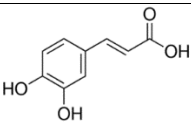
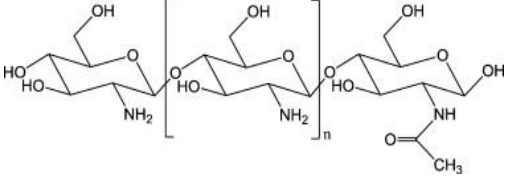
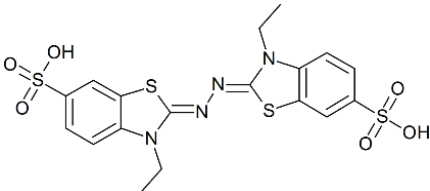
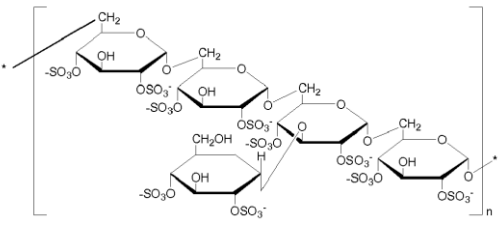
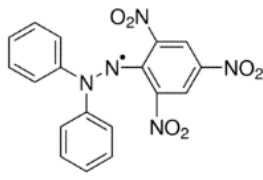
KVR ir CH kompleksai galėtų būti gauti adsorbuojant iš tirpalų KVR pradiniais chitozano milteliais. Tačiau literatūroje neradome duomenų apie taip gaunamus netirpius KVR ir CH kompleksus.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Medžiagos

Darbe naudotos cheminės medžiagos, jų formulės, gamintojai bei grynumas pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Naudotos medžiagos

Medžiaga	Formulė	Gamintojas, grynumas
Kavos rūgštis		Sigma-Aldrich, 98%
Chitozanas (mažos, vidutinės, aukštos molekulinės masės)		Sigma-Aldrich, deacetilavimo laipsnis 75-95 %
Etanolis	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	AB „Stumbras“
Acto rūgštis	$\text{CH}_3\text{COOH}$	UAB „EUROCHEMICALS“
Dikilio vandenilio fosfatas	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Alfa Aesar
Kalio divandenilio fosfatas	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Alfa Aesar
2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfo rūgšties diamonio druska (ABTS)		Sigma-Aldrich, 98%
Druskos rūgštis	$\text{HCl}$	UAB „EUROCHEMICALS“
Kalio persulfatas	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	UAB „EUROCHEMICALS“
Dekstrano sulfatas (DESU)		UAB „EUROCHEMICALS“
Druskos rūgštis	$\text{HCl}$	UAB „EUROCHEMICALS“
2,2 -difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH)		Sigma-Aldrich, 95%

## 2.2. Tyrimų metodai

### 2.2.1. Kavos rūgšties ir chitozano kompleksų gavimas

Kavos rūgšties (KVR) tirpalas buvo ruošiamas 1 g/l koncentracijos distiliuotame vandenyje. KVR tirpinama maišant magnetine maišykle (300 rpm) 2-3 valandas ~ 70° C temperatūroje. Atvėsintinas iki kambario temperatūros tirpalas filtruojamas per stiklinį filtrą. Tiksliai KVR tirpalo koncentracija nustatoma *UV/VIS* spektrofotometru (*Jenway 6715, Didžioji Britanija*).

KVR ir chitozano (KVR-CH) kompleksams gauti į 100 ml stiklines suberiamas reikiamas kiekis mažos, vidutinės ar didelės molekulinės masės CH miltelių, ir užpilama tam tikru kiekiu KVR tirpalu, jei reikia papildomai pilama distiliuoto vandens. Mišinys maišomas 60 minučių magnetine maišykle (150 rpm). Po to, 10 ml mišinio filtruojama pro popierinį filtrą (likutiniai KVR koncentracijai nustatyti), o likusi dalis pro stiklinį filtrą. Gauti KVR-CH milteliai praplaunami distiliuotu vandeniu ir paliekami išdžiūti kambario temperatūroje. Pradinis CH ir KVR santykis išreikštas CH molių kiekiu tenkančiu moliui KVR (CH/KVR, mol/mol). Pradinių mišinių sudėtis buvo keičiama nuo 0,53 iki 21,64 mol/mol.

CH milteliais adsorbuotas KVR kiekis apskaičiuotas iš pradiniame tirpale ir filtrate nustatytų KVR koncentracijų skirtumų ir išreikštas moliais KVR tenkančiais moliui CH (KVR-CH, mol/mol) arba procentais nuo pradinės KVR koncentracijos.

### 2.2.2. Adsorbcijos kinetikos tyrimai

0,075 g absoliučiai sausų CH miltelių suberiami į konusinę kolbą ir užpilami 100 ml 0,5 g/l KVR tirpalu. Uždengta kolba įstatoma į termostatuojamą vandens vonelę su kratykle *WB-14* („*Memmert GmbH*“, *Vokietija*), kurioje temperatūra palaikoma ± 1 °C. Tam tikrais laiko intervalais mišinys buvo išimamas iš termostato ir filtruojamas pro popierinį filtrą. Filtrate nustatoma likutinė KVR koncentracija.

CH milteliais adsorbuotas KVR kiekis  $q_t$  (g/g) tam tikru laiko momentu apskaičiuojamas pagal lygtį:

$$q_t = \frac{(C_o - C_t) \cdot V}{W}; \quad (2.1)$$

čia:  $C_o$  – KVR pradinė koncentracija, g/l;  $C_e$  – KVR koncentracija laiko momentu  $t$ , g/l;  $V$  – tirpalo tūris, l;  $W$  – absoliučiai sauso CH masė, g.

### 2.2.3. Adsorbcijos pusiausvyros tyrimai

Buvo ruošiami KVR tirpalai į 100 ml matavimo kolbas įpilant 20, 40, 60, 70, 80 ar 100 ml pradinio apie 1 g/l koncentracijos KVR tirpalo ir praskiedžiant distiliuotu vandeniu iki brūkšnio. Tirpalai apie 15 min termostatuojami reikiamoje temperatūroje ir užpilami ant konusinėse kolbose 0,0001 g tikslumu pasvertų mažos molekulinės masės CH miltelių. Užkimštos kolbos įstatomos į termostatuojamą vandens vonelę su kratykle *WB-14 (Mammert, Vokietija)*, kurioje temperatūra palaikoma  $\pm 1$  °C tikslumu. Kratyklės judėjimo dažnis 135 judesių per minutę. Adsorbcijos temperatūra buvo 30, 40 ir 50 °C. Adsorbcija truko 90 min. pasibaigus adsorbcijai mišinys buvo filtruojamas pro popierinį filtrą ir filtrate nustosima likutinė KVR koncentracija. Adsorbuotas KVR kiekis apskaičiuotas pagal formulę 2.1 tik vietoje  $q_t$  yra apskaičiuojama  $q_e$  vertė.

### 2.2.4. Kavos rūgšties koncentracijos nustatymas

KVR koncentracija tiriamajame tirpale nustatoma išmatavus 291 nm bangos ilgio UV spindulio sugertį KVR tirpalu *UV/VIS* spektrofotometru (*Jenway 6715, Didžioji Britanija*) ir apskaičiavus iš kalibracinės tiesės.

### 2.2.5. Drėgmės kiekio nustatymas

Medžiagoje drėgmės kiekis nustatytas drėgnomačiu (*Kern MRS 120-3, Vokietija*) ir apskaičiuotas pagal pateiktą formulę:

$$\omega = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \cdot 100\%; \quad (2.2)$$

čia:  $\omega$  – drėgmės kiekis, %;  $m_0$  – pradinė medžiagos masė, g;  $m_1$  – medžiagos masė po džiovinimo, g.

### 2.2.6. Furje transformacijos infraraudonoji (FT-IR) spektroskopija

KVR-CH kompleksų ir CH miltelių FT-IR visiško atspindžio (ATR) spektrai užrašyti *Frontier* spektrofotometru (*Perkin Elmer, JAV*). Prie deimanto kristalo plokštelės prispaudžiamas bandinio nedidelis kiekis ir užrašomas spektras bangų srities intervale nuo 4000  $\text{cm}^{-1}$  iki 655  $\text{cm}^{-1}$ , skenavimų skaičius 5, skiriamoji geba 4  $\text{cm}^{-1}$ .



### 2.2.7. Skenuojamosios elektroninės mikroskopijos (SEM) tyrimas

SEM tyrimui CH ar KVR-CH milteliai buvo užberiami ant specialios lipnios juostelės, kuri specialiu metaliniu antgaliu įdedama į aparatą. SEM nuotraukos gautos didelės skiriamosios gebos skenuojamuoju elektroniniu mikroskopu *FEI Quanta 200 FEG*.

### 2.2.8. Termogravimetrinė (TG) analizė

Termogravimetrinė KVR-CH ir CH miltelių analizė atlikta *Perkin Elmer (TGA 4000)* terminiu analizatoriumi. Bandinys (~ 10 mg) azoto arba oro aplinkoje (dujų debitas 20 cm<sup>3</sup>/min) kaitinamas keraminiame tiglyje keliant temperatūrą 10 °C/min greičiu temperatūrų intervale nuo 35 °C iki 600 °C.

### 2.2.9. Kavos rūgšties desorbcijos iš KVR-CH miltelių tyrimas

0,001 g tikslumu pasverti 0,05 g skirtingos sudėties KVR-CH kompleksų miltelių užpilti 50 ml desorbcijos tirpalo. Desorbcija vyko 30 min maišant magnetinės maišyklės 300 aps./min greičiu kambario temperatūroje. Po to bandiniai filtruoti pro popierinį filtrą ir filtrate nustatyta KVR koncentracija. Kaip desorbcijos terpė naudoti tirpalai: 0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas (pH vertė 6,8), etanolis, 0,1 M HCl tirpalas, distiliuotas vanduo.

Desorbuotas KVR kiekis apskaičiuotas iš pradinės su KVR-CH milteliais įdėtos kavos rūgšties koncentracijos atėmus kavos rūgšties koncentraciją nustatytą filtrate. Desorbcijos efektyvumas (*DEF*, %), apskaičiuotas pagal lygtį:

$$DEF = \frac{C_{lik}}{C_{prd}} \cdot 100 \% \quad (2.3)$$

čia:  $C_{lik}$  – KVR likutinė koncentracija filtrate, g/l;  $C_{prd}$  – KVR koncentracija, apskaičiuota įvertinus tyrime naudotą KVR-CH miltelių kiekį, g/l.

### 2.2.10. KVR-CH kompleksų antioksidacinio efektyvumo įvertinimas

Antioksidacinis KVR-CH miltelių arba jais apdorotų arbatžolių efektyvumas nustatytas ABTS metodu, naudojant 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfo rūgšties) diamonio druską.

ABTS katijoninis radikalas gautas reaguojant 7 mM koncentracijos ABTS tirpalui su 2,45 mM koncentracijos kalio persulfato tirpalu, laikant mišinį tamsoje 12-16 valandų kambario

temperatūroje. Gautas ABTS yra stabilus laikant tamsoje apie 48 valandas kambario temperatūroje. ABTS tirpalas buvo skiedžiamas distiliuotu vandeniu taip, kad 734 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugertis būtų artima vienetui.

*KVR-CH miltelių antioksidacinio efektyvumo nustatymas.* Stiklinėje 0,01 g tiksliai atvertų KVR-CH komplekso miltelių buvo užpilti 25 ml praskiesto ABTS tirpalo turinčiu 1 ml 0,1 N acto rūgšties. Po 7, 15, 20 min spektrofotometru *PG Instruments T60 UV/Vis* išmatuojama 734 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugertis gautu tiriamuoju tirpalu. Antioksidacinis efektyvumas (*AOEF*, %) skaičiuojamas pagal pateiktą formulę:

$$AOEF = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \cdot 100 \% ; (2.4)$$

čia:  $A_0$  – šviesos sugertis ABTS<sup>+</sup> tirpalu prieš bandymą, sant. v.;  $A_t$  – šviesos sugertis ABTS<sup>+</sup> tirpalu laiko momentu  $t$ , sant. v.

*Arbatžolių antioksidacinio efektyvumo įvertinimas.* Stiklinėje 0,5 g tiksliai pasverti pradinių ar apdorotų pagal 2.2.12 skyriuje aptartą metodiką arbatžolių buvo užpilti 100 ml verdančio vandens, 5 min maišomi magnetine maišykle ir filtruojami pro popierinį filtrą. Atvėsintas filtratas praskiestas 10 kartų. 1 ml praskiesto filtrato užpiltas 25 ml ABTS tirpalo, turinčiu 1 ml 0,1 N acto rūgšties. Tam tikrais laiko intervalais spektrofotometru *PG Instruments T60 UV/Vis* išmatuota 734 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugertis gautu tiriamuoju tirpalu. Antioksidacinis efektyvumas (*AOEF*, %) skaičiuotas pagal 2.4 formulę.

### **2.2.11. Vandens garų sugerties KVR-CH milteliais arba plėvelėmis nustatymas**

Stikliniuose biuksuose skirtingos sudėties KVR-CH milteliai arba iš jų pagal 2.2.13 skyriuje aprašytą metodiką pagamintos plėvelės išdžiovinti 105 °C temperatūroje iki absoliučiai sausos masės ir pasverti analitinėmis svarstyklėmis, patalpinti į 92 % pastovaus drėgnio eksikatorių, užpildytą sočiu KNO<sub>2</sub> tirpalu, kambario temperatūroje (22±1 °C). Po 24 h biuksai, uždarius dangtelius, išimti iš eksikatoriaus ir pasverti. Absorbuotas vandens garų kiekis apskaičiuotas iš bandinio masės padidėjimo ir išreikštas procentais nuo absoliučiai sausų miltelių masės pagal formulę:

$$W = \frac{m_d - m_s}{m_d} \cdot 100\% ; (2.5)$$

čia:  $m_d$  – bandinio masė išimto iš eksikatoriaus po 24 h, g ;  $m_s$  – absoliučiai sauso bandinio masė, g.

### 2.2.12. Arbatžolių apdorojimas KVR-CH kompleksu tirpalais

Paruošti 0,5 % koncentracijos CH ir KVR-CH kompleksų, turinčių 0,048 mol/mol ir 0,158 mol/mol KVR, tirpalai 1 % acto rūgšties tirpale. Tam reikiamas kiekis CH arba KVR-CH miltelių buvo užpilti 50 ml 1 % acto rūgšties tirpalu ir maišyti magnetine maišykle 2 h kambario temperatūroje.

Tyrimui atlikti buvo naudojama susmulkinti tamsiai žalios spalvos, turintys fitocheminių medžiagų kaip polifenoliai, kofeinas, flavanoidai, žaliosios arbatos lapeliai.

*Imirkymas paruoštais tirpalais.* 5 g žaliosios arbatos užpiltos paruoštais tirpalais. Palyginimui 5 g arbatžolių užpilti 50 ml distiliuoto vandens, 5 min maišytos stikline lazdele, nufiltruotos pro stiklinį filtrą ir išdžiovintos 65 °C temperatūroje.

*Užnešimas užpurškiant.* 5 g žaliosios arbatos žolelių paskleidžiamas plonu sluoksniu ir apipurškiami 15 ml paruoštu CH ar KVR-CH kompleksu tirpalu. Apdorotos žolelės išdžiovintos 65 °C temperatūroje.

### 2.2.13. KVR-CH kompleksų plėvelių gavimas

Buvo ruošiami 1 % (pagal chitozano kiekį komplekse) KVR-CH tirpalai arba dispersijos 1 % koncentracijos acto rūgšties tirpale. Tam atsvertas reikiamas KVR-CH miltelių užpiltas 35 ml 1 % acto rūgšties tirpalo ir maišytas 2 h magnetine maišykle kambario temperatūroje. 30 g gauto tirpalo arba dispersijos buvo supilami į 90 mm skersmens stiklines Petri lėkšteles padėtas ant svarstyklių. Petri lėkšteles su tirpalais buvo džiovinamos kambario temperatūroje. Gautos KVR-CH kompleksų išimtos iš Petri lėkštelių. Palyginimui taip paruošta CH plėvelė.

### 2.2.14. Rezultatų patikimumo įvertinimas

Iš gautų bandymo metu rezultatų buvo skaičiuojami aritmetiniai vidurkiai pagal formulę:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}; \quad (2.6)$$

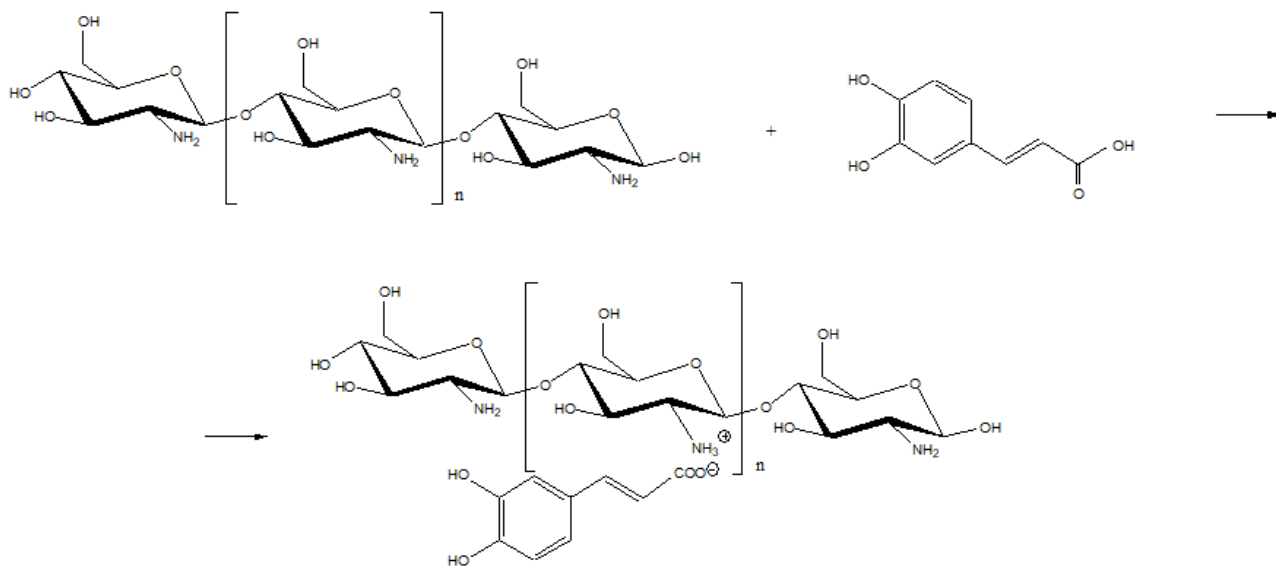
čia  $\bar{X}$  – aritmetinis vidurkis;  $N$  – bandymų skaičius;  $X_i$  – vieno bandymo rezultatas.

Aritmetinio vidurkio vidutinė kvadratinė paklaida apskaičiuojama pagal formulę:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{X} - X_i)^2}{N-1}}; \quad (2.7)$$

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Parūgštintuose tirpaluose, paprastai naudojami 0,5–1,0 % koncentracijos acto rūgšties tirpalai, jonizuojasi chitozanas (CH) pirminė aminogrupė ir jis ištirpsta. Atsiradusios teigiamo krūvio ženklo grupės gali dalyvauti elektrosstatinėje sąveikoje su mažomolekuliais anijoninių grupių turinčiais junginiais, tame tarpe kavos rūgštimi (KVR) [69]. Iš literatūros žinoma, kad KVR disociacijos konstanta pKa yra 4,47 [82]. Bandymuose naudotų vandeninių KVR tirpalų pH vertė buvo  $3,2 \pm 0,1$ . Todėl nedidelė KVR molekulių dalis tokia tirpale yra jonizuota. Disocijuojant KVR karboksigrūpei tirpale atsiradę laisvi vandenilio jonai, įbėrus pradinių CH miltelių, jonizuoja jo aminogrupes, visų pirma, esančias miltelių paviršiuje. Dėl elektrosstatinės sąveikos tarp jonizuotų KVR karboksigrūpių ir jonizuotų CH aminogrupių, susidaro KVR ir CH kompleksai (KVR-CH) (žr. 3.1 pav.). Kadangi KVR molekulės CH miltelių paviršiuje orientuojasi aromatinium žiedu į išorę, KVR-CH milteliai nespėja ištirpti. Taip gaunami netirpūs miltelių pavidalo KVR-CH kompleksai.



3.1 pav. Elektrosstatinė sąveika susidarant netirpiems KVR-CH kompleksams

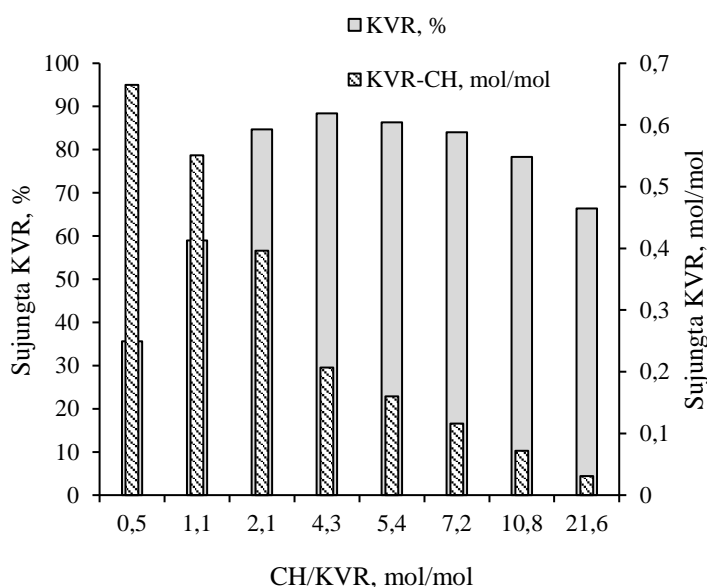
#### 3.1. KVR kiekis komplekse nuo reagentų santykio, nuo CH molinės masės, polielektrolininis titravimas

Yra žinoma, kad kompleksų tarp jonogeninių polimerų ir mažomolekulių junginių susidarymui turi įtakos reaguojančių komponentų molių santykis [83].

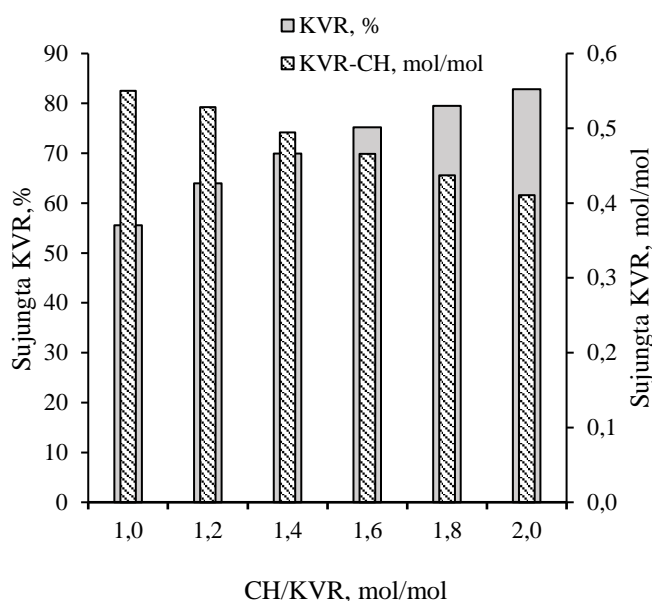
Todėl pirmajame darbo etape buvo ištirta KVR ir CH molių santykių įtaka CH milteliais adsorbuotos KVR kiekiui. Tik skirtingai nuo literatūroje aprašytų bandymų, kai kompleksams gauti

buvo maišomi kompleksą sudarančių junginių tirpalai, mūsų atveju tam tikras tiksliai atsvertas (pagal absoliučiai sausą masę) CH miltelių kiekis buvo užpilamas tam tikru reikiamos koncentracijos KVR tirpalo kiekiu. Pagal bandymo metu naudotų CH miltelių ir KVR tirpalo kiekį buvo apskaičiuotas KVR ir CH molekulių santykis, išreikštas CH molekuliais tenkančiais molekuliui KVR (CH/KVR, mol/mol). Susidarę KVR-CH komplekso milteliai buvo nufiltruoti, ir nustatius filtrate KVR koncentraciją, apskaičiuotas CH sujungtas KVR kiekis, kuris išreikštas tiek KVR molekuliais tenkančias vienam molekuliui CH (KVR-CH, mol/mol), tiek procentais nuo pradinės KVR koncentracijos tirpale. Gauti rezultatai pateikti 3.2 paveiksle, iš kurio matyti, kad į kompleksą sujungto KVR kiekis priklauso nuo kompleksą sudarančių medžiagų masių santykio.

Kai tirpale yra CH miltelių perteklius (CH/KVR molinis santykis yra 4,3 mol/mol ir daugiau), apie 90 % tirpale esančios KVR yra sujungiami į kompleksą. Tačiau perskaičiavus sujungtą KVR kiekį į molekulis tenkančias molekuliui CH, tokie kompleksai turi mažiau nei 0,2 mol/mol KVR. Efektyviausiai, įvertinus tiek sujungtą kiekį tiek mol/mol, tiek procentais, KVR yra sunaudojama, kai CH/KVR molinis santykis yra tarp 1,1 ir 2,1 mol/mol. Tikslu optimizuoti KVR-CH kompleksų gavimą, CH/KVR molinis santykis pradiniam tirpale jį keičiant nuo 1 mol/mol iki 2 mol/mol, kas 0,2 mol/mol. Gauti duomenys pateikti 3.3 paveiksle. Kaip matyti iš paveiksle pateiktų duomenų optimalus pradinis CH/KVR santykis yra 1,4–1,6 mol/mol. Esant tokiam pradiniam santykiui į kompleksą yra sujungiami 70–75 % tirpale buvusios rūgšties, ir gaunami KVR-CH komplekso milteliai turintis 0,47–0,49 mol/mol KVR.



3.2 pav. Į kompleksą sujungto KVR kiekio priklausomybė nuo pradinio KVR ir CH molekulių santykio



**3.3 pav.** Į kompleksą sujungto KVR kiekio priklausomybė nuo pradinio CH/KVR molekulių santykio

KVR-CH kompleksų susidarymui gali turėti CH molekulinė masė. Todėl KVR-CH kompleksams gauti, esant pradiniam CH/KVR molekulių santykiui 1,1, 2,1 ir 4,3 mol/mol, buvo naudotas mažos, vidutinės ir didelės molekulinės masės CH. Kaip matyti iš 3.1 lentelėje pateiktų duomenų, CH molekulinė masė neturėjo didesnės įtakos į kompleksą susijungtam KVR kiekiui. T. y. KVR-CH kompleksų susidarymui turi įtakos tik komplekse sudaryme dalyvaujančių junginių jonogeninių grupių skaičius, kas patvirtina elektrostatinę sąveiką tarp jonizuotų KVR karboksigrupių ir jonizuotų CH aminograpių.

**3.1 lentelė.** CH molekulinės masės ir pradinio CH/KVR molinio santykio įtaka į kompleksą sujungtam KVR kiekiui

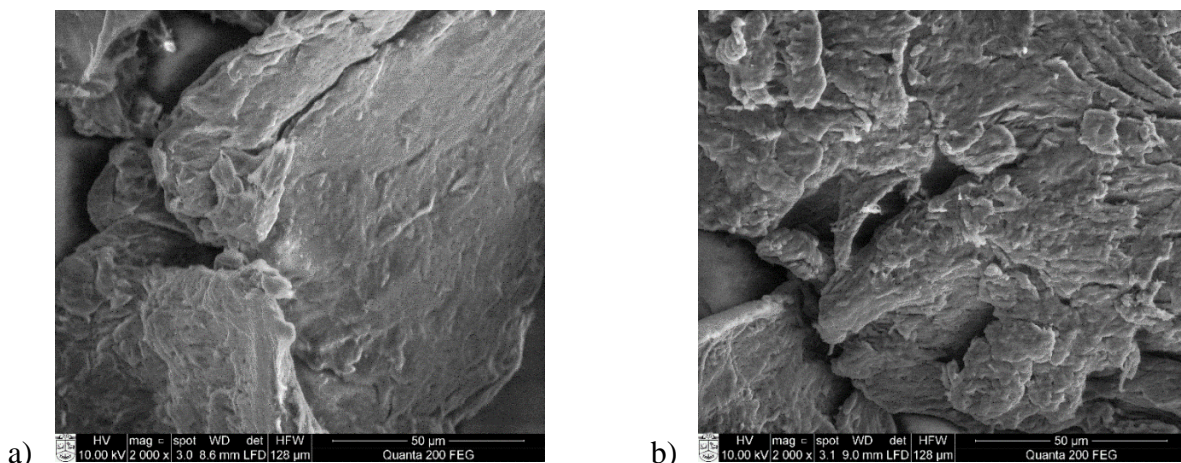
CH molekulinė masė	CH/KVR, mol/mol	Į kompleksą sujungtas KVR kiekis	
		mol/mol	%
Maža	1,1	0,55	59
	2,1	0,40	85
	4,3	0,21	88
Vidutinė	1,1	0,49	55
	2,1	0,36	77
	4,3	0,20	84
Didelė	1,1	0,56	60
	2,1	0,41	87
	4,3	0,21	92

Norėdami įsitikinti, ar esant CH miltelių pertekliui pradiniam tirpale, visos jo aminogrupės dalyvauja sąveikoje su KVR, filtratas, likęs nufiltravus kompleksus, kurie sudaryti esant CH/KVR molių santykiui 2,1 ir 4,3 mol/mol, buvo titruotas 0,001 mol/l koncentracijos dekstrano sulfato (DESU) tirpalu, kaip indikatorių naudojant toluidino mėlynąjį, kuris keičia spalvą iš mėlynos į violetinę, kai tirpale atsiranda DESU perteklius. Jeigu tirpale yra laisvų CH aminogrupių, jos dalyvauja sąveikoje su DESU. Titruojant mažos molekulinės masės CH tirpalą 1 % koncentracijos acto rūgštyje, sunaudotas DESU kiekis, išreikštas mol/l, atitiko CH koncentraciją titruojamajame tirpale, išreikštą mol/l. Tuo tarpu titruojant tirpalus, likusius nufiltravus KVR-CH komplekso miltelius, jau po pirmųjų DESU lašų indikatoriaus spalva pasikeitė iš mėlynos į violetinę, todėl galima buvo padaryti išvadą, kad CH laivų aminogrupių filtrate nėra.

Apibendrinant šiame skyriuje pateiktus duomenimis galima padaryti išvadą, kad netirpūs KVR-CH miltelių pavidalo kompleksai gali būti gauti užpilus CH miltelius KCR tirpalu. Priklausomai nuo pradinio CH ir KVR molių santykio galima gauti skirtingos sudėties kompleksus. Optimalus CH/KVR molinis santykis 1,4–1,6 mol/mol. Esant tokiam pradiniam santykiui į kompleksą yra sujungiamą 70–75 % tirpale buvusios rūgšties, ir gaunami KVR-CH komplekso milteliai, turintys 0,47–0,49 mol/mol KVR.

### 3.2. Kavos rūgšties adsorbcijos chitozono milteliais tyrimas pusiausvyros sąlygomis

Iš ankstesniame skyriuje pateiktų duomenų matyti, kad CH milteliai gali adsorbuoti tirpale esančią KVR. Po adsorbcijos tirpale lieka netirpūs KVR-CH komplekso milteliai. 3.4 paveiksle yra pateiktos 1000 kartų padidintos CH ir KVR-CH komplekso, turinčio 0,21 mol/mol adsorbuotos KVR, miltelių SEM nuotraukos. Iš pateiktų nuotraukų matyti, kad po KVR adsorbcijos išlieka pradinis CH miltelių pavidalas, t. y. momentaliai adsorbuojanti KVR CH miltelių paviršiuje, jie nespėja ištirpti ir išlaiko savo pradinę formą. Tačiau lyginant su CH miltelių paviršiumi, KVR-CH miltelių paviršius yra labiau gruoblėtas.



3.4 pav. 1000 kartų padidintos CH (a) ir KVR-CH (b), turinčio 0,21 mol/mol adsorbuotos KVR, SEM nuotraukos

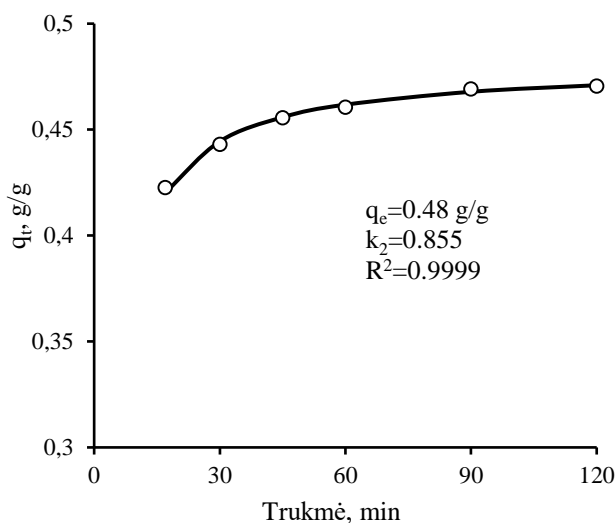
Daugiau informacijos apie adsorbcijos pobūdį galima gauti iš pusiausvirosios adsorbcijos duomenų, jiems parašyti pritaikius dviejų kintamųjų adsorbcijos modelius. Kadangi CH molekulinė masė neturi kiek didesnės įtakos KVR adsorbcijai (žr. 3.1 lent.), KVR pusiausvirosios adsorbcijos sąlygomis adsorbuota mažos molekulinės masės CH milteliai.

3.5 paveiksle yra pateikta kinetinė KVR adsorbcijos CH milteliais 30 °C temperatūroje kreivė, iš kurios matyti, kad adsorbcijos pusiausvyra yra pasiekiam po 120 min. Kinetinei kreivei aprašyti buvo pritaikytas pseudo-antrojo laipsnio kinetinis modelis, kurio tiesės lygtis yra tokia:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} \cdot t \quad (3.1)$$

čia:  $q_t$  – adsorbuotos rūgšties kiekis laiko momentu  $t$  (min.), g/g;  $q_e$  – adsorbuotos rūgšties kiekis pusiausviros sąlygomis, g/g;  $k_2$  – pseudo-antrojo laipsnio greičio konstanta,  $\text{min}^{-1}$ .

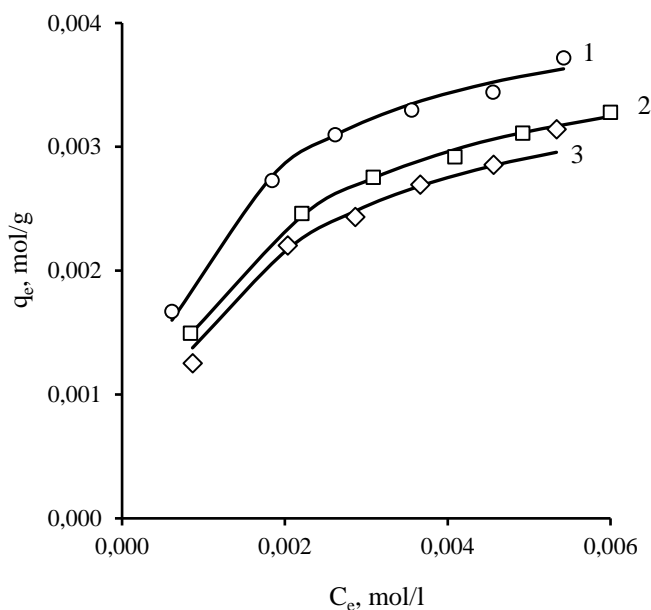
Naudojant šią lygtį buvo apskaičiuotos kinetinio modelio rodiklių  $q_e$  ir  $k_2$  vertės, kurios pateiktos 3.5 paveiksle. Naudojant šias vertes per eksperimentinius taškus nubrėžta teorinė kreivė.



**3.5 pav.** CH milteliais adsorbuoto KVR kiekio priklausomybė nuo trukmės 30 °C temperatūroje. Pradinė KVR koncentracija 0,6 g/l. Kreivė per eksperimentinius taškus nubrėžta naudojant pseudo-antrojo laipsnio kinetinio modelio rodiklių vertes

KVR iš tirpalo CH milteliais buvo adsorbuota iki pusiausviros sąlygomis 30 °C, 35 °C ir 40 °C temperatūroje, adsorbcija truko 120 min. Gautas adsorbcijos izotermės yra pateiktos 3.6 paveiksle.





**3.6 pav.** KVR adsorbcijos CH milteliais izotermės, kai adsorbcijos temperatūra: 1 – 30 °C; 2 – 35 °C; 3 – 40 °C.

Kreivės per eksperimentinius taškus nubraižytos naudojant Lengmiuro adsorbcijos modelio rodiklius

Adsorbcijos izotermėms aprašyti pritaikyti Lengmiuro, Freundlichio ir Dubinino-Radushkevichiaus dviejų kintamųjų adsorbcijos modeliai.

Lengmiuro adsorbcijos modelis [84] teigia, jog adsorbato molekulės vientisu sluoksniu padengia aktyvius adsorbento centrus. Adsorbato molekulei užėmus aktyvų centrą, šis nebedalyvauja adsorbcijoje, bei tarp gretimų aktyvių centrų užėmusių adsorbato molekulių nėra sąveikos. Taip pat adsorbento struktūra yra homogeniška, o visi aktyvūs centrai yra identiški ir energetiškai vienodi. Teoriškai adsorbento sorbcinė geba yra visiškai išnaudota, kai jame nelieka laisvų aktyvių centrų. Lengmiuro adsorbcijos modelio lygtys yra tokios:

$$q_e = \frac{K_L \cdot Q_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (3.2)$$

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_L \cdot K_L} + \frac{1}{Q_L} C_e \quad (\text{tiesinė lygtis}) \quad (3.3)$$

čia:  $q_e$  – adsorbato kiekis adsorbente, g/g arba mmol/g, o  $C_e$  – adsorbtyvo kiekis tirpale, g/l arba mmol/l pusiausvyros sąlygomis;  $Q_L$  – maksimalus adsorbato kiekis adsorbento masės vienetui, kuriam esant adsorbento paviršius pilnai padengiamas adsorbato monosluoksniu (Lengmiuro sorbcinė geba), g/g arba mmol/g;  $K_L$  – Lengmiuro pusiausvyros konstanta, l/g arba l/mmol.

Freundlichio adsorbcijos modelis [85] tvirtina, kad vyksta daugiasluoksnė adsorbcija, tai yra adsorbato kiekis adsorbente didėja tol, kol didėja adsorbato koncentracija tirpale. Minėtas modelis

aprašo adsorbciją ant heterogeninių paviršių, turinčių vienodus energetinius centrus, ir galimą sąveiką tarp adsorbuotų adsorbato molekulių. Freundlichio modelio lygtys pateiktos:

$$q_e = K_F \cdot C_e^{\frac{1}{n_F}} \quad (3.4)$$

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n_F} \ln C_e \quad (\text{tiesės lygtis}) \quad (3.5)$$

čia:  $n_F$  – bedimensinė Freundlichio konstanta;  $K_F$  – Freundlichio konstanta, apibūdinanti santykinę adsorbento sorbcinę gebą

Dubinino-Radushkevicho adsorbcijos modelis [86] daugiau informacijos suteikia apie adsorbcijos mechanizmą bei prigimtį, kuris remiasi Dubinino prielaida, kad adsorbatas užsipildo adsorbento mikroporų tūrį, o ne sluoksnis po sluoksnio padengia adsorbento porų sienelės, bei Polanyi adsorbcijos potencialo teorija. Dubinino-Radushkevicho adsorbcijos modelio pateiktos lygtys:

$$q_e = Q_{DR} \exp(-\beta \varepsilon^2) \quad (3.6)$$

$$\ln q_e = \ln Q_{DR} - \beta \varepsilon^2 \quad (\text{tiesės lygtis}) \quad (3.7)$$

čia:  $\beta$  – konstanta susijusi su laisvąja adsorbcijos energija, mol<sup>2</sup>/kJ<sup>2</sup>;  $Q_{DR}$  – maksimalus adsorbuotas adsorbato kiekis (Dubinino-Radushkevicho sorbcinė geba), mmol/g;  $\varepsilon$  – Polanyi potencialas apskaičiuojamas taip:

$$\varepsilon = RT \ln \left( 1 + \left( \frac{1}{C_e} \right) \right) \quad (3.8)$$

čia:  $R$  – universalioji dujų konstanta, J/(mol·K);  $T$  – temperatūra, K

Atidėjus priklausomybę tarp  $\varepsilon^2$  ir  $\ln q_e$  iš gautos tiesės polinkio ir atkirtimo galima apskaičiuoti  $\beta$  ir  $Q_{DR}$  vertes. Dubinino-Radushkevicho adsorbcijos energija  $E_{DR}$  (kJ/mol) apskaičiuojama, žinant konstantos  $\beta$  vertę:

$$E_{DR} = \frac{1}{\sqrt{2\beta}} \quad (3.9)$$

Apskaičiuotos pagrindinės Lengmiuro, Freundlichio ir Dubinino-Radushkevichiaus modelių rodiklių vertės kartu su tiesės pasiklivimo lygmens  $R^2$  vertėmis yra pateiktos 3.2 lentelėje.

**3.2 lentelė.** Temperatūros įtaka KVR adsorbcijos CH milteliais izotermių Lengmiuro, Freundlichio ir Dubinino-Radushkevichiaus adsorbcijos modelių rodiklių vertėms

Adsorbcijos temperatūra, °C	Lengmiuro modelis			Freundlichio modelis		Dubinino-Radushkevichiaus modelis	
	$Q_L$ , mmol/g	$EF$ , mol/mol	$R^2$	$n_F$	$R^2$	$E_{DR}$ , kJ/mol	$R^2$
30	4,33	0,70	0,9968	2,8	0,9767	10,5	0,9888
35	4,02	0,65	0,9967	2,5	0,9719	10,0	0,9853
40	3,80	0,61	0,9971	2,0	0,9743	9,2	0,9840

Kaip matyti iš lentelėje pateiktų koreliacijos koeficiento verčių su didžiausia tikimybe ( $R^2 > 0,99$ ) KVR adsorbcijos CH milteliais izotermes aprašo Lengmiuro adsorbcijos modelis. Tai patvirtina, kad KVR adsorbcija CH milteliais vyksta esant elektrostatinei sąveikai tarp jonizuotų KVR karboksigrupių ir CH aminograpių – aktyviais adsorbento centrais. Naudojant Lengmiuro sorbcinės gebos vertes buvo apskaičiuotos CH aminograpių efektyvumo ( $EF$ ) sujungiant KVR vertės, išreikštos KVR molių skaičiumi tenkančiu vienai CH aminogrupei. Jeigu visos CH aminogrupės dalyvautų sujungiant tirpale esančius KVR anijonas,  $EF$  vertė būtų 1 mol/mol. Kaip matyti iš 3.2 lentelėje pateiktų duomenų Lengmiuro sorbcinės gebos  $Q_L$  vertės, o tuo pačiu ir  $EF$  vertės mažėja didėjant adsorbcijos temperatūrai. Tokia temperatūros įtaka adsorbcijos rezultatams yra būdinga chemisorbcijai. Daugiausiai KVR CH milteliais yra adsorbuojama 30 °C temperatūroje.  $EF$  vertės mažėja nuo 0,7 mol/mol 30 °C temperatūroje iki 0,61 mol/mol 40 °C temperatūroje ir parodo, kad ne visos CH aminogrupės yra vienodai prieinamos sąveikai su KVR. Adsorbcijos pradžioje KVR molekulės yra adsorbuojamos CH miltelių paviršiuje. Susidaręs adsorbuotų KVR molekulių sluoksnis gali apsunkinti kitų KVR molekulių difuzijai į CH miltelių vidų.

Kiek su mažesnėmis pasiklivimo lygmens vertėmis,  $R^2 > 0,98$  ir  $R^2 > 0,97$  adsorbcijos izotermes aprašo, atitinkamai, Dubinino-Radushkevichiaus ir Freundlichio adsorbcijos modeliai (žr. 3.2 lent.).

Freundlichio konstantos ( $n_F$ ) vertė naudojama adsorbcijos sąlygoms įvertinti [87]. Jeigu  $n_F$  vertė yra tarp 2 ir 10, sąlygos adsorbcijai vykti yra palankios. Kai  $n_F$  vertės yra tarp 1 ir 2, adsorbcija vyksta sunkiai, o jeigu  $n_F < 1$ , sąlygos adsorbcijai yra nepalankios. Kaip 3.2 lentelėje pateiktų duomenų, didėjant adsorbcijos temperatūrai nuo 30 °C iki 40 °C, konstantos  $n_F$  vertės sumažėja nuo 2,8 iki 2,0 ir parodo, kad sąlygos adsorbcijai nepakankamai palankios.

Iš apskaičiuotų Dubinino-Radushkevichiaus adsorbcijos energijos ( $E_{DR}$ ) verčių spręsti galima apie adsorbcijos prigimtį [88]: jei  $E_{DR}$  vertė yra tarp 8 ir 16 kJ/mol, adsorbcija vyksta dėl jonų mainų,

kai  $E_{DR}$  vertė yra mažesnė kaip 8 kJ/mol, adsorbciją lemia fizikinės sąveikos jėgos. Kaip matyti iš 3.2 lentelėje pateiktų duomenų, didėjant adsorbcijos temperatūrai  $E_{DR}$  vertės mažėja nuo 10,5 kJ/mol (30 °C temperatūroje) iki 9,2 kJ/mol (40 °C temperatūroje). Tokios  $E_{DR}$  vertės patvirtina, kad KVR yra adsorbuojama vykstant jonų mainams tarp CH ir KVR.

### 3.3. Kavos rūgšties adsorbcijos chitozano milteliais termodinamika

Naudojant 3.5 paveiksle pateiktų izotermių duomenis, buvo apskaičiuotos KVR adsorbcijos CH milteliais termodinaminių rodiklių Gibso laisvosios energijos ( $\Delta G$ ), entalpijos ( $\Delta H$ ) ir entropijos ( $\Delta S$ ) pokyčių, vertės pagal formules:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_C; \quad (3.9)$$

$$\ln K_C = \frac{\Delta S^{\circ}}{R} - \frac{\Delta H^{\circ}}{RT}; \quad (3.10)$$

čia:  $K_C$  – termodinaminė pasiskirstymo konstanta, tarp adsorbato kiekio adsorbente ( $q_e$ , mol/g) ir adsorbtyvo kiekio tirpale ( $C_e$ , mol/l) pusiausvyros sąlygomis;  $T$  – temperatūra, K;  $R$  – universalioji dujų konstanta, J/mol·K.

Termodinaminės pasiskirstymo konstantos  $K_C$  vertė gali būti gauta atidėjus eksperimentinius duomenis koordinatėse  $\ln q_e/C_e$  nuo  $q_e$ . Gautos tiesės lygties atkirtimas yra  $\ln K_C$  [89]. Žinant  $\ln K_C$  vertes,  $\Delta H^{\circ}$  ir  $\Delta S^{\circ}$  vertės yra apskaičiuojamos iš tiesės polinkio ir atkirtimo, atidėjus priklausomybę  $\ln K_C$  nuo  $1/T$ .

KVR adsorbcijos CH milteliais termodinaminių rodiklių vertės kartu su  $R^2$  vertėmis yra pateiktos 3.3 lentelėje.

**3.3 lentelė.** KVR adsorbcijos CH milteliais termodinaminių rodiklių vertės

Adsorbcijos temperatūra, °C	$\Delta G$ , kJ/mol	$R^2$	$\Delta H$ , kJ/mol	$\Delta S$ , J/mol·K	$R^2$
30	-5,6	0,9786	-77	-299	0,9807
35	-4,2	0,9684			
40	-2,6	0,9885			

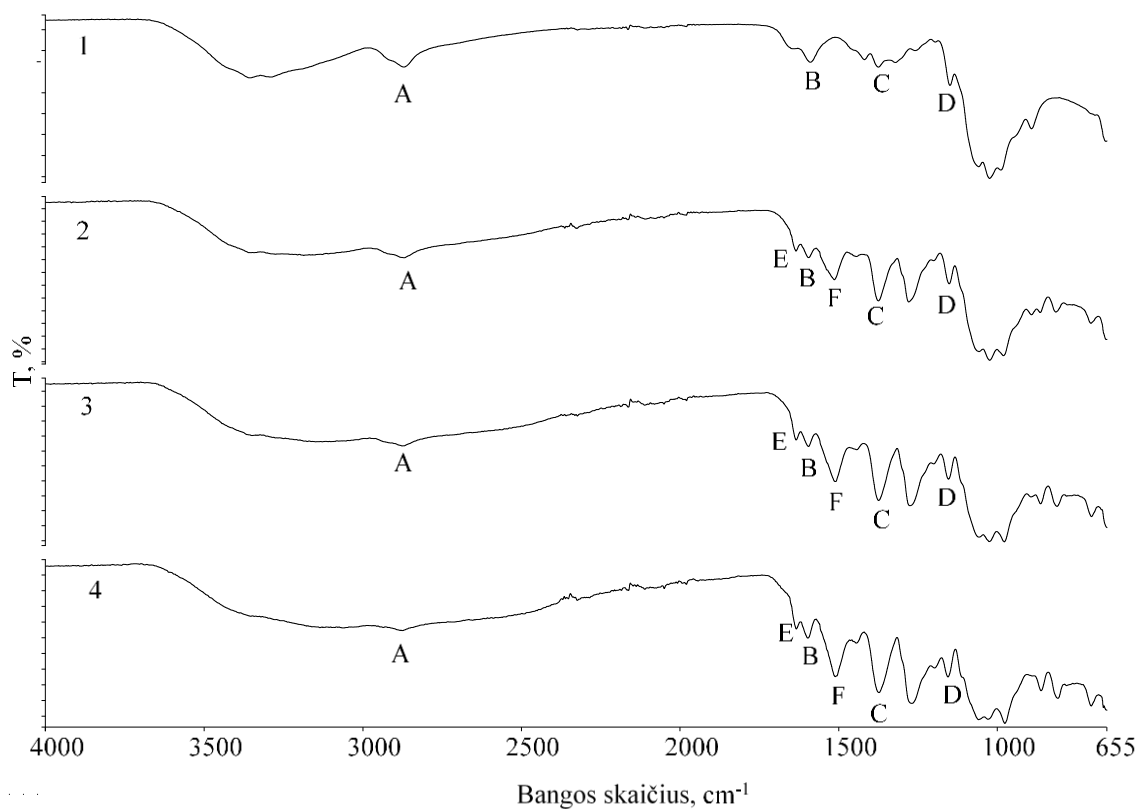
Gibso laisvosios energijos pokyčio  $\Delta G^{\circ}$  vertė suteikia informacijos apie adsorbato giminiškumą adsorbentui ir adsorbcijos varomąsias jėgas. Kuo didesnė neigiama  $\Delta G^{\circ}$  vertė, tuo spontaniškesnė

adsorbicija, tuo daugiau adsorbato, nusistovėjus pusiausvyrai, yra sujungta adsorbentu. Kaip matyti iš 3.3 lentelėje pateiktų neigiamų  $\Delta G$  verčių, KVR adsorbicija CH milteliais yra spontaniška, tačiau adsorbicijos spontaniškumas KVR giminiškumas CH ženkliai mažėja didėjant adsorbicijos temperatūrai. Temperatūrai padidėjus 10 laipsnių (nuo 30 °C iki 40 °C), neigiama Gibso laisvosios energijos pokyčio vertė sumažėja dvigubai. Didelės neigiamos entalpijos  $\Delta H$  ir entropijos  $\Delta S$  pokyčių vertės rodo, kad KVR adsorbicija CH milteliais yra egzoterminė ir sistemos tvarka adsorbicijos išdavoje padidėja.

### 3.4. KVR-CH kompleksų FT-IR analizė

Atsižvelgiant į 3.1 skyriuje aprašytą pradinio CH ir KVR molių santykio įtaką gautų KVR-CH kompleksų sudėčiai, buvo gauti KVR-CH kompleksų, turinčių 0,275 mol/mol, 0,40 mol/mol ir 0,67 mol/mol adsorbuotos KVR, milteliai ir užrašyti jų FT-IR spektrai, kurie pateikti 3.7 paveiksle. Šiame paveiksle pateiktas ir CH FT-IR spektras.

FT-IR spektrų analizė patvirtina KVR-CH kompleksų susidarymą. CH FT-IR spektre (žr. 3.7 pav., 1 kr.) yra eilė jam būdingų smailių [71, 90]. Tai smailė ties 2868  $\text{cm}^{-1}$  (smailė A) būdinga piranozės žiedui, smailė ties 1597  $\text{cm}^{-1}$  (smailė B) ir smailė ties 1377  $\text{cm}^{-1}$  (smailė C), būdingos, atitinkamai, N–H jungties virpesiams amino- ir amidogrupėse bei smailė ties 1154  $\text{cm}^{-1}$  (smailė D), susijusi su virpesiais glikozidinėje jungtyje. Šios smailės išlieka ir KVR-CH FT-IR spektruose (žr. 3.7 pav., 2–4 kr.), tačiau keičiasi kai kurių iš jų intensyvumas. Smailės A intensyvumo sumažėjimas gali būti paaiškintas CH kiekio mažėjimu KVR-CH komplekse, turinčiame daugiau adsorbuotos KVR. CH būdingų smailių B ir D intensyvumas praktiškai nesikeičia, tuo tarpu smailės C ties 1377  $\text{cm}^{-1}$  intensyvumas ženkliai išauga, nes persidengia su KVR –O–H grupei būdingas virpesiais [91, 92] ir patvirtina sąveiką tarp CH ir KVR. Be to, KVR-CH spektruose atsiranda ir kitos KVR būdingos smailės: ties 1633  $\text{cm}^{-1}$  (smailė E) būdinga –C=O grupės virpesiams, ties 1510  $\text{cm}^{-1}$  (smailė F), siejama su KVR fenolio žiedu, ir ties 1277  $\text{cm}^{-1}$  (smailė H), siejama su KVR karboksigrūpei būdingais virpesiais. Šių grupių intensyvumas didėja, didėjant KVR kiekiui komplekse.

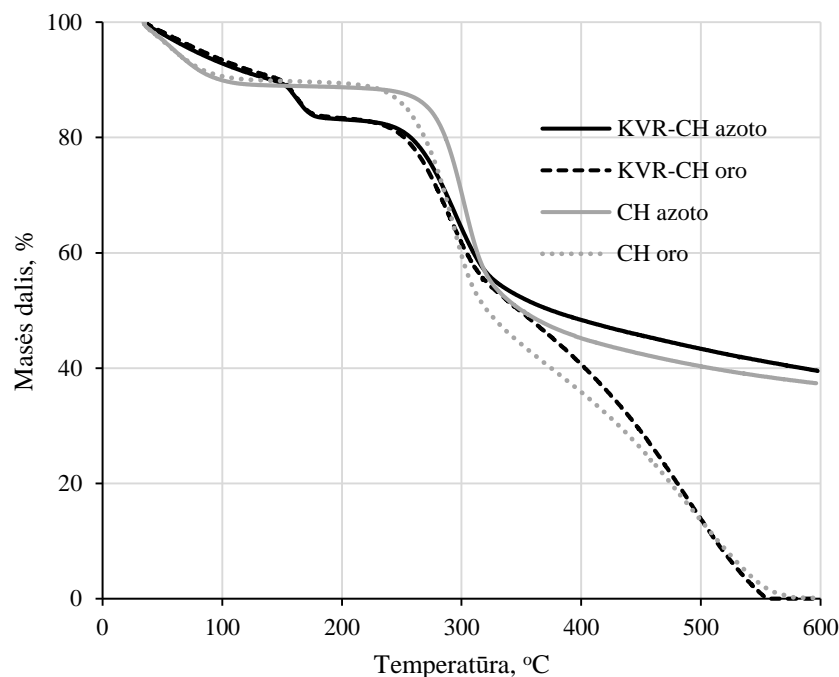


**3.7 pav.** FT-IR spektrai CH (1) ir KVR-CH kompleksų, kurių sudėtis, mol/mol: 2 – 0,275 3 – 0,40; 4 – 0,67

### 3.5. KVR-CH kompleksų TG analizė

KVR-CH kompleksai gali būti panaudoti kaip priedas pagerinantis maisto produktų ar maisto papildų antioksidacines savybes. Maisto produktų gamyboje dažnai yra naudojamas terminis apdorojimas. Todėl vienas iš šio darbo uždavinių buvo ištirti KVR-CH kompleksų terminę destrukciją.

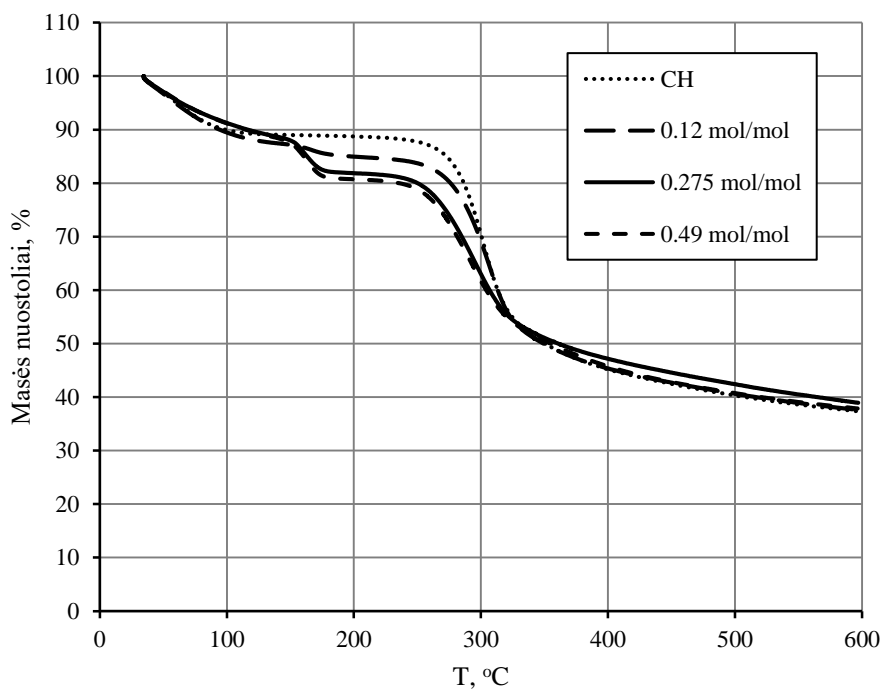
CH ir KVR-CH, turinčio 0,275 mol/mol KVR, TG kreivės užrašytos keliant temperatūrą 10 °C/min greičiu oro ir azoto aplinkoje, yra pateiktos 3.8 paveiksle.



**3.8 pav.** CH ir KVR-CH, turinčio 0,275 mol/mol KVR, TG kreivės oro ir azoto aplinkoje. Temperatūros kėlimo greitis 10 °C/min

Terminiškai inicijuoti CH ir KVR-CH masės pokyčiai azoto aplinkoje gali būti suskirstyti, atitinkamai, į dvi ir tris stadijas, o oro aplinkoje į tris ir keturias (žr. 3.8 pav.). Pirmojoje stadijoje nepriklausomai nuo naudojamos atmosferos tiek iš CH, tiek iš KVR-CH miltelių pasišalinam drėgmė ir neįtakoja pačio komplekso destrukcijos. Toliau keliant temperatūrą CH ir KVR-CH terminė destrukcija skiriasi. Kaitinant CH miltelius temperatūroje aukštesnėje nei 200 °C prasideda polimero terminė destrukcija, kuri oro aplinkoje vyksta intensyviau. Analogiški rezultatai buvo gauti ir kitų tyrėjų [93, 94]. Tuo tarpu kaitinant KVR-CH miltelius temperatūroje virš 150 °C prasideda antra terminės destrukcijos stadija, kurioje iš komplekso pasišalina dalis KVR, ir kurios vyksmas nepriklauso nuo kaitinimo aplinkos. Trečioji KVR-CH kompleksų terminės destrukcijos stadija vyksta temperatūrų intervale panašiam CH terminės destrukcijos, todėl siejama su komplekse esančio polimero destrukcija. Šios stadijos vyksmas taip pat mažai priklauso nuo kaitinimo metu naudotos atmosferos sudėties. Terminėi destrukcijai vykstant oro aplinkoje sekančioje stadijoje (trečioje CH atveju ir ketvirtoje KVR-CH atveju) sudega CH ir komplekso destrukcijos produktai. Azoto aplinkoje lieka termiškai stabilus anglinis likutis. KVR-CH komplekso terminės destrukcijos mechanizmas tiek ore, tiek azoto aplinkoje iki trečios stadijos pabaigos yra vienodas. Todėl galima teigti, kad ore esantis deguonis neinicijuoja terminės komplekso destrukcijos. Reikia atkreipti dėmesį, kad vieno CH terminė destrukcija oro aplinkoje yra intensyvesnė.

Skirtingą KVR kiekį turinčių KVR-CH kompleksų terminės destrukcijos azoto aplinkoje kreivės yra pateiktos 3.9 paveiksle. KVR-CH kompleksų antros ir trečios stadijų pradžios ir pabaigos temperatūrų bei masės nuostolių priklausomybė nuo KVR kiekio komplekse yra pateikta 3.4 lentelėje.



**3.9 pav.** CH ir įvairios sudėties KVR-CH kompleksų TG kreivės. Temperatūros kėlimo greitis 10 °C/min, aplinka – azoto

**3.4 lentelė.** CH ir KVR-CH kompleksų masės pokyčių charakteringieji duomenys iš TG kreivių. Temperatūros kėlimo greitis 10 °C/min, azoto aplinka

Bandinys	II stadija			III stadija		
	T <sub>pr</sub> , °C	T <sub>pb</sub> , °C	m <sub>pb</sub> , %	T <sub>pr</sub> , °C	T <sub>pb</sub> , °C	m <sub>pb</sub> , %
CH	-	-	-	278	325	48,7
KVR-CH 0,12 mol/mol	158	179	85,2	279	329	48,8
KVR-CH 0,275 mol/mol	153	174	82,3	260	326	50,3
KVR-CH 0,49 mol/mol	150	174	81,0	259	323	50,9

Pastabos: T<sub>pr</sub> – terminės destrukcijos pradžios temperatūra; T<sub>pb</sub> – terminės destrukcijos pabaigos temperatūra; m<sub>pb</sub> – masės nuostoliai terminės destrukcijos pabaigoje

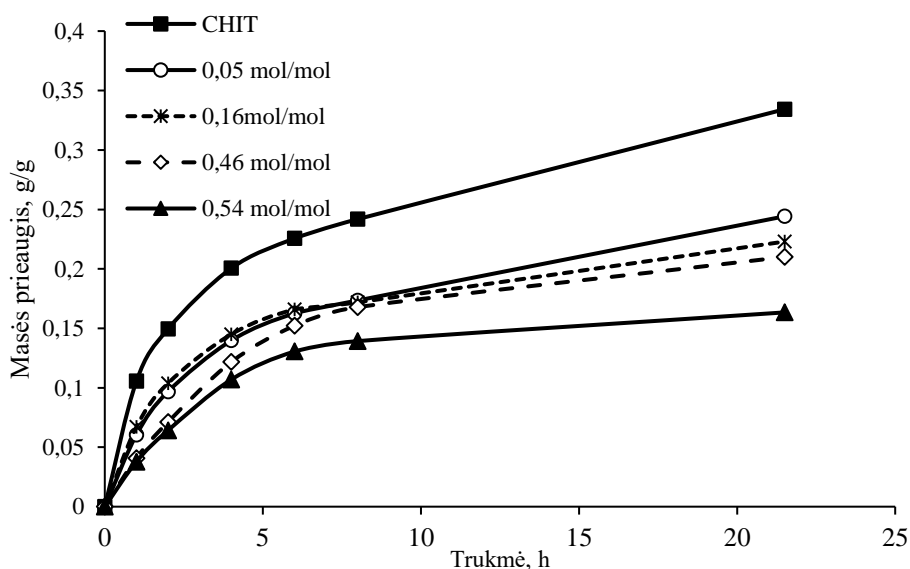
Kaip matyti iš 3.9 paveiksle ir 3.4 lentelėje pateiktų duomenų, didėjant KVR-CH komplekse KVR kiekiui tiek antra (KVR pasiūalinimo iš komplekso), tiek trečia (komplekso destrukcijos)



terminės destrukcijos stadijas prasideda vis žemesnėje temperatūroje. Tuo tarpu abiejų stadijų pabaigos temperatūrai KVR kiekio didėjimas komplekse didesnės įtakos neturi. Masės nuostoliai pasibaigus antrajai stadijai taip pat priklauso nuo į kompleksą sujungtos KVR kiekio, t. y. iš daugiau KVR turinčių kompleksų masės nuostoliai antrojoje stadijoje yra didesni. Įvertinus komplekse esančios KVR kiekį bei masės nuostolius antrojoje stadijoje, atmetus pašalintą drėgmę, gauta, kad nepriklausomai nuo KVR-CH sudėties antrojoje iš komplekso pašalinama apie 25 % sujungtos KVR. Likusi KVR nekeičia CH terminės destrukcijos eigos tik sumažina trečiosios stadijos pradžios temperatūrą.

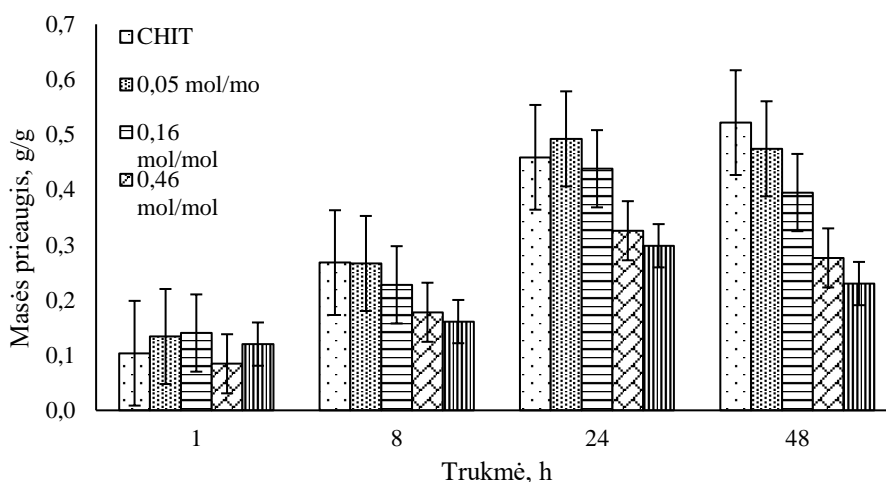
### 3.6. Vandens garų sugertis KVR-CH milteliais arba plėvelėmis

Adsorbuojantis CH miltelių paviršiuje dėl elektrostatinės sąveikos KVR molekulių karboksigrupės tampa nukreiptos į CH miltelių paviršių, o aromatinis žiedas su hidroksigrupėmis į išorę. Dėl tokio išsidėstymo turėtų keistis KVR-CH kompleksų paviršiaus hidrofobiškumas. Jam įvertinti buvo ištirta drėgmės sugertis skirtingos sudėties KVR-CH milteliais. Palyginimui buvo įvertinta drėgmės sugertis pradinio CH milteliais. Kaip matyti iš 3.10 paveiksle pateiktų duomenų, net nedidelis adsorbuotos KVR kiekis ženkliai sumažina komplekso miltelių giminškumą vandens garams. Ypatingai mažiau vandens garų adsorbavo KVR-CH milteliai, turintys 0,54 mol/mol adsorbuotos KVR. Po 24 h laikymo eksikatoriuje su 92 % drėgniu tokios sudėties kompleksas adsorbavo du kartus mažiau drėgmės nei chitozanas.



3.10 pav. KVR-CH kompleksų miltelių masės prieaugio dėl drėgmės sugerties priklausomybė nuo trukmės ir komplekso sudėties

Iš KVR-CH kompleksų, turinčių skirtingą adsorbuotos KVR kiekį buvo paruošti tirpalai arba dispersijos 1 % acto rūgšties tirpale ir išlietos plėvelės. Kaip ir KVR-CH kompleksų miltelių, taip ir plėvelių buvo nustatyta drėgmės sugertis išlaikant 92 % drėgmės eksikatoriuje. Gausti duomenys pateikti 3.11 paveiksle, iš kurio matyti, kad kaip ir miltelių, taip ir iš kompleksų gautų plėvelių hidrofobiškumas didėja didėjant KVR kiekiui. Be to, skirtumas tarp sugertos drėgmės kiekio skirtingos sudėties KVR-CH kompleksų plėvelėmis didėjant ilgėjant išlaikymo eksikatoriuje trukmei. Todėl galima galvoti, kad tokių kompleksų panaudojimas maisto ar farmacijos produktuose leistų sumažinti juose drėgmės kiekį ir dėl to prailginti produkto galiojimo trukmę.



**3.11 pav.** KVR-CH kompleksų plėvelių masės prieaugio dėl drėgmės sugerties priklausomybė nuo trukmės ir komplekso sudėties

### 3.7. Kavos rūgšties desorbcija iš KVR-CH kompleksų miltelių

Norint panaudoti KVR-CH kompleksus praktiniams tikslams svarbus yra ne tik adsorbuotas KVR kiekis, bet ir galimybė atpalaiduoti KVR iš KVR-CH kompleksų tam į tam tikras terpes. Buvo ištirtas KVR atpalaidavimas iš kompleksų į keturias terpes: distiliuotą vandenį, 0,1 M fosfatinio buferio, kurio pH vertė yra 6,8 (modelinė žarnyno terpė), ir 0,1 M HCl (modelinė skrandžio terpė) tirpalus bei etanolis. Desorbuotas KVR kiekis pateiktas 3.5 lentelėje.

**3.5 lentelė.** Desorbuotas KVR kiekis į komplekso, turinčio 0,21 mol/mol adsorbuotos KVR, į skirtingas terpes

Terpė	Atpalaiduotas KVR kiekis, %
Distiliuotas vanduo	12,4
0,1 N HCl	92,9
Fosfatinis buferis, pH=6,8	98,2
Etanolis	5,0

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad daugiausiai iš kompleksų KVR buvo desorbuota į fosfatinio buferio tirpalą. 0,1 M HCl tirpale kompleksai ištirpo, tačiau ne visas su kompleksu milteliais įdėtas KVR kiekis buvo rastas desorbicijos tirpale. Galimas galvoti, kad iš tirpaus KVR-CH kompleksu KVR taip pat ne visada gali būti atpalaiduota. Labai nedaug tik 5 % KVR buvo desorbuota į distiliuotą vandenį ir kiek virš 12 % – į etanolį.

3.6 lentelėje yra pateikti duomenis apie KVR atpalaidavimą į fosfatinio buferio tirpalą, kurio pH vertė yra 6,8, iš skirtingą adsorbuotos KVR kiekį turinčių KVR-CH kompleksų. Kaip matyti iš pateiktų desorbuotos KVR kiekis priklauso nuo kompleksu sudėties. Didėjant į kompleksą su CH sujungtam KVR kiekiui, pradžioje į fosfatinį buferį yra atpalaiduojama vis daugiau KVR. Kai KVR kiekis komplekse tampa didesnis kaip 0,21, atpalaiduotos į terpę KVR kiekis pradeda mažėti.

**3.6 lentelė.** Desorbuoto į fosfatinį buferį KVR kiekio priklausomybė nuo KVR-CH kompleksu sudėties

KVR-CH sudėtis, mol/mol	Atpalaiduotas KVR kiekis, %
0,03	83,3
0,07	85,8
0,12	90,8
0,16	93,4
0,21	94,5
0,4	91,3
0,55	87,2
0,67	74,9

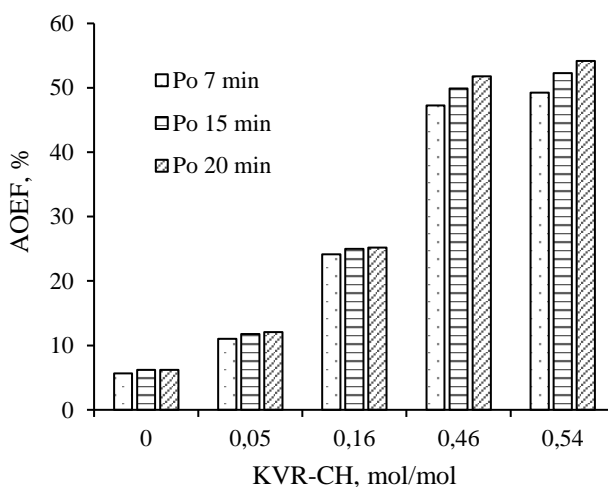
### 3.8. KVR-CH kompleksų ir jais apdorotų arbatžolių antioksidacinis efektyvumas

KVR pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, dėl dviejų hidroksigrupių benzeno žiede. Antioksidacinėmis savybėmis turėtų pasižymėti ir KVR-CH kompleksai. Antioksidacinės KVR-CH kompleksu savybės įvertintos ABTS metodu ir palygintos su vieno CH antioksidacinėmis savybėmis. 3.12 paveiksle pateikta po 7, 15, 20 min nustatyto antioksidacinio efektyvumo (*AOEF*, %) priklausomybė nuo prijungto KVR kiekio KVR-CH komplekse.

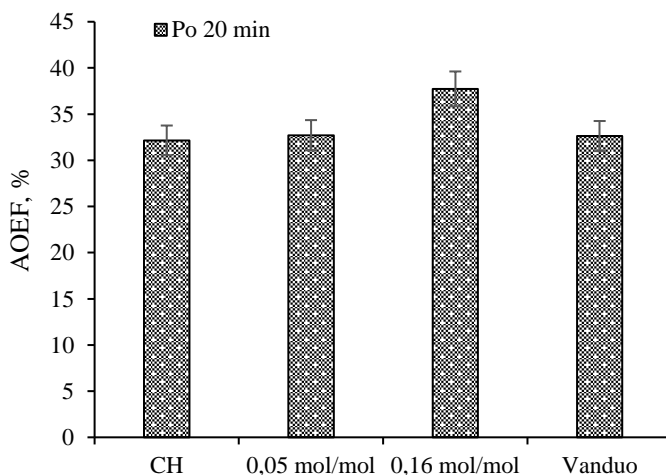
Iš gautų duomenų matyti, kad nedideliu antioksidaciniu efektyvumu pasižymi ir vienas CH. Adsorbuota CH milteliais KVR ženkliai padidina Ch antioksidacinį efektyvumą, kuris didėja didėjant adsorbuotos KVR kiekiui KVR-CH komplekse iki 0,46 mol/mol. Padidinus KVR kiekį iki 0,54 mol/mol antioksidacinis kompleksu efektyvumas praktiškai nepasikeitė

KVR-CH kompleksai galėtų būti panaudoti arbatžolių antioksidacinių savybių praturtinimui. Pasirinktos žaliosios arbatos arbatžolės. Jų apdorojimui buvo pasirinkti KVR-CH kompleksai turintys 0,05 ir 0,16 mol/mol adsorbuotos KVR. Tokios sudėties kompleksai pasirinkti dėl didesnio jų tirpumo

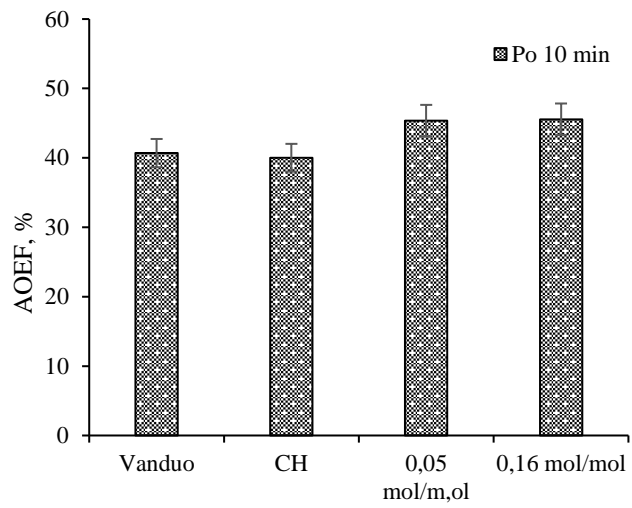
1 % acto rūgšties tirpale. KVR-CH kompleksais arbatžolės buvo apdorotos dviem būdais: įmirkant žoleles paruoštuose tirpaluose arba paruoštus tirpalu užpurškiant ant žolelių. Palyginimui žolelės buvo apdorotos distiliuotu vandeniniu arba CH tirpalu 1 % acto rūgštyje. Gauti rezultatai pateikti 3.13 ir 3.14 paveikslė. Iš paveiksluose pateiktų duomenų galima padaryti tokias išvadas. Didesniu antioksidaciniu efektyvumu pasižymėjo arbatžolės, ant kurių apdorojimo tirpalai buvo užpurškšti. To priežastimi gali būti dalies pačiose arbatžolėse esančių bioaktyvių junginių pasišalinimu įmirkimo metu. Todėl geresnis būdas apdoroti arbatžoles būtų, jas apipurškšti KVR-CH kompleksų tirpalais. Apdorojus arbatžoles bet kuriuo būdu KVR-CH tirpalais, jų antioksidacinis efektyvumas buvo kiek didesnis nei apdorotų distiliuotu vandeniu ar tik CH turinčiu tirpalu.



3.12 pav. KVR-CH kompleksų antioksidacinio efektyvumo (AOEF) priklausomybė nuo KVR kiekio komplekse



3.13 pav. Įmirkytų žaliosios arbatos antioksidacinio aktyvumo (AOEF) priklausomybė nuo apdorojimui naudoto tirpalo sudėties



**3.14 pav.** Užpurškiant apdorotų žaliosios arbatos antioksidacinio aktyvumo (*AOEF*) priklausomybė nuo apdorojimui naudoto tirpalo sudėties

## Išvados

1. Netirpūs miltelių pavidalo kavos rūgštis ir chitozono kompleksai (KVR-CH) gauti adsorbuojant kavos rūgštį (KVR) iš tirpalų pradiniais chitozono (CH) milteliais. Imobilizuotos komplekse KVR kiekis priklauso nuo KVR ir CH molinio santykio pradiniam tirpale. Esant optimaliam santykiui (1, 4–1,6 mol/mol) į kompleksą yra sujungiama 70–75 % tirpale esančios KVR, ir gaunami KVR-CH kompleksai, turintys 0,47–0,49 mol/mol imobilizuotos KVR. CH molekulinė masė neturi įtakos gaunamų kompleksų sudėčiai. Kompleksų sudėtis patvirtinta FT-IR spektroskopija.
2. Ištirta pusiausviroji KVR adsorbcija CH milteliais skirtingose temperatūrose. Gautoms adsorbcijos izotermėms aprašyti pritaikyti dviejų kintamųjų adsorbcijos modeliai bei apskaičiuoti termodinaminiai rodikliai:
  - 2.1. Su didžiausia tikimybe KVR adsorbcija CH milteliais aprašo Lengmiuro adsorbcijos modelis, kuris patvirtina, kad adsorbcija vyksta dėl elektrostatinės sąveikos tarp rūgštinėje terpėje jonizuotų CH aminogrupių ir KVR karboksigrupių.
  - 2.2. Neigiamos Gibso laisvosios energijos pokyčio vertės parodė, kad KVR adsorbcija CH milteliais vyksta spontaniškai, tačiau giminiškumas mažėja didėjant temperatūrai. Adsorbcija yra egzoterminis procesas ir sistemos tvarka adsorbcijos metu didėja.
3. Daugiausia KVR iš KVR-CH kompleksų desorbuojama į fosfatinį buferinį tirpalą, kurio pH vertė yra 6,8, tačiau atpalaiduotos KVR kiekis priklauso nuo komplekso sudėties.
4. KVR-CH kompleksų destrukcija vyksta trimis stadijomis: pirmojoje iš komplekso pasišalina drėgmė, antrojoje atskyla apie 25 % komplekse sujungtos KVR ir trečiojoje vyksta polimero destrukcija. Ore esantis deguonis neinicijuoja terminės KVR-CH kompleksų destrukcijos. Didėjant adsorbuotos KVR kiekiui, didėja kompleksų antioksidacinis efektyvumas.
5. Žaliosios arbatžolės antioksidacinės savybės galima pagerinti užpurškus KVR-CH kompleksų tirpalus.

## Literatūros sąrašas

1. MAGNANI, C., V.L.B. ISAAK, M.A. CORREA and H.R.N. SALGADO. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Anal. Methods* [interaktyvus]. 2014, 6, 3203–3210 [žiūrėta 2018-01-10]. Prieiga per doi: 10.1039/C3AY41807C.
2. KROON, P. A. and G. WILLIAMSON. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999, 79 (3), 355–361. ISSN 0022-5142.
3. GERMANO, M. P. et al. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, 105 (3), 368–373. ISSN0378-8741.
4. CAMPOS, F. M. and T. A. HOGG. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J. Appl. Microbiol* [interaktyvus]. 2003, 94, 167–174 [žiūrėta 2018-02-02]. Prieiga per doi: 1365-2672.2003.01801.x.
5. COVIELLO, T., P. MATRICARDI, C. MARIANECCI, F. ALHAIQUE. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release* [interaktyvus]. 2007, 119 (1), 5–24 [žiūrėta 2018-02-20]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jconrel.2007.01.004.
6. ALVAZER-LORENZO, C., B. BLANCO-FERNANDEZ, A. M. PUGA, A. CONCHEIRO. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [interaktyvus]. 2013, 65 (9), 1148–1171 [žiūrėta 2018-01-20]. Prieiga per doi: 10.1016/j.addr.2013.04.016 .
7. KUMAR, M. N. et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev* [interaktyvus]. 2004, 104 (12), 6017–6084 [žiūrėta 2018-02-18]. Prieiga per doi: 10.1021/cr030441b.
8. NUNES, C. et al. Chitosan–caffeic acid–genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2013, 91 (1), 236–243 [žiūrėta 2018-02-22]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2012.08.033.
9. LIU, J. et al. Reaction mechanisms and structural and physicochemical properties of caffeic acid grafted chitosan synthesized in ascorbic acid and hydroxyl peroxide redox system. *J Agric. Food. Chem.* [interaktyvus]. 2018, 66 (1), 279–289 [žiūrėta 2018-02-12]. Prieiga per doi: 10.1021/acs.jafc.7b05135.
10. DANG, J. M. and K. W. LEONG. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* [interaktyvus]. 2006, 58, 487–499 [žiūrėta 2018-03-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.addr.2006.03.001.

11. MALAFAYA, P. B., G. A. SILVA, R. L. REIS. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* [interaktyvus]. 2007, 59, 207–233 [žiūrėta 2018-02-21]. Prieiga per doi: 10.1016/j.addr.2007.03.012.
12. KAWKER, C. J., K. L. WOOLEY. The convergence of synthetic organic and polymer chemistries. *Science* [interaktyvus]. 2005, 309, 1200–1205 [žiūrėta 2018-02-12]. Prieiga per doi: 10.1126/science.1109778.
13. BARNES, D. K. A., F. GALGANI, R. C. THOMPSON, M. BARLAZ. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Phil. Trans. R. Soc. B.* [interaktyvus]. 2009, 364, 1985–1998 [žiūrėta 2018-02-20]. Prieiga per doi: 10.1098/rstb.2008.0205.
14. SAM, T. Regulatory implications of excipient changes in medicinal products. *Drug Inf. J.* [interaktyvus]. 2000, 34, 875–894 [žiūrėta 2018-02-20]. Prieiga per doi: 10.1177/009286150003400324.
15. COLQUHOUN, I. J. et al. Structure and conformation of a novel genetically engineered polysaccharide P2. *Carbohydrate Research* [interaktyvus]. 2001, 330 (3), 325–333 [žiūrėta 2018-02-27]. Prieiga per doi: 10.1016/S0008-6215(00)00293-7.
16. WANG, W. B., J. X. XU, A. Q. WANG. A pH-, salt- and solvent-responsive carboxymethylcellulose-g-poly(sodium acrylate)/medical stone superabsorbent composite with enhanced swelling and responsive properties. *Express Polym. Lett.* [interaktyvus]. 2011, 5, 385–400 [žiūrėta 2018-02-27]. Prieiga per doi: 10.3144/expresspolymlett.2011.38.
17. BENEKE, C. E., A. M. VILJOEN, J. H. HAMMAN. Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. *Molecules* [interaktyvus]. 2009, 14, 2602–2620 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules14072602.
18. LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* [interaktyvus]. 2008, 60, 1650–1662 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per doi: 10.1016/j.addr.2008.09.001.
19. SHRIVASTAVA, A. et al. *Flavobacterium johnsoniae* RemA is a mobile cell-surface lectin involved in gliding. *J. Bacteriol.* [interaktyvus]. 2012, 19, 3678–3688 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per doi: 10.1128/JB.00588-12.
20. BRULE, S. et al. Doxorubicin release triggered by alginate embedded magnetic nanoheaters: a combined therapy. *Adv. Mater.* [interaktyvus]. 2011, 23, 787–790 [žiūrėta 2018-03-01]. Prieiga per doi: 10.1002/adma.201003763.
21. ALVAZER-LORENZO, C., A. CONCEIRO. Intelligent drug delivery systems: polymeric micelles and hydrogels. *Mini-Rev. Med. Chem.* [interaktyvus]. 2008, 8, 1065–1074 [žiūrėta 2018-03-01]. Prieiga per doi: 10.2174/138955708785909952.



22. CHEUNG, R. C. F., T. Z. NG, J. H. WONG, W. Y. CHAN. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar. Drugs* [interaktyvus]. 2015, 13(8), 5156–5186 [žiūrėta 2018-02-20]. Prieiga per doi: 10.3390/md13085156.
23. YOUNES, I., M. RINAUDO. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar. Drugs* [interaktyvus]. 2015, 13 (3), 1133–1174 [žiūrėta 2018-02-20]. Prieiga per doi: 10.3390/md13031133.
24. PERCOT, A., C. VITON, A. DOMARD. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules* [interaktyvus]. 2003, 4 (1), 12–18 [žiūrėta 2018-02-27]. Prieiga per doi: 10.1021/bm025602k.
25. JUNG, W. J. et al. Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Microbiol. Biotechnol.* [interaktyvus]. 2006, 71 (2), 234–237 [žiūrėta 2018-02-20]. Prieiga per doi: 10.1007/s00253-005-0126-3.
26. REGE, P. R., L. H. BLOCK. Chitosan processing: Influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydr. Res.* [interaktyvus]. 1999, 321, 235–245 [žiūrėta 2018-03-10]. Prieiga per doi: 10.1016/S0008-6215(99)00172-X.
27. GALED, G. et al. *N*-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydr. Polym.* [interaktyvus]. 2005, 62 (4), 316–320 [žiūrėta 2018-03-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2005.03.019.
28. NWE, N., T. FURUIKE, H. TAMURA. Chapter One – Isolation and characterization of chitin and chitosan from marine origin. *Advances in Food and Nutrition Research* [interaktyvus]. 2014, 72, 1–15 [žiūrėta 2018-03-10]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-800269-8.00001-4.
29. PHILIPPOVA, O. E. et al. Aggregation of some water-soluble derivatives of chitin in aqueous solutions: Role of the degree of acetylation and effect of hydrogen bond breaker. *Carbohydr. Polym.* [interaktyvus]. 2012, 87, 687–694 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.043.
30. SINHA, V.R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.* [interaktyvus]. 2004, 274, 1–33 [žiūrėta 2018-03-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijpharm.2003.12.026.
31. KARAGOZLU, M.Z., S. K. KIM. Chapter Twelve – Anticancer effects of chitin and chitosan derivatives. *Advances in Food and Nutrition Research* [interaktyvus]. 2014, 72, 215–225 [žiūrėta 2018-03-01]. Prieiga per doi: 10.1007/978-3-319-07145-9\_20.

32. MARTINS, A. F. et al. Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing *N*-quaternized moieties in its backbone: a review. *Int. J. Mol. Sci.* [interaktyvus]. 2014, 15, 20800–20832 [žiūrėta 2018-03-02]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms151120800..
33. NGO, D. H., S. K. SIM. Chapter Two – Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Advances in Food and Nutrition Research* [interaktyvus]. 2014, 73, 15–31 [žiūrėta 2018-03-02]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0.
34. ARANAZ, I. et al. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* [interaktyvus]. 2009, 3, 203–230 [žiūrėta 2018-03-02]. Prieiga per doi: 10.2174/187231309788166415.
35. RHOADES, J., S. ROLLER. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* [interaktyvus]. 2000, 66, 80–86 [žiūrėta 2018-04-20]. Prieiga per doi: 10.1128/AEM.66.1.80-86.2000.
36. CHANDY, T., C. P. SHARMA. Chitosan – as a biomaterial. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* [interaktyvus]. 1990, 18 (1), 1–24 [žiūrėta 2018-03-03]. Prieiga per doi: 10.3109/10731199009117286.
37. FELT, O., P. BURI, R. GURNY. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* [interaktyvus]. 1998, 24, 979–993 [žiūrėta 2018-03-03]. Prieiga per doi: 10.3109/03639049809089942.
38. HAN, L. K., Y. KUMARA, H. OKUDA. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* [interaktyvus]. 1999, 23, 174–179 993 [žiūrėta 2018-03-02]. Prieiga per doi: 10.1038/sj.ijo.0800806.
39. ZHANG, Y., M. ZHANG. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *J. Biomed. Mater. Res.* [interaktyvus]. 2002, 61, 1–8 [žiūrėta 2018-03-02]. Prieiga per doi: 10.1002/jbm.10176
40. HERMANN, K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 1989, 28 (4), 315–347. ISSN:0099-0248.
41. ADOM, K. K., R. H. LIU. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2002, 50, 6182–6187. ISSN:0021-8561.
42. EL-SEEDI, H. R., et al. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J. Agric. Food Chem.* [interaktyvus]. 2012, 60 (44), 10877–10895 [žiūrėta 2018-03-04]. Prieiga per doi: 10.1021/jf301807g.
43. MUSTAFA, N. R., R. VERPOORTE. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews.* 2007, 6, 243–258. ISSN:1568-7767.

44. MATTILA, P., J. HELLSTORM. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007, 20 , 152–160. ISSN:0889-1575.
45. CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999, 79 (3), 362–372. ISSN:0022-5142.
46. MATTILA P., J. KUMPULAINEN. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50 (13), 3660–3667. ISSN:0021-8561.
47. POTTEN, C. S. Epithelial cell growth and differentiation II. Intestinal apoptosis. *American Journal of Physiology*. 1997, 273, 253–257. ISSN:0002-9513.
48. OLSEN, H. et al. Antiproliferative effects of fresh and thermal processed green and red cultivars of curly kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *Sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, 60 (30), 7375–7383. ISSN:0021-8561.
49. GREENWALD, P. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. *J. Nutr.*[interaktyvus]. 2004, 134(12), 3507–3512 [žiūrėta 2018-03-15]. Prieiga per doi: 10.1093/jn/134.12.3507S.
50. WINSON, J. A., K. TOEUFEL, N. WU. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* [interaktyvus]. 2001, 156 (1), 67–72 [žiūrėta 2018-03-15]. Prieiga per doi: 10.1016/S0021-9150(00)00625-0.
51. CHEN, J. H., C. T. HO. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compound, *J. Agric. Food Chem.* .[interaktyvus]. 1997, 45, 2374–2378 [žiūrėta 2018-04-20]. Prieiga per doi: 10.1021/jf970055t.
52. HYNES M. J., M. O'COICEANAINN. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *J Inorg Biochem.* [interaktyvus]. 2004, 98(8), 1457–1464 [žiūrėta 2018-03-15]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jinorgbio.2004.05.009.
53. TERAO, J., et al. Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and Its related phenolic compounds in solution. *Biosci Biotechnol Biochem.* [interaktyvus]. 1993, 57 (7), 1204–1215 [žiūrėta 2018-03-15]. Prieiga per doi: 10.1271/bbb.57.1204.
54. CANILLAC, N., A. MOUREY. Effects of several environmental factors on the anti-*Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excelsa*. *Int J Food Microbiol.* [interaktyvus]. 2004; 92(1), 95–103 [žiūrėta 2018-03-20]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.09.001.
55. ALAMJANO, M. P., R. CARBO, M. E. DELGADO, M. H. GORDON. Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *J. Food Sci.* [interaktyvus]. 2007, 72 (5), 258–263 [žiūrėta 2018-03-20]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00387.x.

56. HU, Q, Y. LUO. Polyphenol-chitosan conjugates: Synthesis, characterization, and applications. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2016, 151, 624–639 [žiūrėta 2018-03-20]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.109.
57. CURCIO, M., et al. Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2009, 57 (13), 5933–5938 [žiūrėta 2018-03-20]. Prieiga per doi: 10.1021/jf900778u.
58. WORANUCH, S. and R. YOKSAN. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2013, 96 (2), 495–502 [žiūrėta 2018-03-20]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2013.04.006.
59. REN, J., et al. Phenolic antioxidants-functionalized quaternized chitosan: Synthesis and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. 2013, 53, 77–81 [žiūrėta 2018-03-20]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.11.011.
60. TAGURI, T., T. TANAKA, I. KOUNO. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* [interaktyvus]. 2004, 27 (12), 1965–1969 [žiūrėta 2018-03-20]. Prieiga per doi: 10.1248/bpb.27.1965.
61. KUO, Y. Y., et al. Caffeic acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2015, 16, 10748–10766 [žiūrėta 2018-03-20]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms160510748.
62. OMENE, C., O., J. WU, K. FRENKEL. Caffeic acid phenethyl ester (cape) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. *Investigational New Drugs* [interaktyvus]. 2012, 30, 1279–1288 [žiūrėta 2018-03-20]. Prieiga per doi: 10.1007/s10637-011-9667-8.
63. CHUU, C. P., et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70s6k and akt signaling networks. *Cancer Prevention Research*, [interaktyvus]. 2012, 5, 788–797 [žiūrėta 2018-03-22]. Prieiga per doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0004-T.
64. CHIANG, E. P. I., et al. Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: involvement of the pi3-k/akt and ampk signaling pathways. *PLoS One* [interaktyvus]. 2014, 6, 1–17 [žiūrėta 2018-03-22]. Prieiga per doi: 10.1371/journal.pone.0099631.
65. TOLBA, M., et al. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life* [interaktyvus]. 2013, 65, 699–709 [žiūrėta 2018-03-23]. Prieiga per doi: 10.1002/iub.1189.

66. LIU, J., X. Y. WEN, J. F. LU, J. KAN, C. H. JIN. Free radical mediated grafting of chitosan with caffeic and ferulic acids: structures and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. 2014, 65, 97–106 [žiūrėta 2018-03-23]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.021.
67. BOŽIČ, M., S. GORGIVE, V. KOKOL. Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2012, 87, 2388–2398 106 [žiūrėta 2018-03-23]. Prieiga per doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2013.01.005.
68. AYTEKIN, A., S. MORIMURA. Growth effects of caffeic acid and thioglycolic acid modified chitosans in u937 cells. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation* [interaktyvus]. 2010, 4, 325–329 [žiūrėta 2018-03-23]. Prieiga per doi: 10.1999/1307-6892/1199.
69. DELAIR T. Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile noncarriers of bioactive molecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [interaktyvus]. 2011, 78, 10–18 [žiūrėta 2018-03-23]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ejpb.2010.12.001.
70. MIHAI M., E. S. DRAGAN. Chitosan based nonstoichiometric polyelectrolyte complexes as specialized flocculants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [interaktyvus]. 2009, 346, 39–46 [žiūrėta 2018-03-27]. Prieiga per doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.05.021.
71. ROSCA C., O. NOVAC, G. LISA, M. I. POPA. Polyelectrolyte complexes of chitosan with dextran sulphate. Synthesis and characterization. *Cellulose Chemistry and Technology* [interaktyvus]. 2011, 45, 185–189 [žiūrėta 2018-03-27]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ejpb.2010.12.001.
72. COSTALAT M., L. DAVID, T. DELAIR. Reversible controlled assembly of chitosan and dextran sulfate: A new method for nanoparticle elaboration. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2014, 102, 717–726 [žiūrėta 2018-03-27]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.098.
73. ANITHA A., et al. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological activities of curcumin loaded dextran sulphate-chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2011, 84, 1158–1164 [žiūrėta 2018-03-29]. Prieiga per doi: 10.1002/jbm.a.32163.
74. LIU J., et al. Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2012, 90, 16–22 [žiūrėta 2018-03-29]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2012.04.036.

75. WANG Y. J., et al. NMR imaging of chitosan and carboxymethyl starch tablets : Swelling and hydration of the polyelectrolyte complex. *International Journal of Pharmaceutics* [interaktyvus]. 2011, 419, 215–221 [žiūrėta 2018-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.08.008.
76. RODRIGUES S., A. M. ROSA DA COSTA, A. GRENHA. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2012, 89, 82–289 [žiūrėta 2018-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.010.
77. HOSSEINI S. F., M. ZANDI, M. REZAEI, F. FARAHMANDGHAHI. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2013, 95, 50–56 [žiūrėta 2018-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2013.02.031.
78. OKUYAMA, K., et al. Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2000, 4 (3), 237–247 [žiūrėta 2018-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/S0144-8617(99)00142-3.
79. OGAWA, K., K. OKA, T. YIU. X-ray study of chitosan–transition metal complexes. *Chemistry of Materials* [interaktyvus]. 1993, 5 (5), 726–728 [žiūrėta 2018-04-10]. Prieiga per doi: 10.1021/cm00029a026.
80. OGAWA, K., S. INUKAI. X-ray diffraction study of sulfuric, nitric, and halogen acid salts of chitosan. *Carbohydrate Research* [interaktyvus]. 1987, 160, 425–433 [žiūrėta 2018-04-15]. Prieiga per doi: 10.1016/0008-6215(87)80328-2.
81. WEI, Z., Y. GAO. Evaluation of structural and functional properties of chitosan–chlorogenic acid complexes. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2016, 86, 376–382 [žiūrėta 2018-04-15]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.084.
82. KABIR, F., S. KATAYAMA, N. TANJI, S. NAKAMURA. Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* [interaktyvus]. 2014, 57, 359–365 [žiūrėta 2018-04-15]. Prieiga per doi: 10.1007/s13765-014-4056-6.
83. DRAGAN, E. S., S. SWARZ. Polyelectrolyte complexes. VI. Polycation structure, polyanion molar mass, and polyion concentration effects on complex nanoparticles based on poly(sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate). *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [interaktyvus]. 2004, 42, 2495–2505 [žiūrėta 2018-04-15]. Prieiga per doi: 10.1002/pola.20110.
84. LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* [interaktyvus]. 1918, 40, 212–223 [žiūrėta 2018-04-20]. Prieiga per doi: 10.1021/ja02242a004.
85. FREUNDLICH, H. Adsorption in solution. *Phys. Chemie.* 1906, 57, 384–410.

86. DUBININ, M. M. Modern theory of voluminal filling of micropores of carbon adsorbent. *Izvestija Akademii Nauk SSSR, Chimija*, 1, 1991..
87. HAMDAOUI, O., E. NAFFRECHOUX. Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters. *Journal of Hazardous Materials* [interaktyvus]. 2007, 147, 381–394 [žiūrėta 2018-04-20]. Prieiga per doi:10.1016/j.jhazmat.2007.01.021.
88. HELFFERICH, F. *Ion exchange*. New York: McGraw Hill, 1962.
89. KHAN, A. A, R. P. SINGH. Adsorption thermodynamic of carbofuran on Sn(IV) arsenosilicate in H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Cd<sup>+</sup> forms. *Colloids surf.* [interaktyvus]. 1987, 24, 33–42 [žiūrėta 2018-04-20]. Prieiga per doi: 10.1016/0166-6622(87)80259-7.
90. LI, P., Y.-N, DAI, J.-P. Zhang, A.-Q. Wang, Q, Wei. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *International Journal of Biomedical Science* [interaktyvus]. 2008, 4, 221–228 [žiūrėta 2018-05-02]. Prieiga per: NCBI.
91. XING, Y.. et al. Caffeic acid product from the highly copper-tolerant plant *Elshaltzia splendens* post-phytoremediation: its extraction, purification, and identification, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* [interaktyvus]. 2012, 13, 487–493 [žiūrėta 2018-05-02]. Prieiga per: Springer Link.
92. ŚWISLOCKA, R. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV absorption, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) and theoretical (in B3LYP/6-311++G\*\* level) studies on alkali metals salts of caffeic acid. *Spectrochim. Acta A.* [interaktyvus]. 2013, 100, 21–30 [žiūrėta 2018-05-02]. Prieiga per doi: 10.1016/j.saa.2012.01.048.
93. HAO, Y.-H., et al. A comparison study on nonisothermal decomposition kinetics of chitosan with different analysis methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [interaktyvus]. 2017, 128, 1077–1091 [žiūrėta 2018-05-03]. Prieiga per doi: 10.1007/s10973-016-5972-y .
94. ZENG, L., C. QIN, L. WANG, W. LI. Volatile compounds formed from pyrolysis of chitosan. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2011, 83, 1553–1557 [žiūrėta 2018-05-03]. Prieiga per doi: 10.1016/j.carbpol.2010.10.007.