

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Karolina Almonaitytė

**NETIRPIŲ ROZMARINO RŪGŠTIES IR CHITAZANO
KOMPLEKSŲ GAVIMAS IR SAVYBIŲ ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovė

Doc. dr. Rima Klimavičiūtė

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**NETIRPIŲ ROZMARINO RŪGŠTIES IR CHITIZANO
KOMPLEKSŲ GAVIMAS IR SAVYBIŲ ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Studijų programa Chemijos inžinerija (kodas 621H81004)

Vadovė

Doc. dr. Rima Klimavičiūtė

Recenzentė

Doc. Dr. Joana Bendoraitienė

Projektą atliko

Karolina Almonaitytė

KAUNAS, 2018



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Karolina Almonaitytė

Studijų programa Chemijos inžinerija (kodas 621H81004)

„Netirpių rozmarino rūgšties ir chitozano kompleksų gavimas ir savybių įvertinimas“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

Patvirtinu, kad mano, Karolinos Almonaitytės, baigiamasis projektas tema „Netirpių rozmarino rūgšties ir chitozano kompleksų gavimas ir savybių įvertinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų 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)

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Tvirtinu:

Cheminės technologijos fakulteto dekanas
Prof. E.Valatka

Suderinta:

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

Dekano įsakymas Nr. ST18-F-02-3
2018 m. balandžio 11 d.

2018 m. balandžio 11 d.

MAGISTRO BAIGIAMOJO PROJEKTO UŽDUOTIS

Išduota studentei: Karolinai Almonaitytei

1. Projekto tema: Netirpių rozmarino rūgšties ir chitozano kompleksų gavimas ir savybių įvertinimas.

2. Darbo tikslas ir uždaviniai:

gauti skirtingos sudėties netirpius miltelių pavidalo rozmarino rūgšties ir mažos molekulinės masės chitozano kompleksus ir įvertinti jų savybes.

3. Projekto sudėtinės dalys:

1. Literatūros apžvalga (Fenolinės rūgštys, rozmarino rūgšties struktūra, savybes ir imobilizavimas polimeriniuose nešikliuose, chitozanas ir jo savybės, chitozano ir anijoninių polimerų polielektrolitiniai, mažamolekulių anijoninių junginių kompleksai.

2. Eksperimentinė dalis:

- Rozmarino rūgšties adsorbcija chitozano milteliais;
- Skirtingą rozmarino rūgšties kiekį turinčių netirpių RR-Chz kompleksų gavimas ir savybių tyrimas;
- RR-Chz kompleksų miltelių FT-IR analizė;
- RR-Chz kompleksų termogravimetrinė analizė;
- RR desorbcija iš RR-Chz miltelių į skirtingas terpes;
- RR-Chz kompleksų dispersijų fluorescencijos tyrimai;
- Vandens garų sugertis RR-Chz kompleksų milteliais;
- RR-Chz kompleksų antioksidacinio efektyvumo įvertinimas;
- Netirpių RR-Chz kompleksų gamybos technologinę schema.

3. Darbuotojų sauga ir sveikata

4. Išvados

5. Bibliografinių nuorodų sąrašas.

6. Mokslinių publikacijų baigiamojo magistrinio projekto tema sąrašas

Užduoties išdavimo data 2016 m. rugsėjo 1 d.

Užbaigto darbo pateikimo terminas 2018 m. gegužės 31 d.

Vadovas: Doc. dr. Rima Klimavičiūtė
(vardas, pavardė)

(parašas, data)

Užduotį gavau: Karolina Almonaitytė
(vardas, pavardė)

(parašas, data)

TURINYS

IŽANGA	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Fenoliniai junginiai	13
1.1.1. Fenolinės rūgštys	14
1.2. Rozmarino rūgštis ir jos struktūra	15
1.2.1. Rozmarino rūgšties savybės	16
1.2.2. Rozmarino rūgšties imobilizavimas polimeriniuose nešikliuose	18
1.3. Chitozanas ir jo savybės	20
1.3.1. Chitozано ir anijoninių polimerų polielektrolitiniai kompleksai	21
1.3.2. Chitozано ir mažamolekulių anijoninių junginių kompleksai.....	22
1.4. Magistrinio darbo temos pagrindimas	24
2. METODINĖ DALIS.....	26
2.1. Naudotos medžiagos	26
2.2. Eksperimentų metodikos	27
2.2.1. Adsorbcijos kinetikos tyrimai.....	27
2.2.2. Rozmarino rūgšties koncentracijos nustatymas.....	27
2.2.3. Chitozано miltelių su adsorbuota rozmarino rūgštimi gavimas	27
2.2.4. Drėgmės kiekio nustatymas.....	28
2.3. RR-Chz miltelių analizė	28
2.3.1. Skenuojamosios elektroninės mikroskopijos (SEM) tyrimas.....	28
2.3.2. Furje transformacijos infraraudonoji (FT-IR) spektroskopija.....	28
2.3.3. Termogravimetrinė (TG) analizė.....	28
2.3.4. Fluorescencinė spektroskopija.....	28
2.3.5. Rozmarino rūgšties desorbcijos iš RR-Chz miltelių tyrimas	29
2.3.6. Antioksidacinio efektyvumo įvertinimas	29
2.3.7. Vandens garų sugerties RR-Chz milteliais nustatymas.....	30
2.4. Rezultatų patikimumo įvertinimas.....	30
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	31
3.1. Rozmarino rūgšties adsorbcija chitozано milteliais	31
3.2. Skirtingą rozmarino rūgšties kiekį turinčių netirpių RR-Chz kompleksų gavimas ir savybių tyrimas	36
3.2.1. RR-Chz kompleksų miltelių FT-IR analizė.....	37
3.2.2. RR-Chz kompleksų termogravimetrinė analizė	38
3.2.3. RR desorbcija iš RR-Chz miltelių į skirtingas terpes	40
3.2.4. RR-Chz kompleksų dispersijų fluorescencijos tyrimai	41
3.2.5. Vandens garų sugertis RR-Chz kompleksų milteliais	43
3.2.6. RR-Chz kompleksų antioksidacinio efektyvumo įvertinimas.....	45
4. REKOMENDACIJOS (INŽINERINĖ DALIS).....	47
4.1. Netirpių RR-Chz kompleksų gamybos technologinė schema	47
5. DARBUOTJŲ SAUGA IR SVEIKATA	49
IŠVADOS.....	53
LITERATŪROS SĄRAŠAS	54
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ BAIGIAMOJO MAGISTRINIO PROJEKTO TEMA SĄRAŠAS	61

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1.1 pav. Flavonoidų struktūrinės formulės	13
1.2 pav. Hidroksibenzenkarboksirūgščių ir hidroksicinamono rūgščių dariniai	14
1.3 pav. Rozmarino rūgšties struktūrinė formulė	15
1.4 pav. RR neutralios ir disocijuotų formų cheminė struktūra ir būdingos pKa vertės ...	17
1.5 pav. Chitino deacetilinimo reakcija	20
1.6 pav. Chitozano-KMC PEK susidarymas	22
3.1 pav. Elektrostatinė sąveika susidarant netirpiems RR-Chz kompleksams	31
3.2 pav. SEM nuotraukos Chz miltelių (a, c) ir RR-Chz komplekso, turinčio 0,39 mol/mol RR, miltelių (b, d).	32
3.3 pav. Chz milteliais adsorbuoto RR kiekio priklausomybė nuo trukmės, kai adsorbcijos temperatūra: 1 – 30 °C; 2 – 35 °C; 3 – 40 °C.	33
3.4 pav. Chz milteliais adsorbuoto RR kiekio priklausomybė nuo trukmės, kai RR koncentracija: 1 – 0,3 g/l; 2 – 0,58 g/l; 3 – 1,04 g/l.	33
3.5 pav. RR koncentracijos įtaka vandeninių tirpalų fluorescencijos intensyvumui	36
3.6 pav. FT-IR spektrai Chz ir RR-Chz kompleksų	38
3.7 pav. TG kreivės: Chz, RR ir RR-Chz kompleksų. Temperatūros kėlimo greitis 10 °C/min, aplinka – azoto.....	39
3.8 pav. RR-Chz kompleksų dispersijų fluorescencijos spektrai.....	42
3.9 pav. Bangos ilgio, kuriam esant fluorescencijos intensyvumas yra didžiausias, priklausomybė RR-Chz komplekso sudėties.	43
3.10 pav. Chz ir RR-Chz miltelių masės padidėjimo dėl vandens garų absorbcijos (masės padidėjimas) priklausomybė nuo trukmės.	44
3.11 pav. RR-Chz kompleksų antioksidacinio efektyvumo (AOEF) priklausomybė nuo trukmės ir RR kiekio RR-komplekse.....	46
4.1 pav. RR-Chz miltelių gamybos technologinė schema	48

LENTELIŲ SĄRAŠAS

2.1 lentelė. Tyrimams naudotos medžiagos.....	26
3.1 lentelė. RR adsorbcijos Chz milteliais pseudo-antrojo laipsnio kinetinio modelio rodiklių priklausomybė nuo adsorbcijos temperatūros.....	34
3.2 lentelė. RR adsorbcijos Chz milteliais pseudo-antrojo laipsnio kinetinio modelio rodiklių priklausomybė nuo RR koncentracijos	34
3.3 lentelė. RR, Chz ir skirtingos sudėties RR-Chz kompleksų charakteringieji antrosios stadijos terminės destrukcijos rodikliai.....	40
3.4 lentelė. RR desorbcijos iš skirtingos sudėties RR-Chz miltelių efektyvumo (DEF) priklausomybė nuo desorbcijos terpės	41
5.1 lentelė. Rizikos veiksnių identifikavimas ir jų kiekybinis vertinimas	49

SIMBOLIAI IR SANTRAUKOS

H – vandenilio atomas

RR – rozmarino rūgštis

AIBN – azodiizobutironitrilas

UV – ultravioletiniai

pK_a – rūgšties disociacijos konstanta

HPLC – efektyvioji skysčių chromatografija

ABTS* – 2,2-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties radikalo

FT-IR – Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija

ŽSA – žmogaus serumo albuminas

CD – ciklodekstrinai

TKK – tinklinis ketvirtinių amoniogrupių turintis krakmolas

EF – efektyvumas

TPF – natrio tripolifosfatas

PEK – polielektrolitinis kompleksas

IEK – joninis kompleksas

DESU – dekstrano sulfatas

KMC – karboksimetilceliuliozė

2,5-DHBA – 2,5-dihidrobenzoinė rūgštis

CLR – chlorogeno rūgštis

Chz – chitozanas

SEM – skenuojamoji elektroninė mikroskopija

TG – termogravimetrinė analizė

AOEF – antioksidacinis efektyvumas

Almonaitytė, Karolina. Netirpių rozmarino rūgšties ir chitozano kompleksų gavimas ir savybių įvertinimas. Baigiamasis magistro projektas / vadovas Doc. dr. Rima Klimavičiūtė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Technologijos mokslai, Chemijos inžinerija
Reikšminiai žodžiai: rozmarino rūgštis, chitozanas, adsorbicija
Kaunas, 2018. 61 p.

SANTRAUKA

Vandenyje netirpūs skirtingo molinio santykio chitozano (Chz) ir rozmarino rūgšties (RR) kompleksai (RR-Chz) buvo gauti adsorbuojant RR iš vandeninių tirpalų Chz milteliais. RR adsorbicijos mažos molekulinės masės Chz milteliais kinetikai aprašyti pritaikytas pseudo-antrojo laipsnio kinetinis modelis, kuris patvirtino, kad adsorbicija vyksta dviem etapais. Pasiūlytas RR adsorbicijos Chz milteliais mechanizmas.

Gauti RR-Chz kompleksai, turintys 0,11, 0,22, 0,39, 0,6 ir 0,8 mol/mol adsorbuotos RR. Jų sudėtis buvo patvirtinta FT-IR spektroskopija. RR-Chz vandeninių dispersijų fluorescencijos tyrimai parodė, kad didėjant adsorbuotos RR kiekiui, RR-Chz kompleksų dispersijų fluorescencijos intensyvumas mažėja, o maksimumas pasislenka trumpesniųjų bangų link, t. y. keičiasi RR išsidėstymas komplekso miltelių paviršiuje. RR-Chz kompleksų terminė destrukcija vyksta dviem etapais: pirmajame iš komplekso pašalinama drėgmė, o antrajame vyksta terminė komplekso destrukcija, kuri prasideda žemesnėje temperatūroje nei chitozano. RR-Chz komplekse imobilizuota RR gali būti atpalaiduota į 0,1 M druskos rūgšties ir fosfatinio buferinio, kurio pH vertė yra 6,8, tirpalus. Į distiliuotą vandenį ir etanolį nepriklausomai nuo RR-Chz komplekso sudėties atpalaiduojama tik iki 5 % imobilizuotos RR. Antioksidacinis RR-Chz kompleksų tyrimas ABTS metodu parodė, kad RR-Chz kompleksai, turintys daugiau adsorbuotos RR, pasižymi prailgintu antioksidaciniu efektyvumu.

Almonaitytė, Karolina. Obtaining and properties of insoluble rosmarinic acid and chitosan complexes. Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. prof dr. Rima Klimavičiūtė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Technological Science, Chemical Engineering

Keywords: rosmarinic acid, chitosan, adsorption.

Kaunas, 2018. 61 pages.

SUMMARY

Water insoluble chitosan (Chz) and rosmarinic acid (RR) complexes (RR-Chz) of different composition were obtained by adsorbing RR from aqueous solutions on Chz powder. The adsorption of RR on Chz powder occurred in two stages. The pseudo-second kinetic model was fitted to the data of both adsorption steps. The mechanism of RA adsorption on the surface of Chz powder was elaborated.

The RR-Chz with RR to Chz molar ratio of 0.11, 0.22, 0.39, 0.6 and 0.8 were obtained. FT-IR spectra confirmed the composition of RR-Chz complexes. Fluorescence spectroscopy investigation of RR-Chz aqueous dispersions showed that with an increase of RR amount in the complex the fluorescence emission spectrum maximum was shifted towards shorter wavelengths and that suggests stronger association of RR molecules on Chz powder surface. The thermal destruction of RR-Chz complexes occurred in two steps: release of physically retained water (first step) and decomposition of complex (second step) at temperature lower than that of CH alone. RR can be released from RR-Chz complexes into solution of 0.1 M HCl or phosphate buffer (pH=6.8). However, RR-Chz complexes are stable in distilled water and ethanol. The antioxidant activity estimated by ABTS assay showed that RR-Chz complexes containing higher amount of adsorbed RA demonstrated prolonged antioxidant activity.

IŽANGA

Darbo aktualumas. Pagal paplitimą gamtoje rozmarino rūgštis yra antra po chlorogeno rūgšties. Ji plačiai taikoma medicinoje, visų pirma, dėl savo antioksidacinių savybių, susijusių su laisvųjų radikalų slopinimu. Be to, yra žinomi rozmarino rūgšties antibakterinis, antivirusinis, priešuždegiminis, antimutageninis poveikiai. Tačiau praktinį rozmarino rūgšties taikymą dažnai riboja mažas bioprieinamumas ir nestabilumas fiziologinėje aplinkoje. Stabilumui ir bioprieinamumui padidinti rozmarino rūgštis yra imobilizuojama įvairiuose polimeriniuose nešikliuose.

Chitozanas yra vienintelis gamtoje randamas katijoninis polimeras, kuris dėl specifinių savybių, tokių kaip biosuderinamumas ir bioskaidumas, plačiai naudojamas bioaktyvių junginių pernašai farmacijoje, biomedicinoje bei maisto pramonėje. Parūgštintuose tirpaluose jonizuojasi chitozono pirminė aminogrupė, todėl jis gali sudaryti joninius kompleksus su anijoniniais mažamolekuliais junginiais, tame tarpe rozmarino rūgštimi. Tam dažniausiai yra naudojamos tinklinių makromolekulių chitozono nano- ir mikrogranulės.

Netirpūs rozmarino rūgšties ir chitozono kompleksai galėtų būti gauti adsorbuojant rozmarino rūgštį iš tirpalų nemodifikuoto pradinio chitozono milteliais, taip išvengiant papildomos chitozono modifikavimo stadijos. Tačiau literatūroje nėra duomenų apie rozmarino rūgšties imobilizavimą chitozono milteliuose ar gautų kompleksų savybių tyrimą.

Darbo tikslas – gauti skirtingos sudėties netirpius miltelių pavidalo rozmarino rūgšties ir mažos molekulinės masės chitozono kompleksus ir įvertinti jų savybes.

Tiksliui pasiekti buvo iškelti tokie uždaviniai:

1. Ištirti rozmarino rūgšties adsorbcijos mažos molekulinės masės chitozono milteliais kinetiką ir įvertinti sąveikos jėgas.
2. Gauti skirtingos sudėties netirpius miltelių pavidalo rozmarino rūgšties ir chitozono (RR-Chz) kompleksus.
3. Įvertinti rozmarino rūgšties desorbciją iš RR-Chz kompleksų į skirtingas terpes.
4. Įvertinti RR-Chz kompleksų termines savybes.
5. Įvertinti RR-Chz kompleksų antioksidacines savybes.
6. Pateikti netirpių RR-Chz kompleksų gamybos technologinę schemą.

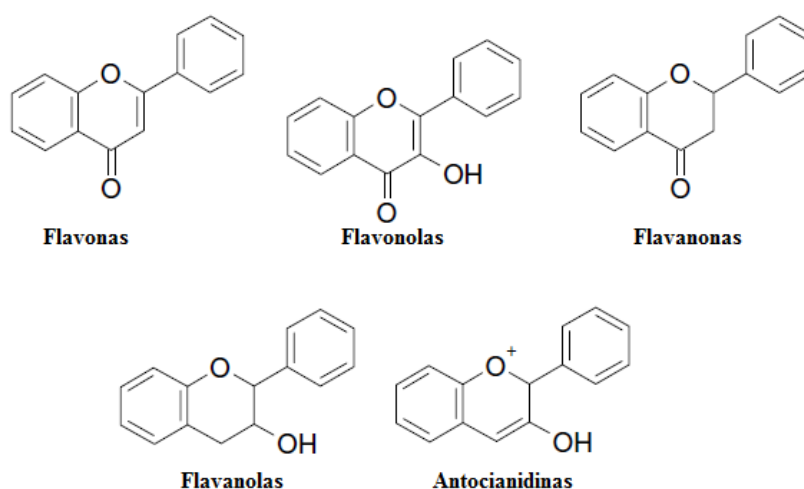
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Fenoliniai junginiai

Fenoliniai junginiai, kuriems priskiriama ir rozmarino rūgštis yra antriniai metabolitai, kurie dažniausiai randami augaluose, tačiau juos gamina ir kai kurios grybų, bakterijų ir dumblių rūšys [1]. Pasikeitus augalų aplinkos sąlygoms ar pažeidus juos, kaip atsaką, jie pradeda sintetinti fenolinius junginius. Dėl fenolinių junginių augalai apsisaugo nuo kenksmingo ultravioletinių saulės spindulių poveikio, patogeninių mikroorganizmų ir oksidacinio poveikio [2]. Atiduodami elektroną arba vandenilio atomą fenoliniai junginiai gali neutralizuoti laisvuosius radikalus, todėl gali būti taikomi lėtinėms ligoms gydyti [3].

Fenoliniai junginiai priskiriami nemaistiniams bioaktyviems mitybos komponentams, pasižymintiems priešvėžiniu (antimutageniniu ir antikancerogeniniu), priešuždegiminiu, antioksidaciniu, antialerginiu, antibakteriniu, priešvirusiniu, antitrombogeniniu poveikiais [4]. Didžioji dalis fenolinių junginių randama fenolinių esterių ar fenolinių glikozidų formoje. Pagrindinis struktūros elementas yra aromatinis žiedas, turintis vieną ar kelias hidroksigrupes. Yra skiriamos 8 pagrindinės fenolinių junginių grupės: flavonoidai, fenolinės rūgštys, stilbenai, chinonai, kumarinai, ligninai, ksantonai ir chromonai [5]. Flavonoidai ir fenolinės rūgštys yra vieni iš gausiausių fenolinių junginių grupių.

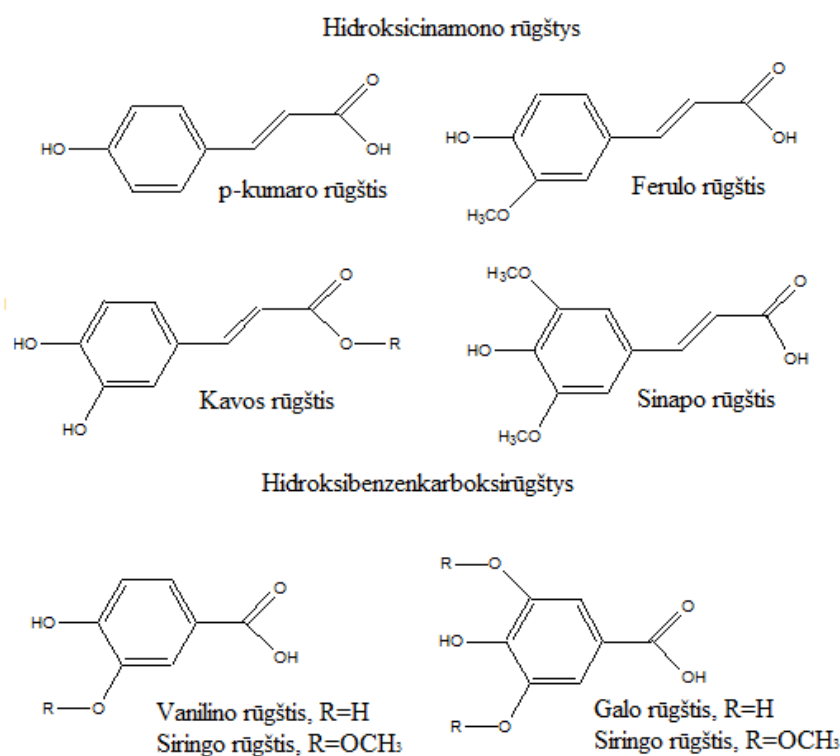
Flavonoidams yra būdingas C6-C3-C6 bendras struktūrinis pagrindas. Jie skirstomi į flavonus, flavonolius, flavanolius, flavononus ir antocianidinus (žr. 1.1 pav.) [2]. Flavonoidai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, didina kraujagyslių elastingumą, sudaro kompleksus su sunkiųjų metalų jonais, todėl gali būti vartojami apsinuodijus sunkiaisiais metalais [6].



1.1 pav. Flavonoidų struktūrinės formulės [2]

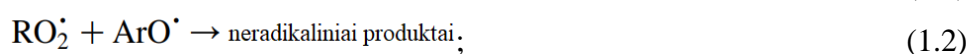
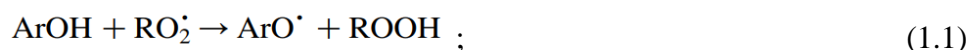
1.1.1. Fenolinės rūgštys

Kita plačiai paplitusi fenolinių junginių grupė yra fenolinės rūgštys, kurios skirstomos į hidroksibenzenkarboksirūgštis ir hidroksicinamono rūgštis darinius. Tik maža dalis fenolinių rūgščių egzistuoja rūgštis pavidalu, dažniausiai, jos sudaro esterius ar eterius [7]. Hidroksibenzenkarboksirūgštims būdinga C1–C6 struktūra, o hidroksicinamono rūgštims – C3–C6 struktūra (žr. 1.2 pav.) [5, 8]. Hidroksibenzenkarboksirūgštis dariniai yra plačiau paplitę nei hidroksicinamono rūgštis dariniai. Laisvoje formoje jos randamos retai, dažniausiai, perdirbtuose maisto produktuose, kurie buvo užšaldyti, sterilizuoti ar fermentuoti [9].

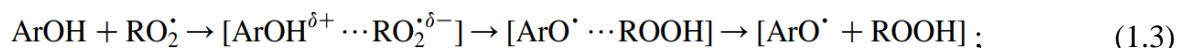


1.2 pav. Hidroksibenzenkarboksirūgščių ir hidroksicinamono rūgščių dariniai [9]

Fenolinių rūgščių ir jų esterių antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo hidroksigrupių skaičiaus molekulėje. Didėjant hidroksigrupių skaičiui molekulėje – antioksidantinis aktyvumas didėja. Remiantis teoriniais ir eksperimentiniais duomenimis daroma prielaida, kad antioksidacinis efektyvumas siejamas su vandenilio atomo (H) abstrakcijos reakcija [10, 11]:



Suminė (1) ir (2) reakcijų lygtis atrodo taip:



Reakcija (3) yra analogiška oksidacijos–redukcijos reakcijai :



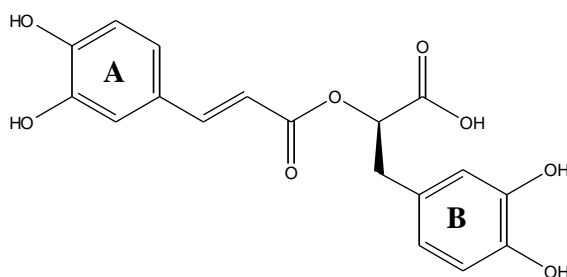
Iš anksčiau pateiktų reakcijos lygčių matyti, kad antioksidaciniam fenolinių junginių aktyvumui didelės įtakos turi H–abstrakcijos reakcijos lygis ir laisvųjų radikalų stabilumas [12].

Antioksidacinis efektyvumas sumažėja, kai fenolinių rūgščių hidroksigrupės pakeičiamos metoksigrupėmis fenolinio žiedo C3 ir C5 padėtyse. Tyrimais įrodyta, kad hidroksicinamono rūgščių antioksidantinis aktyvumas yra didesnis nei hidroksibenzenkarboksirūgščių. Jis susijęs su hidroksicinamono rūgščių molekulėje esančia –CH=CH–COOH grupe, dėl kurios užtikrinamas didesnis vandenilio atomo atidavimas bei radikalų stabilizavimas, palyginus su –COOH grupe hidroksibenzenkarboksirūgštyse [2]. Kavos rūgštis yra viena iš labiausiai paplitusių hidroksicinamono rūgšties darinių, randama, tiek laisvoje, tiek esterių formoje įvairių vaisių išorinėse dalyse [13]. Iš kavos rūgšties esterių augaluose dažniausiai randamos chlorogeno ir rozmarino rūgštys.

1.2. Rozmarino rūgštis ir jos struktūra

Rozmarino rūgštis ir panašūs junginiai, dar prieš nustatant jų cheminę struktūrą buvo žinomi, kaip viena iš taninų rūšių, randamų magnolijūnų šeimos (lot. *Lamiaceae*) augaluose. Taninų tipo darinys, gautas iš vaistinės melisos (lot. *Melissa officinalis*) buvo apibūdintas kaip kondensuotas katechinas ar galo-/elagotanas, galimai turintis kavos rūgšties [14]. 1958 m. du italų chemikai, Scarpatis ir Orientis, pirmą kartą išskyrė gryną junginį iš kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis*), ir jį pavadino rozmarino rūgštimi (RR) [15]. Tolesni tyrimai parodė, kad RR kaupiasi augalų ląstelių vakuolėse [16]. Pagal paplitimą augaluose RR yra antra po chlorogeno rūgšties.

RR yra kavos rūgšties (3,4-dihidroksicinamono rūgšties) ir 3,4-dihidroksifenilpieno rūgšties esteris. RR molekulę sudaro du fenolio žiedai (A ir B), turintys po dvi hidroksigrupes *orto*- padėtyje, karbonilgrupę, dviguba jungtis bei karboksigrupę (žr. 1.3 pav.) [17].



1.3 pav. Rozmarino rūgšties struktūrinė formulė

1.2.1. Rozmarino rūgšties savybės

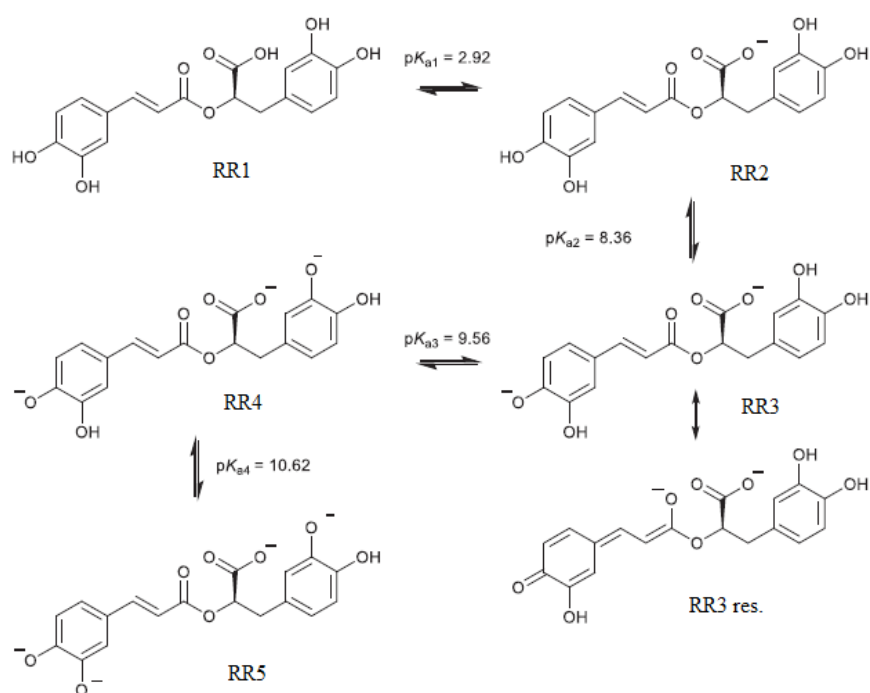
Antioksidacinės RR savybės, visų pirma, yra siejamos su A ir B žieduose esančių hidroksigrupių *orto*-padėtimi (žr. 1.3 pav.). Šių grupių vandenilio atomai gali dalyvauti laisvųjų radikalų reakcijose [18]. Nors A ir B žiedų aktyvumas yra panašus, B žiedas yra stipresnis elektronų donoras nei A žiedas. Radikalas suformuotas A žiede esančio vandenilio atomo yra stabilesnis negu suformuotas B žiede [12]. Buvo atlikti teoriniai RR molekulos struktūros skaičiavimai pagrįsti tankio funkcionalo teorija (ang. *DFT*) [12]. Gauti rezultatai patvirtino, kad RR antioksidacinis efektyvumas priklauso nuo H–abstrakcijos reakcijos. Lyginant su flavonoidais, kuriuose hidroksigrupių aktyvumas didesnis B žiede, RR hidroksigrupių vandenilio atomų geba dalyvauti H–abstrakcijos reakcijose yra panaši abiejuose žieduose (A ir B).

RR antioksidacinės savybės buvo tiriamos radikalinių reakcijų sužadimui naudojant azodiizobutironitrilą (AIBN) [19]. Radikalinių reakcijos produktų tyrimas efektyviaja skysčių chromatografija (angl. *high performance liquid chromatography (HPLC)*), parodė, kad antioksidacinė reakcija vyksta RR molekulos 2-oksifenipropanil fragmente.

Su antioksidacinėmis RR savybėmis labai glaudžiai susijusios fotofizikinės RR savybės, tokios kaip UV spindulių absorbcija ir fluorescencija. Tokios fenolinių junginių savybės labai priklauso nuo tirpalams ruošti naudojamo tirpiklio, o vandeniniuose tirpaluose nuo tirpalo pH vertės [20], nuo kurios priklauso RR disociacijos laipsnis [21]. Kai terpės pH vertė yra mažesnė nei RR pK_a vertė, kuri lygi 2,92, ji yra nedisocijuotoje formoje (žr. 1.4 pav.). Didėjant terpės pH vertei, pradžioje disocijuoja RR karboksigrupė. Šarminėje terpėje gali disocijuoti viena ar kelios RR hidroksigrupės. 1.4 paveiksle yra pateiktos neutrali ir galimos disocijuotos RR formos, jų žymėjimas bei būdingos pK_a vertės

RR neutralios ir disocijuotų formų fotofizikines savybes buvo ištirtos darbe [22]. Buvo palyginti skirtingų pH verčių RR vandeninių tirpalų fluorescencijos ir UV absorbcijos spektrai. Kai tirpalo pH vertė yra 1,1, RR yra nedisocijuotoje formoje RR1 (žr. 1.4 pav., RR1). Jos UV absorbcijos spektre maksimumas stebimas ties 328 nm, o fluorescencijos spektre – ties 445 nm. Tirpalo pH vertei padidėjus iki 2, fluorescencijos spektro maksimumo intensyvumo padidėja. Hipsochrominis UV absorbcijos ir fluorescencijos maksimumų poslinkis stebimas tirpalo pH vertei padidėjus iki 3. Šis pokytis siejamas su karboksigrupės disociacija t. y. perėjimu iš formos RR1 į RR2 (žr. 1.4 pav.). Toliau didinant RR tirpalo pH vertę iki 6, fluorescencija tampa vis intensyvesnė. Autoriai daro išvadą, kad disocijuotoje formoje (RR2 forma), RR pasižymi stipresnėmis fluorescencinėmis savybėmis nei rūgšties (RR1) formoje. Intensyviausiai RR tirpalas fluorescencuoja, kai jo pH vertė yra 8. UV absorbcijos spektre pastebimas batochrominis poslinkis, o fluorescencijos spektre atsiranda maksimumas ties 510 nm. Iš potenciometrinio

titravimo rezultatų yra žinoma [21], kad A žiede esančios OH grupės disociacijos konstanta pK_{a2} yra 8,36, t. y. fluorescencijos maksimumo poslinkis ilgesnių bangų link gali būti siejamas su disocijuotos formos RR3 (žr. 1.4 pav.) susidarymu. Kai RR tirpalo pH vertė yra 10, fluorescencijos maksimumo intensyvumas sumažėja, o UV absorbcijos spektro maksimumas pasislenka dėl B žiede esančios hidroksigrupės disociacijos, kai susidaro RR4 (žr. 1.4 pav.). Toliau didinant RR tirpalo pH vertę iki 12, UV absorbcijos spektro pobūdis nesikeičia, o fluorescencijos spektre stebimas hipsochrominis poslinkis. Tame pačiame darbe [22] buvo ištirta ir tirpiklio įtaką RR tirpalų fluorescencijai bei UV spindulių absorbcijai. Nustatyta, kad didėjant tirpiklio poliškumui, RR tirpalų fluorescencijos spektre stebimas botochrominis poslinkis, o UV spindulių absorbcijos spektre pokyčiai nežymūs. Apibendrinę gautus rezultatus darbo [22] autoriai daro išvadą, kad UV spindulių absorbcijos ir fluorescencijos spektrų pokyčiai yra susiję su RR forma, t. y. RR rūgšties forma pasižymi skirtingomis savybėmis lyginant su disocijuotomis formomis.



1.4 pav. RR neutralios ir disocijuotų formų cheminė struktūra ir būdingos pK_a vertės [21]

RR plačiai taikoma medicinoje, visų pirma dėl savo antioksidacinių savybių, susijusių su laisvųjų radikalų slopinimu, kuris yra didesnis nei trolokso (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksi rūgštis) [23], paprastai naudojamu įvertinant įvairių junginių antioksidacines savybes. Literatūroje aprašytas RR antibakterinis, antivirusinis ir priešuždegiminis [24], antimutageninis [25] poveikiai; galimybė gydyti atopinį dermatitą [26]; taikymas kolopatologinių vėžio ląstelių tyrimuose [27]. Tačiau praktinį fenolinių junginių

taikymą, taip pat ir RR, riboja jų mažas bioprieinamumas ir nestabilumas fiziologinėje aplinkoje [23]. RR stabilumą ir bioprieinamumą galima padidinti imobilizuojant įvairiuose polimeriniuose nešikliuose [28, 29].

1.2.2. Rozmarino rūgšties imobilizavimas polimeriniuose nešikliuose

Dėl savo puikių antioksidacinių, priešuždegiminių savybių RR galėtų pagerinti pieno produktų kokybę. Todėl darbe [30] buvo tiriama sąveika tarp RR ir galvijų pieno išrūgų baltymų (α -Lactalbumino, β -Lactoglobulino ir Lactoferrino), naudojant 2,2-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties radikalo (ABTS*) metodą antioksidacinėms savybėms įvertinti, HPLC, dinaminės šviesos sklaidos, FT-IR spektroskopijos bei diferencinės skenuojamosios kalorimetrijos metodus. Gauti rezultatai patvirtino nekovalentinę sąveiką tarp RR ir išrūgų baltymų: hidrofobinę, vandenilinių ryšių, dipolio-dipolinę. Gautų kompleksų dydis priklausė nuo terpės pH vertės ir antrinės baltymų struktūros. Intensyviausia sąveika vyko rūgštinėje terpėje ir visais atvejais buvo grįžtama. Į kompleksą sujungti baltymai buvo stabilesni nei atskirai paimti. Tačiau antioksidacinės RR savybės sumažėjo, ypač, komplekse su α -Lactalbuminu. Autorių nuomone prastesnes antioksidacines savybes sąlygojo dalies hidroksigrupių ekranavimas, susidarant kompleksui su baltymais.

Kiniečių mokslininkai [31] tyrinėjo RR sąveiką su žmogaus serumo albuminu (ŽSA) fluorescencinės spektroskopijos metodu. Gauta, kad vykstant sąveikai RR ženkliai sumažina ŽSA fluorescenciją. Autorių nuomone, ŽSA fluorescencinių savybių kitimas liudija apie sąveiką tarp RR ir ŽSA, pagrinde, dėl hidrofobinės sąveikos.

Kita problema, kylanti naudojant RR, yra jos nedidelis tirpumas vandenyje. RR ekstrakcijai iš gamtinės žaliavos dažnai yra naudojami metil- ar etilacetatas ir jų mišiniai su vandeniu [32]. Mažesnis fenolinio junginio tirpumas lemia prastesnį jo bioprieinamumą. Bioprieinamumui padidinti buvo ištirti RR ir natūralių ar modifikuotų ciklodekstrinų (CD) įtarpos kompleksai [33]. CD įtaka spektrinėms RR tirpalų savybėms buvo tiriama pastoviosios fluorescencijos bei UV spindulių absorbcijos metodais. Nustatyta, kad stochiometriniai kompleksai susidaro, esant moliniam CD ir RR santykiui lygiam 1. Didžiausiu efektyvumu sujungiant RR pasižymėjo metil- β -ciklodekstrinas. Gauti CD-RR kompleksų tirpalai buvo liofilizuoti. Jų sudėtis patvirtinta IR spektroskopija. Autoriai pažymėjo, kad gautų kompleksų antioksidacinis efektyvumas buvo didesnis nei vienos RR, ir tai siejo su o-katecholo struktūros RR molekulėje stabilizavimu dėl vandenilinių ryšių ir hidrofobinės sąveikos, susidarant kompleksui su CD. Tokie kompleksai, autorių nuomone, galėtų būti sėkmingai panaudoti maisto ir farmacijos pramonėje.

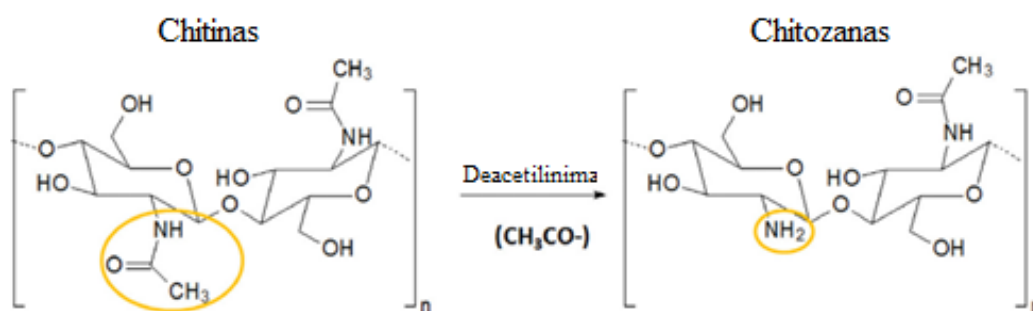
RR, kavos ir chlorogeno rūgščių adsorbicijai iš tirpalų buvo panaudotas tinklinis ketvirtinių amoniogrūpių turintis krakmolos (TKK) [34]. Pusiausviresios adsorbicijos sąlygomis gautoms adsorbicijos izotermėms aprašyti buvo panaudoti Lengmiuro, Freundlichio ir Dubinino-Raduškevičiaus adsorbicijos modeliai. Pagal adsorbicijos efektyvumo didėjimą tiriamos rūgštys išsidėstė tokia eile: kavos rūgštis < chlorogeno rūgštis < RR, t. y. jų disociacijos konstantos pK_a vertės mažėjimo tvarka. Kaip pagrindinė adsorbicijos varomojo jėga pripažinta elektrostatinė sąveika tarp TKK ketvirtinių amoniogrūpių ir jonizuotų rūgščių karboksigrūpių. Buvo apskaičiuotas TKK amoniogrūpių efektyvumas (EF), sujungiant fenolines rūgštis, kuris išreikštas moliais rūgšties tenkančiais vienai TKK ketvirtinio amoniogrupėi. Jeigu kiekviena ketvirtinė amoniogrupė prijungia vieną rūgšties molekulę, EF vertė lygi 1. Jeigu kavos ir chlorogeno rūgščių atveju 30 °C temperatūroje EF vertės buvo 0,42 mol/ekv. ir 0,61 mol/ekv., tai RR atveju 1,46 mol/ekv. [34]. Autoriai padarė prielaidą, kad adsorbuojant RR be elektrosstatinės sąveikos gali vykti ir hidrofobinė sąveika tarp jau adsorbuotų RR molekulių ir RR molekulių esančių tirpale.

Dėl specifinių savybių, tokių kaip biosuderinamumas ir bioskaidumas, polisacharidai vis dažniau naudojami bioaktyvių junginių pernašos sistemose [28]. Vienas iš gamtinių polisacharidų galintis imobilizuoti RR yra chitozanas. Darbe [35] RR buvo įkapsuliuota gamtinio ir modifikuoto, turinčio prijungtų karboksigrūpių, chitozано mikrodalelėse, išdžiovinant mišinio tirpalą purkštuvinėje džiovykloje. Gautos mikrodalelės, kurių vidutinis skersmuo buvo atitinkamai 4,5 μm ir 7,7 μm . RR rūgštis iš tokių dalelių buvo atpalaiduota į distiliuotą vandenį, kurio pH vertė 5,5, ir kokosų aliejų. Autorių nuomone taip imobilizuota RR gali būti taikoma kosmetinių preparatų gamyboje.

Pastaruojų metu ypatingas dėmesys yra skiriamas biopolimerų nanodalelių – aktyvių medžiagų pernašos sistemų kūrimui [29, 36], akcentuojant paiešką naujų daugiafunkcinių pernašos sistemų su tikslingu aktyvių junginių pristatymu ir atpalaidavimu, padidintu jų bioprieinamumu, naujomis bioaktyvumo variacijomis [37]. Darbe [23] chitozано nanodaleles buvo gautos tinklinant ištirpintą chitozaną natrio tripolifosfatu (TPF), esant jų masių santykiui 7:1. Taip gautų dalelių dydis buvo 200–300 nm. Prieš tinklinimą TPF į chitozано tirpalą įpylus RR tirpalo ar RR turinčių šalavijų ir dašio ekstraktų, buvo gautos dalelės su įkapsuliuotomis bioaktyviomis medžiagomis. Imobilizavimo efektyvumas, atitinkamai, buvo 51,2, 96,1 % ir 98,2 %. Gautos dalelės pasižymėjo terminiu stabilumu ir antioksidaciniu efektyvumu. Bandymai *in vitro* parodė, kad taip gautos tinklinio chitozано nanodalelės su įkapsuliuotomis RR, šalavijų ar dašių ekstraktais neturi reikšmingo citotoksiškumo akies tinklainės pigmento epitelio ir žmogaus ragenos ląstelėms, todėl yra perspektyvios taikant oftalmologijoje [38].

1.3. Chitozanas ir jo savybės

Chitozanas yra vienas iš dažniausiai gamtoje randamo polisacharido chitino darinys. Chitinas yra pagrindinė jūrų vėžiagyvių, vabzdžių ir kitų gyvūnų dengiamųjų audinių dalis, kurio taip pat randama kai kurių mikroorganizmų ląstelių sienelėse [39, 40, 41]. Chitinas ir chitozanas yra poliglukozaminai, besiskiriantys acetilinimo laipsniu (žr. 1.5 pav.), kuris yra vienas iš pagrindinių rodiklių nulemiančių tirpumą bei tirpalų savybes. Chitinas – linijinės struktūros polimeras, sudarytas iš 70–90 % N-acetil-D-gliukozamino ir 10–30 % D-gliukozamino vienetų, sujungtų β -1,4-glikozidinėmis jungtimis atsitiktine tvarka. Chitozanas sudarytas iš 75–95 % gliukozamino ir 5–25 % N-acetil-D-gliukozamino vienetų [39, 42].



1.5 pav. Chitino deacetilinimo reakcija

Chitozanas yra išgaunamas iš vėžiagyvių kriauklelių, naudojant eilę technologinių operacijų: baltymų pašalinimas, kriauklės apdorojant 1–2 % NaOH tirpalu; kalcio pašalinimas, apdorojant 10 % HCl tirpalu; chitino deacetilinimas 40–50 % NaOH tirpalu; plovimas; neutralizavimas; džiovinimas [42]. Taip gautas chitozanas yra baltos, rausvos arba gelsvos spalvos, bekvapiai, beskoniai milteliai, kurių fizikinės ir cheminės savybės priklauso nuo išgavimo sąlygų ir naudotos žaliavos [43]. Be to, chitozanas savybės priklauso nuo molekulinės masės. Yra skiriamas mažos, vidutinės ir didelės molekulinės masės chitozanas.

Chitozanas netirpsta vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, tačiau puikiai tirpsta parūgštintuose tirpaluose, kuriuose jonizuojasi jo pirminė aminogrupė. Tokiu būdu chitozanas yra vienintelis gamtinis pseudo-katijoninis polimeras, galintis sudaryti polielektrolitinius kompleksus (PEK) su anijoninių grupių turinčiais polimerais [44, 45] arba joninius kompleksus (IEK) su anijoniniais mažamolekuliniais junginiais [46, 47].

Dėl savo antibakterinių, antigrybinių, imunostimuliacinių savybių chitozanas plačiai naudojamas farmacijoje ir biomedicinoje, tame tarpe bioaktyvių junginių imobilizavimui [44, 48, 49].

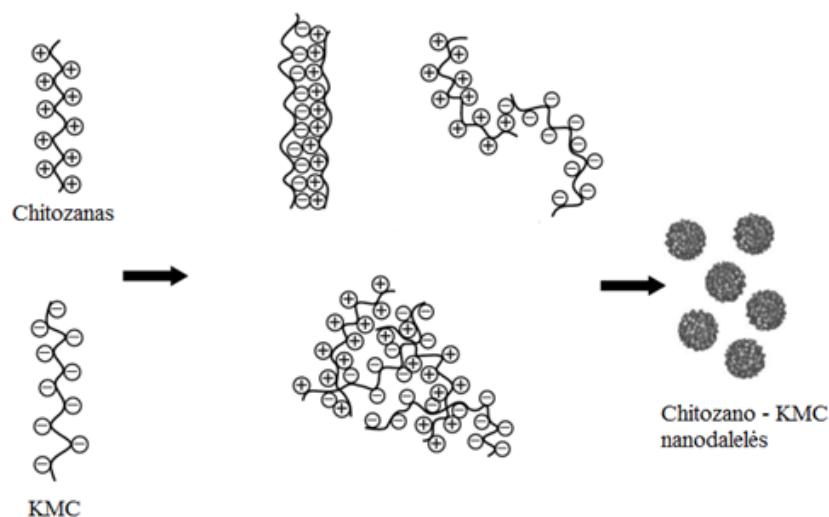
1.3.1. Chitozano ir anijoninių polimerų polielektrolitiniai kompleksai

Vienas dažniausiai naudojamų anijoninių polimerų PEK su chitozanu sudaryti yra dekstrano sulfatas (DESU). PEK susidaro dėl elektrostatinės sąveikos tarp DESU sulfonatgrupių ir protonuotų chitozano aminogrupių [50]. Daugiausia dėmesio yra skiriama nanodalelių pavidalo chitozano-DESU PEK gauti. Tam autoriai darbe [51] naudojo NaCl. Kai NaCl koncentracija buvo 2 mol/l ir daugiau, gautas tirpus chitozano-DESU kompleksas, kurį dializuojant, susidarė netirpus, stabilus saugant nanodydžio PEK dalelių koloidas. Chitozano-DESU PEK nanodalelės buvo panaudotos biologiškai aktyviai medžiagai kurkuminui imobilizuoti [52]. Gautos 200–220 nm dydžio, neigiamojo krūvio ženklo, kurkumino turinčios nanodalelės.

Chitozano ir karageninų PEK susidaro atitinkamai tarp silpno polielektrolito (chitozano) protonuotų aminogrupių ir stipraus polielektrolito (karageninų) sulfonatgrupių. Priklausomai nuo chitozano ir karagenino molekulinės masės, molinio santykio, bendros koncentracijos, terpės pH vertės ir joninės jėgos galima gauti tiek tirpius, tiek nuosėdų pavidalo PEK [45]. Chitozano-karagenino kompleksai nanodalelių pavidalu gaunami praskiestuose tirpaluose [53]. Gautų dalelių paviršiaus krūvis priklauso nuo masių santykio ir tirpalų supylimo tvarkos. Teigiamojo krūvio nanodalelės (+60 Mv, 500 nm) gautos lašinant praskiestą karagenino tirpalą į chitozano tirpalą. Mažesnio dydžio PEK dalelės gautos sudarant skersinius ryšius suformuotame chitozano-karagenino komplekse TPF [54]. Tinklinių dalelių dydis buvo 200 nm, jos gautos su didesne išeiga.

PEK tarp chitozano ir kito gamtinio anijoninio polisacharido natrio alginato susidarymas priklauso nuo terpės pH vertės. Alginato makromolekulė įgauna neigiamą krūvį, kai terpės pH vertė yra didesnė nei 3,38–3,65, o chitozano – teigiamą krūvį, kai pH vertė mažesnė nei 6,3 [55]. Chitozano-alginato PEK gali būti gauti „vienu etapu“ arba „dviem etapais“. Pirmuoju būdu alginato tirpalas lėtai lašinamas į chitozano tirpalą, turintį kalcio jonų arba be jų. Dviejų etapų procese, pirmiausiai, paruošiamas kalcio alginato gelis, kuris vėliau lašinamas į chitozano tirpalą. Priklausomai nuo metodikos gaunami nano-/mikrodalelių, nanovamzdelių, hidrogelių, plėvelių pavidalo chitozano-alginato PEK, kurie naudojami mažamolekulių junginių ar makromolekulių (baltymų, nukleotidų) pernašai vaistų sistemose [45]. Darbe [56] chitozano-alginato PEK panaudoti fenolinių junginių iš augalinių ekstraktų (gudobelių, kraujažolės, dilgėlių, aviečių ir alyvuogių lapų) imobilizavimui. Ekstruzijos būdu gautos mikrogranules pasižymėjo antioksidacinėmis savybėmis. Pasiūlyta jas naudoti padidintos biologinės vertės maisto produktuose.

Karboksimetilceliuliozės (KMC) makromolekulės grandinėse esančios karboksigrupės yra pilnai disocijavusios, kai terpės pH vertė yra 5, o dalinai – intervale nuo 3 iki 4. Taigi KMC karboksigrupės sąveikaudamos su chitozano protonuotomis aminogrupėmis sudaro PEK (žr. 1.6 pav.), ir priklausomai nuo įvairių faktorių (kompleksadarių koncentracijos, molekulinės masės, pH vertės ir kt.) galima gauti tirpius, nano- ar mikrodalelių pavidalo PEK [57]. Chitozano-KMC PEK gali būti naudojami vaistų pernašos sistemose [58], valgomųjų dangų gamyboje [59].



1.6 pav. Chitozano-KMC PEK susidarymas [57]

1.3.2. Chitozano ir mažamolekulių anijoninių junginių kompleksai

Kaip jau buvo minėta ankstesniuose skyriuose, chitozanas, jo aminogrupei prisijungus vandenilio atomą ir įgavus teigiamą krūvio ženklą, gali dalyvauti elektrostatinėje sąveikoje su anijoninių grupių turinčiais mažamolekuliais junginiais ir sudaryti joninius kompleksus. Taip buvo gauti RR ir tinklinių makromolekulių chitozano kompleksai [23, 37], aprašyti 2.2.2 skyriuje.

Literatūroje randama visa eilė darbų, skirtų kitų fenolinių rūgščių bei alifatinių karboksirūgščių sąveikai su chitozanu.

Rusų mokslininkai tyrė alifatinių karboksirūgščių adsorbciją iš vandeninių tirpalų ar vandens-etanolio tirpalų chitozano milteliais ir tinklinio chitozano mikrogranulėmis pusiausvrosios adsorbcijos sąlygomis [47]. Adsorbcijos izotermėms aprašyti jie taikė Lengmiuro, Freundlichio ir Redlichio-Peterseno adsorbcijos modelius. Iš vandeninių tirpalų adsorbuotas rūgščių kiekis priklausė nuo jų pK_a vertės, ir rūgštys išsidėstė tokia tvarka: acto > butano > pentano > propiono, t. y. jų pK_a vertės didėjimo tvarka. Autorių nuomone, pagrindinė adsorbcijos varomoji jėga yra elektrostatinė sąveika tarp jonizuotų chitozano aminogrupių ir jonizuotų rūgšties karboksigrupių. Tačiau jie pažymėjo ir hidrofobinės sąveikos tarp

karboksirūgščių angliavandenilinės grandinės ir hidrofobinių chitozano vidinės struktūros domenų svarbą. Adsorbuojant chitozano milteliais iš vandens-etanolio mišinio, pagal adsorbuotą kiekį rūgštys išsidėstė kita tvarka – pagal didėjantį angliavandenilinės grandinės ilgį: pentano > butano > propano > acto. Autoriai daro prielaidą, kad vandens-etanolio mišinyje chitozano makromolekulės keičia savo konformaciją, ir vidiniai hidrofobiniai domenai tampa labiau prieinami hidrofobinei angliavandenilinei karboksirūgšties daliai.

Mažos ir didelės molekulinės masės tinklinių makromolekulių chitozano ir protokatechino ar 2,5-dihidrobenzoinės rūgščių (2,5-DHBA) kompleksų nanodalelės gautos dėl elektrostatinės sąveikos tarp jonizuotų chitozano aminogrupių ir tiriamų rūgščių karboksigrupių [60]. Nuo 300 iki 600 nm dydžio nanodalelės buvo suformuotos tirpale ir sukonzentruotos centrifuguojant. Jos buvo stabilios 30 dienų, saugant 4 °C temperatūroje, tuo pačiu išsaugant antioksidacines rūgščių savybes. Buvo tiriama chitozano molekulinės masės įtaka imobilizuotų rūgščių atpalaidavimui iš nanodalelių į modelines skrandžio ir žarnyno terpes. Gauti duomenys parodė, kad fenolinių rūgščių atpalaidavimas į skrandžio terpę nepriklauso nuo naudoto kompleksui gauti chitozano molekulinės masės. Tuo tarpu į žarnyno terpę 2,5-DHBA buvo daugiau atpalaiduota iš nanodalelių gautų su mažos molekulinės masės chitozanu, o protokatechnino rūgštis lengviau atsipalaidavo iš dalelių gautų su didelės molekulinės masės chitozanu.

Galo rūgštis įkapsuliuojimui buvo panaudoti vidutinės molekulinės masės chitozanas, β-ciklodekstrinas ir ksantanas. Mikrodalelės buvo gautos liofilizuojant galo rūgštis ir atitinkamo polimero tirpalų mišinius [61]. Daugiausiai galo rūgštis buvo imobilizuota chitozano pagrindu gautose mikrodalelėse. Visais atvejais komplekse esanti galo rūgštis išsaugojo antioksidacines savybes.

Chlorogeno rūgštis (CLR) yra viena iš daugiausiai augaluose randamų fenolinių rūgščių, ypač daug jos yra žaliose kavos pupelėse. CLR buvo imobilizuota chitozano nanodalelėse, gautose sudarius tarp chitozano makromolekulių joninius skersinius ryšius TPF [62]. Terminio stabilumo tyrimai parodė, kad gautas kompleksas pasižymi geru terminiu stabilumu, todėl gali būti naudojamas termiškai ruošiamuose maisto produktuose. CLR iš gautų komplekso dalelių buvo atpalaiduota į modelines skrandžio ir žarnyno terpes: buvo stebimas staigus CLR atsipalaidavimas per pirmas 10 h (atsipalaidavo 69 % CLR), kuris sulėtėjo ir toliau truko iki 100 h. Autoriai konstatuoja, kad taip paruoštos CLR-chitozano nanodalelės gali būti panaudotos maisto produktų ir farmacinių preparatų praturtinimui CLR.

Dėl jonizuotos aminogrupės chitozanas gali adsorbuoti iš tirpalų anijoninius dažiklius [63]. Darbe [64] ištirpinto 1 % acto rūgštis tirpale ir, po to, liofilizuoto chitozano mikrogranulės buvo panaudotos sintetinių maistinių dažiklių pusiausvirajai adsorbicijai iš vandeninių tirpalų. Gautos po liofilizacijos chitozano mikrogranulės turėjo didesnę specifinę paviršių, susidariusių

mikroporų dydis buvo nuo 50 iki 200 μm . Dviejų pakopų Lengmiuro adsorbcijos modelis buvo panaudotas gautoms izotermėms aprašyti. Gauta, kad maistiniai dažikliai yra adsorbuojami dėl elektrostatinės sąveikos tarp priešingo krūvio ženklo grupių, sąlygos adsorbcijai ant chitozano mikrogranulių vykti yra palankios, adsorbcija vyksta spontaniškai, yra egzoterminė. Chitozano mikrogranulių sorbcinė geba priklausė nuo maistinio dažiklio struktūros, adsorbcijos temperatūros ir buvo nuo 788 iki 3316 mg/g.

Po tinklinimo TPF gautos chitozano mikrogranulės buvo panaudotos anijonių dažiklių Metanilinio geltono ir Rūgštinio mėlyno 15 adsorbcijai [65]. Adsorbuotų dažiklių kiekis priklausė nuo terpės pH vertės, ir buvo didžiausias, kai terpės pH vertė buvo mažesnė nei 5, t. y. esant terpei palankiai chitozano aminogrupių jonizacijai. Tai patvirtino, kad anijoniniai dažikliai yra adsorbuojami dėl elektrostatinės sąveikos. Adsorbcijos kinetikai aprašyti autoriai taikė pseudo-pirmojo ir pseudo-antrojo laipsnio kinetines lygtis. Gauta, kad pseudo-pirmojo laipsnio lygtis geriau aprašo adsorbcijos kinetiką, esant mažoms dažiklio koncentracijoms, o pseudo-antrojo – esant didesnėms tirtų dažiklių koncentracijoms. Pseudo-antrojo laipsnio kinetinė lygtis geriausiai tiko aprašyti ir maistinių dažiklių Rūgštinio mėlyno 9 bei Maistinio geltono 3 adsorbcijai ant chitozano miltelių [66], kas patvirtino anijoninių dažiklių chemisorbciją chitozanu.

1.4. Magistrinio darbo temos pagrindimas

RR plačiai taikoma medicinoje, visų pirma, dėl savo antioksidacinių savybių, susijusių su laisvųjų radikalų slopinimu. Literatūroje aprašytas RR antibakterinis, antivirusinis, priešušdegiminis, antimutageninis poveikiai [15]. Tačiau praktinį fenolinių junginių taikymą, tame tarpe ir RR, riboja jų mažas bioprieinamumas ir nestabilumas fiziologinėje aplinkoje. RR stabilumą ir bioprieinamumą galima padidinti imobilizuojant įvairiuose polimeriniuose nešikliuose, tame tarpe, chitozano nano- ir mikrogranulėse [23, 34].

Dėl specifinių savybių, tokių kaip biosuderinamumas ir bioskaidumas, chitozanas plačiai naudojamas bioaktyvių junginių pernašai farmacijoje ir biomedicinoje [44]. Chitozanas tirpsta parūgštintuose tirpaluose, kuriuose jonizuojasi jo pirminė aminogrupė. Tokiu būdu, chitozanas yra vienintelis gamtinis pseudo-katijoninis polimeras, galintis sudaryti polielektrolitinius kompleksus (PEK) su anijoninių grupių turinčiais polimerais [45] arba joninius kompleksus (IEK) su anijoniniais mažamolekuliais junginiais [47].

Paprasčiausias būdas netirpiems IEK gauti yra sumaišyti kompleksą sudarančių junginių tirpalus. Tačiau toks būdas nėra ekonomišką, nes naudojami praskiesti tirpalai, todėl labai nedidelės komplekso išeigos. Be to, prieš naudojant chitozaną reikia ištirpinti parūgštintuose

tirpaluose, o rūgštiniuose tirpaluose fenolinės rūgštys sunkiai disocijuoja. Todėl IEK gauti būtina kruopščiai parinkti tirpalų pH vertes.

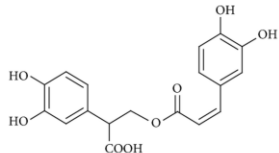
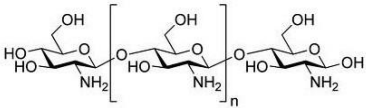
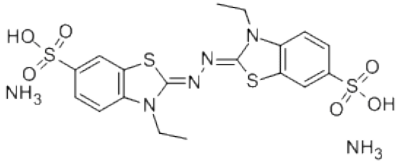
Kitas būdas – tarp chitozano makromolekulių sudaryti skersinius joninius ryšius natrio tripolifosfatu, ir gautas netirpias chitozano mikrogranules panaudoti fenolinėms rūgštims adsorbuoti [23, 60, 62]. Tuo tarpu alifatinėms karboksirūgštims [47] bei anijoniniams dažikliams adsorbuoti [66] buvo panaudoti pradiniai iš gamintojo gauti chitozano milteliai. Adsorbuojantis chitozano miltelių paviršiuje rūgštis ar dažiklio anijonui, gauti netirpūs IEK milteliai. Tačiau literatūroje neradome duomenų apie pradinių chitozano miltelių panaudojimą RR adsorbacijai. Tai būtų paprastas būdas gauti norimą kiekį turinčių netirpių miltelių pavidalo RR ir chitozano kompleksų.

2. METODINĖ DALIS

2.1. Naudotos medžiagos

Rozmarino rūgštis (RR) ir chitozanos (Chz) kompleksų gavimui ir jų ištyrimui naudotos medžiagos bei jų charakteristikos pateiktos 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Tyrimams naudotos medžiagos

Medžiaga	Formulė	Gamintojas, grynumas
Rozmarino rūgštis		Sigma-Aldrich, 96%
Chitozanas (mažos molekulinės masės)		Sigma-Aldrich
2,2-azinobis-(3- etilbenzotiazolino-6- sulfo rūgštis diamonio druska (ABTS)		Sigma-Aldrich, 98%
Acto rūgštis	CH_3COOH	UAB „EUROCHEMICALS“
Diklio vandenilio fosfatas	K_2HPO_4	Alfa Aesar
Kalio divandenilio fosfatas	KH_2PO_4	Alfa Aesar
Etanolis	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	AB „Stumbras“
Kalio persulfatas	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	UAB „EUROCHEMICALS“
Druskos rūgštis	HCl	UAB „EUROCHEMICALS“

2.2. Eksperimentų metodikos

2.2.1. Adsorbcijos kinetikos tyrimai

Į konusinę kolbą įdedama 0,025 g Chz miltelių ir užpilama 100 ml tam tikros koncentracijos RR vandeniniu tirpalu, kuris gaunamas praskiedus 1 g/l RR tirpalą. RR pradinių tirpalų pH vertės buvo $2,95 \pm 0,05$. Kolba uždengiama ir įstatoma į termostatuojamą vandens vonią su kratykle *WB-14* "Mettler GmbH" (Vokietija), kurioje temperatūra palaikoma ± 1 °C tikslumu. Tyrimai atliekami 30 °C, 35 °C ir 40 °C temperatūroje. Tam tikrais laiko intervalais mišinys filtruojamas per popierinį filtrą, ir filtrate nustatoma likutinė RR koncentracija.

Tam tikru laiko momentu Chz milteliais adsorbuotas RR kiekis q_t (g/g) apskaičiuojamas pagal lygtį:

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

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

2.2.2. Rozmarino rūgšties koncentracijos nustatymas

RR koncentracijai tiriamajame tirpale nustatyti, jis praskiedžiamas distiliuotu vandeniu reikiamą skaičių kartų, ir išmatuojama UV spindulio sugertis gautu praskiestu tirpalu UV/VIS spektrofotometru *Jenway 6715* (Didžioji Britanija). Matuojama 326 nm UV spindulio (λ_{\max}) sugertis. RR koncentracija nustatoma iš kalibracinės tiesės.

2.2.3. Chitozano miltelių su adsorbuota rozmarino rūgštimi gavimas

1 g Chz miltelių suberiamas į stiklinę, įpilama 500 ml 1 g/l koncentracijos RR tirpalo ir maišoma magnetine maišykle 60 minučių kambario temperatūroje (22 ± 1 °C). Tada mišinys filtruojamas per stiklinį filtrą, ir apskaičiuojama likutinė RR koncentracija filtrate. Chz milteliais adsorbuotas RR kiekis apskaičiuotas pagal formulę (2.1), kurioje vietoje koncentracijos C_t , yra naudojama likutinė RR koncentracija filtrate po adsorbcijos. Stiklo filtre likę milteliai du kartus praplauti distiliuotu vandeniu ir džiovinti kambario temperatūroje (1 žingsnis).

Gauti Chz milteliai su adsorbuota RR pavadinti RR-Chz milteliais, jų sudėtis įvertinta moliais RR tenkančiais moliui Chz (mol/mol).

Norint gauti RR-Chz miltelius su didesniu adsorbuotos RR kiekiu, aukščiau aprašyta procedūra buvo kartojama keletą kartų, naudojant RR-Chz miltelius, gautus 1 žingsnyje ar po to kituose. Taip gauti RR-Chz milteliai, kurių sudėtis buvo 0,1 mol/mol, 0,22 mol/mol, 0,39 mol/mol, 0,6 mol/mol ir 0,8 mol/mol.

2.2.4. Drėgmės kiekio nustatymas

Drėgmės kiekis medžiagoje nustatytas drėgnomačiu *Kern MRS 120-3* (Vokietija) ir apskaičiuotas pagal formulę:

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

čia: ω – drėgmės kiekis, %; m_0 – pradinė medžiagos masė, g; m_1 – medžiagos masė po džiovavimo, g.

2.3. RR-Chz miltelių analizė

2.3.1. Skenuojamosios elektroninės mikroskopijos (SEM) tyrimas

SEM tyrimui Chz ar RR-Chz 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*.

2.3.2. Furje transformacijos infraraudonoji (FT-IR) spektroskopija

Chz ir RR-Chz miltelių FT-IR visiško atspindžio (ATR) spektrai užrašyti *Frontier* spektrofotometru *Perkin Elmer* (JAV). Nedidelis kiekis bandinio prispaudžiamas prie deimanto kristalo plokštelės ir užrašomas spektras bangų srities intervale nuo 4000 cm^{-1} iki 655 cm^{-1} , skenavimų skaičius 5, skiriamoji geba 4 cm^{-1} .

2.3.3. Termogravimetrinė (TG) analizė

Chz ir RR-Chz miltelių TG analizė atlikta *Perkin Elmer (TGA 4000)* terminiu analizatoriumi azoto (dujų debitas $20 \text{ cm}^3/\text{min}$) aplinkoje. Apie 10 mg bandinys keraminiame tiglyje buvo kaitinamas $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ greičiu temperatūrų intervale nuo 35 iki $600 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3.4. Fluorescencinė spektroskopija

RR-Chz miltelių vandeninių ir etanolinių dispersijų bei RR vandeninių tirpalų fluorescencijos spektrai užrašyti spektrofotometru *Perkin Elmer LS-55*, kambario temperatūroje. Sužadinimo spindulio bangos ilgis 325 nm, o emisijos spektras užrašytas intervale nuo 350 nm iki 650 nm, skenuota 2 kartus.

RR-Chz miltelių vandeninių dispersijų paruošimas matavimo kiuvetėje. Skirtingos sudėties RR-Chz kompleksų miltelių buvo pasveriami tiek, kad juose RR būtų 0,001g. Milteliams sudrėkinti įlašinami 2 lašai etanolio, įpilama 3 ml distiliuoto vandens, kiuvetė dedama į spektrofotometrą ir gauta dispersija maišoma magnetine maišykle 3 min. Tada maišymas išjungiamas ir užrašomas fluorescencijos spektras.

RR-Chz miltelių etanolinių dispersijų paruošimas. Skirtingos sudėties RR-Chz kompleksų miltelių buvo pasveriami tiek, kad juose RR būtų 0,005 g. Milteliai užpilami 50 ml etanolio ir 30 min maišomi magnetine maišykle 300 aps./min greičiu. Gauta dispersija skiedžiama etanolio 50 kartų, ir užrašomas gautos praskiestos dispersijos fluorescencijos spektras.

RR vandeninių tirpalų paruošimas. RR koncentracija vandeniniuose tirpaluose buvo tokia, kokia būtų įdėjus 0,002 g atitinkamos sudėties RR-Chz kompleksų. Tokios koncentracijos RR vandeniniai tirpalai paruošti skiedžiant 1 g/l RR tirpalą.

2.3.5. Rozmarino rūgšties desorbcijos iš RR-Chz miltelių tyrimas

Tiksliai pasverti 0,05 g absoliučiai sausų skirtingos sudėties RR-Chz miltelių buvo užpilami 50 ml desorbcijos tirpalo ir 30 min maišomi magnetine maišykle 300 aps./min greičiu 22±1 °C temperatūroje. Po to bandiniai filtruoti pro popierinį filtrą ir filtrate nustatyta RR koncentracija.

Desorbuotas RR kiekis apskaičiuotas iš pradinės, su RR-Chz milteliais įdėtos RR koncentracijos atėmus RR koncentraciją nustatytą filtrate. Kaip desorbcijos tirpalai naudoti distiliuotas vanduo, etanolis, 0,1 M HCl tirpalas, 0,5% acto rūgšties tirpalas ir 0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas, kurio pH vertė 6,8.

Desorbcijos efektyvumas (*DEF*, %), apskaičiuotas pagal lygtį:

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

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

2.3.6. Antioksidacinio efektyvumo įvertinimas

RR-Chz miltelių antioksidacinis efektyvumas įvertintas, naudojant 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfo rūgšties) diamonio druską (ABTS metodu) [67]. $ABTS^+$ radikalo katijonas gautas reaguojant 7 mM ABTS tirpalui su 2,45 mM kalio persulfato tirpalu, paliekant mišinį tamsoje kambario temperatūroje 12–16 valandų. Gautas $ABTS^+$ yra stabilus apie 2 dienas laikant tamsoje, kambario temperatūroje. $ABTS^+$ tirpalas buvo skiedžiamas distiliuotu vandeniu taip, kad 734 nm monochromatinio spindulio sugertis būtų $1,0 \pm 0,02$.

Skirtingos sudėties RR-Chz miltelių stiklinėje pasveriami tiek, kad juose RR būtų 0,001g. Milteliai suvilgomi 1 ml etanolio ir įpilama 100 ml praskiesto $ABTS^+$ tirpalo. Po 5, 15, 30, 60 ir 120 min spektrofotometru *PG Instruments T60 UV/Vis* išmatuojama 734 nm bangos ilgio

monochromatinio spindulio sugertis tiriamu tirpalu. Antioksidacinis efektyvumas (*AOEF*, %) apskaičiuojamas pagal formulę:

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

čia: A_0 – šviesos sugertis ABTS⁺ tirpalu prieš bandymą, sant.vnt.; A_t – šviesos sugertis ABTS⁺ tirpalu laiko momentu t , sant.vnt.

2.3.7. Vandens garų sugerties RR-Chz milteliais nustatymas

Stikliniuose biuksuose skirtingos sudėties RR-Chz milteliai, išdžiovinti 105 °C temperatūroje iki absoliučiai sausos masės ir pasverti analitinėmis svarstyklėmis, patalpinti į 92 % pastovaus drėgnio eksikatorių, užpildytą sočiu KNO₂ 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:

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

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

2.4. 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.

Standartinė matavimų paklaida apskaičiuojama pagal formulę:

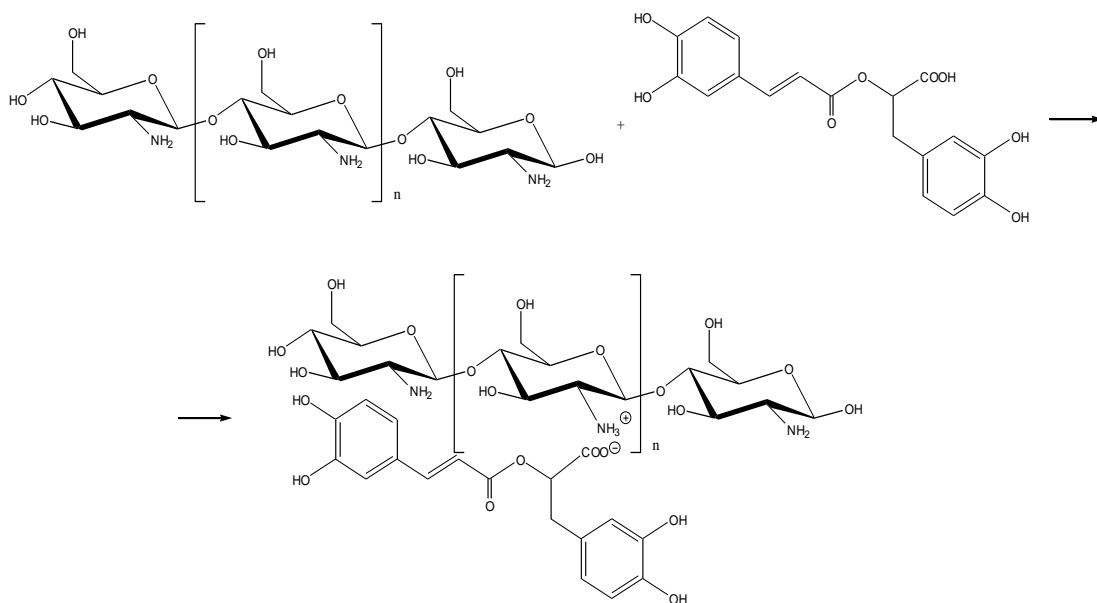
$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{X} - X_i)^2}{N - 1}} ; \quad (2.7)$$

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Rozmarino rūgšties adsorbicija chitozano milteliais

Parūgštintuose tirpaluose chitozanas (Chz) ištirpsta, nes jonizuojasi jo pirminė aminogrupė. Turėdamas teigiamo krūvio ženklą grupių, Chz tirpale gali sudaryti joninius kompleksus su neigiamo krūvio ženklą turinčiais mažamolekuliniais junginiais [46, 47], tame tarpe rozmarino rūgštimi (RR) [37]. Netirpiams kompleksams gauti tarp Chz makromolekulių yra sudaromi skersiniai ryšiai, dažniausiai tam naudojant TPF [23].

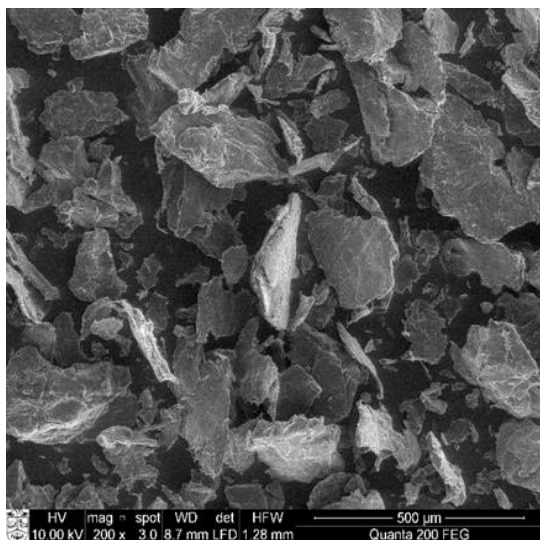
Šio darbo tikslas buvo gauti netirpius RR ir Chz kompleksus (RR-Chz) adsorbuojant RR iš tirpalų pradiniais Chz milteliais. Tyrimuose naudotų RR vandeninių tirpalų pH vertė, priklausomai nuo koncentracijos, buvo $2,95 \pm 0,05$. Yra žinoma, kad RR disociacijos konstantos pK_a vertė yra 2,92 [21]. Taigi naudotuose vandeniniuose tirpaluose RR karboksigrupė yra jonizuota. Jonizuojantis RR karboksigrūpei atsipalaidavęs vandenilio jonas jonizuoja Chz miltelių paviršiuje esančias aminogrupes, kurios iškart dalyvauja elektrostatinėje sąveikoje su jonizuotomis karboksigrūpėmis (žr. 3.1 pav.), ir neleidžia susidariusiam RR-Chz kompleksui ištirti.



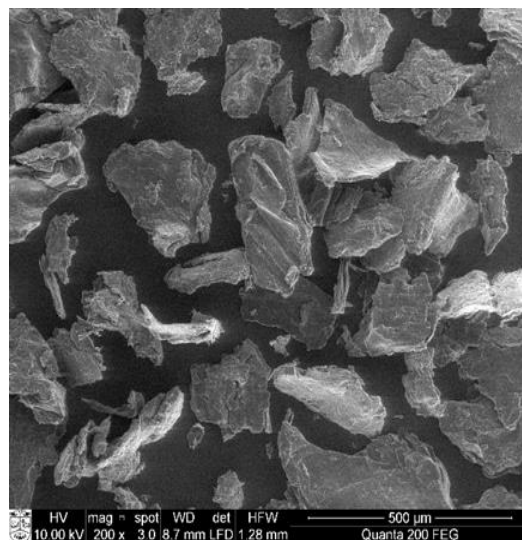
3.1 pav. Elektrostatinė sąveika susidarant netirpiams RR-Chz kompleksams

Tai, kad adsorbudamas RR Chz nesuspėja ištirti, ir gauti RR-Chz kompleksai yra analogiško Chz milteliams pavidalo, parodo 3.2 paveiksle pateiktos padidintos SEM nuotraukos. RR yra adsorbuojama įvairaus dydžio, daugiakampių plokštelių pavidalo Chz milteliais, kurių forma po adsorbicijos nepasikeičia, tačiau nelieka smulkesnių dalelių (žr. 3.2 pav., a ir b). Kaip matyti iš 1000 kartų padidintų RR-Chz miltelių SEM nuotraukos (žr. 3.2 pav., d), adsorbicijos

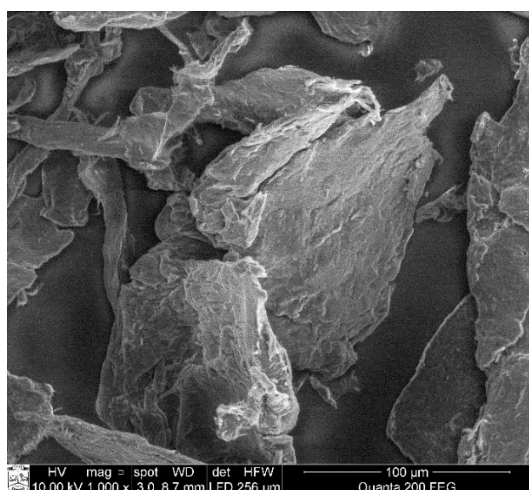
metu smulkesnės dalelės yra sujungiamos į agregatus. Be to, RR-Chz dalelių paviršius yra labiau gruoblėtas palyginus su Chz dalelių paviršiumi (žr. 3.2 pav., c).



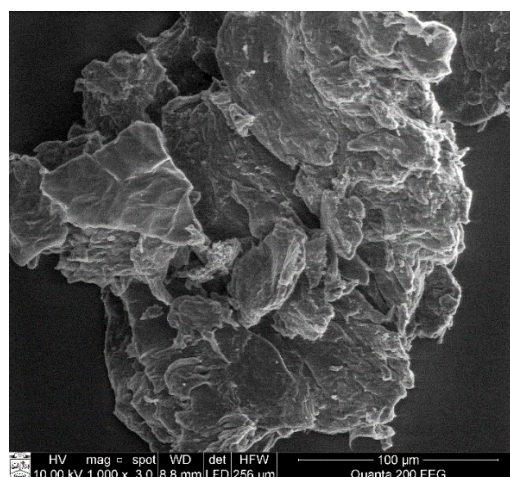
a



b



c

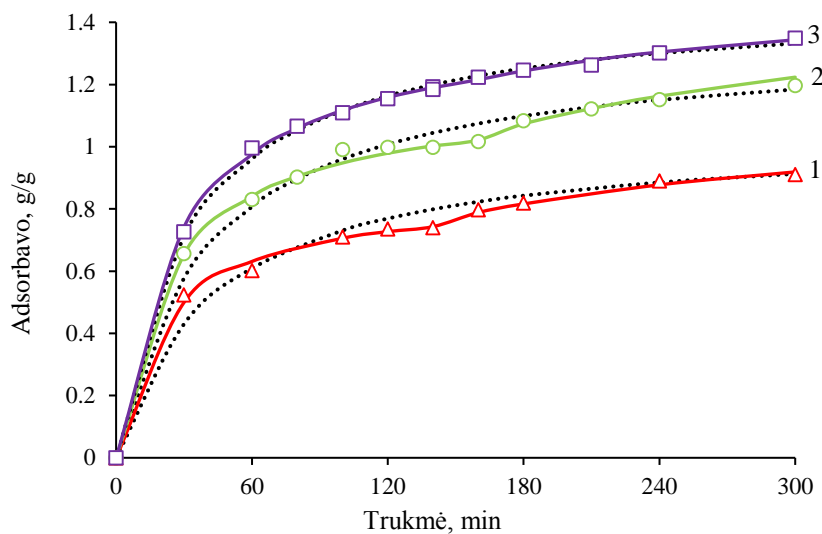


d

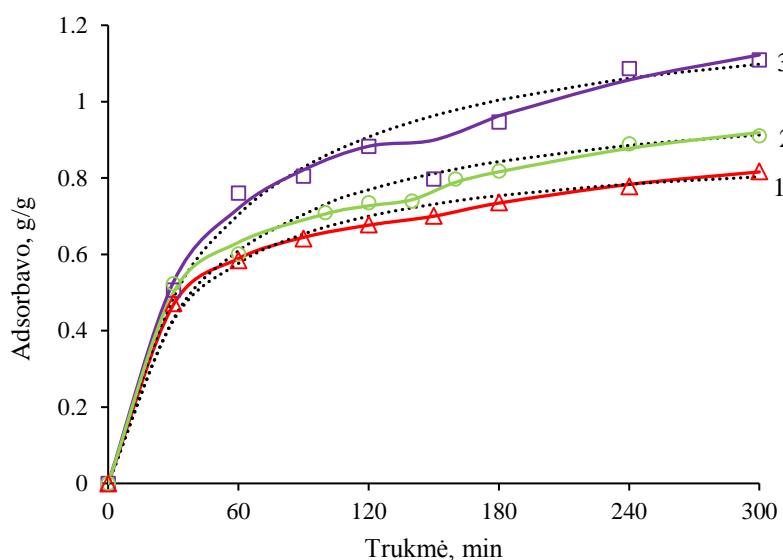
3.2 pav. SEM nuotraukos Chz miltelių (a, c) ir RR-Chz komplekso, turinčio 0,39 mol/mol RR, miltelių (b, d). Didinimas: a, b – 200 kartų; c, d – 1000 kartų.

Buvo ištirta RR adsorbcijos Chz milteliais priklausomybė nuo adsorbcijos temperatūros ir RR koncentracijos tirpale. Gautos kinetinės kreivės yra pateiktos 3.3 ir 3.4 paveiksluose. Kaip matyti iš paveiksluose pateiktų duomenų, Chz milteliais adsorbuotas RR kiekis didėja didėjant adsorbcijos temperatūrai (žr. 3.3 pav.) bei RR koncentracijai tirpale (žr. 3.4 pav.). Be to, iš pateiktų kinetinių kreivių matyti, kad RR adsorbcija vyksta nevienodu greičiu. Pradžioje RR adsorbuojama greitai ir pusiausvyra nusistovi po 120 min (I etapas). Toliau tęsiant adsorbciją, adsorbuotas RR kiekis vėl didėja, tačiau lėčiau ir pusiausvyra pasiekama maždaug po 300 min

(II etapas). Panašūs duomenys buvo gauti adsorbuojant švino jonus tinklinio chitozono mikrogranulėmis [68].



3.3 pav. Chz milteliais adsorbunto RR kiekio priklausomybė nuo trukmės, kai adsorbcijos temperatūra: 1 – 30 °C; 2 – 35 °C; 3 – 40 °C. Taškai atitinka eksperimentinius duomenis, kreivės nubrėžtos naudojant pseudo-antrojo laipsnio kinetinio modelio rodiklius, kai skaičiavimuose naudoti: taškinė kreivė – visi eksperimentiniai taškai; ištisinė kreivė - atskirai I ir II etapų duomenys. Pradinės RR ir Chz koncentracijos, atitinkamai, buvo 0,58 g/l ir 0,25g/l



3.4 pav. Chz milteliais adsorbunto RR kiekio priklausomybė nuo trukmės, kai RR koncentracija: 1 – 0,3 g/l; 2 – 0,58 g/l; 3 – 1,04 g/l. Taškai atitinka eksperimentinius duomenis, kreivės nubrėžtos naudojant pseudo-antrojo laipsnio kinetinio modelio rodiklius, kai skaičiavimuose naudoti: taškinė kreivė – visi eksperimentiniai taškai; ištisinė kreivė - atskirai I ir II etapų duomenys. Pradinė Chz koncentracija 0,25g/l, temperatūra 30°C

3.3 ir 3.4 paveiksle pateiktiems RR adsorbcijos Chz milteliais duomenims 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, min^{-1} .

Pseudo-antrojo laipsnio kinetinio modelio rodiklių q_e ir k_2 vertės buvo apskaičiuotos tiek naudojant visus eksperimentinius duomenis, t. y. 0–300 min intervale, tiek atskirai I (0-120 min intervalas) ir II (120-300 min intervalas) etapams. Gauti rezultatai kartu su pasiklivimo lygmens R^2 vertėmis pateikti 3.1 ir 3.2 lentelėse.

3.1 lentelė. RR adsorbcijos Chz milteliais pseudo-antrojo laipsnio kinetinio modelio rodiklių priklausomybė nuo adsorbcijos temperatūros. Pradinės RR ir Chz koncentracijos atitinkamai buvo 0,58 g/l ir 0,25 g/l

Adsorbcijos temperatūra, °C	I etapas			II etapas			Visi eksperimentiniai duomenys		
	q_e , g/g	k_2 , min^{-1}	R^2	q_e , g/g	k_2 , min^{-1}	R^2	q_e , g/g	k_2 , min^{-1}	R^2
30	0.86	0.054	0.9969	1.13	0.013	0.9966	1.02	0.023	0.9927
35	1.17	0.037	0.9973	1.47	0.010	0.9974	1.32	0.021	0.9957
40	1.43	0.025	0.9992	1.53	0.016	0.9992	1.48	0.021	0.9920

3.2 lentelė. RR adsorbcijos Chz milteliais pseudo-antrojo laipsnio kinetinio modelio rodiklių priklausomybė nuo RR koncentracijos. Pradinė Chz koncentracija 0,25 g/l, temperatūra 30 °C

RR koncentracija, g/l	I etapas			II etapas			Visi eksperimentiniai duomenys		
	q_e , g/g	k_2 , min^{-1}	R^2	q_e , g/g	k_2 , min^{-1}	R^2	q_e , g/g	k_2 , min^{-1}	R^2
0,30	0,79	0,060	0,9848	0,98	0,017	0,9994	0,89	0,034	0,9978
0,58	0,86	0,054	0,9969	1,13	0,013	0,9966	1,02	0,023	0,9927
1,04	1,14	0,025	0,9915	1,49	0,007	0,9820	1,28	0,016	0,9938

Kaip matyti iš lentelėse pateiktų duomenų, pasiklivimo lygmens R^2 vertės yra didesnės nei 0,99, išskyrus du skaičiavimo atvejus (žr. 3.2 lentelė), kai R^2 vertė buvo didesnė nei 0,98. Tai rodo, kad pseudo-antrojo laipsnio kinetinė lygtis gerai tinka aprašyti tiek visiems eksperimentiniams duomenims, tiek atskirai I ir II etapų duomenims. Bendras adsorbuotas RR

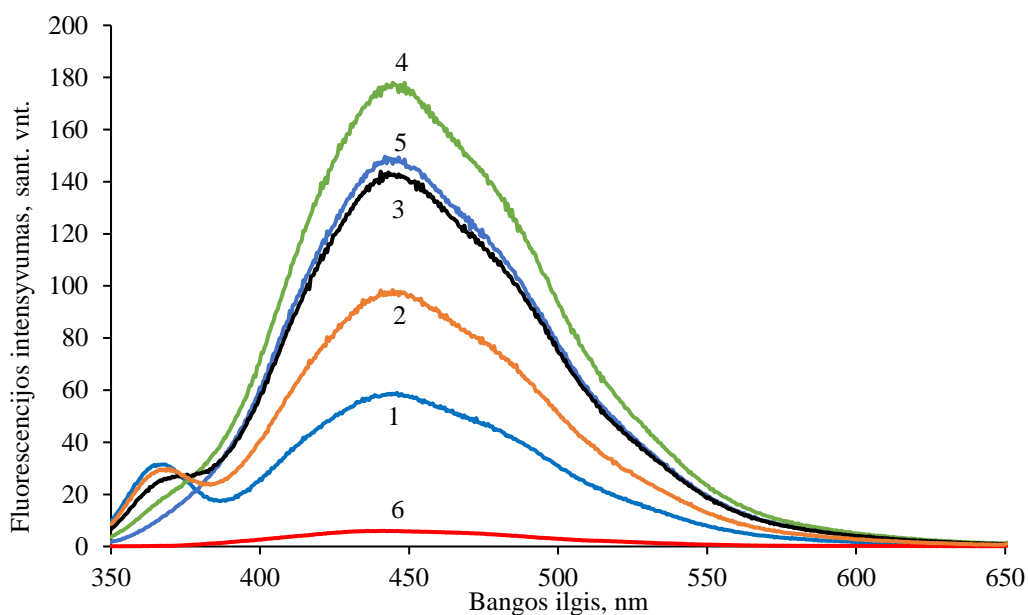
kiekis bei RR kiekis adsorbuotas I ir II etapuose didėja didėjant temperatūrai (žr. 3.1 lent.) ir RR koncentracijai tirpale (žr. 3.2 lent.). Kiek kitaip yra su adsorbcijos greičiu. I etape adsorbcijos greitis mažėja tiek didėjant adsorbcijos temperatūrai, tiek RR koncentracijai tirpale. Temperatūros įtaka adsorbcijos greičiui II etape nėra vienareikšmė, tuo tarpu didėjant RR koncentracijai tirpale, adsorbcijos greitis II etape taip pat mažėja. Analogišką įtaką adsorbcijos temperatūra ir RR koncentracija turi ir adsorbcijos greičiui, apskaičiuotam naudojant visus eksperimentinius taškus.

3.1 ir 3.2 lentelėse pateikti pseudo-antrojo laipsnio kinetinio modelio rodikliai buvo panaudoti braižant teorines kreives per eksperimentinius taškus. Iš 3.3 ir 3.4 paveiksluose pateiktų kreivių matyti, kad kreivės nubraižytos naudojant atskirai I ir II etapui apskaičiuotus rodiklius, (ištininė kreivė) geriau atitinka eksperimentinius taškus nei kreivės, nubraižytos, kai kinetinio modelio rodikliai buvo skaičiuoti naudojant visus eksperimentinius taškus (taškinė kreivė). Tai patvirtina, kad RR adsorbcija Chz milteliais vyksta dviem etapais ir skirtingu greičiu.

Pirmajame etape visos aminogrupės išoriniame Chz miltelių paviršiuje yra laisvos, o RR tirpalo koncentracijos gradientas yra didelis, todėl RR adsorbuojama greitai. Antrasis RR adsorbcijos etapas gali vykti dėl dviejų priežasčių: aminogrupių jonizacijos Chz miltelių vidiniame paviršiuje arba dėl adsorbcijos jėgų pasikeitimo išoriniame Chz miltelių paviršiuje. Pasibaigus pirmajam etapui RR karboksigrupės dėl elektrostatinės sąveikos su Chz aminogrupėmis yra nukreiptos į Chz miltelių paviršių. Tuo tarpu aromatiniai RR žiedai yra nukreipti į išorę, t. y. RR-Chz komplekso miltelių paviršius tampa hidrofobinis. Todėl II adsorbcijos etapas gali vykti dėl hidrofobinės sąveikos tarp RR molekulių, adsorbuotų Chz miltelių paviršiuje ir tirpale likusių laisvų, aromatinių žiedų. Tokia sąveika yra aiškinamas rūgštinių dažiklių giminingumas vilnos pluoštui [69, 70], t. y. be elektrostatinės sąveikos tarp dažiklio anijono ir jonizuotų vilnos aminogrupių, vyksta ir hidrofobinė sąveika tarp hidrofobinių dažiklio ir vilnos dalių, kuri ir apsprendžia rūgštinių dažiklių giminingumą pluoštui. Kai hidrofobinis rūgštinio dažiklio anijonas patenka į vandenį, vandens molekulės stengiasi iki minimumo suamžinti kontaktą su hidrofobinėmis dažiklio dalimis. Todėl dažikliai tirpale agreguojasi arba yra išstumiami ant pluošto paviršiaus, ir vandens molekulių struktūra atsistato.

Kad RR molekulės vandeniniame tirpale linkę sudaryti agregatus patvirtina 3.5 paveiksle pateikta vandeninių RR tirpalų fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo koncentracijos. RR tirpalų fluorescencijos intensyvumas priklauso nuo RR molekulių koncentracijos tirpale. Pradžioje, didėjant koncentracijai nuo 0,002 g/l iki 0,02 g/l, RR tirpalai fluorescuoja vis intensyviau, nes tirpale didėja galinčių fluorescuoti RR molekulių skaičius. Tačiau 0,03 g/l koncentracijos RR tirpalo fluorescencija sumažėja, o 0,2 g/l RR tirpalas praktiškai visai ne

fluorescuoja, t. y. tirpale nelieka laisvų RR molekulių dėl hidrofobinės sąveikos nulemtos agregacijos. Hidrofobinė sąveika, skatinanti RR molekulių agregaciją, tikėtina yra RR adsorbcijos Chz milteliais II etape priežastis.



3.5 pav. RR koncentracijos įtaka vandeninių tirpalų fluorescencijos intensyvumui. RR koncentracija tirpale: 1 – 0,002 g/l; 2 – 0,003 g/l; 3 – 0,007 g/l; 4 – 0,02 g/l; 5 – 0,03 g/l; 6 – 0,2 g/l

Apibendrinant šiame skyriuje pateiktus duomenis galima teigti, kad pradžioje RR molekulės yra adsorbuojamos Chz miltelių paviršiuje dėl elektrostatinės sąveikos tarp jonizuotų RR karboski- ir Chz aminogrupių. Adsorbuojantis RR molekulėms Chz miltelių paviršius tampa vis labiau hidrofobiniu, susidaro netirpūs vandenyje RR-Chz komplekso milteliai. Toliau tęsiant adsorbciją prasideda hidrofobinė sąveika tarp jau adsorbuotų Chz milteliais RR molekulių ir tirpale likusių RR molekulių aromatinių dalių. Šiame etape RR molekulės RR-Chz komplekso miltelių paviršiuje išsidėsto aromatinėmis dalimis į vidų, o jonogeninėmis karboksigrupėmis į išorę, todėl ir RR-Chz miltelių hidrofobiškumas turėtų mažėti.

3.2. Skirtingą rozmarino rūgšties kiekį turinčių netirpių RR-Chz kompleksų gavimas ir savybių tyrimas

Skirtingas RR molekulių išsidėstymas RR-Chz komplekso miltelių paviršiuje galėtų turėti įtakos kompleksų savybėms. Savybių tyrimams reikėjo gauti didesnius RR-Chz komplekso miltelių kiekius. RR tirpumas yra ribotas, todėl galima naudoti ne didesnės kaip 1 g/l koncentracijos RR tirpalus. Norint Chz milteliais adsorbuoti didesnę RR kiekį, reikėtų sunaudoti labai daug RR tirpalo. Be to, po adsorbcijos dalis RR liktų tirpale, t. y. būtų neekonomiškai

naudojama brangi RR. Todėl RR-Chz kompleksams, turintiems daugiau adsorbuotos RR, gauti buvo panaudota daugiapakopė adsorbicija.

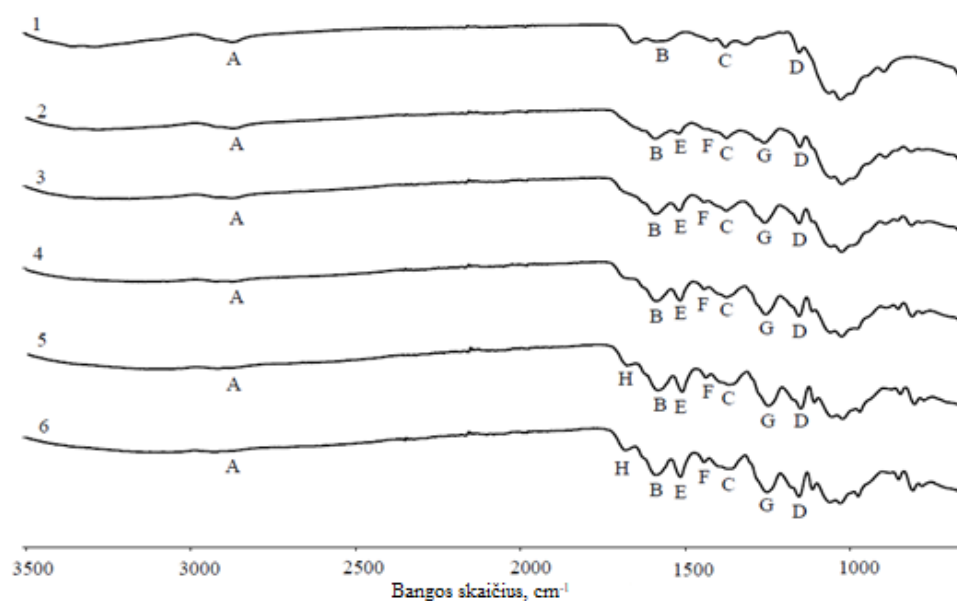
Pradžioje 4 g absoliučiai sausų mažos molekulinės masės Chz miltelių buvo užpilti 1000 ml 1 g/l koncentracijos RR tirpalu ir maišomi magnetine maišykle 60 minučių kambario temperatūroje (22 ± 1 °C). Tada mišinys filtruotas pro stiklinį filtrą, ir nustatyta likutinė RR koncentracija filtrate (0,064 g/l). Stiklo filtre likę milteliai du kartus praplauti distiliuotu vandeniu ir išdžiovinti kambario temperatūroje. Chz milteliais adsorbuotas RR kiekis apskaičiuotas iš skirtumo tarp pradinės ir likutinės RR tirpalo koncentracijos. Taip gautas RR-Chz kompleksas turintis 0,11 mol/mol RR. 0,8 g komplekso miltelių buvo palikti, o likusi dalis užpilta 750 ml 1 g/l RR tirpalu ir pakartota aukščiau aprašyta adsorbicijos procedūra. Gautas RR-Chz kompleksas, turintis 0,22 mol/mol adsorbuotos RR. Toliau kartojant procedūrą buvo gauti kompleksai turintys 0,39 mol/mol, 0,6 mol/mol ir 0,8 mol/mol adsorbuotos RR. Kadangi sekančiuose etapuose po adsorbicijos likutinė RR koncentracija filtrate buvo didesnė nei 0,2 g/l, filtratai buvo panaudoti ruošiant sekančio adsorbicijos etapo tirpalus.

3.2.1. RR-Chz kompleksų miltelių FT-IR analizė

RR-Chz sudėčiai patvirtinti buvo užrašyti Chz ir skirtingos sudėties RR-Chz miltelių FT-IR spektrai, kurie pateikti 3.6 paveiksle.

Chz FT-IR spektre (žr. 3.6 pav., 1 kr.) yra matoma eilė Chz būdingų sugerties juostų [71, 72, 73]: ties 2872 cm^{-1} (smailė A) priskiriama piranozės žiedui, ties 1590 cm^{-1} (smailė B) ir 1375 cm^{-1} (smailė C), priskiriamos, atitinkamai, N–H jungties virpesiams amino- ir amidogrupėse bei ties 1150 cm^{-1} (smailė D), susijusi su –C–O–C– virpesiais glikozidinėje jungtyje.

RR-Chz kompleksų FT-IR spektruose (žr. 3.6 pav., 2–6 kr.) Chz būdingos sugerties juostos išlieka, tačiau keičiasi jų intensyvumas. Smailės ties 2872 cm^{-1} (smailė A) intensyvumo sumažėjimas gali būti susiejamas su mažėjančiu Chz kiekiu RR-Chz komplekse, didėjant adsorbuotos RR kiekiui. Tuo tarpu smailių B, C ir D intensyvumas, atvirkščiai, didėjant adsorbuotos RR kiekiui komplekse didėja. Smailės ties 1590 cm^{-1} (smailė B) intensyvumo padidėjimas gali būti paaiškintas jonizuotų aminogrupių kiekio padidėjimu dėl elektrostatinės sąveikos su jonizuotomis RR karboksigrupėmis, ir patvirtina joninio komplekso tarp Chz ir RR susidarymą. Tuo labiau, kad didėjant RR kiekiui komplekse, išauga sugerties juostų intensyvumas ties 1514 cm^{-1} (smailė E) ir 1444 cm^{-1} (smailė F), o tai siejama su RR aromatinio žiedo virpesiais [74].



3.6 pav. FT-IR spektrai Chz (1) ir RR-Chz kompleksų, kurių sudėtis, mol/mol: 2 – 0,11; 3 – 0,22; 4 – 0,39; 5 – 0,6; 6 – 0,8

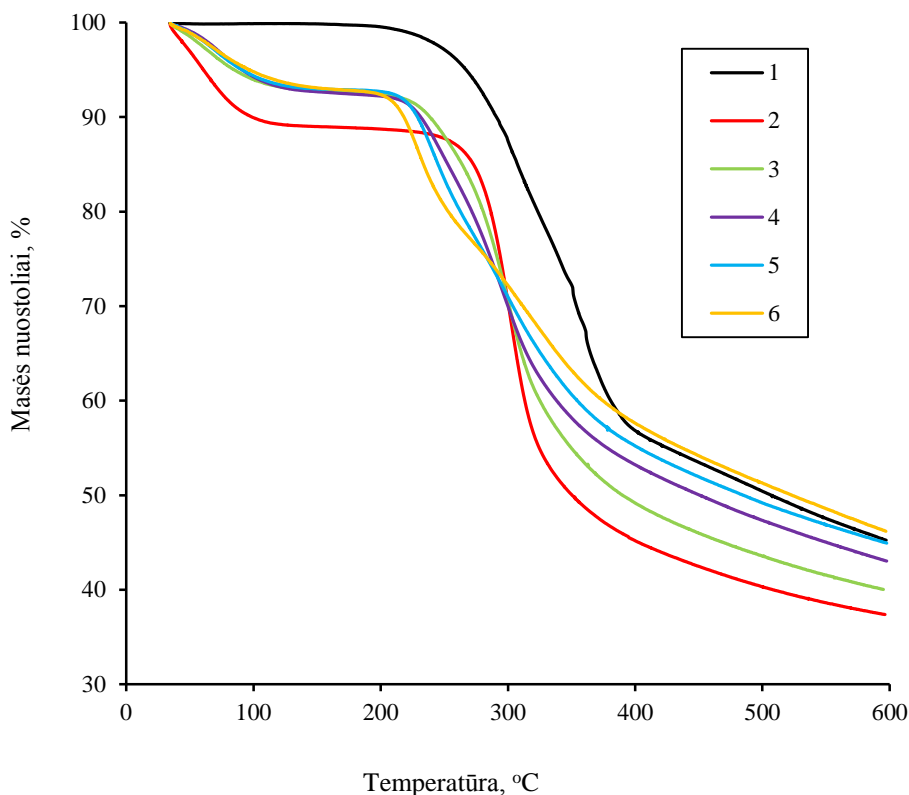
Deformaciniai RR karboksigrupės virpesiai gali būti stebimi plačiame bangų skaičiaus intervale 1450–1150 cm^{-1} [75]. Todėl smailė ties 1257 cm^{-1} (smailė G) matoma RR-Chz kompleksų FT-IR spektruose (3.6 pav., 2–6 kr.) gali būti priskirta RR karboksigrupės virpesiams. RR-Chz spektruose stebimos platesnės ir intensyvesnės sugerties juostos ties 1375 cm^{-1} (smailė C) ir 1150 cm^{-1} (smailė D) gali būti siejamos su virpesių, būdingų RR karboksigrupei ir Chz persidengimui, didėjant komplekse adsorbuotos RR kiekiui.

RR-Chz kompleksų, kuriuose RR molinis santykis 0,6 mol/mol ir didesnis, FT-IR spektruose (3.6 pav., 5 ir 6 kr.) su RR aromatiniu žiedu siejamų smailių E ir F intensyvumas nesikeičia, tačiau atsiranda sugerties juosta ties 1682 cm^{-1} (smailė H), būdinga į kompleksus sujungtos RR nejonizuotai karboksigrupei [23]. Toks smailių E, F ir H intensyvumo pobūdis gali būti vienu iš įrodymų, kad RR molekulių išsidėstymas RR-Chz kompleksų, kurių molinis santykis yra lygus ar didesnis nei 0,6 mol/mol, miltelių paviršiuje keičiasi – dalis jų išsidėsto karboksigrupėmis į išorę. Taip pat buvo aiškinamas FT-IR spektruose stebimas analogiškų smailių pokytis, formuojantis RR ir ciklodekstrinų įtarpos kompleksams [76].

3.2.2. RR-Chz kompleksų termogravimetrinė analizė

Iš ankstesniuose skyreliuose pateiktų duomenų matoma, kad komplekse su Chz RR yra apsaugoma nuo oksidacinės destruktijos, todėl yra prailginamas jos antioksidacinis poveikis. Tuo pat metu RR iš RR-Chz kompleksų gali būti lengvai atpalaiduojama žmogaus virškinimo sistemoje. Dėl tokių savybių RR-Chz kompleksai galėtų būti panaudoti kaip maisto priedai ar maisto papildų sudėtinė dalis. Maisto produktų gamyboje dažnai yra naudojami terminiai

apdorėjimai. Todėl yra svarbu įvertinti RR-Chz kompleksų terminę destrukciją. Orasausių Chz, RR ir įvairios sudėties RR-Chz kompleksų termogramos, užrašytos azoto aplinkoje, keliant temperatūrą 10 °C/min greičiu, yra pateiktos 3.7 paveiksle.



3.7 pav. TG kreivės: 1 – RR; 2 – Chz; 3 – RR-CH, 0,11 mol/mol; 4 – 0,22 mol/mol; 5 – 0,39 mol/mol; 6 – 0,8 mol/mol. Temperatūros kėlimo greitis 10 °C/min, aplinka – azoto

Iš paveiksle pateiktų kreivių matyti, kad Chz ir RR-Chz kompleksų terminis skilimas vyksta dviem stadijomis. Pirmojoje stadijoje, temperatūrų intervale 35–128 °C ir 35–148 °C, atitinkamai, iš Chz ir RR-Chz išgaruoja vanduo. Masės nuostoliai šioje stadijoje, atitinkamai, sudaro 89 % ir 93 %. Pradiniai RR milteliai drėgmės neturi, todėl RR termogramoje pirmosios stadijos nėra. Temperatūroje virš 200 °C prasideda antroji stadija, t. y. Chz ar RR-Chz kompleksų terminės destrukcijos stadija. Šios stadijos pradžios ir pabaigos temperatūros bei masės nuostoliai pateikti 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. RR, Chz ir skirtingos sudėties RR-Chz kompleksų charakteringieji antrosios stadijos terminės destrukcijos rodikliai

Bandinys	Terminės destrukcijos pradžios temperatūra, °C	Terminės destrukcijos pabaigos		Temperatūrų intervalas, °C
		Temperatūra, °C	Masės nuostoliai, %	
RR	279	328	47,4	49
RR-Chz, 0,11 mol/mol	256	337	50,8	81
RR-Chz, 0,22 mol/mol	227	341	55,0	114
RR-Chz, 0,39 mol/mol	218	360	55,8	142
RR-Chz, 0,8 mol/mol	212	373	58,7	161
CH	262	400	56,6	138

Kaip matyti iš 3.3 lentelėje pateiktų duomenų, RR-Chz kompleksų antrosios stadijos terminė destrukcija prasideda žemesnėje temperatūroje lyginant su Chz ar RR terminės destrukcijos pradžios temperatūra. Be to, kuo daugiau RR-Chz komplekse yra RR, tuo žemesnė antrosios stadijos terminės destrukcijos pradžios temperatūra, ir priešingai, aukštesnė pabaigos temperatūra. RR-Chz kompleksų terminė destrukcija trunka ilgiau (platesnis temperatūrų intervalas), ir gali būti siejama su ilgiau trunkančia RR termine destrukcija (žr. 3.3 lent.).

3.2.3. RR desorbcija iš RR-Chz miltelių į skirtingas terpes

Praktiniam taikymui svarbu, kaip RR-Chz milteliuose adsorbuota RR rūgštis yra atpalaiduojama į skirtingas terpes. Buvo iširta RR desorbcija iš RR-Chz miltelių, turinčių 0,1 mol/mol, 0,22 mol/mol, 0,39 mol/mol, 0,6 mol/mol ir 0,8 mol/mol adsorbuotos RR, į distiliuotą vandenį, 96% etanolį, 0,5% acto rūgšties tirpalą, 0,1 M HCl tirpalą (modelinę skrandžio terpę), ir 0,1 M fosfatinį buferinį tirpalą, kurio pH = 6,8 (modelinę žarnyno terpę). Gauti duomenys, išreikšti desorbuotos RR procentais nuo RR kiekio įdėto į desorbcijos terpę su RR-Chz milteliais (*DEF*, %), pateikti 3.4 lentelėje.

Kaip matyti iš lentelėje pateiktų duomenų, labai nedaug (iki 5 %) RR yra desorbuojama į distiliuotą vandenį. Be to, desorbuotas RR kiekis praktiškai nepriklauso nuo RR-Chz milteliuose adsorbuoto RR kiekio

Labai nedaug RR iš RR-Chz komplekso miltelių yra desorbuojama ir į etanolį. Tik į etanolį desorbuotas RR kiekis nežymiai didėja, didėjant RR kiekiui RR-Chz milteliuose.

3.4 lentelė. RR desorbcijos iš skirtingos sudėties RR-Chz miltelių efektyvumo (DEF) priklausomybė nuo desorbcijos terpės

RR-Chz sudėtis, mol/mol	DEF, %, kai desorbcijos terpė				
	Distiliuotas H ₂ O	Fosfatinis buferis pH = 6,8	0,5% acto rūgštis	96% etanolis	0,1 N HCl
0,1	3,9±0,5	93±2	74±2	1,0±0,2	83±1,5
0,22	3,1±0,5	85±2	39±1,5	1,7±0,2	90±1,5
0,39	3,2±0,5	86±2	17±1,5	2,3±0,2	88,5±1,5
0,6	4,2±0,5	85±2	7,5±0,9	3,2±0,3	90±1,5
0,8	4,8±0,5	76±2	6,2±0,5	5,2±0,3	60±1,5

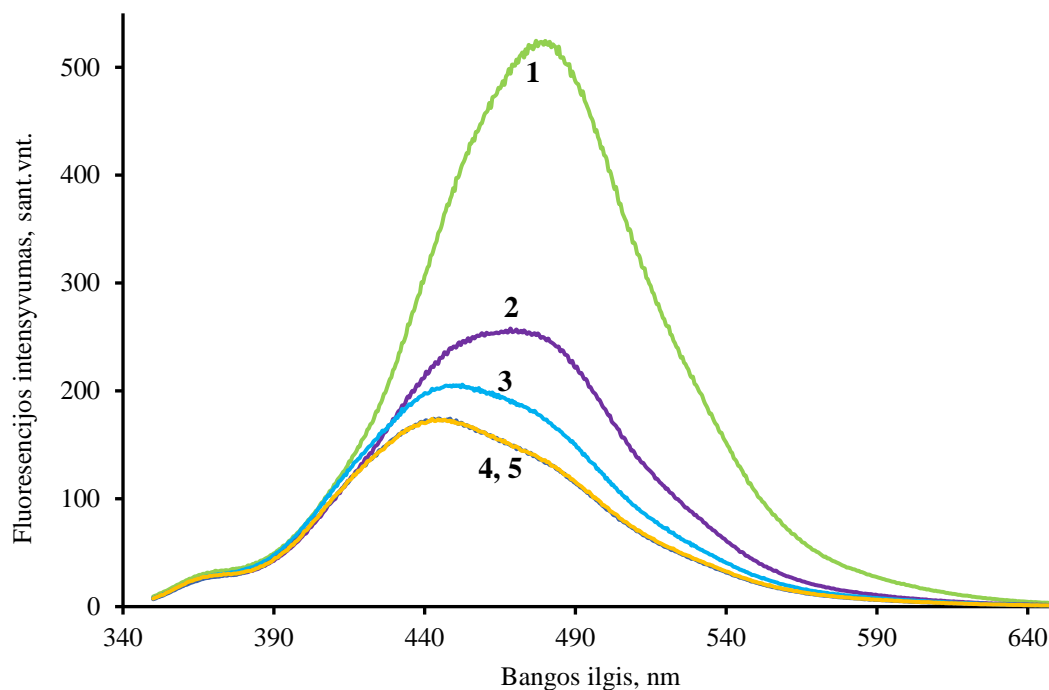
Į 0,5% acto rūgšties tirpalą desorbuotas RR kiekis labai priklauso nuo RR-Chz komplekso sudėties, ir ženkliai mažėja didėjant adsorbuotos RR-Chz milteliuose RR kiekiui (žr. 3.4 lent.). Jeigu iš RR-Chz miltelių, turinčių 0,1 mol/mol RR, desorbuoja 74 % RR, tai iš RR-Chz, turinčių 0,8 mol/mol RR, desorbuota tik 6,2 % komplekse esančios RR. Šie skirtumai gali būti siejami su skirtingu RR-Chz kompleksų tirpumu, kuris priklauso nuo to, kiek Chz aminogrupių dalyvauja sąveikoje su RR. Kuo mažiau RR yra adsorbuota, tuo daugiau laisvų Chz aminogrupių gali jonizuotis acto rūgšties tirpale ir padidinti RR-Chz komplekso tirpumą, o tuo pačiu ir desorbuotos RR kiekį.

Daugiausiai RR iš RR-Chz miltelių buvo desorbuota į modelines skrandžio (fosfatinį buferinį tirpalą, kurio pH vertė 6,8) ir žarnyno (0,1 N HCl tirpalą) terpes, atitinkamai, nuo 76 % iki 93 % ir nuo 60 % iki 83 %. Reikia atkreipti dėmesį, kad iš RR-Chz miltelių, turinčių 0,22 mol/mol, 0,39 mol/mol ir 0,6 mol/mol RR, desorbuotas praktiškai vienodas RR kiekis, apie 85 % į fosfatinį buferinį tirpalą ir apie 90 % į 0,1 N HCl tirpalą. Nors 0,1 N HCl tirpale RR-Chz kompleksai ištirpo, tačiau tirpale buvo rasta mažiau RR nei įdėta su komplekso milteliais. Galima galvoti, kad nors RR-Chz kompleksas ištirpo, jis nesuiro, ir iš tirpaus komplekso RR nebuvo atpalaiduota. Tačiau ženkliai mažiau desorbuota iš RR-Chz, turinčio daugiausiai adsorbuotos RR (0,8 mol/mol), atitinkamai tik 76 % ir 60 %. Tai galima sieti su 3.1 skyriuje aptartomis skirtingomis RR adsorbcijos Chz jėgomis, kai RR adsorbuojama ne tik elektrostatinės, bet hidrofobinės sąveikos jėgomis, kurios gali keisti ir RR desorbcijos pobūdį.

3.2.4. RR-Chz kompleksų dispersijų fluorescencijos tyrimai

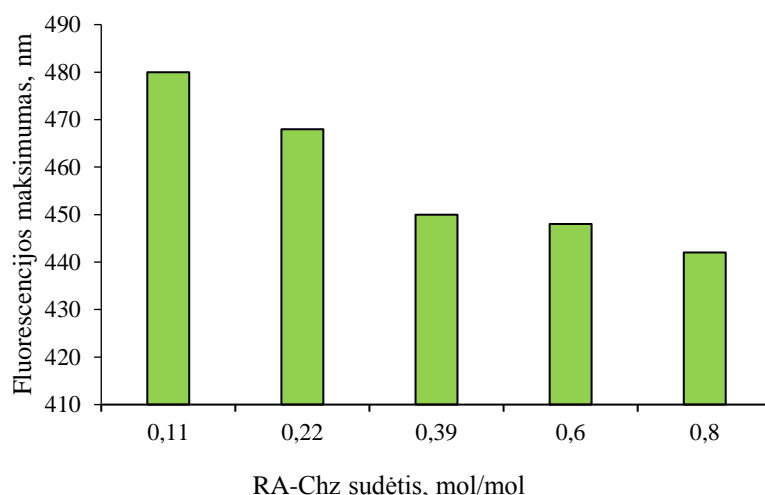
Buvo užrašyti skirtingos sudėties RR-Chz kompleksų vandeninių dispersijų fluorescencijos spektrai, kurie pateikti 3.8 paveiksle. Iš ankstesniame skyriuje pateiktų duomenų matyti, kad į distiliuotą vandenį iš RR-Chz kompleksų atpalaiduojamas RR kiekis nepriklauso nuo komplekso

sudėties ir sudaro apie 5 % nuo Chz milteliais adsorbuoto RR kiekio. Todėl 3.8 paveiksle pateikti spektrai yra susiję tik su RR-Chz komplekse esančios RR fluorescencija.



3.8 pav. RR-Chz kompleksų dispersijų fluorescencijos spektrai, kai RR kiekis komplekse buvo, mol/mol: 1 – 0,11; 2 – 0,22; 3 – 0,39; 4 – 0,6; 5 – 0,8. RR koncentracija dispersijoje visais atvejais buvo vienoda ir lygi 0,33 g/l

Kaip matyti iš 3.8 paveiksle pateiktų spektrų, tiek fluorescencijos intensyvumas, tiek bangos ilgis, kuriam esant fluorescencija yra intensyviausia, priklauso nuo RR-Chz komplekso sudėties. Intensyviausiai fluorescavo mažiausiai adsorbuotos RR turinčio (0,11 mol/mol) RR-Chz komplekso dispersija. Didėjant RR kiekiui RR-Chz kompleksuose jų dispersijų fluorescencijos intensyvumas mažėjo. Reikia atkreipti dėmesį, kad 0,33 g/l koncentracijos vandeninis RR tirpalas praktiškai ne fluorescuoja. Jau 0,2 g/l koncentracijos RR vandeninio tirpalo fluorescencija buvo nedidelė (žr. 3.5 pav.). Panašūs rezultatai buvo gauti Danafo su bendraautorais [22], kurių nuomone disocijuotoje formoje RR fluorescuoja kur kas intensyviau nei nedisocijuotoje rūgšties formoje. Be to, kad fluorescencijos intensyvumas mažėja, didėjant RR kiekiui RR-Chz komplekse, fluorescencijos maksimumas pasislenka trumpesniųjų bangų link (žr. 3.8 pav.). Bangos ilgio, kuriam esant fluorescencijos intensyvumas yra didžiausias, priklausomybė RR-Chz komplekso sudėties yra pateikta 3.9 paveiksle, iš kurio matyti, kad padidėjus RR kiekiui komplekse nuo 0,11 mol/mol iki 0,8 mol/mol, fluorescencijos maksimumo bangos ilgis persislenka nuo 480 nm iki 442 nm.



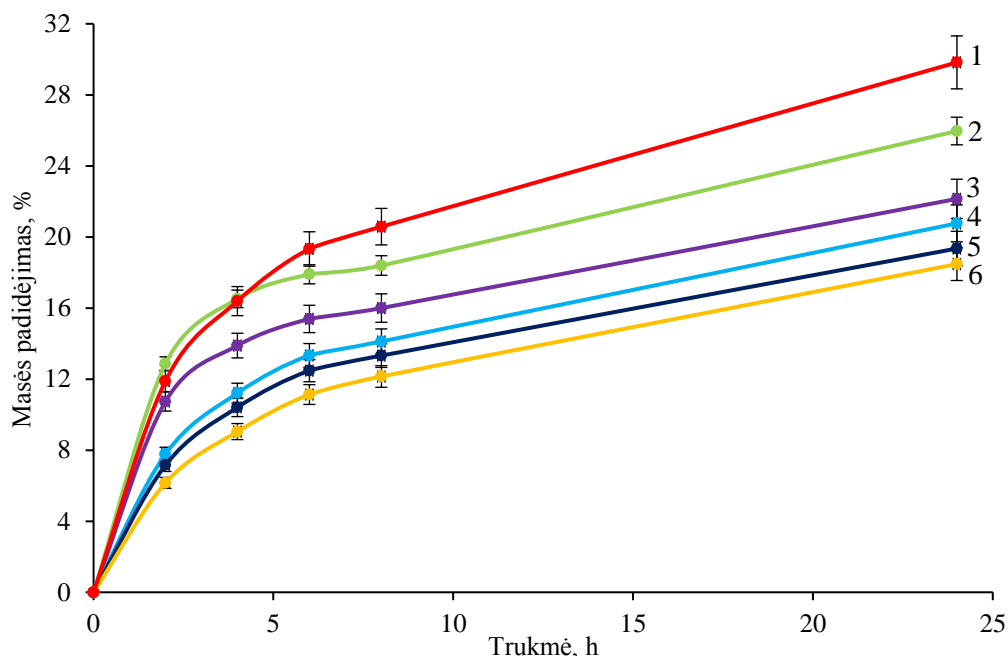
3.9 pav. Bangos ilgio, kuriam esant fluorescencijos intensyvumas yra didžiausias, priklausomybė RR-Chz komplekso sudėties. RR koncentracija dispersijoje visais atvejais buvo vienoda ir lygi 0,33 g/l

Darbe [22] buvo tiriama RR vandeninių tirpalų pH vertės įtaka fluorescencijai. Autorių nuomone, fluorescencijos maksimumas ties 510 nm yra susijęs tiek su RR karboksigrupės, tiek aromatinuose žieduose esančių hidroksigrupių jonizacija. Tuo tarpu, kai terpės pH vertė yra 3, ir jonizuotos yra tik RR karboksigrupės, tirpalų fluorescencijos maksimumas yra ties 442 nm [22]. Todėl 3.9 paveiksle pateikti duomenys leidžia teigti, kad Chz miltelių paviršiuje adsorbuotų RR molekulių pobūdis priklauso nuo adsorbuoto RR kiekio. Kai RR kiekis komplekse yra 0,11 mol/mol ar 0,22 mol/mol, RR molekulės Chz miltelių paviršiuje yra adsorbuotos monomolekuliniu sluoksniu veikiant elektrostatinei sąveikai tarp jonizuotų RR karboksigrupių ir jonizuotų Chz aminograpių, t. y. jonizuotos yra sąveikoje su Chz dalyvaujančios karboksigrupės. Be to, gali būti jonizuotos nukreiptuose į išorę aromatinuose RR žieduose esančios hidroksigrupės, tai patvirtina fluorescencijos maksimumas ties 470–480 nm. Didėjant adsorbuotos rūgšties kiekiui (0,39 mol/mol ir daugiau) RR-Chz komplekso miltelių paviršiuje pradeda formotis antrasis RR molekulių sluoksnis dėl sąveikos tarp hidrofobinių RR molekulių dalių, todėl prie aromatinių žiedų prijungtos hidroksograpių negali jonizuotis, ir jonizuotomis lieka tik karboksigrupės (fluorescencijos maksimumas ties 442–450 nm), pagrinde dalyvaujančios elektrostatinėje sąveikoje su Chz aminograpiėmis.

3.2.5. Vandens garų sugertis RR-Chz kompleksų milteliais

RR adsorbuojantis Chz miltelių paviršiuje dėl elektrosatinės sąveikos tarp RR karboksigrapių ir jonizuotų Chz aminograpių, ir jos molekulės išsidėsto aromatiniais žiedais į išorę. Todėl turėtų keistis RR-Chz komplekso miltelių hidrofiliinės-hidrofobinės savybės. Joms įvertinti išdžiovinti iki absoliučiai sausos masės skirtingos sudėties RR-Chz kompleksų milteliai buvo suberti į stiklinius biuksus ir patalpinti į 92 % pastovaus drėgnio eksikatorių, užpildytą

sočiu KNO₂ tirpalu, kambario temperatūroje. Kartu buvo laikomi ir pradiniai Chz milteliai. Komplexais ar Chz milteliais absorbuotas vandens garų kiekis apskaičiuotas iš bandinio masės padidėjimo ir išreikštas procentais nuo absoliučiai sausų miltelių masės. Gauti rezultatai pateikti 3.10 paveiksle.



3.10 pav. Chz (1) ir RR-Chz miltelių masės padidėjimo dėl vandens garų absorbcijos (masės padidėjimas) priklausomybė nuo trukmės. RR-Chz sudėtis, mol/mol: 2 – 0,11; 3 – 0,22; 4 – 0,39; 5 – 0,6; 6 – 0,8. Vandens garų drėgnis 92 %, temperatūra 22±1 °C

Kaip matyti iš paveiksle pateiktų duomenų per pirmąsias dvi valandas RR-Chz kompleksų, turinčių 0,11 mol/mol ir 0,22 mol/mol RR, milteliais adsorbuotas panašus kaip ir Chz milteliais vandens garų kiekis. Tačiau toliau laikant bandinius eksikatoriuje, RR-Chz kompleksų milteliais pradeda adsorbuoti vis mažiau vandens garų. Todėl po 24 h, Chz miltelių masės priedavimas dėl vandens garų absorbcijos buvo 30 %, o RR-Chz kompleksų milteliais, atitinkamai, 26 % ir 22,1 %. RR-Chz kompleksų, turinčių daugiau adsorbuotos RR (0,39, 0,6 ir 0,8 mol/mol), milteliai jau nuo bandymo pradžios absorbavo mažiau vandens garų, ir ši tendencija išliko viso bandymo metu. Tokios sudėties RR-Chz milteliais absorbuotas vandens garų kiekis mažiau priklausė nuo komplekse esančio RR kiekio. Po 24 h tokios sudėties RR-Chz kompleksų miltelių masės priedavimas dėl absorbuotų vandens garų sudarė, atitinkamai, 20,7 %, 19,3 % ir 18,5 %.

Apibendrinant šiame skyrelyje pateiktus duomenis, galima padaryti išvadą, kad dėl RR absorbcijos, RR-Chz milteliai yra hidrofobiškesni lyginant su Chz milteliais. Skirtumai absorbuojant vandens garus ypač gerai matomi, kai absorbuota nedaug RR (0,11 ar 0,22 mol/mol). Galima galvoti, kad tokiuose kompleksuose RR molekulės miltelių paviršiuje sudaro

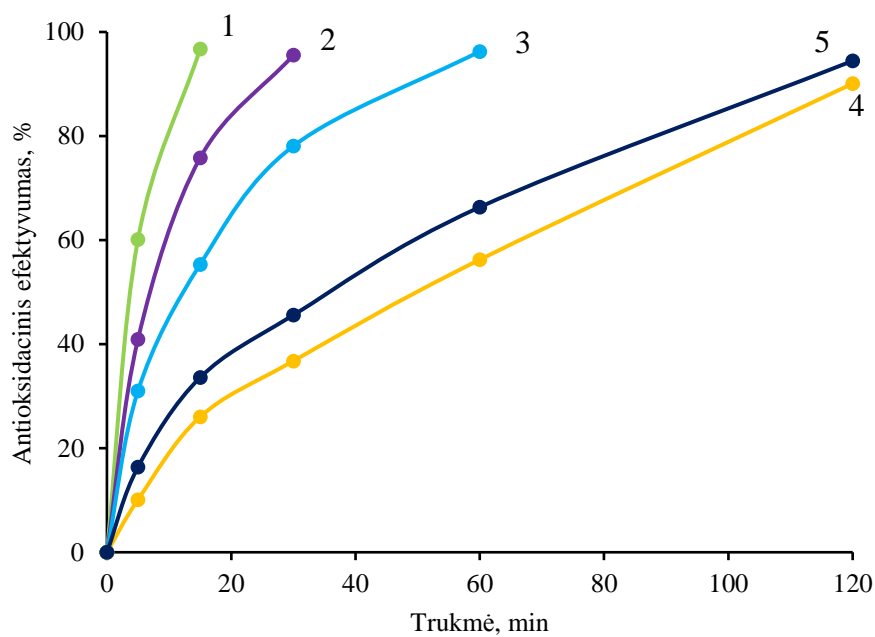
monomolekulinį sluoksnį, dėl elektrostatinės sąveikos yra eliminuojamos jonogenines Chz aminogrupes, ir paviršius tampa hidrofobiškesnis. Toliau didinant adsorbuotos RR kiekį, gali pradėti formuotis antrasis RR molekulių sluoksnis dėl hidrofobinės sąveikos. Tada RR-Chz miltelių hidrofilinėms-hidrofobinėms savybėms gali turėti į išorę nukreiptos jonogeninės RR karboksigrupės, taip kompensuodamos hidrofobiškumo padidėjimą dėl didėjančio adsorbuotos RR kiekio.

3.2.6. RR-Chz kompleksų antioksidacinio efektyvumo įvertinimas

Iš literatūros yra žinoma, kad fenolinių rūgščių imobilizavimas polimeriniuose nešikliuose padidina jų stabilumą ir išsaugo antioksidacines savybes [23]. Skirtingos sudėties RR-Chz komplekso miltelių antioksidaciniam efektyvumui (AOEF) įvertinti buvo panaudota 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfo rūgšties) diamonio druska, t. y. ABTS* radikalo sujungimo metodas [67]. Buvo matuojama 740 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugertis ABTS* tirpalu, turinčiu RR-Chz komplekso miltelių. RR-Chz komplekso miltelių kiekis ABTS* radikalo tirpale buvo toks, kad RR kiekis visais atvejais būtų toks pat ir lygus 0,01 g/l. Iš gautų šviesos sugerties verčių buvo apskaičiuota AOEF vertė pagal metodinėje dalyje pateiktas formules. Skirtingos sudėties RR-Chz komplekso dispersijų AOEF priklausomybės nuo trukmės kreivės yra pateiktos 3.11 paveiksle. Reikia paminėti, kad į ABTS* tirpalą įpylus RR vandeninį tirpalą, turintį tiek pat RR kaip ir įdėtas su RR-Chz kompleksais, jis iškart iš mėlynai žalio tapo geltonu, t. y. visas RR kiekis iškart sureagavo su ABTS* radikalu.

Kaip matyti iš 3.11 paveiksle pateiktų duomenų, greitis su kuriuo RR-Chz komplekse esanti RR reaguoja su ABTS* radikalu labai priklauso nuo komplekso sudėties. Kuo daugiau RR yra adsorbuota RR-Chz komplekso milteliuose, tuo lėčiau ji reaguoja su ABTS* radikalu. RR-Chz kompleksai, turintys 0,11 mol/mol, 0,22 mol/mol ir 0,39 mol/mol RR nuspalvino ABTS* radikalo tirpalą per 15 min, 30 min ir 60 min, o turintys 0,6 mol/mol ir 0,8 mol/mol RR – per 120 min. Skirtingas greitis, su kuriuos mažėja ABTS* radikalo koncentracija skirtingos sudėties RR-Chz kompleksų turinčiuose tirpaluose, visų pirma, gali būti siejama su skirtingu RR prieinamumu skirtingos sudėties kompleksuose. Be to, įtakos RR-Chz kompleksų antioksidaciniam efektyvumui gali turėti sąveikos jėgos, kuriomis veikiant RR yra adsorbuojama Chz miltelių paviršiuje. Yra žinoma [77], kad tirpale esantys kiti junginiai, visų pirma elektrolitai, gali trukdyti elektrostatinei sąveikai joniniuose kompleksuose. Iš kitos pusės, hidrofobinė sąveika, pasireiškianti formuojantis kompleksams, padidina joninių kompleksų stabilumą vandeniniuose tirpaluose [78].

Apibendrinant galima teigti, kad RR imobilizavimas Chz milteliuose efektyviai ją apsaugo nuo oksidacinės destrukcijos. Be to, RR-Chz kompleksai, turintys daugiau imobilizuotos RR, pasižymi prailgintu antioksidaciniu poveikiu.

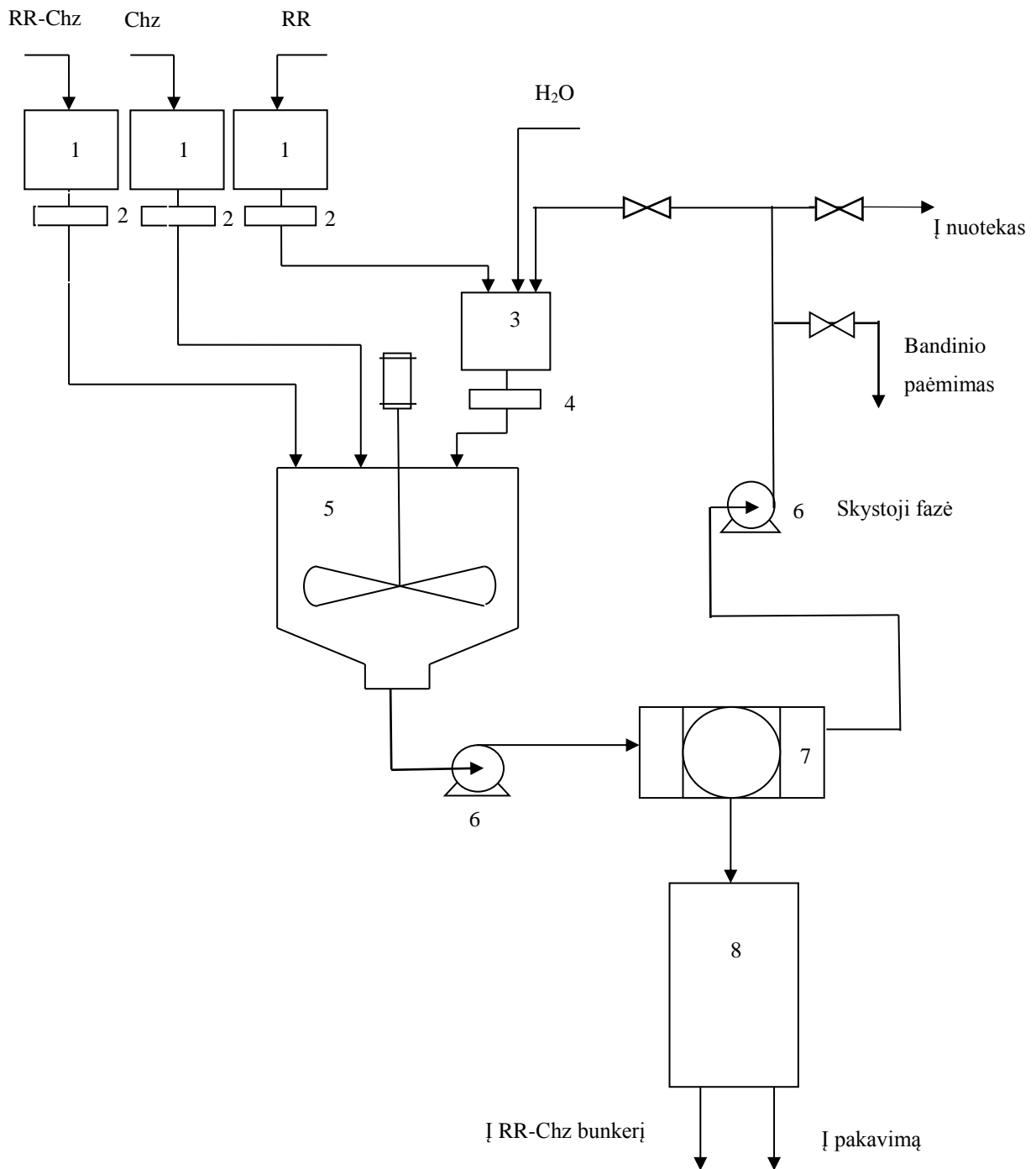


3.11 pav. RR-Chz kompleksų antioksidacinio efektyvumo (AOEF) priklausomybė nuo trukmės ir RR kiekio RR-komplekse, mol/mol: 1 – 0,11; 2 – 0,22; 3 – 0,39; 4 – 0,6; 5 – 0,8. RR koncentracija visais atvejais buvo vienoda ir lygi 0,01 g/l

4. REKOMENDACIJOS (INŽINERINĖ DALIS)

4.1. Netirpių RR-Chz kompleksų gamybos technologinė schema

Savo darbe numatau gaminti RR-Chz komplekso miltelius. Numatoma RR-Chz miltelių gamyba susideda iš keturių stadijų: RR tirpalo paruošimo, RR adsorbcijos Chz milteliais, RR-Chz mikrogranulių atskyrimo filtruojant ir džiovinimo. Technologinė gamybos schema yra pateikta 4.1 paveiksle. Šiame paveiksle taip pat pateikti įrenginiai būtini atskiroms technologinėms stadijoms realizuoti. Chz mikrogranulės saugomos bunkeryje (1) ir dozuojamos svoriniu dozatoriumi (2). Pasvertas Chz tiekiamas į reaktorių (5). RR yra pasveriamas ir tiekiamas į tirpintuvą (3), į kurį įpilamas reikiamas vandens kiekis. Gautas RR tirpalas per tūrinį dozatorių (4) patenka į periodinio veikimo reaktorių (5), kuriame RR yra adsorbuojama Chz milteliais 20–25 °C temperatūroje. Adsorbcijos trukmė 60 min. RR-Chz milteliai nuo RR tirpalo atskiriami būgniniame vakuuminiame filtre (7). RR-Chz milteliai išdžiovinami konvekcinėje džiovykloje (8) pseudoverdančiame sluoksnyje 80–90 °C temperatūroje. Išdžiovinti RR-Chz milteliai patenka į produkcijos pakavimo sandėlį arba į RR-Chz bunkerį (1). Kai reikia pagaminti daugiau adsorbuotos RR turinčius RR-Chz komplekso miltelius, tam aptartas procesas kartojamas, tik vietoje Chz miltelių į reaktorių yra tiekiamas RR-Chz komplekso milteliai. RR yra brangi, todėl norint sumažinti gamybos išlaidas, po adsorbcijos RR tirpalas su didesne nei 0,1 g/l koncentracija gali būti pakartotinai panaudotas, todėl filtrate nustatoma likutinė RR koncentracija. Jeigu RR koncentracija yra mažesnė nei 0,1 g/l siurbliu (6) išleidžiamam į kanalizaciją, kitu atveju tiekiamas į RR tirpintuvą (3).




4.1 pav. RR-Chz miltelių gamybos technologinė schema. Įrenginiai: 1 – bunkeriai; 2 – svoriniai dozatoriai; 3 – tirpintuvas; 4 – tūrinis dozatorius; 5 – reaktorius; 6 – siurbiai; 7 – būgninis vakuuminis filtras; 8 – konvekinė džiovykla pseudoverdančiame sluoksnyje

5. DARBUOTJŲ SAUGA IR SVEIKATA






Darbuotojų sauga darbo vietoje yra vienas iš svarbiausių veiksnių, norint tinkamai atlikti darbus. Pagrindinė saugios darbo aplinkos užtikrinimo prevencinė priemonė yra profesinės rizikos vertinimas. Profesinės rizikos įvertinimo tikslas yra įvertinti esamą arba galimą riziką darbe, ją pašalinti, ar numatyti prevencijos ar mažinimo priemones. Pagrindiniai veiksniai, galintys kelti pavojų profesinei saugai yra biologiniai, fiziniai, fizikiniai, cheminiai, ergonominiai ir psichosocialiniai [79].

Atliktame darbe pagrindiniai profesinės rizikos veiksniai yra cheminiai, naudotos pagrindinės medžiagos yra nepavojingos žmogaus sveikatai. Visos šios medžiagos yra ir gali būti naudojamos kuriant farmacinius preparatus. Galimi rizikos veiksniai, pavojingumo ir atsargumo frazės, įspėjamieji ženklai, pirmosios pagalbos ir priešgaisrinės priemonės yra pateiktos į 5.1 lentelę.






5.1 lentelė. Rizikos veiksnių identifikavimas ir jų kiekybinis vertinimas

Rizikos veiksnys, keliantis pavojų profesinei saugai ir sveikatai	Įspėjamieji ženklai	Pirmosios pagalbos ir priešgaisrinės priemonės	Prevencijos priemonių būtinumas
Mažos molekulinės masės chitozanas	Nepavojinga medžiaga ar mišinys pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008.	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Bendroji pagalba: kreiptis į gydytoją. Lankantis pas gydytoją, parodyti saugos duomenų lapą.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.
Diklio vandeninio fosfatas	Sukelia smarkų akių dirginimą: 	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją. Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.



5.1 lentelė. Tęsinys

Rizikos veiksnys, keliantis pavojų profesinei saugai ir sveikatai	Išpėjamieji ženklai	Pirmosios pagalbos ir priešgaisrinės priemonės	Prevencijos priemonių būtinumas
Rozmarino rūgštis	Nepavojinga medžiaga ar mišinys pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008.	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Bendroji pagalba: kreiptis į gydytoją. Lankantis pas gydytoją, parodyti saugos duomenų lapą.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.
Etilo alkoholis, 96%	Degus skystis ir garai:  Sukelia smarkų akių dirginimą:  Kenksminga prarijus: 	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją. Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją. Prarijus: asmeniui, neturinčiam sąmonės, nieko neduoti. Praskalauti burną vandeniu. Kreiptis į gydytoją.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.
Acto rūgštis	Degus skystis ir garai:  Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis: 	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją. Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.

5.1 lentelė. Tęsinys

Rizikos veiksnys, keliantis pavojų profesinei saugai ir sveikatai	Išpėjamieji ženklai	Pirmosios pagalbos ir priešgaisrinės priemonės	Prevencijos priemonių būtinumas
Druskos rūgštis	Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis:  Sukelia smarkų akių dirginimą: 	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją. Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.
Kalio persulfatas	Degus skystis ir garai:  Sukelia smarkų akių dirginimą:  Kenksminga prarijus: 	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją. Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją. Prarijus: asmeniui, neturinčiam sąmonės, nieko neduoti. Praskalauti burną vandeniu. Kreiptis į gydytoją.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.

5.1 lentelė. Tęsinys

Rizikos veiksnys, keliantis pavojų profesinei saugai ir sveikatai	Išpėjamieji ženklai	Pirmosios pagalbos ir priešgaisrinės priemonės	Prevencijos priemonių būtinumas
Kalio divandeninio fosfatas	Sukelia smarkų akių ir odos dirginimą: 	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją. Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.
2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfo) rūgšties diamonio druska (ABTS)	Sukelia akių ir odos dirginimą: 	Tinkamos gesinimo priemonės: naudoti vandens pusrslus, alkoholiui atsparias putas, sausą cheminį preparatą arba anglies dioksidą. Patekus į akis: kruopščiai, mažiausiai 15 min. plauti gausiu vandens kiekiu ir kreiptis į gydytoją. Patekus ant odos: nedelsiant nusivilkti užterštus drabužius ir nusiauti batus. Nuplauti muilu ir gausiu vandens kiekiu. Kreiptis į gydytoją.	Kvėpavimo takų odos apsaugos priemonės, ventiliacija, pirštinės, apsaugos drabužiai.

IŠVADOS

1. Rozmarino rūgšties adsorbicijai mažos molekulinės masės chitozano milteliais kinetikai aprašyti pritaikytas pseudo-antrojo laipsnio kinetinis modelis, kuris patvirtino, kad adsorbicija vyksta dviem etapais. Pirmajame rozmarino rūgštis yra adsorbuojama dėl elektrostatinės sąveikos tarp jonizuotų jos karboksigrupių ir jonizuotų chitozano amino grupių. Antrajame etape adsorbicija vyksta dėl hidrofobinės sąveikos tarp jau adsorbuotų chitozano milteliais rozmarino rūgšties molekulių ir tirpale likusių rozmarino rūgšties molekulių aromatinių dalių.

2. Skirtingos sudėties, netirpūs rozmarino rūgšties ir chitozano kompleksų (RR-Chz) milteliai gauti adsorbuojant rozmarino rūgštį iš vandeninių tirpalų chitozano arba RR-Chz komplekso milteliais. Didėjant adsorbuotos rozmarino rūgšties kiekiui, RR-Chz kompleksų dispersijų fluorescencijos intensyvumas mažėja, o maksimumas pasislenka trumpesniųjų bangų link, t. y. keičiasi rozmarino rūgšties išsidėstymas komplekso miltelių paviršiuje.

3. RR-Chz komplekse imobilizuota rozmarino rūgštis gali būti atpalaiduota iš jų į 0,1 M druskos rūgšties (modelinė skrandžio terpė) ir fosfatinį buferinį tirpalą, kurio pH vertė yra 6,8 (modelinė žarnyno terpė). Atpalaiduotos rozmarino rūgšties kiekis priklauso nuo komplekso sudėties. Tačiau į distiliuotą vandenį ir etanolį nepriklausomai nuo RR-Chz komplekso sudėties atpalaiduojama tik apie 5 % imobilizuotos rūgšties.

4. RR-Chz kompleksų terminė destrukcija vyksta dviem etapais: pirmajame iš komplekso pašalinama drėgmė, o antrajame vyksta terminė komplekso destrukcija. RR-Chz kompleksų antrasis terminės destrukcijos etapas prasideda žemesnėje temperatūroje nei chitozano ar rozmarino rūgšties terminė destrukcija.

5. Imobilizavimas kompleksuose su chitozanu apsaugo rozmarino rūgštį nuo oksidacinės destrukcijos. RR-Chz kompleksai, turintys daugiau imobilizuotos rozmarino rūgšties, pasižymi pailgintu antioksidaciniu poveikiu.

6. Pasiūlyta netirpių miltelių pavidalo RR-Chz kompleksų gamybos technologinė schema.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Randhir, R., Lin, Y.T., Shetty, K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2004, vol 13, p. 295-307.
2. Balasundram N., Sundram K., Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006, vol. 99, p. 191-203.
3. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010, vol 2, p. 1231-46.
4. Huang W., Cai Y., Zhang Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*, 2009, vol. 62, p. 1-20.
5. Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 1999, vol. 66, p. 401-36.
6. Duda-Chodak A., Tarko T., Satora P., Sroka P., Tuszyński T. The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 2010, vol 18, p. 39–50.
7. Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Bival Štefan M., Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In: Dr Venketeshwer Rao editor. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. Rijeka: InTech, 2012, 155-180 p.
8. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010, vol. 2, p. 1231-46.
9. Clifford M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, vol 79, p. 362–72.
10. Burton G.W., Ingold K.U. Autoxidation of biological molecules. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc* 1981, vol. 103, 6472-6477
11. Niki E., Kawakami A., Saito M., Yamamoto Y., Tsuchiya J., Kamiya Y. Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol 260, p. 2191-2196.
12. Cao H., Cheng W., Li C., Pan X., Xie X., Li T. DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2005, vol 719, p. 177-183

13. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, vol 79, p. 727-747
14. Petersen, M., Simmonds, M.S. Rosmarinic acid. *Phytochemistry Reviews*, 2003, vol. 62, p.121-5.
15. Petersen M. Rosmarinic acid : new aspects. *Phytochemistry Reviews*, 2013, vol. 12, p.207-227.
16. Haüssler E., Petersen M., Alfermann A.W. Isolation of protoplasts and vacuoles from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. *Plant Cell Reports*, 1993, vol. 12, p. 510-512.
17. Tepe B., Eminagaoglu O., Askin Akpulat H., Aydin E. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 2007, vol. 100, p. 985-989
18. Hall C.A., Cuppett S.L. Antioxidant methodology : in vivo and in vitro concepts. USA: AOCS Press, 1997, 141-170 p.
19. Fujimoto A., Masuda T. Antioxidation mechanism of rosmarinic acid, identification of an unstable quinone derivative by the addition of odourless thiol. *Food chemistry*, 2012, vol. 132, p. 901-906
20. Favaro G., Clementi C., Romani A., Vickackaite V. Acidichromism and Ionochromism of Luteolin and Apigenin, the Main Components of the Naturally Occurring Yellow Weld: A Spectrophotometric and Fluorimetric Study. *Journal of fluorescence*, 2007, vol.17, p. 707–714.
21. Maegawa Y., Sugino K., Sakurai H. Identification of free radical species derived from caffeic acid and related polyphenols. *Free Radic. Res.*, 2007, vol. 41, p. 110-119.
22. Al Danaf N., Abi Melhem R., Assaf K.I., Nau W. M., Patra D. Photophysical properties of neutral and dissociated forms of rosmarinic acid. *Journal of Luminescence*, 2016, vol. 175, p. 50-56.
23. Silva S.B., Amorim M., Fonte P., Madureira R., Ferreira D., Pintado M, Sarmiento B. Natural extracts into chitosan nanocarriers for rosmarinic acid drug. *Pharmaceutical Biology*, 2015, vol.53, p. 642–652.
24. Huang N., Hauck C., Yum M.Y., Rizshsky L., Widrlechner M.P., McCoy J.A., Murphy P.A., Dixon P.M., Nikolau B.J., Birt D.F. Rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* ethanol extract inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 and nitric oxide in RAW 267.7 mouse macrophages. *J Agric Food Chem*, 2009, vol 57, p. 10579–10589.

25. Furtado M.A., de Almeida L.C., Furtado R.A., Cunha W.R., Tavares D.C. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research*, 2008, vol. 657, p. 150–154.
26. Lee J., Jung E., Koh J., Kim Y.S., Park D. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *Journal of Dermatology*, 2008, vol. 35, p.768–771.
27. Xavier C.P., Lima C.F., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. Salvia fruticosa, Salvia officinalis, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutr Cancer*, 2009, vol. 61, p.564-71.
28. Debele T. A., Mekuria S. L., Tsai H.-C. Polysaccharide based nanogels in drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Mat. Sci. Eng. C*, 2016, vol. 68, p. 964-981.
29. Esfanjani A. F., Jafari S. M. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloid Surf. B*, 2016, vol. 146, p. 532-543.
30. Ferraro V., Madureira A.R., Sarmiento B., Gomes A., Pintado M.E. Study of the interactions between rosmarinic acid and bovine milk whey protein α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin and Lactoferrin. *Food Research International*, 2015, vol. 77, p. 450–459
31. Peng X., Wang X., Qi W., Su R., He Z. Affinity of rosmarinic acid to human serum albumin and its effect on protein conformation stability. *Food Chemistry*, 2016, vol. 192, p. 178–187.
32. Aydi A., Claumann C.A., Zibetti A.W., Abderrabba M. Differential scanning calorimetry and solubility of rosmarinic acid in different pure solvents and in binary mixtures (methyl acetate + water) and (ethyl acetate + water) from 293,2 to 313,2 K. *Journal of Chemical & Engineering data*, 2016, vol. 61, p. 3718–3723.
33. Celik S.E., Ozyürek M., Tufan A.N., Güçlü K. , Apak R. Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins . *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, vol.78, p. 1615–1624.
34. Simanaviciute D., Klimaviciute R., Rutkaite R. Equilibrium adsorption of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids on cationic cross-linked starch with quaternary ammonium groups, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, vol. 95, p. 788–795.
35. Casanova F., Estevinho B.N., Santos L. Preliminary studies of rosmarinic acid microencapsulation with chitosan and modified chitosan for topical delivery. *Powder Technology*, 2016, vol. 297, p. 44–49

36. Li Z., Jiang H., Xu C., Gu L. A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*, 2015 vol. 43, p. 153-164.
37. McClements D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Adv. Colloidal Interface Sci.*, 2015 vol. 219, p. 27-53.
38. Baptista da Silvaa S., Ferreira D., Pintado M., Sarmentoc B. Chitosan-based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery—In vitro tests. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, vol. 84, p.112–120.
39. Tharanathan R. N., Kittur F. S. Chitin – the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003. vol. 43, p. 61–87.
40. Roberts G. A. F. *Chitin Chemistry*. Great Britain: The Macmillan Press, 1992, 15-30 p.
41. Majeti N. V., Kumar R. A review of chitin and chitosan applications . *Reactive & Functional Polymers*, 2000, vol. 46, p. 1–27.
42. Winterowd J.G., Sanford P.A. Chitin and chitosan. *Polysaccharides and Their Applications*. New York, 1995, p.441–462.
43. Sekmokienė D., Speičienė V., Šalaševičienė A., Garmienė G. Chitozano maisto produktuose nustatymas. *Veterinarija ir Zootechnika*, 2005, vol. 31, p. 87-92.
44. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 2011, vol. 36, p. 981–1014.
45. Luo Y., Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological macromolecules*, 2014, vol. 64, p. 353–367.
46. Wong Y.C., Szeto Y.S., Cheung W.H., McKay G. Adsorption of acid dyes on chitosan – equilibrium isotherm analysis. *Process Biochemistry*, 2004, vol. 39, p. 693–702.
47. Shamov M.V., Bratskaya S.Yu., Avramenko V.A. Interaction of carboxylic acids with chitosan: effect of pK and hydrocarbon chain length. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, vol. 249, p. 316–321.
48. Jakobek L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 2015, vol. 175, p. 556–567.
49. Brown, C. D.; Hoffman, A. S. *Modification of natural polymer: Chitosan*. California: Academic Press, 2002, 565–574 p.

50. Delair T. Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile noncarriers of bioactive molecules, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011 vol. 78, p. 10-18.
51. Costalat M., David L., Delair T. Reversible controlled assembly of chitosan and dextran sulfate: A new method for nanoparticle elaboration. *Carbohydrate Polymers*, 2014, vol. 102, p. 717-726
52. Anitha A., Deepagan V.G., Divya Rani V.V., Menon D., Nair S.V., Jayakumar R. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate-chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 2011, vol. 84, p. 1158-1164.
53. Grenha A., Gomes M. E., Rodrigues M., Santo V.E., Mano J. F., Neves N. M., Reis R.L. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2010, vol. 92, p. 1265-1272.
54. Rodrigues S., Costa A.M., Grenha A. () Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios *Carbohydrate Polymers*. 2012 vol. 89, p. 282-289
55. Sweeney I.R., Mirafteb M., Collyer G. Absorbent alginate fibres modified with hydrolysed chitosan for wound care dressings – II. Pilot scale development. *Carbohydrate Polymers*, 2014, vol. 102, p. 920-927.
56. Belščak-Cvitanović A., Stojanović A., Manojlović V., Komes D., Cindrić I.J., Nedović V., Bugarski B. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 2011, vol. 44, p.1094-1101.
57. Zhang S., Liu W., Liang J., Li X., Liang W., He S., Zhu C., Mao L. Buildup mechanism of carboxymethyl cellulose and chitosan self-assembled films. *Cellulose*, 2013, vol. 20, p.1135–1143.
58. Saleem M. A., Kotadia D. R., Kulkarni R.V. Effect of Formulation Variables on Dissolution of Water-Soluble Drug from Polyelectrolyte Complex Beads. *Dissolution Technologies*, 2012, p. 21-28.
59. Arnon H., Zaitsev Y., Porat R., Poverenov E. Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2014, vol. 87, p. 21-26.
60. Madureira A.R., Pereira A., Pintado M. Chitosan nanoparticles loaded with 2,5-dihydroxybenzoic acid and protocatechuic acid: Properties and digestion. *Journal of Food Engineering*, 2016, vol. 174, p. 8-14.

61. Gonçalves da Rosa C., Dellinghausen Borges C., Zambiasi R.C., Nunes M.R., Benvenuti E.V., Rickes da Luz S., D'Avila R.F, Rutz J. K. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 46, p. 138–146.
62. Nallamuthu I., Devi A., Khanum F. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, vol. 10, p. 203-211.
63. Vakili M., Rafatullah M., Salamatinia B., Abdullah A.Z., Ibrahim M.H., Tan K.B., Gholami Z., Amouzgar P. Application of chitosan and its derivatives as adsorbent for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydrate Polymers*, 2014, vol. 113, 115–130.
64. Esquerdo V.M., Cadaval jr. T.R.S., Dotto G.L., Pinto L.A.A. Chitosan scaffold as an alternative adsorbent for the removal of hazardous food dyes from aqueous solutions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014, 7–15.
65. Chio M.S., Chuang G.S. Competitive adsorption of dye metanil yellow and RB15 in acid solution on chemically cross-linked chitosan beads. *Chemosphere*, 2006, vol. 62, p. 731–740.
66. Dotto G.L., Pinto L.A.A. Adsorption of food dyes acid blue 9 and food yellow 3 onto chitosan: stirring rate effect in kinetics and mechanism, *Journal of Hazardous materials*, 2011, vol. 187, p. 164–170.
67. Re R., Pellegrini N., Protoggente A., Pannala M., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical. Biol. Med*, 1999, vol. 26, p.1231–1237.
68. Cestari A.R., Vieira E.F.S., dos Santos A.G.P., Mota J.A., de Almeida V.P. Adsorption of anionic dyes on chitosan beads. 1. The influence of the chemical structure of dyes and temperature on the adsorption kinetics. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, vol. 280, p. 380–386.
69. T. Vickerstaff, *The physical chemistry of dyeing*, Interscience, New York-London, Oliver and Boud, London-Edinburg, 1954, p. 514.
70. Zollinger H.. *The dye and substrate: the role of hydrophobic bonding in dyeing process*. *J. Soc. Dyers Colour*, 1965, vol. 81, p. 345–350.
71. Li P., Dai Y.-N., Zhang J.-P., Wang A.-Q, Wei Q. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *International Journal of Biomedical Science*, 2008, vol. 4, p. 221–228.

72. Rosca C., Novac O., Lisa G., Popa M.I. Polyelectrolyte complexes of chitosan with dextran sulphate. Synthesis and characterisation. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2011, vol. 45, p. 185–189.
73. Corazzari I., Nistico R., Turci F., Faga M.G., Franzoso F., Tabasso S., Magnacca G. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FT-IR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity, *Polymer Degradation and Stability*, 2015, vol. 112, p. 1–9.
74. Sthfest K., Boese M., Kerns G., Piry A., Wilhelm C. Fourier transformation infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid *in situ*. *Journal of Plant Physiology*, 2004, vol. 161, p. 151–156.
75. Maroappan G., Sundaraganesan N., Manoharan S. Experimental and theoretical spectroscopy studies of anticancer drug rosmarinic acid using HF and density functional theory. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, vol. 97, p.340–351.
76. Celic A.E., Ozyurek M., Tufan A.N., Guclu K., Apak. R. Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, vol. 78, p.1615–1624.
77. Buchhammer H. M., Petzold G., Lunkwitz K. Salt effect on formation and properties of interpolyelectrolyte complexes and their interactions with silica particles. *Langmuir*, 1999, vol. 15, p. 4306–4310.
78. Klimaviciute R., Bendoraitiene J., Rutkaite R., Siugzdaite J., Zemaitaitis A. Preparation, stability and antimicrobial activity of cationic cross-linked starch-iodine complexes. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, vol. 51, p. 800–807.
79. Profesinės rizikos vertinimo bendrieji nuostatai Nr. A1-457/V-961. Vilnius. Lietuvos Respublikos socialinės apsaugos ir darbo ministerija ir Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministerija.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ BAIGIAMOJO MAGISTRINIO PROJEKTO TEMA SĄRAŠAS

Straipnis recenzuojamame mokslo leidinyje

1. Liudvinaviciute, Dovile; **Almonaityte, Karolina**; Rutkaite, Ramune; Bendoraitiene, Joana; Klimaviciute, Rima. Adsorption of rosmarinic acid from aqueous solution on chitosan powder. IJBIOMAC-2018-1507. International Journal of Biological Macromolecules. Pataisytas po recenzijos.

Konferencijų pranešimų medžiagoje paskelbtos tezės

1. **Almonaitytė, Karolina**; Klimavičiūtė, Rima (vadov.). Netirpių rozmarinų rūgšties ir chitozano kompleksų gavimas ir savybių tyrimas // Chemija ir cheminė technologija: studentų mokslinės konferencijos pranešimų medžiaga, Klaipėdos universitetas, Jūros technologijų ir gamtos mokslų fakultetas, 2018 m. gegužės 18 d. / Klaipėdos universitetas, Kauno technologijos universitetas, Vilniaus universitetas. Klaipėda : Jūros technologijų ir gamtos mokslų fakultetas, 2018. ISBN 9789955189893. p. 10-13.
2. **Almonaitytė, Karolina**; Liudvinavičiūtė, Dovilė. Formation and properties of rosmarinic acid and chitosan complexes // Open readings 2018: 61st international conference for students of physics and natural sciences, March 20-23, 2018, Vilnius, Lithuania: programme and abstracts. 2018, p. 290.