



Politechnika Krakowska
Jubileusz 80-lecia



**Wydział Inżynierii
i Technologii Chemicznej**

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej
Katedra Chemii i Technologii Organicznej

ROZPRAWA DOKTORSKA

Badania nad bio-czynnikami sieciującymi do zastosowań
medycznych

mgr inż. Paulina Sapuła

Promotor: dr hab. inż. Katarzyna Bialik-Wąs, prof. PK

Kraków, 2025

*Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi,
Pani **dr hab. inż. Katarzynie Bialik-Wąs, prof. PK**,
za życzliwość, inspirację oraz merytoryczne wskazówki,
które towarzyszyły mi na każdym etapie przygotowywania niniejszej rozprawy.*

*Z całego serca pragnę podziękować moim **Rodzicom i Siostrze**
za ich nieustającą troskę, obecność oraz wspieranie moich wyborów.*

*Szczególne podziękowania kieruję również do mojego **Narzeczonego Rafała**
za wyrozumiałość, cierpliwość i motywację.*

STRESZCZENIE

Materiały hydrożelowe są powszechnie stosowane w medycynie i farmacji, między innymi jako opatrunki wspomagające gojenie ran, implanty tkankowe, rusztowania komórkowe, soczewki kontaktowe oraz produkty higieniczne. Hydrożele o zwiększonej wytrzymałości mechanicznej i wysokiej stabilności w środowisku fizjologicznym są najczęściej otrzymywane na drodze chemicznego sieciowania z wykorzystaniem czynników sieciujących pochodzenia syntetycznego lub naturalnego. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie bio-czynnikami pochodzenia naturalnego, które stanowią ekologiczną alternatywę dla ich syntetycznych odpowiedników.

Celem badań było opracowanie efektywnej metody pozyskiwania substancji aktywnych z odpadowego surowca roślinnego - fusów kawowych, które mogą pełnić rolę bio-czynników sieciujących. Otrzymane ekstrakty zastosowano do chemicznego usieciowania modyfikowanych materiałów hydrożelowych na bazie żelatyny zawierających niacynamid i kwas hialuronowy, a następnie oceniono ich wpływ na wybrane właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i termiczne hydrożeli. Ponadto wyznaczono profile uwalniania zastosowanych substancji czynnych oraz oceniono cytotoksyczność otrzymanych hydrożeli w warunkach *in vitro*.

W niniejszej pracy opracowano metodę pozyskiwania substancji aktywnych z fusów kawowych z wykorzystaniem następujących technik ekstrakcji: ciecz-ciało stałe (LSE), wspomaganą ultradźwiękami (UAE), wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE) oraz łączącej działanie ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego (UMAE). Otrzymane ekstrakty zawierały znaczne ilości związków bioaktywnych, takich jak kwas chlorogenowy, kwas kawowy, kofeina i kwas szikimowy. Wykazywały również aktywność przeciwdrobnoustrojową, brak cytotoksyczności *in vitro* oraz promujący wpływ na migrację ludzkich fibroblastów skórnych (NHDF). Dodatkowo potwierdzono możliwość chemicznego usieciowania żelatyny z użyciem opracowanych bio-czynników, co pozwoliło uzyskać materiały hydrożelowe o wyższym stopniu usieciowania, zwiększonej stabilności termicznej oraz zmniejszonej podatności na degradację hydrolityczną względem żelatyny nieusieciowanej chemicznie. Materiały hydrożelowe modyfikowane niacynamidem i kwasem hialuronowym charakteryzowały się zróżnicowanymi profilami uwalniania substancji czynnych oraz brakiem cytotoksycznego działania wobec pierwotnych fibroblastów GM07452.

ABSTRACT

Hydrogels are extensively applied in medical and pharmaceutical fields, serving as wound dressings, tissue implants, cellular scaffolds, contact lenses, and hygiene products. To achieve the mechanical strength and stability required for biomedical applications, hydrogels are typically enhanced through chemical crosslinking with either synthetic or natural crosslinking agents. In recent years, there has been growing interest in bio-crosslinkers derived from natural sources, which represent an environmentally friendly alternative to their synthetic counterparts.

The aim of this study was to develop an effective method for extracting bioactive compounds from plant-based waste material, spent coffee grounds, which could serve as natural crosslinking agents. The obtained extracts were used for the chemical crosslinking of modified gelatin-based hydrogels containing niacinamide and hyaluronic acid. Their influence on selected physicochemical, mechanical, and thermal properties of the hydrogels was subsequently evaluated. Furthermore, the release profiles of the incorporated active compounds were determined, and the *in vitro* cytotoxicity of the hydrogels was assessed.

In this study, bioactive compounds were extracted from spent coffee grounds using the following techniques: liquid-solid extraction (LSE), ultrasound-assisted extraction (UAE), microwave-assisted extraction (MAE), and a combined ultrasound/microwave-assisted extraction (UMAE). The resulting extracts were rich in bioactive compounds, including chlorogenic acid, caffeic acid, caffeine, and shikimic acid. In addition to their high bioactive content, the extracts demonstrated antimicrobial activity, exhibited no cytotoxic effects *in vitro*, and promoted the migration of normal human dermal fibroblasts (NHDF). The feasibility of chemical crosslinking of gelatin with the developed bio-crosslinking agents was confirmed, resulting in hydrogels with a higher crosslinking degree, enhanced thermal stability, and reduced susceptibility to hydrolytic degradation compared to non-crosslinked gelatin. The hydrogels modified with niacinamide and hyaluronic acid exhibited distinct release kinetics of the active ingredients and demonstrated no cytotoxicity toward primary fibroblasts (GM07452).

WYKAZ SKRÓTÓW

A549 – ludzka linia komórkowa raka płuc

Ang-1 – (ang. angiotensin I), białka biorące udział w angiogenezie i rozwoju naczyń krwionośnych

ARPE-19 – ludzka linia komórkowa nabłonka barwnikowego siatkówki

B16F10 – mysia linia komórkowa czerniaka

BMP – (ang. bone morphogenetic proteins), białko morfogenetyczne kości

BMSC – komórki zrębu szpiku kostnego myszy

BT474 – ludzka linia komórkowa raka piersi

C2C12 – mysia linia komórkowa mioblastów

CAL-51 – ludzka linia komórkowa raka piersi

3-CQA – (ang. 3-O-caffeoylquinic acid), kwas 3-O-kofeinochinowy

5-CQA – (ang. 5-O-caffeoylquinic acid), kwas 5-O-kofeinochinowy

DMEM – (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium), zmodyfikowana pożywka Dulbecco Eagle

ssDNA – (ang. single stranded DNA), forma jednoniciowa DNA

DSC – (ang. differential scanning calorimetry), różnicowa kalorymetria skaningowa

EAE – (ang. enzyme-assisted extraction), ekstrakcja wspomagana enzymami

EAEP – (ang. enzyme assisted aqueous extraction processing), ekstrakcja wodna wspomagana enzymami

ECM – (ang. extracellular matrix), macierz pozakomórkowa

EDTA – kwas wersenowy

FGF2 – (ang. fibroblast growth factor), czynnik wzrostu fibroblastów

FmocFF – niskocząsteczkowy peptyd o właściwościach żelujących

FT-IR – (ang. Fourier transform infrared spectroscopy), spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

G411 – ludzka linia neuronalnych komórek macierzystych glejaka

G523 – ludzka linia neuronalnych komórek macierzystych glejaka

GAE – (ang. gallic acid equivalent), ekwiwalent kwasu galusowego

GFOGER – syntetyczny peptyd o właściwościach naśladujących kolagen

GM07452 – pierwotne ludzkie fibroblasty

HCT-116 – ludzka linia komórkowa raka okrężnicy

HeLa – ludzka linia komórek raka szyjki macicy

HIV – (ang. human immunodeficiency virus), ludzki wirus niedoboru odporności

hMSC – ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste

HPLC – (ang. high-performance liquid chromatography), wysokosprawna chromatografia cieczowa

HSV – (ang. herpes simplex virus), wirus opryszczki pospolitej

HT-29 – ludzka linia komórkowa raka jelita grubego

HUVEC – ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej

L929 – mysia linia komórek fibroblastów

LSE – (ang. liquid-solid extraction), ekstrakcji ciało stałe-ciecz

MAE – (ang. microwave-assisted extraction), ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym

MBC – (ang. minimum bactericidal concentration), minimalne stężenie bakteriobójcze

MC3T3-E1 – mysia przedosteoblastyczna linia komórkowa

MCF-7 – ludzka linia komórek raka piersi

MCF7 – ludzka linia komórkowa raka piersi

MDA-MB-231 – linia komórkowa pochodząca z ludzkiego gruczolaka piersi

MFC – (ang. minimum fungicidal concentration), minimalne stężenie grzybobójcze

MIC – (ang. minimum inhibitory concentration), minimalne stężenie hamujące

MWCO – (ang. molecular weight cut-off), molekularne odcięcie masy membrany

NHDF – (ang. normal human dermal fibroblasts), komórki normalnych ludzkich fibroblastów skórnych

NIH/3T3 – mysia linia komórek fibroblastów

PBS – (ang. phosphate-buffered saline), sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PC12 – neuronalne komórki progenitorowe

PDA – (ang. photodiode array), detektor matrycy fotodiod

PDGF – (ang. platelet-derived growth factor), płytkopochodny czynnik wzrostu

PEG – poli(tlenek etylenu)

mPEGA – eter metylowy poli(glikolu etylenowego)

PEGDA – diakrylan poli(glikolu etylenowego)

mPEGMA – metakrylan metylowego poli(glikolu etylenowego)

PVA – poli(alkohol winylowy)

PVAm – poliwiniloamina

QCE – (ang. quercetin equivalent), ekwiwalent kwercetyny

Saos-2 – ludzka linia komórek kostniakomięsa

SEM – (ang. scanning electron microscopy), skaningowa mikroskopia elektronowa

SFE – (ang. supercritical fluid extraction), ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym

T47D – ludzka linia komórkowa raka piersi

TEG – glikol trietylenowy

TFC – (ang. total flavonoid content), całkowita zawartość flawonoidów

TGA – (ang. thermogravimetry), termogravimetria

TNBS – kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy

TPC – (ang. total phenolic content), całkowita zawartość polifenoli

UAE – (ang. ultrasound-assisted extraction), ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami

UMAE – (ang. ultrasound/microwave-assisted extraction), ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami/promieniowaniem mikrofalowym

UV-Vis – spektrofotometria absorpcyjna UV/VIS

VEGF – (ang. vascular endothelial growth factor), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

Vero – linia komórek nabłonkowych nerek pozyskana z afrykańskiej małpy zielonej

WI-38 – ludzka linia komórkowa złożona z fibroblastów

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	12
1.1. Syntetyczne czynniki sieciujące.....	13
1.1.1. Aldehyd glutarowy.....	13
1.1.2. Glioksal.....	14
1.1.3. Poli(glikol etylenowy) i jego pochodne.....	15
1.2. Naturalne czynniki sieciujące.....	16
1.2.1. Genipina.....	16
1.2.2. Kwas cytrynowy.....	17
1.2.3. Kwas garbnikowy.....	18
1.2.4. Galusan epigallokatechiny.....	18
1.2.5. Wanilina.....	19
1.3. Charakterystyka kawy i jej produktów odpadowych.....	21
1.4. Metody pozyskiwania substancji aktywnych z surowców roślinnych.....	26
1.4.1. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UAE).....	26
1.4.2. Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE).....	27
1.4.3. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami i promieniowaniem mikrofalowym (UMAE).....	29
1.4.4. Pozostałe techniki ekstrakcji.....	31
1.5. Metody pozyskiwania substancji aktywnych z kawy.....	32
1.6. Reakcje sieciowania polimerów prowadzące do otrzymania hydrożeli.....	36
1.7. Hydrożele na bazie polimerów naturalnych.....	42
1.7.1. Polisacharydy.....	42
1.7.2. Białka.....	47
1.8. Żelatynowe materiały hydrożelowe modyfikowane substancjami aktywnymi.....	52
1.9. Podsumowanie opracowania literaturowego.....	56
2. CEL I ZAKRES PRACY	58
3. METODYKA BADAŃ	60
3.1. Surowce i odczynniki.....	60
3.2. Schemat ideowy procesu badawczego.....	61
3.3. Metody pozyskiwania bio-czynników sieciujących z odpadów po kawie.....	62
3.3.1. Ekstrakcja ciało stałe-ciecz.....	62
3.3.2. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami.....	63
3.3.3. Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym.....	63
3.3.4. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami/promieniowaniem mikrofalowym.....	63
3.4. Metody badawcze zastosowane dla bio-czynników sieciujących.....	64
3.4.1. Analiza całkowitej zawartości polifenoli.....	64

3.4.2. Analiza całkowitej zawartości flawonoidów	64
3.4.3. Badanie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH	64
3.4.4. Wysokosprawna chromatografia cieczowa.....	65
3.4.5. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej metodą mikrorozcieńczeń	65
3.4.6. Badanie cytotoksyczności <i>in vitro</i>	67
3.4.7. Badanie migracji komórek <i>in vitro</i>	67
3.5. Metoda otrzymywania bazowej matrycy hydrożelowej.....	68
3.6. Metoda otrzymywania matrycy hydrożelowej modyfikowanej substancjami aktywnymi	68
3.7. Metody badawcze zastosowane dla materiałów hydrożelowych	69
3.7.1. Badanie stopnia usieciowania	69
3.7.2. Badanie stopnia pęcznienia.....	69
3.7.3. Badanie stopnia degradacji	70
3.7.4. Spektroskopia w podczernieni z transformacją Fouriera	70
3.7.5. Skaningowa mikroskopia elektronowa	70
3.7.6. Skaningowa kalorymetria różnicowa.....	70
3.7.7. Termograwimetria.....	71
3.7.8. Badanie właściwości reologicznych	71
3.7.9. Badanie twardości	71
3.7.10. Badanie właściwości mechanicznych	72
3.7.11. Badanie profilu uwalniania bio-czynnika sieciującego.....	72
3.7.12. Badanie profilu uwalniania substancji aktywnych.....	72
3.7.13. Badanie cytotoksyczności <i>in vitro</i>	73
4. CZĘŚĆ BADAWCZA.....	74
4.1. Opracowanie metody otrzymywania bio-czynnika sieciującego	74
4.1.1. Dobór parametrów procesu metodą DoE (Design of Experiment)	74
4.1.2. Analiza HPLC	84
4.1.3. Całkowita zawartość polifenoli i flawonoidów oraz aktywność przeciwutleniająca.....	86
4.1.4. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa.....	88
4.1.5. Cytotoksyczność i migracja komórek	90
4.2. Opracowanie metody otrzymywania bazowego materiału hydrożelowego.....	92
4.2.1. Stopień usieciowania i pęcznienia	92
4.2.2. Analiza FT-IR	94
4.2.3. Analiza SEM.....	98
4.2.4. Analiza TGA	100
4.2.5. Analiza DSC	103
4.2.6. Właściwości reologiczne.....	106
4.2.7. Profil uwalniania kwasu chlorogenowego	107

4.3 Charakterystyka materiałów hydrożelowych zawierających glicerynę	111
4.3.1. Stopień usieciowania, pęcznienia i analiza widm FT-IR	111
4.3.2. Badania mechaniczne.....	114
4.3.3. Analiza TGA.....	117
4.3.4. Analiza DSC	118
4.4. Modyfikacja bazowego materiału hydrożelowego substancjami aktywnymi.....	120
4.4.1. Stopień usieciowania, pęcznienia i degradacji.....	120
4.4.2. Analiza FT-IR	124
4.4.3. Analiza SEM.....	127
4.4.4. Analiza TGA.....	129
4.4.5. Analiza DSC	131
4.4.6. Profil uwalniania substancji aktywnych.....	133
4.4.7. Cytotoksyczność	136
4.5. Podsumowanie części badawczej.....	137
5. WNIOSKI	138
6. BIBLIOGRAFIA.....	140
7. DOROBEK NAUKOWY.....	171

1. WPROWADZENIE

Materiały hydrożelowe przeznaczone do zastosowań medycznych, oprócz potwierdzonej biokompatybilności oraz braku toksycznego działania, powinny charakteryzować się odpowiednio wysoką wytrzymałością mechaniczną, dostosowaną do konkretnej aplikacji. W przypadku hydrożeli, pełniących rolę systemów przedłużonego i kontrolowanego uwalniania substancji czynnych, kluczowe znaczenie ma ich stabilność w warunkach fizjologicznych, która bezpośrednio wpływa na skuteczność stosowanej terapii farmakologicznej [1,2].

Otrzymanie materiałów o pożądanych właściwościach fizykochemicznych najczęściej wymaga stabilizacji struktury polimerowej, między innymi na drodze chemicznego sieciowania przy zastosowaniu czynników sieciujących. Obecnie inżynieria materiałowa w znacznym stopniu opiera się na syntetycznych związkach sieciujących, wśród których wymienić można, m.in. N,N'-metylenobisakryloamid, epichlorohydrynę oraz aldehyd glutarowy. Związki te pozwalają otrzymać materiały o wysokiej wytrzymałości mechanicznej, stabilności hydrolitycznej i enzymatycznej, wydłużonym czasie degradacji oraz ograniczonej podatności na odkształcenia. Jednak ich stosowanie wiąże się z ryzykiem wystąpienia cytotoksyczności, co znacząco może ograniczać ich zastosowanie w produktach medycznych [1–4].

Z tego względu coraz większym zainteresowaniem cieszy się alternatywna koncepcja wykorzystania naturalnych czynników sieciujących pochodzenia roślinnego. Związki te, oprócz niskiej toksyczności, często wykazują również korzystne właściwości biologiczne, takie jak działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwutleniające, przeciwzapalne oraz wspomagające proliferację komórek. Naturalne czynniki sieciujące mogą być pozyskiwane z szerokiej gamy zasobów naturalnych bogatych w substancje aktywne, które należą do grupy kwasów fenolowych, flawonoidów, stilbenów lub tanin [5–8].

Szczególnie interesującym surowcem wydają się ziarna kawy, a zwłaszcza produkt odpadowy powstający po procesie ich parzenia. Fusy kawowe, będące powszechnie dostępnym, a jednocześnie słabo wykorzystywanym odpadem, zawierają cenne związki chemiczne, takie jak kwas chlorogenowy, kwas kawowy, kofeinę czy epikatechinę. Pozyskanie substancji czynnych z fusów kawowych wpisuje się w coraz silniej promowane założenia gospodarki o obiegu zamkniętym, której celem jest jak najbardziej

efektywne wykorzystanie dostępnych zasobów przy jednoczesnym ograniczeniu ilości generowanych odpadów [9,10].

Ekstrakcja związków polifenolowych z fusów kawowych może przyczynić się nie tylko do ograniczenia ilości odpadów o negatywnym wpływie na środowisko, ale także stanowić obiecującą alternatywę dla syntetycznych czynników sieciujących. Uzyskane bio-czynniki sieciujące umożliwiają otrzymanie bezpiecznych, bioaktywnych materiałów hydrożelowych, potencjalnie wykazujących dodatkowe działanie terapeutyczne. Dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym i biologicznym, materiały te wykazują wysoki potencjał w aplikacjach dermatologicznych [11,12].

1.1. Syntetyczne czynniki sieciujące

Syntetyczne czynniki sieciujące to bifunkcyjne związki o określonej strukturze i aktywności chemicznej, które umożliwiają otrzymanie usieciowanej matrycy polimerowej. Reaktywne grupy funkcyjne związków sieciujących mogą łatwo reagować z grupami funkcyjnymi łańcuchów polimerowych, co prowadzi do utworzenia nowych wiązań kowalencyjnych [13–15]. Do najczęściej wykorzystywanych czynników sieciujących w procesie otrzymywania hydrożeli zalicza się aldehyd glutarowy, glioksal oraz pochodne poli(glikolu etylenowego).

1.1.1. Aldehyd glutarowy

Aldehyd glutarowy to syntetyczny czynnik sieciujący, najczęściej wybierany spośród związków z grupy aldehydów ze względu na swoją najwyższą wydajność w procesie modyfikacji polimerów. Ma postać oleistej cieczy o barwie od bezbarwnej do słomkowej, charakteryzuje się doskonałą rozpuszczalnością w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, wysoką reaktywnością, a ponadto łatwą dostępnością i niskim kosztem produkcji. Aldehyd glutarowy może reagować z aminowymi i hydroksylowymi grupami funkcyjnymi obecnymi zarówno w strukturze białek, jak i polisacharydów, a biomateriały otrzymane przy jego zastosowaniu wykazują wysoką wytrzymałość na rozciąganie oraz dobre właściwości mechaniczne. Jednak istnieje ryzyko pojawienia się grup aldehydowych w produkcie końcowym, które działają toksycznie na komórki organizmu człowieka, czego skutkiem mogą być stany zapalne skóry, podrażnienie skóry i oczu, bóle głowy lub uczulenia ogólnoustrojowe. Z tego względu wdraża się dodatkowy etap oczyszczania, który polega, na przykład, na przemywaniu hydrożeli roztworem aminokwasów lub innym zawierającym wolne grupy aminowe. Ponadto maksymalne

stężenie aldehydu glutarowego w mieszaninie reakcyjnej, które pozwala wyeliminować działanie toksyczne po procesie oczyszczania materiału hydrożelowego, zostało ustalone na poziomie 8% (m/v) [16–20].

Literatura naukowa [19,21,22] wskazuje na liczne zastosowanie aldehydu glutarowego w otrzymywaniu hydrożeli bazujących na żelatynie. Opisywana reakcja sieciowania aldehydem glutarowym zachodziła na drodze reakcji grup aldehydowych z grupami ϵ -aminowymi pochodzącymi od lizyny i hydroksylizyny, czyli aminokwasów stabilizujących strukturę polimeru [19]. Wizualnym efektem modyfikacji żelatyny może być zmiana zabarwienia materiału na żółty, spowodowana tworzeniem się zasady Schiffa [21]. Usieciowana próbka charakteryzowała się wysokim stopniem usieciowania, zwiększoną sztywnością, wydłużonym czasem degradacji, zmniejszoną porowatością oraz ograniczonymi właściwościami absorpcyjnymi [19,21,22]. Ponadto reakcja sieciowania poprawiła stabilność termiczną białka poprzez podniesienie temperatury jego denaturacji [19]. Obserwuje się również wyraźną zależność pomiędzy stopniem usieciowania a zjawiskiem pęcznienia, wzrost wartości pierwszego parametru wpływa na ograniczenie szybkości odkształcenia plastycznego materiału [21]. W części publikacji podkreśla się jednak konieczność wielokrotnego przemywania usieciowanej próbki w celu usunięcia pozostałości syntetycznego czynnika sieciującego [19].

1.1.2. Glioksal

Kolejnym przykładem związku aldehydowego, pełniącego rolę czynnika sieciującego, jest glioksal. Dialdehyd charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością, niską prężnością pary w roztworach, a ponadto wykazuje wysoką reaktywność warunkowaną obecnością grup karbonylowych. Wśród syntetycznych czynników sieciujących, jest to związek o ograniczonej toksyczności komórkowej, jednak stosowanie go w stężeniu powyżej 5 mM może wywołać stres oksydacyjny. Brak równowagi między wolnymi rodnikami a przeciwutleniaczami stanowi czynnik ryzyka chorób, takich jak zaburzenia hormonalne, choroby układu krążenia czy przyspieszone starzenie się skóry. Nieprzereagowane cząsteczki glioksalu mogą mieć negatywny wpływ na organizm człowieka w postaci rozwoju lub postępu nefropatii cukrzycowej, rozwoju chorób Parkinsona i Alzheimerera [23–28].

Stabilizacja materiałów chitozanowych glioksałem polega na reakcji pomiędzy wolnymi grupami aminowymi polimeru i grupami aldehydowymi czynnika sieciującego

z utworzeniem zasady Schiffa. W wielu przypadkach otrzymane próbki wymagają dodatkowego etapu przemywania rozpuszczalnikiem w celu usunięcia nadmiaru czynnika sieciującego [29]. Przykładowo reakcja modyfikacji chitozanu przy użyciu glioksalu wpływa na jego kluczowe właściwości, prowadząc do poprawy parametrów mechanicznych, ograniczenia chropowatości powierzchni, zmniejszenia stopnia pęcznienia oraz zwiększenia porowatości przy jednoczesnym obniżeniu powierzchni właściwej [29–31].

1.1.3. Poli(glikol etylenowy) i jego pochodne

Poli(glikol etylenowy) należy do grupy syntetycznych polieterów amfifilowych, jako produkt komercyjny dostępny jest w kilku wariantach różniących się masą cząsteczkową. Polimer rozpuszczalny jest zarówno w wodzie, jak i rozpuszczalnikach organicznych, a ponadto charakteryzuje się nietoksycznością, biokompatybilnością, ograniczoną immunogennością oraz brakiem antygenowości. Jako czynniki sieciujące są również stosowane jego pochodne, takie jak diakrylan poli(glikolu etylenowego) (PEGDA). PEGDA to hydrofilowy polimer o elastycznym łańcuchu, który może być stosowany w reakcjach sieciowania w obecności środków inicjujących. Charakteryzuje się biokompatybilnością i nietoksycznością oraz nie wywołuje odpowiedzi odpornościowej organizmu. Jednak badania przeprowadzone na ludzkich komórkach raka szyjki macicy (HeLa) i linii komórkowej fibroblastów myszy (L929) potwierdziły częściową cytotoksyczność oligomerów i monomerów PEG. Związki, które wykazują toksyczność dla wyżej wymienionych komórek, obejmują PEG-1000, PEG-4000, mPEGMA-950, TEG, mPEGMA-500 i mPEGA-480. W wyniku długotrwałego stosowania, polimery o wyższej masie cząsteczkowej mogą potencjalnie kumulować się w tkankach i wywoływać problemy zdrowotne. Wysokie stężenie PEG może powodować występowanie efektów toksyczności w organizmie człowieka, które dotyczą przede wszystkim nerek. Opisane przypadki obejmują stany, takie jak ostra niewydolność nerek, martwica, skąpomocz i azotemia [32–38].

Reakcja sieciowania chitozanu pochodną PEG, która rozpoczyna się otwarciem pierścienia epoksydowego czynnika sieciującego, zachodzi pomiędzy grupami aminowymi i epoksydowymi. Również w przypadku tej grupy związków uwzględniono etap wymywania nieprzereagowanego PEG z próbki [39]. Otrzymane materiały charakteryzują się bardzo dobrą stabilnością hydrolityczną i termiczną, zwiększoną

podatnością na odkształcenia sprężyste i plastyczne, obniżonym stopniem pęcznienia oraz zwiększoną odpornością na degradację [39–41].

Syntetyczne czynniki sieciujące są powszechnie stosowane w celu efektywnej stabilizacji materiałów polimerowych o wielokierunkowym zastosowaniu, w tym medycznym i kosmetycznym. Wśród zalet wymienić można ich wysoką reaktywność i wydajność, powszechną dostępność i dużą różnorodność, podatność na modyfikacje funkcjonalne, a także skalowalność i powtarzalność reakcji sieciowania. Pomimo istotnych korzyści płynących ze stosowania syntetycznych czynników sieciujących, ograniczenia, takie jak toksyczność biologiczna, niska biodegradacja oraz obecność resztkowych reagentów w materiale końcowym, skłaniają do poszukiwania alternatywnych związków o właściwościach sieciujących, ze szczególnym uwzględnieniem zasobów naturalnych.

1.2. Naturalne czynniki sieciujące

W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się naturalnym odpowiednikom syntetycznych czynników sieciujących. Zapewniają one łagodniejsze i bardziej przyjazne dla środowiska warunki modyfikacji polimerów, co wpisuje się w założenia zrównoważonego rozwoju. Dzięki takim właściwościom jak biokompatybilność i biodegradowalność, związki pochodzenia naturalnego zyskują na znaczeniu, szczególnie w zastosowaniach biomedycznych [13–15].

1.2.1. Genipina

Genipina to związek naturalny otrzymywany na drodze ekstrakcji owoców rośliny *Gardenia jasminoides* Ellis, która jest powszechnie stosowana w medycynie tradycyjnej w niektórych regionach Azji Południowej. Związek wykazuje działanie łagodzące bóle głowy i objawy cukrzycy typu II, a także stosowany jest w leczeniu stanów zapalnych i chorób wątroby. Genipina to pochodna niecukrowego składnika glikozydów, która stosowana jest w procesie sieciowania zarówno białek, jak i polisacharydów. Wykazuje wysoką selektywność względem związków zawierających w swojej strukturze wolne grupy aminowe. Charakteryzuje się biozgodnością, biodegradowalnością, około 10 000 razy niższą cytotoksycznością oraz 5 000 razy silniejszym działaniem stymulującym namnażanie komórek w stosunku do aldehydu glutarowego [42]. Z tego względu materiały hydrożelowe na bazie naturalnego czynnika sieciującego wykazują wyższą biokompatybilność niż produkty usieciowane syntetycznymi odpowiednikami. Ponadto

posiadają one wyższą wytrzymałość mechaniczną i stabilność termiczną, lepszą odporność na biodegradację enzymatyczną oraz wyższy stopień usieciowania kontrolowany wartością pH środowiska reakcji. Obecnie zastosowanie genipiny jest ograniczone ze względu na znaczny koszt procesu pozyskiwania związku z zasobów naturalnych [5,17,43–46].

Mechanizm sieciowania genipiną obejmuje atak nukleofilowy grupy aminowej żelatyny na atom węgla C3 w cząsteczce czynnika sieciującego z utworzeniem pośredniej grupy aldehydowej, a następnie atak wtórnej aminy na grupę aldehydową z powstaniem związku heterocyklicznego [47]. W rezultacie otrzymane materiały wykazują wyższy stopień usieciowania oraz zwiększoną stabilność w środowisku wodnym, jak i w obecności enzymów proteolitycznych. Reakcja sieciowania przy użyciu genipiny korzystnie wpływa na właściwości mechaniczne hydrożelu na bazie żelatyny, zwiększa jej sztywność oraz odporność na odkształcenia. Ponadto poprawia wytrzymałość termiczną białka, podwyższając jego temperaturę denaturacji [47–49].

1.2.2. Kwas cytrynowy

Kwas cytrynowy to związek należący do grupy hydroksykwasów karboksylowych, a jego głównym źródłem są owoce cytrusowe. W niewielkich ilościach występuje w organizmach metabolizujących węglowodany, natomiast zjonizowana forma kwasu cytrynowego jest produktem pośrednim cyklu Krebsa, czyli procesu umożliwiającego organizmom tlenowym wytwarzanie energii. Związek znalazł szerokie zastosowanie jako czynnik sieciujący dla polisacharydów i białek ze względu na brak efektu toksyczności, działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz niski koszt surowca. Dodatkowo pełni szereg funkcji w organizmie człowieka, takich jak regulacja metabolizmu i aktywności neuronów w mózgu, zwiększenie przyswajalności związków mineralnych oraz zmniejszenie ryzyka powstawania kamieni nerkowych. Badania nad hydrożelami celulozowymi wskazują, że sieciowanie kwasem cytrynowym wpływa na zwiększenie hydrofilowości materiału końcowego oraz chropowatość jego powierzchni, a także promuje różnicowanie komórek macierzystych człowieka. Ponadto omawiany związek korzystnie wpływa na właściwości mechaniczne, wytrzymałość na rozciąganie i stabilność materiału hydrożelowego [5,16,17,50,51].

Reakcja sieciowania kwasem cytrynowym zachodzi pomiędzy grupami aminowymi żelatyny a grupami karboksylowymi naturalnego czynnika sieciującego i prowadzi do

podstawienia nukleofilowego z powstaniem wiązania amidowego [52]. Stabilizacja białka prowadzi do zwiększenia stopnia usieciowania, ograniczenia właściwości absorpcyjnych oraz wydłużenia czasu degradacji enzymatycznej. Zarówno wytrzymałość na rozciąganie, jak i wydłużenie przy zerwaniu ulegają zmniejszeniu w wyniku powstania bardziej usieciowanej struktury polimerowej [52–54]. Dodatkowo zastosowanie kwasu cytrynowego pozytywnie wpływa na właściwości barierowe materiału hydrożelowego względem promieniowania UV [52].

1.2.3. Kwas garbnikowy

Kwas garbnikowy należy do grupy tanin, czyli pochodnych fenoli, mających swoje źródło między innymi w korze dębu, kasztanowca i sekwoi. Związek jest estrem kwasu galusowego i digalusowego z centralnie położoną jednostką glukozy. Charakteryzuje się biozgodnością, właściwościami przeciwutleniającymi, przeciwzapalnymi i przeciwdrobnoustrojowymi, a ponadto wykazuje silne właściwości adhezyjne do powierzchni hydrofilowych i hydrofobowych. Potwierdzono, że kwas garbnikowy może niwelować występowanie stresu oksydacyjnego spowodowanego obecnością reaktywnych form tlenu. Kwas garbnikowy może być stosowany jako czynnik sieciujący w reakcji fizycznej i chemicznej modyfikacji polisacharydów i białek, która zachodzi poprzez utworzenie wiązań wodorowych, jonowych, kowalencyjnych lub oddziaływań hydrofobowych [55–62].

Sieciowanie chitozanu i żelatyny za pomocą kwasu garbnikowego pozwoliło otrzymać materiały o dobrej biozgodności i niskiej toksyczności wobec komórek [57], a także o korzystnym wpływie na ich proliferację, co potwierdza praca Bhattacharyya i in. [63]. Zastosowanie naturalnego czynnika sieciującego prowadzi do zwiększenia gęstości usieciowania, ograniczenia stopnia pęcznienia oraz poprawy właściwości mechanicznych i wzrostu twardości materiału. Usieciowane próbki charakteryzują się strukturą o równomiernie rozmieszczonych porach, których rozmiar ulega zmniejszeniu na skutek zajścia reakcji sieciowania [57,64]. Ponadto modyfikowana żelatyna wykazuje obniżoną sprężystość, a jednocześnie zwiększoną spójność i gumowatość [64].

1.2.4. Galusan epigallokatechiny

Galusan epigallokatechiny to związek należący do grupy flawonoidów, który w największej ilości znajduje się między innymi w liściach zielonej herbaty, gdzie stanowić może nawet 1/3 suchej masy surowca. Wśród innych katechin obecnych w zielonej

herbacie wymienić można 3-galusan (-)-epikatechiny, (-)-epigallokatechinę, (-)-epikatechinę oraz (+)-katechinę. Cząsteczka galusanu epigallokatechiny zbudowana jest ze szkieletu podstawowego złożonego z 15 atomów węgla ułożonych w konfiguracji C6-C3-C6, do którego przyłączony jest kwas galusowy. Związek charakteryzuje się właściwościami przeciwzapalnymi, przeciwbakteryjnymi i przeciwwirusowymi. Ponadto pojawiły się doniesienia literaturowe o jego działaniu przeciwnowotworowym, kardioprotekcyjnym i neuroprotekcyjnym. Chemiczne sieciowanie polimerów przy zastosowaniu galusanu epigallokatechiny zachodzi w wyniku powstania wiązań kowalencyjnych na drodze reakcji Michaela lub poprzez tworzenie zasady Schiffa. Otrzymane materiały hydrożelowe wykazują odporność na degradację enzymatyczną, właściwości samonaprawiające oraz silnie adhezyjne. Dodatkowo galusan epigallokatechiny korzystnie wpływa na odporność termiczną oraz wytrzymałość mechaniczną polimerów, a sam w sobie odznacza się doskonałą biokompatybilnością i niską cytotoksycznością [5,62,65–68].

Reakcja sieciowania białka przy zastosowaniu galusanu epigallokatechiny może zachodzić poprzez oddziaływania fizyczne, jak i wiązania kowalencyjne tworzące się pomiędzy grupami fenolowymi czynnika sieciującego i grupami aminowymi lub tiolowymi polimeru [69]. Usieciowany w ten sposób materiał odznaczał się wysoką wytrzymałością i spójnością, zwiększoną chropowatością i twardością, a także porowatą strukturą o rosnącej wielkości porów względem materiału niepoddanego modyfikacji. Zastosowanie naturalnego czynnika sieciującego dodatkowo przyczynia się do poprawy wytrzymałości i elastyczności próbek poprzez podniesienie temperatury topnienia, zwiększenie odporności na rozciąganie oraz wzrost wartości siły zrywającej [69–71].

1.2.5. Wanilina

Wanilina (4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd) to aldehyd fenolowy zbudowany z pierścienia benzenowego, który zwiera w swojej strukturze grupę aldehydową, hydroksylową i metoksyłową. Naturalnie występuje w strąkach nasion wanilii i stosowana jest jako dodatek do aromatów spożywczych, składnik kompozycji zapachowych oraz półprodukt w wyrobach kosmetycznych i farmaceutycznych. Roczna produkcja naturalnej waniliny wynosi około 7 500 ton, natomiast popyt na ten surowiec osiągnął około 18 600 ton w roku 2016. Pokrycie tak znacznego zapotrzebowania wymaga stosowania zarówno chemicznych, jak i biologicznych metod otrzymywania

waniliny. Związek charakteryzuje się właściwościami przeciwnowotworowymi, przeciwzapalnymi, przeciwutleniającymi i antymutagennymi. Zastosowany jako czynnik sieciujący pozwala na otrzymanie hydrożeli samonaprawiających się, które mogą należeć do grupy tzw. materiałów inteligentnych, wrażliwych na zmianę temperatury i pH [14,72–76].

Reakcja sieciowania chitozanu waniliną zachodzi na skutek reakcji grup aldehydowych czynnika sieciującego z grupami aminowymi polimeru, czego rezultatem jest utworzenie zasady Schiffa. Dodatkowo możliwe jest tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi obecnymi w strukturze waniliny a grupami aminowymi i hydroksylowymi pochodzącymi z łańcucha polisacharydu [72]. Reakcja sieciowania powoduje modyfikację właściwości polimeru, przejawiającą się między innymi wzrostem stopnia usieciowania, ograniczeniem zdolności absorpcyjnych, zmniejszeniem chropowatości powierzchni oraz poprawą jej jednolitości. Jednocześnie obserwuje się wzrost wytrzymałości na rozciąganie, obniżenie wydłużenia przy zerwaniu oraz zwiększenie modułu Younga [72–74]. Hydrożele sieciowane waniliną charakteryzowały się wysoką biokompatybilnością *in vitro* oraz nieznaczną odpowiedzią zapalną *in vivo*, w przeciwieństwie do jej ciężkiej postaci w przypadku zastosowania aldehydu glutarowego [73,74].

W **Tabeli 1** przedstawiono porównanie właściwości naturalnych i syntetycznych czynników sieciujących.

Tabela 1. Porównanie właściwości naturalnych i syntetycznych czynników sieciujących.

Rodzaj czynnika sieciującego	Zalety	Wady	Lit.
Naturalny	Biokompatybilność	Wyższe koszty produkcji	[16,17,43,55,65]
	Biodegradowalność	Brak powtarzalności surowca	
	Niska cytotoksyczność	Ograniczona dostępność	
	Surowce odnawialne		
Syntetyczny	Wysoka reaktywność	Potencjalna toksyczność	[17,23,32,77,78]
	Lepsza kontrola właściwości	Ograniczona biodegradacja	
	Duża dostępność	Surowce nieodnawialne	
	Niski koszt produkcji		

Obecnie obserwuje się wzrost zainteresowania pozyskiwaniem substancji czynnych z surowców roślinnych, takich jak migdałecznik chebulowiec (*Terminalia chebula*), oliwka europejska (*Olea europaea L.*), sumaka chińskiego (*Rhus chinensis*) czy gardenia jaśminowata (*Gardenia jasminoides* Ellis) [43,79–81]. Jest to ściśle związane z właściwościami, jakimi charakteryzują się tego typu związki, między innymi biokompatybilnością, biodegradowalnością, nietoksycznością, reaktywnością w warunkach fizjologicznych, swoistą aktywnością biologiczną oraz odnawialnością wynikającą z ich pochodzenia.

Interesującą i stale nierozwiniętą koncepcją jest zastosowanie odpadów spożywczych jako surowca roślinnego dla substancji aktywnych, co wpisuje się w założenia gospodarki o obiegu zamkniętym, która z jednej strony dąży do ograniczenia powstawania odpadów, a z drugiej maksymalnego wykorzystania dostępnych zasobów. Stąd też idea pozyskiwania związków, które mogą pełnić rolę naturalnych czynników sieciujących w procesie otrzymywania materiałów hydrożelowych wydaje się zasadna. Do grupy związków o potencjalnym zastosowaniu jako czynniki sieciujące należą hydroksykwasy karboksylowe, taniny, flawonoidy i aldehydy fenolowe [52,57,69,72,82]. Zarówno ziarna kawy, jak i pozostałości powstałe po ich parzeniu, stanowią bogate źródło substancji aktywnych o wysokim potencjale sieciującym, wśród których wyróżnia się polifenole, alkaloidy oraz hydroksykwasy karboksylowe [83].

1.3. Charakterystyka kawy i jej produktów odpadowych

Ziarna kawy są istotnym surowcem spożywczym, którego zużycie w Europie w latach 2020/2021 przyjęło wartość 3,2 mln ton i stanowiło tym samym 33% całkowitej światowej konsumpcji kawy. Zasób naturalny przetwarzany na takim poziomie generuje znaczne ilości odpadów, które pomimo procesu parzenia są bogatym źródłem różnego rodzaju związków chemicznych i substancji aktywnych [84–86]. Wśród wspomnianych odpadów wskazać można pulpę kawową, srebrne osłonki oraz łuski i fusy kawy, przy czym ostatnie z wymienionych posiadają największy udział sięgający nawet 45% [87–89]. W dużej mierze niewykorzystanym strumieniem odpadów generowanym w ogromnych ilościach są fusy kawowe, których roczna produkcja w procesie otrzymywania kawy rozpuszczalnej wynosi około 6 milionów ton [90–92]. Przyjmuje się, że na 30 g zmielonych ziaren kawy przypada około 45-60 g mokrych fusów [86].

Na skład chemiczny ziaren kawy, a tym samym także jej odpadów wpływa wiele czynników, w tym stopień palenia, odmiana uprawianych kawowców oraz region i warunki wzrostu [86,90,93]. Metoda parzenia kawy znacząco wpływa na skład chemiczny powstających fusów, ponieważ warunkuje parametry ekstrakcji takie jak temperatura, ciśnienie i czas kontaktu z wodą [94]. Wśród najczęściej spotykanych gatunków kawy dominują Arabica (*C. arabica* L.) i Robusta (*C. canephora* L.), przy czym Arabica stanowi około 50-60% produkcji światowej. Do jej największych producentów należą Brazylia i Kolumbia [95]. Wśród głównych grup związków obecnych w strukturze surowca znajdują się węglowodany, białka, tłuszcze i woski, minerały oraz polifenole. Związkami, stanowiącymi około 50% suchej masy fusów, są polisacharydy, a w szczególności hemiceluloza (39%) i celuloza (12%) [90]. Pierwszy z wymienionych jest heterogennym glukanem o krótkim łańcuchu bocznym złożonym z dwóch lub więcej monosacharydów. Grupami cukrowymi są głównie ksyloza, glukoza, mannoza, arabinoza i galaktoza oraz ich pochodne. Monomery obecne w strukturze polimeru połączone są ze sobą wiązaniami β -glikozydowymi w wyniku czego tworzą rozgałęzioną strukturę polimerową [96–100]. Wśród pozostałych związków wchodzących w skład fusów kawowych można wyróżnić białka, występujące w ilości 8-12% oraz tłuszcze o stężeniu w zakresie między 10-20%. Natomiast zawartość polifenoli, czyli związków odpowiedzialnych za korzystne właściwości biologiczne, wynosi 4,6-9,9 mg lub 16-173,3 mg równoważnika kwasu galusowego w gramie suchej masy surowca [91,92,101].

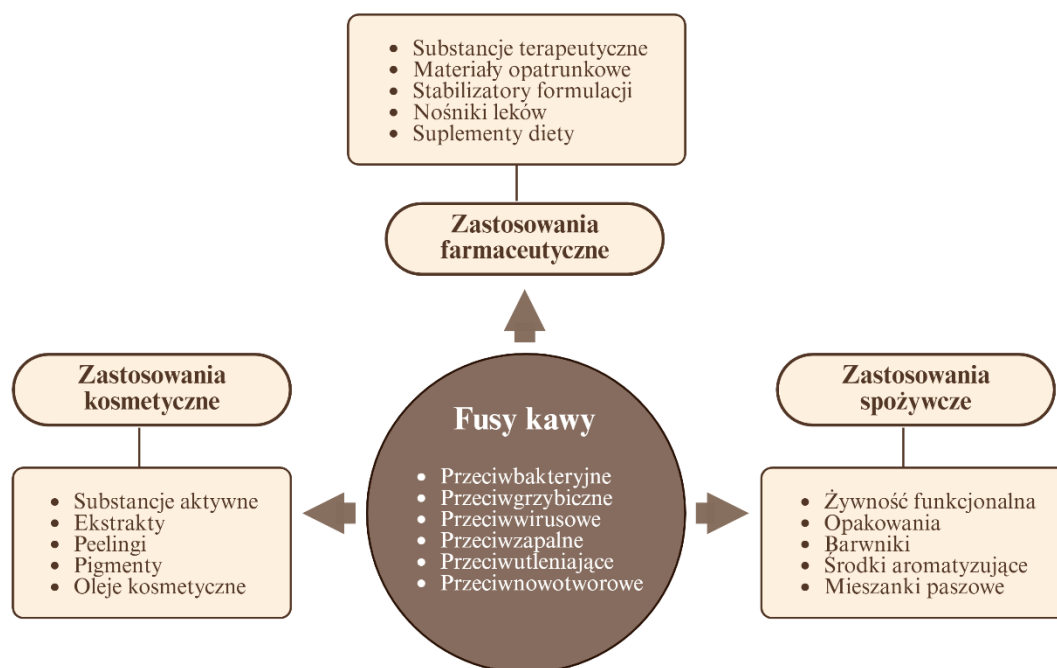
Związki fenolowe stanowią metabolity wtórne o swoistym działaniu, które są produkowane przez rośliny w celu ochrony przed szkodnikami i patogenami, a wśród nich największe znaczenie mają przede wszystkim kumaryny, flawonoidy, proantocyjanidyny i stilbeny [83]. Substancjami aktywnymi występującymi w fusach kawy są między innymi kwas chlorogenowy, kwas kawowy, kwas syringowy, kwas galusowy, kofeina, epikatechina czy apigenina [9,10]. W konsekwencji ich obecności ekstrakty kawowe charakteryzują się licznymi właściwościami biologicznymi, takimi jak działanie przeciwdrobnoustrojowe (względem szczepów *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*), przeciwutleniające, przeciwzapalne, a także zmniejszające proliferację melanocytów. Dostępne są również doniesienia dotyczące zmniejszenia żywotności i proliferacji komórek nowotworowych, w szczególności ludzkich komórek raka jelita grubego (HT-29) i komórek raka płuc (A549) [9,10,83,102–

104]. Kwas chlorogenowy, główny związek polifenolowy ekstraktu, to ester zbudowany z kwasów *trans*-cynamonowych (głównie kwasu kawowego, kumarowego lub ferulowego) i kwasu (-)-chinowego, który wykazuje szereg właściwości korzystnych dla funkcjonowania organizmu człowieka [105–108]. Związek charakteryzuje się działaniem przeciwzapalnym i przeciwutleniającym, dzięki czemu ogranicza występowanie stanów zapalnych i chroni przed uszkodzeniami wywołanymi przez wolne rodniki [105,107,108]. Ponadto może pełnić funkcję czynnika przeciwbakteryjnego w kierunku szczepów *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus*, a także przeciwwirusowego względem HSV-1 i HSV-2, HIV oraz adenowirusa [107]. Oprócz działania hepatoprotekcyjnego, neuroprotekcyjnego i wazorelaksacyjnego, kwas chlorogenowy oddziałuje na komórki nowotworowe poprzez ograniczanie ich proliferacji oraz promowanie apoptozy [105,107]. Z tego względu ekstrakty na bazie odpadów po procesie parzenia ziaren kawy wykazują znaczny potencjał do zastosowania w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym w celu funkcjonalizacji żywności, zmniejszenia obciążenia mikrobiologicznego, przedłużenia okresu przydatności do użycia oraz stabilizacji produktów [102,104].

Proces parzenia ziaren kawy stanowi źródło generujące znaczne ilości odpadu w postaci fusów, które w zdecydowanej większości nie znajdują ponownego zastosowania. Stale prowadzone są badania, mające na celu ponowne zagospodarowanie tego surowca w dziedzinie farmacji, kosmologii, ale także biopaliw, adsorbentów i fotokatalizatorów [109–111]. Bevilacqua i in. [86] zaproponowali zastosowanie fusów kawy do funkcjonalizacji żywności, a tym samym nadania jej zarówno zdrowotnych, jak i niemedycznych właściwości, obejmujących działanie konserwujące oraz modyfikujące parametry sensoryczne. Surowiec odpadowy potencjalnie może również pełnić rolę pomocniczą w przeciwdziałaniu chorobom neurodegeneracyjnym, które związane są z występowaniem stresu oksydacyjnego i neurozapaleń inicjujących degenerację neuronów [112]. Ponadto fusy kawy użyto w procesie otrzymywania kropek kwantowych, a w rezultacie otrzymano biokompatybilne systemy dostarczania leków, które jednocześnie działają antyproliferacyjnie w kierunku linii komórek raka piersi CAL-51 [113]. Kanlayavattanukul i in. [114] przeprowadzili natomiast badania nad pozyskiwaniem frakcji olejowej z odpadu po procesie parzenia ziaren kawy, a następnie zastosowaniem jej jako komponentu o działaniu rozjaśniającym i zwiększającym elastyczność skóry. W

literaturze można również znaleźć dane dotyczące użycia fusów kawy jako mikrowypełniacza w kompozytach biopolimerowych w celu otrzymania biodegradowalnych opakowań o poprawionych właściwościach strukturalnych i mechanicznych [115]. Dodatkowo Lee i in. [116] opracowali metodę otrzymywania paliw stałych na bazie surowca odpadowego, które wykazywały dużą zawartość węgla, znaczną wydajność energetyczną oraz wysoką sprawność cieplną przy niskiej energii aktywacyjnej. Kolejnym rozwiązaniem jest przekształcenie fusów w materiał węglowy o właściwościach adsorpcyjnych, co może znaleźć zastosowanie w procesie remediacji wody poprzez usuwanie zanieczyszczeń takich jak pestycydy fosforoorganiczne, pozostałości farmaceutyczne i barwniki kationowe [117]. Ponadto materiał węglowy może również stanowić szkielet dla hybrydowych fotokatalizatorów opartych na dwutlenku tytanu, które wpływają na efektywność degradacji zanieczyszczeń organicznych, na przykład antybiotyków lub barwników [118]. W literaturze brakuje jednak doniesień dotyczących wykorzystania fusów kawy jako surowca do otrzymywania bio-czynników sieciujących dla materiałów polimerowych przeznaczonych do zastosowań medycznych, co wskazuje na istniejącą niszę badawczą wymagającą przeprowadzenia pogłębionej analizy i dalszych badań.

Rysunek 1 przedstawia możliwe kierunki zastosowania odpadowego surowca roślinnego, jakim są fusy z kawy w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym.



Rysunek 1. Możliwe kierunki zastosowania fusów z kawy w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym.

W literaturze pojawiają się badania koncentrujące się na wykorzystaniu różnych surowców naturalnych w procesie otrzymywania bio-czynników sieciujących. Substancje aktywne pozyskane z ekstraktu z pestek winogron, bogatego w proantocyjanidyny, zastosowano jako dodatki do kompozytów dentystycznych przeznaczonych do wypełnień i odbudowy zębiny, w celu stabilizacji jej kolagenowej struktury [119]. Z kolei migdałecznik chebulowiec (*Terminalia chebula*) zawiera związki o szerokim działaniu biologicznym, w tym o właściwościach przeciwutleniających, przeciwbakteryjnych, przeciwzapalnych, kardioprotekcyjnych, hepatoprotekcyjnych oraz wspomagających gojenie ran. Ekstrakt z jego owoców wykorzystano do fizycznego usieciowania rusztowań kolagenowych, które mogą znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej [79]. Ponadto włókna biopolimerowe poddano stabilizacji ekstraktem z oliwki europejskiej (*Olea europaea L.*), którego głównym składnikiem jest oleuropeina, czyli związek pozwalający zapobiegać infekcjom bakteryjnym i grzybicznym, redukować stany zapalne, a także stymulować proliferację, migrację i różnicowanie komórek. Autorzy nie potwierdzają jednoznacznie wystąpienia chemicznego usieciowania polimeru, ograniczając się do sformułowania hipotezy o możliwej reakcji sieciowania

pomiędzy grupami aminowymi białka a grupami hydroksylowymi polifenoli [80]. Hydrożele żelatynowe zostały fizycznie usieciowane z wykorzystaniem ekstraktu z sumaka chińskiego (*Rhus chinensis*), który zawiera znaczne ilości polifenoli o silnym działaniu przeciwutleniającym. Związki te mogą wspierać proces leczenia cukrzycy, choroby wieńcowej oraz wysokiego ciśnienia [81]. Wśród kluczowych elementów dla procesu wyodrębniania związków aktywnych z biomasy wymienić należy dobór metody ekstrakcji, która umożliwi pozyskiwanie związków z wysoką wydajnością i w sposób zrównoważony dla środowiska.

1.4. Metody pozyskiwania substancji aktywnych z surowców roślinnych

Najpowszechniej stosowaną metodą pozyskiwania substancji aktywnych z zasobów roślinnych jest proces ekstrakcji rozpuszczalnikowej, który polega na wyodrębnianiu określonych związków z mieszaniny ciekłej lub stałej poprzez działanie na nią odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem. Klasyczne podejście, oparte na ekstrakcji ciała stałego przy użyciu rozpuszczalników organicznych w aparacie Soxhleta, charakteryzuje się znaczną czasochłonnością, niską selektywnością oraz koniecznością stosowania dużych ilości kosztownych i często toksycznych ekstrahentów. Wspomniane wady stanowią czynnik skłaniający do dalszego rozwoju bardziej wydajnych i przyjaznych dla środowiska technik. Wśród nowoczesnych metod ekstrakcji wymienić można ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (UAE), promieniowaniem mikrofalowym (MAE), a także ultradźwiękami/promieniowaniem mikrofalowym (UMAE) [120–131].

1.4.1. Ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami (UAE)

Metoda ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami (UAE) opiera się na wykorzystaniu energii fal ultradźwiękowych w celu ułatwienia ekstrakcji związków z próbek stałych przez rozpuszczalnik, który jest dobierany w zależności od charakteru substancji ekstrahowanej. Metoda ta stosuje fale ultradźwiękowe o częstotliwości od 20 kHz do 100 kHz. Opiera się na zjawisku kawitacji akustycznej, czyli szybkich przejściach fazy ciekłej w fazę gazową, które spowodowane są występowaniem stref wysokiego i niskiego ciśnienia wpływających na zmienność temperatury rozpuszczalnika. Zjawisko kawitacji powoduje naruszenie ciągłości ściany komórkowej surowca roślinnego, co zwiększa wydajność procesu poprzez osiągnięcie większej powierzchni kontaktu międzyfazowego [120–131]. Badania nad procesem UAE pozwoliły stwierdzić, że działanie na próbkę

niższą częstotliwością zwiększa intensywność występowania kawitacji akustycznej podczas procesu ekstrakcji. Ponadto zastosowanie ultradźwięków ma wpływ na wartość temperatury i ciśnienia procesu. Technika ekstrakcji wspomaganiej ultradźwiękami jest szczególnie atrakcyjna ze względu na prostotę i niski koszt aparatury, wśród której najpowszechniej stosowana jest łaźnia lub sonda ultradźwiękowa. W przypadku łaźni ultradźwiękowej na próbkę pośrednio działa fala o częstotliwości 40-50 kHz. Alternatywnym rozwiązaniem jest zastosowanie sondy ultradźwiękowej, która pozwala bezpośrednio działać na próbkę częstotliwością 20 kHz [120–131].

Dostępne są liczne publikacje skupiające się na ekstrakcji różnych surowców roślinnych przy zastosowaniu ekstrakcji wspomaganiej ultradźwiękami. Przykładowo ekstrakcję skórki przepękli indochińskiej (*Momordica cochinchinensis*) octanem etylu prowadzono w temperaturze 20°C przy użyciu łaźni ultradźwiękowej o zmiennej mocy ultradźwięków z zakresu 150-250 W oraz częstotliwości wynoszącej 43,2 Hz. W rezultacie najefektywniejsze parametry procesu pozwoliły otrzymać 268 mg całkowitej zawartości karotenoidów w 100 g suchej masy surowca [132]. Proces pozyskiwania substancji aktywnych z czarnej aronii (*Aronia melanocarpa*) przeprowadzono przy użyciu dwóch rozpuszczalników (woda i etanol) w ekstraktorze wyposażonym w generator ultradźwięków. Mieszaninę ekstrakcyjną poddano działaniu temperatury na czterech poziomach wartości z przedziału 20-80°C przy stałej częstotliwości (30,8 Hz) i mocy ultradźwięków (100 W) działających w trybie ciągłym [133]. Natomiast liście drzewa oliwnego (*Olea europaea*) poddano działaniu etanolu przy napięciu 200 V, częstotliwości 50 Hz i temperaturze 25°C. Uzyskano całkowitą zawartość polifenoli wynoszącą 25,06 mg równoważnika kwasu galusowego w gramie wysuszonego materiału roślinnego [134]. Koncepcją przedstawioną dla czerwonych winogron odmiany Tempranillo było zastosowanie sonifikatora o mocy ultradźwięków 200 W oraz ich częstotliwości 24 kHz, który zanurzono w łaźni wodnej dodatkowo wyposażonej w regulator temperatury. Wybrany ekstrahentem był wodny roztwór etanolu, którego pH zmodyfikowano dodatkiem kwasu solnego [135].

1.4.2. Ekstrakcja wspomaganiana promieniowaniem mikrofalowym (MAE)

Ekstrakcja wspomaganiana promieniowaniem mikrofalowym (MAE) może być prowadzona w układzie otwartym pod ciśnieniem atmosferycznym lub w systemie zamkniętym przy podwyższonym ciśnieniu. Zastosowanie systemu zamkniętego

umożliwia osiągnięcie wyższych temperatur w konsekwencji podwyższonego ciśnienia panującego w naczyniu ekstrakcyjnym, co korzystnie wpływa na wydajność i szybkość procesu. Otwarty system pozwala natomiast na większą kontrolę bezpieczeństwa i stanowi odpowiedni wybór w przypadku związków wrażliwych na wysoką temperaturę. Na wydajność procesu ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym wpływa szereg parametrów, takich jak moc i częstotliwość promieniowania mikrofalowego, czas naświetlania, temperatura, ciśnienie oraz liczba cykli ekstrakcji [120–131]. Zastosowanie promieniowania mikrofalowego w przypadku próbek roślinnych wywołuje wewnętrzne przegrzanie cząsteczek wody skutkujące rozerwaniem komórek materiału. Proces ten pozwala przyspieszyć przenoszenie masy oraz dyfuzję substancji aktywnych z ciała stałego do rozpuszczalnika. Dobór rozpuszczalnika stanowi parametr limitujący efektywność procesu ekstrakcji, znaczenie mają między innymi jego stała dielektryczna i współczynnik rozpraszania, a także rozpuszczalność ekstrahowanych związków chemicznych [120–131].

Ekstrakcja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym jest uznawana za znacznie wydajniejszą i bardziej ekologiczną metodę pozyskiwania substancji aktywnych w porównaniu do technik konwencjonalnych (ekstrakcji w aparacie Soxhleta, maceracji). Martino i in. [136] zastosowali ekstrakcję wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym w procesie izolowania kumaryny i jej związków pochodnych z nostrzyku żółtego (*Melilotus officinalis*). Ekstrakcję prowadzono w jednomodowym reaktorze mikrofalowym, w systemie zamkniętym przy mocy promieniowania mikrofalowego równej 100 W. Wyszuszony i rozdrobniony surowiec roślinny poddano ekstrakcji etanolem w temperaturze 50°C lub 110°C w czasie 5 lub 10 minut w jednym lub dwóch cyklach działania promieniowania. W rezultacie maksymalnie uzyskano 3,978 mg/g kumaryny, 1,257 mg/g kwasu o-kumarowego oraz 9,052 mg/g kwasu melilotowego [136]. Przeprowadzono także badania na liściach pistacji kleistej (*Pistacia lentiscus*), które przetwarzano przy zastosowaniu kuchenki mikrofalowej działającej z częstotliwością 2450 kHz oraz pozwalającej na modyfikowanie mocy promieniowania mikrofalowego w zakresie 200-1000 W. Analizowano wpływ szeregu parametrów, takich jak stężenie roztworu etanolu (20-100%), czas prowadzenia procesu (30-210 s) oraz stosunek rozpuszczalnika do surowca roślinnego (10-40 ml/g). Całkowita zawartość polifenoli w ekstrakcie otrzymanym przy wybranych parametrach wynosiła 202,42 mg równoważnika kwasu galusowego na gram suchej masy [137]. Pimentel-Moral i in. [138]

opisali natomiast ekstrakcję kwiatostanów ketmii szczawiowej (*Hibiscus sabdariffa*) w modułowym systemie o maksymalnej mocy promieniowania mikrofalowego wynoszącej 1500 W. Proces prowadzono w wodnym roztworze etanolu o zmiennym stężeniu przez 3-22 minuty w temperaturze 36-164°C. Dobrane parametry pozwoliły otrzymać ekstrakt wykazujący najwyższe stężenie kwasu hibiskusowego (69,0 mg/g ekstraktu) oraz estru dimetylowego kwasu hibiskusowego (70,0 mg/g ekstraktu) [138]. Ekstrakcję wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym przeprowadzono także w kuchence mikrofalowej wyposażonej w zamknięte naczynia teflonowe oraz system kontroli temperatury. Cztery odmiany surowca roślinnego w wodnym roztworze etanolu poddano działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 200 W oraz temperatury równej 50°C przez 18 minut. Wśród przypraw poddanych badaniu znalazły się kolendra siewna (*Coriandrum sativum*), cynamonowiec cejloński (*Cinnamomum zeylanicum*), kmin rzymski (*Cuminum cyminum*) oraz szafran uprawny (*Crocus sativus*). Okazało się, że ostatnia z wymienionych zawierała najwyższe stężenie całkowite polifenoli wynoszące 2939,472 mg kwasu galusowego/100 g [139].

1.4.3. Ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami i promieniowaniem mikrofalowym (UMAE)

Połączenie dwóch efektywnych metod ekstrakcji pozwala na dodatkowe skrócenie czasu trwania procesu oraz prowadzenie go z lepszą wydajnością, z tego względu metody łączone (UMAE) również znalazły zastosowanie w przetwarzaniu surowców roślinnych. Faza ultradźwięków odpowiada za zwiększenie głębokości wnikania rozpuszczalnika do cząstek materiału roślinnego, intensyfikuje kontakt międzyfazowy w mieszaninie ekstrakcyjnej oraz wspiera proces solwatacji rozpuszczalnych substancji aktywnych przez cząsteczki rozpuszczalnika. Natomiast promieniowanie mikrofalowe przyspiesza ogrzewanie ekstrahenta, zwiększając tym samym przepływ masy oraz rozpuszczalność wyodrębnianych związków. Możliwe są odmienne konfiguracje prowadzenia łączonych metod ekstrakcji, tj. jednoczesne lub naprzemienne, a także ciągłe lub przerywane stosowanie poszczególnych komponentów w danym cyklu [120–131].

Obserwuje się wzrost znaczenia metod łączonych ze względu na lepszą efektywność ekstrakcji w odniesieniu do poszczególnych technik, a także korzyści ekonomiczne i środowiskowe płynące z możliwości redukcji kluczowych parametrów procesu, takich jak zużycie rozpuszczalników czy czas trwania. Symultaniczne działanie ultradźwiękami

i promieniowaniem mikrofalowym na algi brunatne *Ascophyllum nodosum* spowodowało ekstrakcję rozpuszczalnych węglowodanów oraz związków fenolowych odpowiednio na poziomie 10408,72 mg równoważnika glukozy oraz 2605,89 mg równoważnika kwasu galusowego w 100 g suchej masy. Garcia-Vaquero i in. [140] zastosowali połączenie głowicy ultradźwiękowej (500 W, 20 kHz) oraz kuchenki mikrofalowej (2450 MHz), a analizie poddali amplitudę ultradźwięków z zakresu 20-100% oraz moc promieniowania mikrofalowego wahającą się w przedziale 250-1000 W. Ekstrakcję likopenu z pasty pomidorowej przeprowadzono przy użyciu reaktora umożliwiającego jednoczesną pracę promieniowaniem mikrofalowym w systemie otwartym przy częstotliwości 2450 MHz oraz ultradźwiękami o mocy 50 W przy częstotliwości 40 kHz. Substancję aktywną izolowano w obecności octanu etylu, a modyfikowanymi parametrami był czas trwania (209-511 s) i moc promieniowania mikrofalowego (60-110 W). Maksymalną wydajność procesu, wynoszącą 97,4%, otrzymano przy ustalonych wartościach optymalnych (367 s, 98 W) [141]. Natomiast Cheng i in. [142] opisali ekstrakcję polifenoli z pulpy chlebowca różnolistnego (*Artocarpus heterophyllus*) poprzez jednoczesne działanie promieniowaniem mikrofalowym (550 W) i ultradźwiękami (250 W) na mieszaninę na bazie wody, metanolu, etanolu lub acetonu. Ostatni z wymienionych uznano za najefektywniejszy rozpuszczalnik, a otrzymany ekstrakt charakteryzował się najwyższą całkowitą zawartością polifenoli równą 1,47 mg ekwiwalentu kwasu galusowego/g [142]. Analizowaną metodę ekstrakcji zastosowano także w celu pozyskania polisacharydów i polifenoli z mangostanu właściwego (*Garcinia mangostana*). Suchą masę roślinną w roztworze kwasu cytrynowego poddano działaniu ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz w łaźni ultradźwiękowej oraz promieniowania mikrofalowego o mocy 400 W w reaktorze mikrofalowym. Proces pozwolił na otrzymanie maksymalnie 20,5% polisacharydów oraz 117,7 mg kwasu galusowego z 1 grama surowca. Autorzy wskazali, że substancje aktywne pozyskane tą metodą mogą z powodzeniem znaleźć zastosowanie jako składniki produktów nutraceutycznych [143]. Połączenie działania ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego spowodowało zwiększenie wydajności ekstrakcji związków fenolowych, węglowodanów rozpuszczalnych oraz likopenu, przewyższając efektywnością metody UAE i MAE stosowane oddzielnie.

1.4.4. Pozostałe techniki ekstrakcji

Ekstrakcja nadkrytyczna (SFE) stanowi metodę wyodrębniania substancji aktywnych z surowca roślinnego przy użyciu rozpuszczalnika w stanie nadkrytycznym, najczęściej dwutlenku węgla. Zasadniczo wyróżnić można dwa główne etapy procesu, ekstrakcję rozpuszczalnych związków naturalnych z suchej masy roślinnej, a następnie rozdział otrzymanej mieszaniny poprzez gwałtowne obniżenie ciśnienia lub zwiększenie temperatury. Ciecze w stanie nadkrytycznym wykazują szereg właściwości korzystnych dla procesu ekstrakcji, takich jak niska lepkość, stosunkowo wysoka dyfuzyjność czy łatwość w modyfikacji gęstości. Charakteryzują się zatem lepszymi właściwościami transportowymi, wyższym stopniem przenikania do matrycy surowca oraz zwiększoną efektywnością rozpuszczania substancji aktywnych w porównaniu do tradycyjnych rozpuszczalników [144–147]. Ponadto w literaturze dostępne są opisy modyfikacji SFE przy zastosowaniu dodatkowych metod, takich jak ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami. Rozwiązanie to pozwala na poprawę wydajności i szybkości procesu poprzez zwiększenie powierzchni kontaktu surowca z rozpuszczalnikiem, a w konsekwencji intensyfikację uwalniania substancji aktywnych z materiału roślinnego [148].

Ekstrakcję nadkrytyczną zastosowano do pozyskiwania polifenoli ze skórek winogron odmian Tinto Mozueleo, Cabernet, Boval, Merlot oraz Tempranillo. Proces prowadzono w temperaturze 60°C, pod ciśnieniem 250 bar, przy przepływie nadkrytycznego dwutlenku węgla wynoszącym 2 ml/min. W wyniku ekstrakcji uzyskano maksymalnie: 897 mg/kg (+)-katechiny (Cabernet), 234 mg/kg (-)-epikatechiny (Merlot) oraz 255 mg/kg kwercetyny (Merlot) [149]. Wyodrębnianie polifenoli z liści zielonej herbaty (*Camellia sinensis*) przeprowadzono z wykorzystaniem nadkrytycznego dwutlenku węgla o przepływie 3 ml/min, przy stałym ciśnieniu 15 MPa. Zastosowana metoda umożliwiła uzyskanie 18 mg/g kofeiny oraz 67 mg/g katechin [150].

Ekstrakcja wspomagana enzymami (EAE) opiera się na zastosowaniu biokatalizatorów przyspieszających rozkład różnych typów związków, takich jak polisacharydy (pektynaza), celuloza (celulaza), hemiceluloza (glukanaza) oraz ksylany (ksylanaza) [151,152]. W trakcie procesu zachodzi degradacja składników ściany komórkowej rośliny, co zwiększa penetrację rozpuszczalnika, najczęściej wody, do wnętrza materiału i umożliwia wyodrębnianie pożądaných substancji aktywnych

[153,154]. EAE należy do metod przyjaznych dla środowiska ze względu na łagodne warunki reakcji, ograniczenie liczby etapów i ilości rozpuszczalnika oraz możliwość użycia całego surowca przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej efektywności i wydajności procesu oraz jakości uzyskanych ekstraktów. Istotnymi dla przebiegu ekstrakcji parametrami są między innymi ilość i rodzaj enzymu, temperatura i pH mieszaniny reakcyjnej, a także czas prowadzenia procesu [155–157]. Synergiczne działanie ekstrakcji wspomaganey enzymami oraz ekstrakcji rozpuszczalnikowej stanowi korzystną modyfikację prowadzącą do zwiększenia stężeń izolowanych substancji aktywnych [158].

Mat Yusoff i in. [153] przeprowadzili ekstrakcję enzymatyczną nasion moringi olejodajnej (*Moringa oleifera*) stosując enzym w stężeniu 2%, przy pH równym 6, temperaturze 40°C oraz czasie inkubacji wynoszącym 12,5 godziny. W warunkach optymalnych uzyskano maksymalny odzysk oleju na poziomie 73% [153]. Ekstrakcję enzymatyczną wytlóków z winogron przeprowadzono z wykorzystaniem tanazy i celulazy, przy zastosowaniu następujących parametrów: czas trwania 2 godziny, temperatura 45°C oraz pH 5,0. Całkowita zawartość polifenoli w otrzymanym ekstrakcie wynosiła od 0,74 do 0,81 g GAE/100 g, co stanowiło wzrost o 66% w porównaniu z metodą referencyjną opisaną w literaturze [159].

1.5. Metody pozyskiwania substancji aktywnych z kawy

Ziarna kawy, a zwłaszcza pozostałości po ich parzeniu, stanowią powszechnie dostępny i niewykorzystany surowiec roślinny, bogaty w substancje bioaktywne, takie jak kwas chlorogenowy, kofeina, kwas kawowy czy trygonelina [160]. Związki polifenolowe, dzięki swojej budowie chemicznej, mogą pełnić rolę czynników sieciujących, stabilizując strukturę matrycy poprzez utworzenie trójwymiarowej sieci pomiędzy ich grupami funkcyjnymi a grupami obecnymi w łańcuchu polimerowym. Reakcja sieciowania przy użyciu ekstraktu, będącego mieszaniną polifenoli, może obejmować zarówno tworzenie wiązań kowalencyjnych, wodorowych, jak i jonowych, co umożliwia otrzymanie hydrożeli o unikalnych właściwościach, trudnych do uzyskania przy zastosowaniu syntetycznych odpowiedników [161]. Literatura naukowa opisuje szereg metod ekstrakcji, których celem jest stała poprawa efektywności odzysku substancji aktywnych, w tym związków polifenolowych. Weryfikacji poddano klasyczne techniki ekstrakcji (maceracja [162], Soxhlet [163]), ale również ich nowoczesne

alternatywy (UAE [164], MAE [165], SFE [166]), aż po metody łączone (UMAE [167], EAEP [168], UAE-SFE [169]). Metody te znalazły zastosowanie w pozyskiwaniu substancji aktywnych z różnych części i odmian rośliny, takich jak zielone [170,171] i palone ziarna kawy [172,173]. Wykorzystywano je również do ekstrakcji związków bioaktywnych z produktów ubocznych i odpadów powstających podczas przetwarzania kawy, w tym z miazgi [174,175], srebrnej osłonki [164,176], łuski [177,178] oraz fusów [179,180]. Parametrami, które mają kluczowe znaczenie w przebiegu procesu, są temperatura, czas ekstrakcji, rozpuszczalnik, stopień palenia kawy oraz rozdrobnienie surowca [181].

Andrade i in. [182] przeprowadzili ekstrakcję łusek i fusów kawy przy zastosowaniu nadkrytycznego dwutlenku węgla o stałym przepływie równym 11 g/min. Proces prowadzono przy zastosowaniu ciśnienia z zakresu 100-300 bar i w temperaturze 313,15-333,15 K. Czas trwania ekstrakcji różnił się w zależności od zastosowanego surowca i wynosił odpowiednio 4,5 h lub 2,5 h. Łuski ziarna stanowiły bogate źródło związków polifenolowych, a maksymalnie wyodrębniono 942,8 µg GAE/g kwasu chlorogenowego, co jest stosunkowo wysokim stężeniem [182]. Wyodrębnianie kwasów tłuszczowych z fusów po procesie parzenia kawy przeprowadzono przy użyciu nadkrytycznego dwutlenku węgla przy parametrach wynoszących $p = 200-300$ bar oraz $T = 40-60^{\circ}\text{C}$. Ponadto wprowadzenie do układu dodatkowego rozpuszczalnika, takiego jak heksan, etanol lub woda, pozwoliło na poprawę wydajności ekstrakcji. Otrzymane maksymalne stężenie nienasyconych kwasów tłuszczowych wynosiło 134,93%, natomiast kwasu linolowego 44,15% [183]. Xu i in. [184] poddali ten sam surowiec działaniu wody w stanie nadkrytycznym przy użyciu ciśnienia 5 MPa, w temperaturze 110-190°C i przez czas 15-75 minut. Optymalne parametry procesu pozwoliły otrzymać ekstrakt zawierający 0,98 mg/g kwasu 3-O-kawoilochinowego, 1,36 mg/g kwasu 4-O-kawoilochinowego oraz 1,41 mg/g kwasu 5-O-kawoilochinowego [184]. Menzio i in [169] opracowali modyfikację ekstrakcji SFE ultradźwiękami dla zielonych ziaren kawy. Autorzy zastosowali głowicę ultradźwiękową, pracującą przy częstotliwości 40 kHz, którą umieścili bezpośrednio w mieszaninie ekstrakcyjnej. Przepływ rozpuszczalnika (CO_2) ustalono na 11-13 kg/h, a pozostałe parametry wynosiły 40-75°C i 125-250 bar. W efekcie uzyskano ekstrakt o stężeniu kofeiny wynoszącym 6,04 mg/g [169].

Torres-Mancera i in. [185] wyodrębnili kwas chlorogenowy i kwas kawowy z pupy kawowej na drodze fermentacji na podłożu stałym przez zastosowanie trzech szczepów

grzybów - *Trametes sp.*, *R. pusillus* i *A. tamaritii*. Otrzymany ekstrakt zawierał maksymalnie 1627,5 mg/kg kwasu chlorogenowego oraz 715,5 mg/kg kwasu kawowego [185]. Natomiast łuski ziaren kawy przetwarzano przy zastosowaniu ekstrakcji enzymatycznej i metod modyfikowanych chemicznie, ultradźwiękami oraz ścinaniem emulgującym. Surowiec poddano procesowi hydrolizy celulazą w medium o pH = 4,9 przy stałym mieszaniu. Modyfikacja chemiczna polegała na wstępnym potraktowaniu materiału roślinnego kwasem chlorowodorowym w temperaturze 60°C. Kolejną metodą było zastosowanie ultradźwięków o mocy 500 W przy T = 65°C po etapie enzymatycznym. Ostatnia modyfikacja opierała się na początkowym emulgowaniu układu ekstrakcyjnego poprzez ścinanie przy wykorzystaniu prędkości obrotowej wynoszącej 7000 obr/min [186]. Ponadto, podczas ekstrakcji ziaren zielonej kawy oraz srebrnej osłonki ziarna, zastosowano określone proteazy - proteazę z *B. licheniformis*, trypsynę, pepsynę i papainę. Proces izolowania substancji aktywnych prowadzono w buforze fosforanowym lub kwasie chlorowodorowym, a temperatura (T = 37-65°C) i pH (2-9) medium były zależne od rodzaju użytego enzymu [187]. Ekstrakcja przeprowadzona przez Souza Almeida i in. [168] dotyczyła zastosowania proteazy alkalicznej, proteazy neutralnej, celulazy i hemicelulazy. Temperatura procesu niezmiennie wynosiła 50°C, a pH wodnego roztworu zawierało się w zakresie 5,6-9,0. Proteaza neutralna pozwoliła uzyskać najwyższą zawartość polifenoli, między innymi kwasu chlorogenowego (6194,13 mg/100 g suchej masy), epikatechiny (1208,12 mg/100 g suchej masy) oraz kofeiny (1194,48 mg/100 g suchej masy) [168].

Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UAE) i promieniowaniem mikrofalowym (MAE) jest stosowana w kontekście pozyskiwania substancji aktywnych z kawy i odpadów po procesie parzenia ze względu na liczne korzyści płynące z uprzednio omówionych metod. Pomimo możliwości uzyskania zwiększonej efektywności procesu, ekstrakcja UMAE wymaga przeprowadzenia bardziej szczegółowej analizy ze względu na niewystarczające dane w tym temacie.

W **Tabeli 2** przedstawiono podsumowanie parametrów dla trzech metod ekstrakcji przy zastosowaniu różnych typów surowca roślinnego.

Tabela 2. Zestawienie parametrów prowadzenia ekstrakcji UAE, MAE i UMAE dla kawy i odpadów po procesie parzenia.

Metoda ekstrakcji	Surowiec roślinny	Parametry procesu	Lit.
UAE	Srebrna osłonka ziarna	20 kHz 5 lub 38 W/cm ³ 10 minut H ₂ O/ CH ₃ OH	[176]
	Pulpa kawowa	37 kHz 148-370 W 60-90°C 3-8 minut H ₂ O	[188]
	Fusy kawy	20 kHz 100-300 W 30-50°C 5-45 minut C ₂ H ₅ OH	[189]
	Ziarna zielonej kawy	24 kHz 400 W 6°C 5-15 minut NaOH/ PBS	[190]
MAE	Ziarna zielonej kawy	50 Hz 400-800 W 30-90°C 2-10 minut H ₂ O/ C ₂ H ₅ OH/ CH ₃ OH	[165]
	Ziarna zielonej kawy	240 W 50°C 40 sekund C ₂ H ₅ OH	[191]
	Fusy kawy	50 Hz 80 W 40-360 sekund C ₂ H ₅ OH	[192]
	Fusy kawy	500 W 393-423 K 1-20 minut C ₂ H ₅ OH	[193]
UMAE	Srebrna osłonka ziarna	200 W (U) 1660 W (M) 80°C 20 minut H ₂ O	[194]
	Ziarna zielonej kawy	350 W (M) 60°C 10 minut C ₂ H ₅ OH	[195]

Wydajność procesu pozyskiwania substancji aktywnych z ziaren kawy i ich produktów odpadowych ściśle zależy od rodzaju surowca roślinnego oraz zastosowanych parametrów. Zarówno ultradźwięki, jak i promieniowanie mikrofalowe w sposób pozytywny wpływają na efektywność ekstrakcji w odniesieniu do konwencjonalnych metod. Dane zamieszczone w **Tabeli 2** wskazują na porównywalną skuteczność wyodrębniania związków polifenolowych techniką UAE i MAE, a ekstrakty opisane w publikacjach zawierały polifenole w stężeniu odpowiednio 6,43-36,17 mg GAE/g [176,188,189] oraz 3,85-43 mg GAE/g [165,191,193]. Nieliczne badania dotyczące synergicznego działania ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego wskazały poprawę stopnia odzysku błonnika pokarmowego ekstrahowanego ze srebrnej osłonki ziarna [194] oraz wzrost wydajności ekstrakcji kwasów tłuszczowych z ziaren zielonej kawy [195] względem poszczególnych metod. Ekstrakcja polifenoli z odpadów po procesie parzenia ziaren kawy z wykorzystaniem ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego stanowi obiecujący, lecz wciąż niedostatecznie opracowany kierunek badań, który może umożliwić rozwój nowych, bio-czynników sieciujących.

Podczas otrzymywania materiałów hydrożelowych kluczową rolę odgrywa dobór właściwej metody sieciowania i czynników sieciujących, co bezpośrednio wpływa na proces stabilizacji matrycy polimerowej oraz jej właściwości fizykochemiczne i użytkowe. Metody sieciowania polimerów mogą mieć zarówno charakter fizyczny (krystalizacja, suszenie w warunkach nadkrytycznych, koacerwacja), jak i chemiczny (cykloaddycja Huisgena, reakcja Dielsa-Aldera, addycja Michaela i reakcja otrzymywania zasad Schiffa). Modyfikacja właściwości strukturalnych i mechanicznych materiału bezpośrednio wpływa na jego funkcjonalność i zakres zastosowań. Analiza tych aspektów stanowi istotny element projektowania hydrożeli do zastosowań dermatologicznych.

1.6. Reakcje sieciowania polimerów prowadzące do otrzymania hydrożeli

Reakcja sieciowania, czyli tworzenia trójwymiarowej sieci polimerowej, stanowi reakcję pomiędzy grupami funkcyjnymi łańcucha polimerowego (-OH, -COOH, -NH₂) a czynnika sieciującego, która prowadzi do powstania nowych wiązań o charakterze fizycznym i/lub chemicznym. W wyniku tworzenia się wiązań kowalencyjnych, wodorowych, jonowych oraz oddziaływań van der Waalsa, następuje modyfikacja szeregu kluczowych właściwości materiałów polimerowych (termicznych,

mechanicznych oraz fizykochemicznych) [3,4,196]. Hydrożele otrzymane na drodze reakcji sieciowania chemicznego stanowią materiały o zwiększonej wytrzymałości mechanicznej, lepszej stabilności w warunkach fizjologicznych oraz wydłużonym czasie degradacji. Chemiczne metody sieciowania polimerów opierają się między innymi na zastosowaniu klasycznych typów reakcji, które obejmują cykloaddycję Huisgena, reakcję Dielsa-Aldera, addycję Michaela i reakcję otrzymywania zasad Schiffa [197–200].

1,3-dipolarna cykloaddycja Huisgena jest reakcją zachodzącą między azydkami i alkinami terminalnymi, a jej produktem jest 1,4- lub 1,5-dwupodstawiony 1,2,3-triazol. Procesy katalizowane Cu(I) wykazują wysoką wydajność i regioselektywność reakcji, a ponadto mogą być prowadzone w stosunkowo łagodnym środowisku. Katalizator miedziowy charakteryzuje się jednak działaniem cytotoksycznym, które może objawiać się stanami zapalnymi wątroby, uszkodzeniem nerek oraz objawami neurologicznymi, co w znacznym stopniu ogranicza przeznaczenie medyczne [201–208]. Z tego względu opracowano szereg modyfikacji wpływających na poprawę reaktywności grup alkinowych (pochodne cyklooktanu, kompleksy karbenowe Fischera lub alkiny z deficytem elektronowym), które umożliwiają prowadzenie reakcji bez udziału katalizatorów [209]. Cykloaddycja Huisgena stosowana jest w syntezie materiałów hydrożelowych na bazie chitozanu, kwasu hialuronowego i celulozy [202,206–208].

Ossipov i in. [210] opisali zastosowanie cykloaddycji Huisgena do otrzymywania hydrożeli na bazie poli(alkoholu winylowego), z zaznaczeniem możliwości rozszerzenia aplikacji na polimery naturalne zawierające w swojej strukturze grupy hydroksylowe. W pierwszej kolejności autorzy poddali polimer modyfikacji azydkami i alkinami, a następnie przeprowadzili reakcję sieciowania katalizowaną jonami Cu^+ . W rezultacie otrzymano materiały o wyższej zawartości frakcji żelowej i poprawionych modułach sprężystości w odniesieniu do PVA usieciowanego małowcząsteczkowym czynnikiem sieciującym (PEG-diazyd) [210]. 1,3-dipolarną cykloaddycję przedstawiono również jako metodę sieciowania żelatyny funkcjonalizowanej alkinami przy użyciu komponentu diazydkowego i w obecności jonów miedzi(I). Badania *in vitro* przeprowadzone na fibroblastach L929 wykazały brak działania cytotoksycznego hydrożeli, autorzy nie zaobserwowali znaczących zmian w funkcjonalności mitochondriów, integralności błony oraz morfologii komórek [211]. Koncepcją opisaną przez Koschella i in. [208] było natomiast zastosowanie omawianej reakcji, katalizowanej jonami Cu(I), w procesie sieciowania pochodnych celulozy, które otrzymano na drodze modyfikacji polimeru

azydkiem sodu i propargiloaminą. Jednak otrzymane materiały hydrożelowe charakteryzowały się niewystarczającą wytrzymałością mechaniczną wynikającą ze zbyt niskiej wydajności reakcji cykloaddycji [208].

Reakcja Dielsa-Aldera stanowi metodę tworzenia nienasyconych pierścieni sześciocłonowych poprzez selektywną cykloaddycję [4+2] pomiędzy sprzężonym dienem i dienofilem. Charakteryzuje ją bioortogonalność, czyli zdolność do zachodzenia reakcji w organizmie żywym bez wpływu na naturalne procesy biologiczne. Ponadto wykazuje regioselektywność w kierunku izomerów orto- i para- oraz częściową stereospecyficzność i stereoselektywność [212]. Reakcja sieciowania polimerów na drodze cykloaddycji zachodzi w łagodnych warunkach, nie wymaga obecności katalizatora, a w efekcie jej zajścia nie powstają produkty uboczne. Chociaż prowadzenie reakcji w środowisku wodnym zapewnia jej szybszy przebieg, całkowity czas trwania reakcji w warunkach fizjologicznych pozostaje dosyć długi, nawet do kilkunastu godzin. Reakcja Dielsa-Aldera to metoda otrzymywania hydrożeli na bazie pektyny, chitozanu, skrobi i chityny [213–218].

Nimmo i in. [219] opracowali jednoetapowy i niewymagający katalizatora proces sieciowania modyfikowanego kwasu hialuronowego, który opierał się na reakcji Dielsa-Aldera. Polimer bazowy połączono z furanem i pochodną PEG, a właściwości mechaniczne i degradacyjne finalnego materiału zaprojektowano zmieniając stosunek molowy wspomnianych komponentów. Badania *in vitro* na komórkach gruczolakoraka MDA-MB-231 potwierdziły cytokompatybilność hydrożeli. Podobne rozwiązanie opisano w pracy Smith i in. [220], zastosowano jednak metylową pochodną furanu, co umożliwiło zajście reakcji Dielsa-Aldera w fizjologicznym pH. Wprowadzona modyfikacja pozwoliła na enkapsulację do materiału żywych komórek - linie komórkowe raka piersi (BT474, MCF7 i T47D), a także linie nerwowych komórek macierzystych glejaka (G523 i G411). Guaresti i in. [221] zastosowali omawiany typ reakcji do otrzymania hydrożeli chitozanolowo-furanowych, które usieciowano bismaleimidem. Materiały sklasyfikowano jako systemy ukierunkowanego dostarczania leków, w tym antybiotyku o działaniu bakteriostatycznym.

Z kolei reakcja Michaela, metoda pozwalająca uzyskać wiązania węgiel-węgiel poprzez addycję nukleofilową, obejmuje przyłączenie nukleofila do α,β -nienasyconego związku karbonylowego. Wśród dwóch głównych odmian wymienić można reakcję aza-

Michaela i tio-Michaela, w których tworzą się odpowiednio wiązanie węgiel-azot lub węgiel-siarka. Zachodzi w warunkach fizjologicznych, a ponadto nie wymaga obecności toksycznych katalizatorów i rozpuszczalników czy promieniowania UV. Addycja Michaela charakteryzuje się wysoką regioselektywnością, dobrą wydajnością chemiczną oraz stosunkowo krótkim czasem trwania. Dodatkowo jest to proces nieodwracalny, który zachodzi bez wydzielania produktów ubocznych, a którego efektem są biokompatybilne materiały hydrożelowe o jednorodnej sieci polimerowej. Reakcja stosowana jest w syntezie hydrożeli na bazie żelatyny, chitozanu, kolagenu i kwasu hialuronowego [222–229].

Reakcję tio-Michaela zastosowano między innymi w procesie otrzymywania wstrzykiwanych hydrożeli na bazie tiolowanego kwasu hialuronowego i PEG funkcjonalizowanego diwinylosulfonem. Modyfikacja masy cząsteczkowej komponentów oraz stężenia polimeru stanowiła metodę kontrolowania czasu żelowania, profilu degradacji enzymatycznej oraz parametrów mechanicznych materiału. Badania cytotoksyczności względem chondrocytów z chrząstki bydlęcej wykazały wysoki stopień przeżywalności komórek przy jednoczesnym zachowaniu swoistego kształtu komórek oraz zdolności do dalszych podziałów [230]. W kontekście materiałów wstrzykiwanych opisano także hydrożele na bazie kolagenu modyfikowanego tiolem oraz wielofunkcyjnego PEG-maleimidu. Na drodze reakcji tio-Michaela otrzymano samoregenerujące się materiały o pożądanym właściwościach reologicznych, minimalnym stopniu pęcznienia oraz cytokompatybilności względem linii komórek zrębu szpiku kostnego myszy (BMSC) i komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) [231]. Liu i in. [223] opracowali natomiast metodę sieciowania *in situ* pochodnej dekstranu i ditiotreitolu, czego rezultatem było otrzymanie trójwymiarowych hydrożeli dla hodowli komórkowych. Materiał poddano enkapsulacji mezenchymalnymi komórkami macierzystymi szpiku kostnego myszy (BMSC) i fibroblastami NIH/3T3. Przeprowadzone badania potwierdziły dobrą cytokompatybilność podłoża wraz z możliwością zachowania przez komórki BMSC potencjału różnicowania.

Otrzymywanie imin (zasad Schiffa) w wyniku reakcji kondensacji aldehydów lub ketonów z pierwszorzędowymi aminami stanowi metodę syntezy chemicznie usieciowanych hydrożeli. Mechanizm polega na nukleofilowym przyłączeniu aminy do grupy karbonylowej obecnej w strukturze aldehydu lub ketonu, przy jednoczesnej eliminacji cząsteczki wody. Reakcja otrzymywania zasad Schiffa jest odwracalna i

zachodzi w środowisku wodnym w temperaturze fizjologicznej, a największą szybkość osiąga przy pH z zakresu od 4 do 6. Charakteryzuje się krótkim czasem trwania, wysoką selektywnością chemiczną oraz produktami wykazującymi brak toksyczności komórkowej. Metoda pozwala na syntezę samonaprawiających się, biokompatybilnych i pH-czułych hydrożeli bazujących na skrobi, chitozanie, żelatynie lub alginianach [222,232–237].

Xu i in. [238] przeprowadzili badania dotyczące zastosowania naturalnej waniliny w reakcji sieciowania chitozanu, która przebiegła pomiędzy grupami aldehydowymi czynnika sieciującego i grupami aminowymi polimeru z utworzeniem zasady Schiffa. Otrzymany materiał hydrożelowy charakteryzował się właściwościami samoregenerującymi oraz jednorodną, porowatą strukturą [238]. Omawiany typ reakcji stanowił podstawę do opracowania wstrzykiwanego hydrożelu na bazie poliwinylaminy (PVA_m), którą usieciowano nanocząstkami skrobiowymi modyfikowanymi chloroformianem cholesterylu. W rezultacie pH-czuły materiał o dobrze zdefiniowanej porowatej strukturze i wytrzymałości mechanicznej z powodzeniem zastosowano jako nośnik doksorubicyny [234]. Ponadto Vahedi i in. [239] opisali formowane *in situ*, wstrzykiwane i samoregenerujące się hydrożele oparte na połączeniu żelatyny i dibenzaldehydu glikolu polietylenowego. Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały cytokompatybilność podłoża względem fibroblastopodobnych komórek mysich L-929. Dodatkowo autorzy potwierdzili zdolność materiału do efektywnego dostarczenia chlorowodoru klindamycyny - modelowego leku o działaniu przeciwbakteryjnym.

Fizyczne metody sieciowania, oparte na słabych i odwracalnych oddziaływaniach, umożliwiają otrzymanie materiałów polimerowych wrażliwych na czynniki środowiskowe, takie jak temperatura, pH, obecność jonów czy światło. Hydrożele mogą być stabilizowane poprzez wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe lub jonowe. Pomimo że wymienione interakcje skutkują ograniczoną wytrzymałością mechaniczną materiałów, sprzyjają zwiększonej zdolności absorpcyjnej oraz wysokiej porowatości [240,241].

Sieciowanie na drodze krystalizacji polega na przeprowadzeniu kilku następujących po sobie cykli zamrażania i rozmrażania. Parametry takie jak temperatura, czas trwania poszczególnych etapów oraz liczba cykli mają istotny wpływ na efektywność metody. W trakcie trwania procesu powstają obszary krystaliczne, które wiążą łańcuchy polimerowe,

prowadząc do fizycznego usieciowania hydrożelu. Ze względu na brak konieczności stosowania syntetycznych czynników sieciujących i inicjatorów, materiały charakteryzują się biokompatybilnością i brakiem toksyczności komórkowej. Ponadto omawiana metoda umożliwiła otrzymanie elastycznych i stosunkowo wytrzymałych mechanicznie hydrożeli [242,243].

Wśród metod sieciowania fizycznego można również wyróżnić suszenie w warunkach nadkrytycznych, które zachodzi poprzez usunięcie rozpuszczalnika z hydrożelu przy użyciu dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym, czyli powyżej warunków krytycznych (31,1°C oraz 7,38 MPa). Materiały otrzymane tą metodą zachowują swój pierwotny rozmiar i kształt, co pozwala uniknąć uszkodzenia ich struktury wewnętrznej. Dodatkowo proces może być prowadzony w niskiej temperaturze, dzięki czemu hydrożele nie ulegają degradacji. Metoda ta stanowi odpowiedni wybór w przypadku polimerów termicznie niestabilnych, a także materiałów modyfikowanych substancjami aktywnymi, które charakteryzują się wrażliwością na czynniki środowiskowe. W rezultacie otrzymuje się aerożele o wysoce rozwiniętej porowatości, powierzchni właściwej oraz przedłużonym czasie trwałości [240,241].

Z kolei sieciowanie metodą koacerwacji polega na rozdzieleniu fazy bogatej w polimer od fazy rozpuszczalnikowej poprzez modyfikację parametrów, takich jak temperatura, pH, siła jonowa czy rozpuszczalność. Ze względu na mechanizm, proces można podzielić na prostą i złożoną koacerwację. Wydzielenie biomateriału może odbywać się zatem na skutek dodatku soli nieorganicznych, rozpuszczalników organicznych lub innych środków koacerwujących czy też zastosowania układu polielektrolitów w postaci przeciwnie naładowanych polimerów. Podstawowym celem każdego ze wskazanych podejść jest agregacja, a następnie wytrącenie materiału polimerowego z mieszaniny reakcyjnej [240,244].

Niezależnie od zastosowanej metody i mechanizmu reakcji sieciowania, kluczowym czynnikiem pozostaje również rodzaj użytego polimeru lub monomeru, wpływający bezpośrednio na właściwości otrzymywanych materiałów hydrożelowych. Indywidualne cechy charakterystyczne dla wybranej makrocząsteczki wpływają na kierunek zastosowania materiału otrzymanego przy jej wykorzystaniu. Początkowe określenie właściwości, którymi powinien odznaczać się hydrożel w kontekście zaplanowanej

aplikacji, stanowi istotny element rzutu na dalszy przebieg procesu projektowania oraz otrzymywania.

1.7. Hydrożele na bazie polimerów naturalnych

Hydrożele klasyfikuje się jako trójwymiarowe sieci o charakterze hydrofilowym, które można otrzymywać na drodze reakcji sieciowania polimerów pochodzenia syntetycznego lub naturalnego. Jedną z właściwości, która wyróżnia materiały hydrożelowe, jest zdolność do absorbowania znacznych ilości wody (od 20-30% do nawet 1000-krotności ich suchej masy) i płynów biologicznych [197,245,246]. Materiały hydrożelowe otrzymuje się najczęściej przy zastosowaniu następujących polimerów syntetycznych: poli(glikol etylenowy) [247], poli(alkohol winylowy) [248], poli(N-izopropylakryloamid) [249] i poli(kwas mlekowy) [250]. Jednak coraz częściej stosowane są polimery naturalne, takie jak polisacharydy (alginiany, chitozan, kwas hialuronowy) czy białka (kolagen, żelatyna, fibryna). Wzrost zainteresowania biopolimerami wynika między innymi z niskich kosztów produkcji, braku negatywnego wpływu na środowisko, a także możliwości otrzymywania biomateriałów o korzystnych właściwościach, takich jak biokompatybilność, biodegradowalność, nietoksyczność i brak immunogenności. Z tego względu materiały hydrożelowe znalazły szerokie zastosowanie w produktach medycznych i farmaceutycznych, m.in jako opatrunki wspomagające gojenie ran o zróżnicowanym podłożu, systemy kontrolowanego i przedłużonego uwalniania substancji aktywnych, implanty tkankowe, rusztowania komórkowe, soczewki kontaktowe oraz produkty higieniczne [246,251–257].

1.7.1. Polisacharydy

Polisacharydy, czyli węglowodany o liniowej lub rozgałęzionej strukturze, zbudowane są z monosacharydów połączonych wiązaniami glikozydowymi uzyskanymi na drodze kondensacji. Pozyskiwane mogą być zarówno z organizmów roślinnych (alginiany, skrobia, celuloza), jak i zwierzęcych (chityna, kwas hialuronowy, glikogen) [258–260]. Często stosowane do otrzymywania hydrożeli ze względu na ich nietoksyczność, biogodność, biodegradowalność, antyadhezyjność i wysoką stabilność [261]. Szereg istotnych właściwości spowodował zastosowanie polisacharydów w obszarze materiałów opatrunkowych, inżynierii tkankowej, systemów dostarczania leków, chirurgii ortopedycznej i zabiegów okulistycznych. Ograniczone właściwości mechaniczne oraz podatność na degradację w środowisku wodnym limituje stosowanie

tej grupy związków, jednak przeprowadzenie reakcji sieciowania lub wprowadzenie do hydrożelu związków modyfikujących (polimery syntetyczne, nanocząstki organiczne lub nieorganiczne) pozwala na wzmocnienie struktury materiału przy jednoczesnym zachowaniu jego pozytywnych właściwości biologicznych [16,262].

Jednym z powszechnie stosowanych polisacharydów są alginiany, zbudowane z reszt kwasu β -D-mannuronowego i α -L-guluronowego, połączonych wiązaniami glikozydowymi. Ich masa cząsteczkowa mieści się w zakresie 10-1000 kDa. Ponadto wysoka zdolność absorpcji wody pozwala na nawet 300-krotny wzrost masy polimeru względem jego suchej masy. Alginiany pozyskiwane są w procesie ekstrakcji różnych gatunków alg morskich, które nadają im swoistych właściwości, takich jak biogodność, nietoksyczność, brak immunogenności, mukoadhezyjność oraz brak działania prozapalnego. Biomateriały na bazie alginianów mogą przybierać zróżnicowane formy, między innymi cząstek, włókien, rusztowań, gąbek i membran [3,253,263,264].

Opisano materiał opatrunkowy, który może znaleźć zastosowanie w leczeniu ran przewlekłych, wspomagając proces nabłonkowania oraz stymulując aktywność fibroblastów. Hydrożel zawierał substancje antybakteryjne (nizyna i EDTA), fibrynogen pełniący rolę czynnika koagulacyjnego oraz alginian wapnia przyspieszający angiogenezę i stymulujący syntezę kolagenu [265]. Kolejnym rozwiązaniem skupiającym się jednak na właściwościach hemostatycznych i antybakteryjnych było połączenie karboksymetylochitozanu, alginianu sodu oraz kolagenu. Berberyna obecna w strukturze opracowanego filmu pozwoliła ukierunkować zastosowanie materiału na przeciwdziałanie infekcjom ran poprzez wpływ na transport i oddychanie bakterii [266]. W kolejnej publikacji mieszaninę alginianu sodu i chitozanu modyfikowanego laktozą zastosowano do otrzymania porowatej matrycy dla hodowli chondrocytów. Rusztowanie wpływało na wzrost i proliferację komórek tkanki chrzęstnej, a finalnie stanowiło wsparcie w ich dostarczaniu podczas terapii regeneracyjnej [267]. Ponadto opracowano mikrocząstki na bazie utlenionego alginianu sodu, do których wprowadzono komórki pierścienia włóknistego. Nośnik stanowił element złożonej formuły fibrynowego hydrożelu wstrzykiwanego w celu naprawy zwyrodnień dysku międzykręgowego. Zgodnie z opisaną koncepcją terapia ma zapewnić stabilizację uszkodzonej struktury oraz ochronę i przedłużone uwalnianie inkorporowanych komórek terapeutycznych, a w rezultacie stymulować proces syntezy macierzy pozakomórkowej (ECM) [268]. Wstrzykiwane hydrożele przedstawiono również w kontekście zastosowania ich podczas

regeneracji uszkodzonych tkanek kostnych. Autorzy opisali rusztowanie na bazie alginianu sodu oraz samoorganizującego się peptydu FmocFF, które wykazało doskonałe właściwości mechaniczne, a także podobieństwo do struktur budujących ECM (glikozaminoglikany i białka włókniste). Ponadto materiał pozytywnie wpłynął na adhezję, proliferację i różnicowanie osteogenne preosteoblastów [269]. Oprócz alginianów, równie szeroko stosowanym polisacharydem jest chitozan, który wykazuje szereg korzystnych właściwości.

Chitozan otrzymywany jest w wyniku chemicznej lub enzymatycznej deacetylacji chityny, której naturalne źródła obejmują muszle morskich skorupiaków i ścianę komórkową wybranych gatunków grzybów. Stanowi liniowy polisacharyd zbudowany z β -(1,4)-D-glukozaminy i N-acetylo-D-glukozaminy, czyli odpowiednio cukrowej części deacetylowanej i acetylowanej. Niewystarczające właściwości mechaniczne chitozanu oraz jego ograniczona rozpuszczalność w niektórych rozpuszczalnikach są niwelowane w efekcie przeprowadzenia chemicznych lub fizycznych modyfikacji. Ze względu na swoje pozytywne właściwości (bioaktywność, biokompatybilność, nietoksyczność i biodegradowalność) znalazł zastosowanie w produkcji materiałów biomedycznych wykazujących kontrolowane uwalnianie leków, takich jak opatrunki, materiały ortopedyczne i hydrożele [253,270–273].

Wśród biomateriałów chitozanowych wymienić można przykład dotyczący systemu kontrolowanego i przedłużonego uwalniania, który poddano modyfikacji poliuretanem. Nośniki na bazie tego rozwiązania pozwoliły kontrolować dystrybucję i kinetykę uwalniania leku, minimalizować prawdopodobieństwo wystąpienia skutków ubocznych, a ponadto charakteryzowały się działaniem przeciwzakrzepowym oraz stabilnością mechaniczną i termiczną [274]. Opisano także rusztowanie na bazie chitozanu i poli(l-laktydu), które może znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej ze szczególnym uwzględnieniem terapii rekonstrukcyjnej kości. Wykazano pozytywny wpływ materiału na proces regeneracji tkanki, a dodatkowa obecność czynników wzrostu, pochodzących z płytek krwi, wywołała efekt osteoindukcyjny [275]. Inną ciekawą koncepcją jest zastosowanie biomateriałów na bazie chitozanu w obszarze inżynierii tkanek nerwowych, na przykład podczas leczenia urazów rdzenia kręgowego. Stwierdzono, że opracowany film w sposób znaczący wpłynął na różnicowanie i proliferację nerwowych komórek macierzystych [276]. Ponadto uzyskana matryca wykazała znaczny potencjał jako środek terapeutyczny w zaburzeniach hiperpigmentacyjnych skóry, który wynikał ze zdolności

do hamowania procesu melanogenezy oraz zjawiska transferu i wchłaniania melanosomów przez keratynocyty. Chitozan wykazał działanie redukujące melanogenezę w komórkach czerniaka B16F10, co w konsekwencji pozwoliło uzyskać efekt przeciwnowotworowy [277]. Literatura opisuje również materiał nanokompozytowy, mający postać matrycy chitozanowej, w której rozproszono nanocząstki bioceramiczne domieszkowane osteogennymi jonami cynku i niobu. Materiał z założenia ma znaleźć zastosowanie w minimalnie inwazyjnych terapiach dentystycznych, zaprojektowany został w celu jednoczesnej redukcji wzrostu drobnoustrojów oraz odbudowy zdeminalizowanych struktur zęba [278]. Kwas hialuronowy, ze względu na swoją biokompatybilność, jest powszechnie stosowany do otrzymywania materiałów hydrożelowych dla zastosowań medycznych.

Strukturę kwasu hialuronowego, należącego do grupy glikozaminoglikanów, budują dwa naprzemiennie występujące mery - kwasu D-glukuronowego i N-acetylo-D-glukozaminy. Jednostki te połączone są wiązaniami β -1,3- oraz β -1,4-glikozydowymi. W organizmie człowieka powszechnie występuje w skórze, płynie stawowym i cieple szklistym oka, a jego naturalnym źródłem są przede wszystkim tkanki zwierzęce. Wykazuje on zdolność do regeneracji tkanek, a także charakteryzuje się biozgodnością, brakiem immunogenności, działaniem przeciwzapalnym oraz właściwościami lepkosprężystymi. Poprzez chemiczną modyfikację (na drodze procesu estryfikacji lub sieciowania) możliwa jest poprawa jego właściwości fizycznych, takich jak rozpuszczalność i szybkość degradacji. Biopolimer jest szeroko stosowany w wielu obszarach medycyny, wśród nich wymienić można okulistykę, chirurgię ortopedyczną i plastyczną [3,263,279–281].

Kwas hialuronowy wraz z pochodną dekstranu zastosowano do opracowania hydrożelu dla druku 3D w obszarze inżynierii tkankowej. Uzyskano zarówno pożądane parametry mechaniczne, wysoką porowatość i cytokompatybilność materiału, a także znaczą przeżywalność chondrocytów poddanych enkapsulacji [282]. Innym przykładem zastosowania jest wstrzykiwana kompozycja hydrożelowa do przedłużonego i ukierunkowanego dostarczania kurkuminy w leczeniu ran cukrzycowych. Opracowana formuła składała się z kwasu hialuronowego, pollulanu, poloksameru P407 oraz substancji aktywnej o działaniu przeciwutleniającym, przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym oraz wspomagającym gojenie ran. Opisane działanie skupiało się na inhibicji aktywności komórek zapalnych oraz promowaniu regeneracji tkanek i

angiogenezy. Materiał po podaniu podskórnym pozytywnie wpłynął na regenerację kolagenu oraz przyspieszał przebieg procesu nabłonkowania [283]. Z kolei połączenie kwasu hialuronowego z tymolem stanowi koncepcję rozwiązania terapeutycznego dla zakażeń z towarzyszącym biofilmem. Przeprowadzone badania potwierdziły zarówno brak toksyczności materiału, jak i jego zdolność do hamowania tworzenia biofilmu przez szczep drożdży *Candida albicans* [284]. W kontekście terapii uszkodzeń chrząstki stawowej zaproponowano biomateriał w postaci kompozytowego rusztowania opartego na kwasie hialuronowym i żelatynie, na którym osadzono mezenchymalne komórki macierzyste. Zaobserwowano stymulujący wpływ rosnącej zawartości kwasu hialuronowego w rusztowaniu na proces chondrogenyzy, będącej zjawiskiem tworzenia tkanki chrzęstnej [285]. Ponadto opracowany został hydrożel na bazie gumy gellan i kwasu hialuronowego z przeznaczeniem dla inżynierii tkankowej siatkówki oka. Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono promowanie wzrostu, zwiększenie przeżywalności i poprawę adhezji komórek linii ARPE-19 po enkapsulacji w materiale [286].

Celuloza, będąca głównym składnikiem ściany komórkowej roślin, stanowi najpowszechniej występujący na Ziemi biopolimer. Podstawowym jej źródłem jest drewno, bawełna, słoma i len. Łańcuchowa cząsteczka celulozy składa się z jednostek β -D-glukozy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi i charakteryzuje się strukturą półkryształiczną, z równocześnie występującymi domenami krystalicznymi oraz amorficznymi. Szereg modyfikacji powierzchni cząsteczki celulozy pozwala na poprawę istotnych właściwości polimeru, takich jak rozpuszczalność i reaktywność. Ze względu na jej cechy swoiste dla biomateriałów medycznych, znalazła zastosowanie między innymi w materiałach wspomagających leczenie trudno gojących się ran [287–292].

Jednym z przykładów zastosowania celulozy jest koncepcja transdermalnego systemu dostarczania kaptoprylu, czyli substancji aktywnej stosowanej w leczeniu nadciśnienia tętniczego i przewlekłej niewydolności serca. Materiał stanowił połączenie chitozanu, karbosymetylocelulozy oraz kombinacji plastyfikatorów. Autorzy potwierdzili między innymi efektywne uwalnianie inkorporowanego leku zarówno w testach inkubacyjnych, jak i w modelu sztucznej skóry. W efekcie kaptopryl skutecznie hamował enzym konwertazy angiotensyny [293]. Ponadto opracowano kompozycję roztworu przedziałniczego na bazie nanokryształów celulozy bakteryjnej oraz chityny regenerowanej, który użyto do wytworzenia bioresorbowalnego włókna o parametrach spełniających wymagania stawiane dla szwów chirurgicznych. Materiał charakteryzował

się zadowalającą wytrzymałością mechaniczną oraz odpornością na degradację enzymatyczną. Podczas badań *in vitro* stwierdzono brak działania cytotoksycznego oraz wsparcie proliferacji komórek L929, a dodatkowo zaobserwowano promujący wpływ włókna na proces gojenia rany *in vivo* z pominięciem skutków ubocznych [294]. Nanowłókna celulozowe, które poddano funkcjonalizacji peptydami oligoproliny, stanowiły rozwiązanie w leczeniu ran przewlekłych narażonych na uszkodzenia oksydacyjne. Badania *in vitro* na ludzkich fibroblastach skórnych potwierdziły ochronne działanie hydrożelu względem reaktywnych form tlenu [295]. Opisane zostało również porowate rusztowanie dla inżynierii tkanek kostnych, którego formuła złożona była z celulozy bakteryjnej, hydroksyapatytu domieszkowanego borem oraz żelatyny. Opracowany materiał odznaczał się cytokompatybilnością względem komórek Saos-2, a dodatkowo wpływał pozytywnie na adhezję, proliferację, różnicowanie i migrację komórek w jego obrębie [296]. Interesujące wydaje się zastosowanie celulozy do otrzymywania aerożeli pełniących rolę systemów kontrolowanego dostarczania substancji aktywnych na drodze transdermalnej, doustnej lub w formie implantu. Rozbudowana powierzchnia właściwa materiału, związana z wysokim stopniem porowatości, pozwala na wprowadzenie do matrycy znacznych ilości leku [297].

1.7.2. Białka

Białka to związki makrocząsteczkowe o złożonej trójwymiarowej strukturze, należące do grupy polimerów naturalnych. Składają się z ponad 20 rodzajów aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi. Ze względu na kształt, można wyróżnić kuliste białka globularne (hemoglobina, insulina, rybonukleaza) i włókienkowate białka fibrylarne (kolagen, elastyna, keratyna). Hydrożele na bazie białek, najczęściej są otrzymywane przy użyciu kolagenu, żelatyny lub fibroiny, wyróżniają się doskonałą biokompatybilnością i bioaktywnością, co pozwala na ich stosowanie w materiałach biomedycznych. Niska wytrzymałość mechaniczna oraz podatność na degradację wymaga stosowania dodatków poprawiających stabilność hydrożeli, takich jak polimery naturalne lub syntetyczne [298–304].

Kolagen, główne białko budulcowe w organizmie człowieka, tworzy strukturę macierzy międzykomórkowej i znajduje się między innymi w kościach, chrząstkach, ścięgnach i skórze. Biopolimer charakteryzuje się doskonałymi właściwościami biologicznymi, biokompatybilnością, nietoksycznością i biodegradowalnością. Ponadto

wykazuje niską antygenowość i słabą odpowiedź zapalną. Związek ten posiada jednak niewystarczające właściwości mechaniczne, a także sprzyja tworzeniu się skrzepów w konsekwencji procesu degradacji. Stosowany jest przede wszystkim w okulistyce, chirurgii, produkcji materiałów opatrunkowych i systemów dostarczania substancji aktywnych [3,253,305–307].

Kolagen zastosowano między innymi do otrzymania wstrzykiwanej matrycy, mogącej stanowić terapię naprawczą i regeneracyjną po zawale mięśnia sercowego. Autorzy potwierdzili wpływ biomateriału na ograniczenie procesu dekompensacji układu krążenia i zapobieganie negatywnej przebudowie komór serca. Ponadto po wstrzyknięciu macierzy kolagenowej zaobserwowano ograniczenie stanu zapalnego w mięśniu sercowym, zmianę profilu cytokin, zmniejszenie zwłóknienia i śmierci komórek oraz przyspieszenie procesu angiogenezy [308]. Podłoże elektroprzewodzące na bazie kolagenu i grafenu wykazało możliwość implementacji w różnych obszarach terapeutycznych, takich jak biomateriały kardiologiczne, rusztowania elektroprzewodzące, matryce do hodowli komórkowych *ex vivo* lub implanty o dopasowanych właściwościach. W przypadku zastosowań kardiologicznych materiał ten zapewniał kompatybilność z tkankami organizmu za sprawą składnika białkowego, a także optymalną wytrzymałość mechaniczną i właściwości przewodzące. Przeprowadzone badania pozwoliły udowodnić promujący wpływ podłoża na wzrost ludzkich fibroblastów sercowych, aktywność metaboliczną kardiomiocytów oraz odporność wobec bakterii *Staphylococcus aureus* [309]. Ponadto opisano kompleks kolagenu z jednoniciowym ssDNA, który przyjął postać zmineralizowanych hydroksyapatytem mikrowłókien oraz trójwymiarowych żeli. Z założenia mogą one znaleźć zastosowanie jako powłoki lub rusztowania osteokondukcyjne. Materiały wspomagały przebieg procesów prowadzących do odbudowy tkanki kostnej. Autorzy zaobserwowali przekształcenie kościotwórczych osteoblastów w komórki morfologicznie zbliżone do dojrzałych osteocytów, które ulegały aglomeracji, a następnie przebudowie do struktur przypominających tkanki [310]. Interesującą koncepcję dotyczącą leczenia ubytków kostnych stanowi także rusztowanie polikaprolaktonowe powlekanie peptydem kolagenowym GFOGER. Zastosowanie materiału zwiększyło efektywność i przyspieszyło proces tworzenia kości w znacznych i niegojących się ubytkach kostnych, co miało miejsce bez konieczności użycia egzogennych komórek lub czynników wzrostu [311]. Natomiast połączenie kolagenu, krzemionki i hydroksyapatytu

pozwoiliło na otrzymanie kserożelu potencjalnie pełniącego rolę wielofunkcyjnego kompozytu kościozastępczego [312]. Innym często wykorzystywanym biopolimerem jest fibroina, która dzięki swoim właściwościom stanowi cenny surowiec do otrzymywania materiałów hydrożelowych.

Fibroina, białko z grupy skleroprotein, stanowi główny składnik włókien jedwabiu oraz pajęczyn wytwarzanych przez pająki i niektóre owady. Pierwszorzędową strukturę fibroiny tworzą sekwencyjnie powtarzające się aminokwasy lizyna, alanina i seryna. Wykazuje szereg pozytywnych właściwości, takich jak wysoka wytrzymałość mechaniczna, elastyczność, biokompatybilność, biodegradowalność, niski potencjał zapalny oraz niska immunogenność. Biomateriały otrzymywane przy użyciu fibroiny mogą przybierać formę hydrożeli, nanowłókien, mikrosfer, membran, gąbek, folii i rusztowań, które oferują różnorodne zastosowania, takie jak inżynieria tkankowa, materiały chirurgiczne oraz kontrolowane systemy dostarczania leków [304,313–317].

Wśród biomateriałów na bazie fibroiny opisano między innymi podłoża mogące pełnić rolę tkankowych przewodników nerwowych lub systemów dostarczania leków w kierunku chorób ośrodkowego układu nerwowego. Podłoża te wykazały dobrą biokompatybilność, wspomagały przeżycie i wzrost neuronów hipokampa, a ponadto ekstrakt z polimeru nie wpływał cytotoksycznie na ich fenotyp i funkcje komórkowe [318]. Fibroinę zbadano również pod kątem zastosowania jako funkcjonalne opatrunki na rany. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić promujący wpływ folii i gąbek na migrację komórek ludzkich fibroblastów WI-38, ekspresję genów związanych z tworzeniem macierzy zewnątrzkomórkowej oraz białek odpowiadających za gojenie ran i odbudowę skóry. Z tego względu fibroina stanowi obiecujący surowiec dla materiałów opatrunkowych przyspieszających odbudowę tkanek [319]. Ponadto badania przeprowadzone dla folii fibroinowej potwierdziły jej cytokompatybilność względem fibroblastopochodnych komórek L929 oraz komórek śródbłónka naczyniowego, a w szczególności brak negatywnego wpływu na ich adhezję, cykl komórkowy i apoptozę. Opracowany materiał nie zakłócał również wydzielania czynników odpowiedzialnych za angiogenezę, czyli proces tworzenia się naczyń włosowatych, takich jak VEGF, Ang-1, FGF2 i PDGF [320]. Kolejnym rozwiązaniem mogącym znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej są rusztowania na bazie fibroiny. Otrzymane materiały charakteryzowały się strukturą o równomiernie rozmieszczonych mikro- i nanoporach, które zapewniły zwiększoną przepuszczalność tlenu przez rusztowania, znaczną

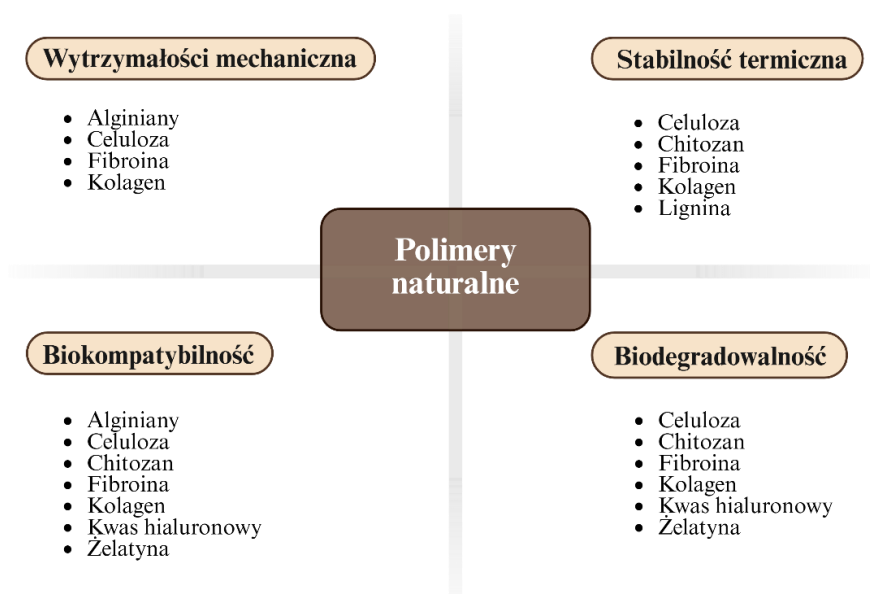
elastyczność oraz wysoką stabilność. Stanowił również doskonale podłoże dla hodowli komórkowych, zaobserwowano poprawę enkapsulacji i dystrybucji fibroblastów oraz stymulujący wpływ na ich proliferację, co w znaczący sposób wpływa na proces naprawy tkanek miękkich [321]. Natomiast połączenie nanochitozanu, fibroiny i kwasu hialuronowego zastosowano do opracowania trójwymiarowych, porowatych rusztowań wspomagających regenerację i odbudowę tkanki kostnej. Badania *in vitro* potwierdziły brak działania cytotoksycznego materiału względem komórek preosteoblastów MC3T3-E1 oraz poprawę ich adhezji, wzrostu i proliferacji. Ponadto stwierdzono promujący wpływ rusztowań na różnicowanie osteogenne komórek oraz proces biomineralizacji [322]. Wśród naturalnych polimerów szczególną uwagę zwraca żelatyna, ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne oraz szerokie zastosowanie w biomedycynie.

Żelatyna to białko o strukturze włóknistej, złożonej z trzech powtarzających się aminokwasów - glicyny, proliny i hydroksyproliny, które jest otrzymywane na drodze częściowej hydrolizy kwasowej (żelatyna typu A) lub zasadowej (żelatyna typu B) kolagenu pochodzącego ze skóry, kości i ścięgien zwierząt. Odznacza się wysoką chłonnością, biokompatybilnością, biodegradowalnością, niską antygenowością oraz brakiem odpowiedzi immunologicznej. Limitującymi właściwościami żelatyny jest jej niska stabilność termiczna oraz niewystarczająca odporność mechaniczna. Znalazła zastosowanie między innymi do otrzymywania materiałów opatrunkowych, miękkich i twardych kapsulek, systemów dostarczania leków, implantów zastępczych lub regenerujących tkanki miękkie [323–328].

Materiał hydrożelowy na bazie żelatyny z dodatkiem modyfikowanej lizyny wykazał dobrą integrację z tkanką otaczającą, co objawiało się brakiem utworzenia torebki włóknistej dookoła implantu oraz brakiem stanu zapalnego tkanek po podskórnym wszczepieniu *in vivo*. Ponadto opracowany hydrożel odznaczał się biokompatybilnością, odpowiednim stopniem degradacji, a także podatnością powierzchni na adhezję komórek [329]. Połączenie żelatyny z kwasem akrylowym i kwasem 2-akryloamido-2-metylopropanosulfonowym opisano jako terapię doustną modyfikowaną oksaliplatyną, czyli lekiem przeciwnowotworowym stosowanym głównie w leczeniu raka jelita grubego. Badania na liniach Vero, MCF-7 i HCT-116 potwierdziły kompatybilność komórkową podłoża hydrożelowego oraz kontrolowaną cytotoksyczność materiałów inkorporowanych modelowym lekiem. Dodatkowo, na podstawie badań *in vivo* nie stwierdzono zmian hematologicznych lub histopatologicznych na skutek podania

doustnego [330]. Interesującym przykładem zastosowania żelatyny jest jej modyfikacja dopaminą lub kwasem floretowym w celu opracowania klejów tkankowych wspomagających zamykanie i gojenie ran. Przeprowadzone badania pozwoliły uzyskać biokompatybilne, wysoce adhezyjne materiały o dużej elastyczności, niskim stopniu pęcznienia i szybkiej biodegradacji [331]. Ponadto zastosowanie żelatyny pozwoliło na modyfikację właściwości fibroiny i opracowanie porowatych rusztowań o jednorodnej strukturze dla inżynierii tkankowej. W rezultacie otrzymano trójwymiarowe struktury o doskonałej biokompatybilności, adhezji komórkowej i pozytywnym wpływie na wzrost fibroblastów L929 [332]. Badania prowadzone nad pektynowo/żelatynowymi hydrożelami pozwoliły opracować podłoże dla komórek mięśniowych (C2C12), neuronalnych komórek progenitorowych (PC12) i mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC). Materiał odznaczał się wytrzymałością mechaniczną, stabilnością w środowisku fizjologicznym, wydłużonym czasem degradacji oraz biokompatybilnością. Autorzy potwierdzili także stymulujący wpływ hydrożelu na tworzenie zmineralizowanej macierzy kostnej, która właściwościami była zbliżona do hydroksyapatytu obecnego w kościach. Zastosowanie techniki litografii UV pozwoliło otrzymać materiały przeznaczone do hodowli komórkowych o ściśle określonej architekturze przestrzennej odpowiadającej tkankom [333].

Rysunek 2 przedstawia wybrane właściwości polimerów naturalnych stosowanych do otrzymywania materiałów hydrożelowych.



Rysunek 2. Właściwości biopolimerów stosowanych do otrzymywania materiałów hydrożelowych.

1.8. Żelatynowe materiały hydrożelowe modyfikowane substancjami aktywnymi

Biomateriały na bazie żelatyny mogą być otrzymywane w różnych formach, takich jak nanocząstki, włókna, membrany, mikrosfery czy hydrożele. Ostatnie z wymienionych stanowią temat licznych badań skupiających się między innymi na ciągłym rozwoju technik ich syntezy oraz metod sieciowania w celu otrzymania materiałów o zmiennej postaci (powłoki, folie, mikrożele, rusztowania, preparaty wstrzykiwane), która indukuje właściwości i zastosowanie. Kluczowym kierunkiem aplikacji hydrożeli są systemy dostarczania substancji aktywnych, takich jak leki syntetyczne, białka, oligonukleotydy lub związki pochodzenia naturalnego. Właściwościami sprzyjającymi tego typu ukierunkowaniu są kompatybilność materiałów bazowych z komórkami ludzkiego organizmu, biodegradowalność oraz możliwość modyfikowania kinetyki uwalniania inkorporowanych związków poprzez regulację gęstości usieciowania, struktury porów oraz szybkości degradacji matrycy [334–336].

Parametrem o istotnym znaczeniu, w przypadku nośników substancji aktywnych, jest rodzaj głównych interakcji stabilizujących strukturę hydrożelu. Fizyczne sieciowanie polimerów obejmuje oddziaływania jonowe, hydrofobowe, elektrostatyczne oraz wodorowe, prowadząc do otrzymywania materiałów o umiarkowanych właściwościach mechanicznych. Ponadto słabe interakcje fizyczne wpływają na zwiększenie podatności materiałów na działanie czynników zewnętrznych, takich jak temperatura, światło, pH, pole magnetyczne i ultradźwięki. Hydrożele o niskim stopniu usieciowania oraz znacznej zdolności do pęcznienia i degradacji mogą stanowić systemy szybkiego dostarczania substancji aktywnych, które wykazują zmienność w kierunku specyficznych warunków, takich jak działanie enzymów, kontakt z płynami ustrojowymi lub wysiękiem czy obecność reaktywnych form tlenu [337–339]. Tymczasem chemiczne sieciowanie, oparte na tworzeniu wiązań kowalencyjnych, pozwala na otrzymanie materiałów o stabilnej strukturze, wytrzymałości mechanicznej i odporności termicznej. Zastosowanie naturalnych czynników sieciujących pozwala na uniknięcie efektu toksyczności, a tym samym zapewnia biokompatybilność hydrożeli. Nośniki usieciowane chemiczne charakteryzują się przedłużonym i kontrolowanym dostarczaniem substancji aktywnych, co stanowi znaczną korzyść w przypadku zastosowań medycznych. Zmiany podstawowych parametrów fizykochemicznych hydrożeli pozwalają na modyfikowanie w znacznym zakresie profilu i kinetyki uwalniania substancji czynnych, tak aby były ściśle dopasowane do konkretnego zastosowania [340–343].

W zależności od właściwości strukturalnych i fizycznych hydrożelu mechanizm uwalniania substancji aktywnych może opierać się na różnych zjawiskach, takich jak dyfuzja, pęcznienie bądź degradacja. Dyfuzja, najczęściej biorąca udział w procesie uwalniania, dotyczy migracji cząsteczek substancji aktywnych o wielkości mniejszej niż średnica porów w strukturze materiału. Zmniejszenie różnicy pomiędzy wielkością cząsteczek a średnicą porów powoduje obniżenie wartości współczynnika dyfuzji, co skutkuje spowolnieniem procesu poprzez ograniczenie efektywności wymywania związku przez płyn akceptorowy. Pęcznienie, czyli absorpcja płynu przez matrycę hydrożelową na drodze osmozy, stanowi koncepcję w przypadku braku możliwości swobodnej, początkowej migracji substancji aktywnych z wolnych przestrzeni. Może być to spowodowane większym rozmiarem cząstek dostarczanego związku lub silniejszą ich interakcją z matrycą polimerową. Natomiast degradacja łańcuchów polimerowych oraz wiązań stabilizujących strukturę materiału pozwala uwolnić zamknięte w sieci nośnika substancje aktywne poprzez zajście erozji powierzchniowej lub objętościowej wywołanej hydrolizą lub działaniem enzymów [252,340,343,344].

Materiały hydrożelowe na bazie żelatyny znalazły szerokie zastosowanie w obszarze inżynierii tkankowej ze względu na podobieństwo polimeru do macierzy zewnątrzkomórkowej tkanek oraz promujący wpływ na adhezję i proliferację komórek. Mehdi-Sefiani i in. [345] opracowali chitozano-żelatynowy nośnik dla tetracykliny, czyli antybiotyku stosowanego w terapii zakażeń bakteryjnych. Uwalnianie modelowego leku charakteryzowało się kontrolowanym, szybkim przebiegiem, a całość wprowadzonego związku została dostarczona w trakcie 6 godzin. Badania przeprowadzone przez Sun i in. [346] dotyczyły materiału opartego na żelatynie metakryloamidowej i argininie, który inkorporowano białkiem morfogenetycznym kości (BMP) pełniącym rolę czynnika wzrostu. Zaprojektowana matryca polimerowa pozwoliła na uwolnienie zasadniczej ilości substancji terapeutycznej w czasie 10 dni, z zaznaczeniem możliwości prostej modyfikacji nośnika skutkującej wydłużeniem tego okresu. Natomiast mikrosfery żelatynowe usieciowane genipiną i zawierające w swojej strukturze tą samą substancję aktywną zostały opisane przez Annamalai i in. [347]. Autorzy początkowo zaobserwowali gwałtowny wyrzut BMP na poziomie powyżej 20% całkowitej zawartości, po którym nastąpiło ciągłe, liniowe uwalnianie silnie powiązane z szybkością degradacji materiału. Po upływie 12 godzin nastąpiło uwolnienie czynnika wzrostu w ilości powyżej 70%. Dodatkowo Gnawi i in. [348] wprowadzili do hydrożelu

na bazie żelatyny czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego, czyli białko biorące udział w procesie tworzenia naczyń krwionośnych. Podczas początkowych 20 dni pomiarowych zaobserwowano uwolnienie znacznej ilości substancji aktywnej, która w dalszym etapie stopniowo malała. Cytokina została dostarczona po upływie 58-65 dni w zależności od jej początkowej zawartości w materiale [348].

Kluczową aplikacją żelatynowych materiałów hydrożelowych jest wspieranie procesu gojenia ran o zróżnicowanej genezie, dzięki właściwościom zapewniającym ranie odpowiednie środowisko regeneracji. Hydrożele pełnią funkcję ochronną, tworząc barierę dla drobnoustrojów utrzymując odpowiedni poziom wilgotności sprzyjający odbudowie tkanek, a także redukują stany zapalne i uśmierzają ból. Hu i in. [349] opracowali matryce na bazie żelatyny i kwasu hialuronowego, która została usieciowana czynnikiem EDC. Wprowadzoną do układu substancją aktywną była trombomodulina, czyli białko biorące udział w regulowaniu krzepnięcia krwi, stanów zapalnych i adhezji komórkowej. Uzyskany materiał hydrożelowy charakteryzował się szybkim uwalnianiem trwającym do 12 godzin. Natomiast Bao i in. [350], w matrycy żelatynowo-fibroinowej stabilizowanej genipiną, inkorporowali artemizyninę, która wykazuje działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Podczas pierwszych 3 godzin nastąpił znaczny „wyrzut” substancji aktywnej wynoszący 72% początkowej jej zawartości. W dalszym etapie związek uwalniał się wolniej i finalnie uzyskano wartość 87% po upływie 96 godzin [350]. Hydrożel na bazie żelatyny inkorporowano również podstawowym czynnikiem wzrostu fibroblastów, pełniącym zasadniczą rolę w procesie leczenia ran poprzez promowanie proliferacji fibroblastów, stymulowanie neowaskularyzacji i syntezy kolagenu. Uwalnianie *in vivo* miało charakter stopniowy i przedłużony, a niemal całość substancji aktywnej została dostarczona po 14 dniach implantacji [351]. Tummalapalli i in. [352] opisali żelatynowo-pektynowy materiał hydrożelowy zawierający w swojej strukturze cyprofloksacyne. Podczas pierwszych 6 godzin badania, uwolnione zostało około 13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ antybiotyku, po czym dostarczanie leku przyjęło postać przedłużoną, charakteryzującą się stopniowym uwalnianiem substancji aktywnej w czasie kolejnych 42 godzin [352]. Film na bazie żelatyny i chitozanu sieciowany aldehydem glutarowym inkorporowano lupeolem, będącym naturalnym triterpenem o właściwościach stymulujących biosyntezę kolagenu, proliferację fibroblastów, a także wykazującym działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne. Autorzy opisali uwalnianie charakteryzujące się w pierwszej kolejności szybkim przebiegiem, które następnie uległo

stabilizacji i ostatecznie przyjęło wartość 91% całkowitej zawartości substancji aktywnej po czasie 24 godzin [353].

Sieciowanie żelatyny przy użyciu czynników sieciujących pochodzenia naturalnego prowadzi do stabilizacji matrycy zarówno na drodze oddziaływań fizycznych, jak i poprzez utworzenie nowych wiązań chemicznych. Sieciowanie może zachodzić pomiędzy reaktywnymi grupami związków fenolowych a grupami aminowymi białek, czemu towarzyszy równoczesne tworzenie wiązań wodorowych oraz oddziaływań hydrofobowych [354,355]. Taki podwójny mechanizm sieciowania umożliwia otrzymanie materiałów o zwiększonej odporności termicznej i hydrolitycznej oraz lepszej wytrzymałości mechanicznej względem nieusieciowanego polimeru. Dodatkowo, silnie usieciowana struktura polimerowa zapewnia przedłużone uwalnianie substancji aktywnych, co jest ważnym aspektem z punktu widzenia zastosowań medycznych.

1.9. Podsumowanie opracowania literaturowego

Naturalne czynniki sieciujące pozyskiwane z surowców roślinnych stanowią interesującą alternatywę dla ich syntetycznych odpowiedników. Wyróżniają się szeregiem korzystnych właściwości z punktu widzenia zastosowań medycznych, takich jak biogodność, biodegradowalność i ograniczona cytotoksyczność. Co więcej, mogą wykazywać dodatkowe działanie terapeutyczne, obejmujące aktywność przeciwdrobnoustrojową, przeciwutleniającą i przeciwzapalną.

Fusy kawowe powstałe po procesie parzenia ziaren kawy, stanowią surowiec nadal bogaty w biologicznie aktywne substancje czynne, takie jak kwas chlorogenowy, kofeina, kwas kawowy czy kwas szikimowy. Literatura podaje liczne możliwości zastosowania tego komponentu, między innymi w celu funkcjonalizacji żywności, redukcji obciążeń mikrobiologicznych, stabilizacji produktów i otrzymywania materiałów o zróżnicowanych aplikacjach. Dotychczas nie odnotowano doniesień literaturowych dotyczących wykorzystania fusów kawowych jako surowca do pozyskiwania bio-czynników sieciujących dla materiałów hydrożelowych. Z tego względu zasadne jest podjęcie prac badawczych w tym kierunku, zgodnie z ideą gospodarki o obiegu zamkniętym, w celu wykorzystania wartościowych zasobów pochodzących z odpadów.

Materiały hydrożelowe o właściwościach pożądanых dla produktów medycznych otrzymywane są na drodze sieciowania chemicznego, głównie przy użyciu syntetycznych czynników sieciujących. Zastosowanie związków pochodzenia naturalnego, zwłaszcza w postaci ekstraktów roślinnych, pozwala z jednej strony na ograniczenie ryzyka cytotoksyczności względem organizmu człowieka, a z drugiej umożliwia otrzymanie materiałów o określonych właściwościach terapeutycznych.

Powszechną metodą pozyskiwania substancji czynnych z fusów kawowych jest ekstrakcja. Klasyczne metody wykorzystujące rozpuszczalniki organiczne mają jednak szereg istotnych wad, co skłania do poszukiwania rozwiązań bardziej efektywnych i przyjaznych środowisku. Nowoczesne metody ekstrakcji, takie jak ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami czy promieniowaniem mikrofalowym, pozwalają na skrócenie czasu procesu, zmniejszenie zużycia ekstrahentów oraz poprawę ogólnej efektywności ekstrakcji. Kierunkiem wartym uwagi wydają się szczególnie techniki łączone, które niosą ze sobą dodatkowe korzyści ekonomiczne i środowiskowe, wynikające z możliwości znaczącej redukcji kluczowych parametrów procesu w

odniesieniu do pojedynczych technik. Podejście to zostało również wykorzystane w ramach realizacji założeń pracy doktorskiej.

Reasumując, podjęta w niniejszej pracy doktorskiej tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i może przyczynić się do rozwoju nowoczesnych materiałów do zastosowań medycznych, charakteryzujących się biokompatybilnością i działaniem terapeutycznym, otrzymywanych zgodnie z zasadami zrównoważonego rozwoju z wykorzystaniem odpadowych surowców roślinnych.

2. CEL I ZAKRES PRACY

Celem niniejszej pracy było opracowanie efektywnej metody pozyskiwania substancji aktywnych z wybranego odpadowego surowca roślinnego, fusów kawowych, oraz ocena ich przydatności jako naturalnych czynników sieciujących dla polimerów białkowych, ze szczególnym uwzględnieniem żelatyny. Zbadano wpływ następujących technik ekstrakcji: ciało stałe-ciecz (LSE), wspomaganej ultradźwiękami (UAE), wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym (MAE) oraz metody łączącej działanie ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego (UMAE), na skład i aktywność otrzymanych ekstraktów. Uzyskane ekstrakty zastosowano do chemicznego usieciowania materiałów hydrożelowych na bazie żelatyny, a następnie oceniono wpływ bio-czynników sieciujących na wybrane właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i termiczne otrzymanych hydrożeli. W kolejnych etapach do wybranej matrycy hydrożelowej wprowadzono dodatkowe substancje aktywne (niacynamid i kwas hialuronowy), aby uzyskać materiały wykazujące działanie terapeutyczne, co jest bardzo istotne z punktu widzenia zastosowań medycznych, w szczególności w obszarze opatrunków na rany.

Zakres pracy obejmował:

- Opracowanie metody pozyskiwania substancji aktywnych z fusów kawowych przy zastosowaniu następujących technik ekstrakcji: ciało stałe-ciecz (LSE), wspomaganej ultradźwiękami (UAE), wspomaganej mikrofalami (MAE) oraz metody łączącej działanie ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego (UMAE).
- Charakterystykę otrzymanych ekstraktów pod kątem zawartości określonych substancji aktywnych (HPLC), właściwości przeciwutleniających, aktywności przeciwdrobnoustrojowej, cytotoksyczności *in vitro* oraz wpływu na migrację komórek *in vitro*.
- Zastosowanie ekstraktów w reakcjach chemicznego sieciowania żelatyny oraz charakterystykę otrzymanych materiałów hydrożelowych, w tym badania fizykochemiczne, strukturalne (FT-IR), morfologiczne (SEM), termiczne (TG/DTG, DSC), reologiczne i mechaniczne.
- Modyfikację bazowego materiału hydrożelowego substancjami aktywnymi (niacynamidem i kwasem hialuronowym) oraz charakterystykę otrzymanych

materiałów hydrożelowych, w tym badania fizykochemiczne, strukturalne (FT-IR), morfologiczne (SEM), termiczne (TG/DTG, DSC), wyznaczenie profili uwalniania substancji aktywnych i określenie cytotoksyczności *in vitro*.

3. METODYKA BADAŃ

3.1. Surowce i odczynniki

Charakterystykę surowców i odczynników zastosowanych do otrzymywania bioczynników sieciujących i modyfikowanych materiałów hydrożelowych przedstawiono w **Tabeli 3A**. Pozostałe surowce i odczynniki użyte w trakcie analiz zamieszczono w **Tabeli 3B**.

Tabela 3A. Charakterystyka surowców i odczynników zastosowanych podczas syntez.

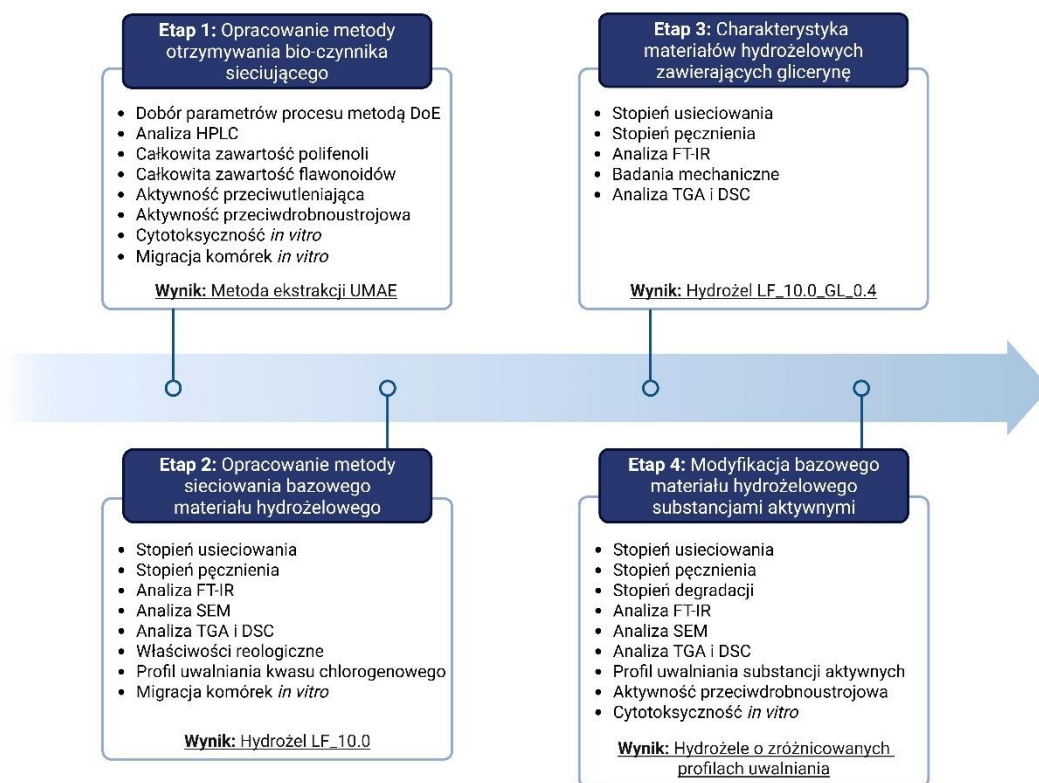
Nazwa IUPAC	Wzór sumaryczny	Masa molowa [g/mol]	Nr CAS	Producent	Pełniona funkcja
Bufor pH 10±0,05	-	-	-	Chempur	Ekstrahent
Wodorotlenek sodu	NaOH	40,00	1310-73-2	Sigma-Aldrich	Czynnik buforujący
Kwas chlorowodorowy	HCl	36,46	7647-01-0	Pol-Aura	Czynnik buforujący
Olej z awokado <i>Persea Gratissima</i>	-	-	-	Zrób sobie krem	Czynnik wspomagający ekstrakcję
Żelatyna ze skóry świńskiej	-	-	9000-70-8	Sigma-Aldrich	Polimer
κ-karagen	-	-	11114-20-8	Pol-Aura	Polimer
Lakaza z <i>Trametes versicolor</i>	-	-	80498-15-3	Sigma-Aldrich	Katalizator
Chlorek potasu	KCl	74,56	7447-40-7	Chempur	Substancja pomocnicza
Nadtlenek wodoru	H ₂ O ₂	34,01	7722-84-1	Sigma-Aldrich	Utleniacz
Gliceryna	C ₃ H ₈ O ₃	92,09	56-81-5	Chempur	Plastyfikator
Niacynamid	C ₆ H ₆ N ₂ O	122,12	98-92-0	ECOSPA	Substancja aktywna
Potrójny kwas hialuronowy	(C ₁₄ H ₂₁ NaNO ₁₁) _n	>10000 DA (0,5%); 100 000 - 400 000 DA (0,5%); 1,0 - 1,8 M DA (0,5%)	9067-32-7	ECOSPA	Substancja aktywna

Tabela 3B. Charakterystyka surowców i odczynników użytych w trakcie analiz.

Nazwa IUPAC	Wzór sumaryczny	Masa molowa [g/mol]	Nr CAS	Producent
Odczynnik Folina i Ciocalteu'a	-	-	-	Chempur
Węglan sodu bezwodny	Na ₂ CO ₃	105,99	497-19-8	Chempur
Kwas galusowy bezwodny	C ₇ H ₆ O ₅	170,12	149-91-7	Pol-Aura
Azotyn sodu	NaNO ₂	69,00	7632-00-0	Chempur
Chlorek glinu sześciowodny	AlCl ₃ ·6H ₂ O	241,43	7784-13-6	Sigma-Aldrich
Kwercetyna bezwodna	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,24	117-39-5	Pol-Aura
2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	394,32	1898-66-4	Pol-Aura
Etanol	C ₂ H ₅ OH	46,07	64-17-5	Chempur
Kwas mrówkowy	CH ₂ O ₂	46,03	64-18-6	Fisher Scientific
Metanol	CH ₃ OH	32,04	67-56-1	POCH
Kwas 3-O-kofeinochinowy	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,31	906-33-2	Sigma-Aldrich
Kwas 5-O-kofeinochinowy	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,31	327-97-9	Sigma-Aldrich
Kofeina	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	58-08-2	Sigma-Aldrich
Kwas kawowy	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	331-39-5	Sigma-Aldrich
Kwas szikimowy	C ₇ H ₁₀ O ₅	174,15	138-59-0	Sigma-Aldrich
Kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy	C ₆ H ₃ N ₃ O ₉ S	293,17	2508-19-2	Sigma-Aldrich
Wodorowęglan sodu	NaHCO ₃	84,01	144-55-8	Chempur
Roztwór buforu fosforanowego (PBS)	-	-	-	Chempur

3.2. Schemat ideowy procesu badawczego

Rysunek 3 przedstawia schemat ideowy procesu badawczego, uwzględniający poszczególne etapy oraz zastosowane metody badawcze.



Rysunek 3. Schemat ideowy przebiegu realizowanych prac badawczych.

3.3. Metody pozyskiwania bio-czynników sieciujących z odpadów po kawie

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem fusów kawowych powstałych w wyniku parzenia jasno palonych ziaren kawy Arabica (Tchibo Exclusive) pochodzących z Ameryki Południowej, przy użyciu ekspresu ciśnieniowego Jura Impressa C5 (ciśnienie parzenia: 15 bar). Odpadowy surowiec suszono na powietrzu, a następnie mielono w elektrycznym młynku Bosch (180 W) do uzyskania materiału o ziarnistości w zakresie 0,25-0,5 mm, określonej za pomocą analizy sitowej.

3.3.1. Ekstrakcja ciała stałe-ciecz

Fusy z kawy (15% m/v) odważono do kolby okrągłodennej, dodano wodę destylowaną z odpowiednią ilością 0,1 M roztworu HCl (pH 2,2-3,2) oraz olej z awokado w stosunku 19:1 (v/v). Mieszaninę ekstrakcyjną ogrzewano przez 25-35 minut w stałej temperaturze 35-45°C. Po przesączeniu ekstraktu przez tkaninę filtracyjną i wirowaniu przez 20 minut przy prędkości obrotowej wynoszącej 4000 obr/min, rozpuszczalnik usunięto na drodze liofilizacji [356].

3.3.2. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami

Fusy z kawy (15% m/v) odważono do kolby okrągłodennej, dodano wodę destylowaną z odpowiednią ilością 0,1 M roztworu HCl (pH 2,3-4,3) oraz olej z awokado w stosunku 19:1 (v/v). Mieszaninę ekstrakcyjną poddano działaniu ultradźwięków o mocy 120 W i częstotliwości 40 kHz przez 35-45 minut w stałej temperaturze 35-45°C. Po przesączeniu ekstraktu przez tkaninę filtracyjną i wirowaniu przez 20 minut przy prędkości obrotowej wynoszącej 4000 obr/min, rozpuszczalnik usunięto na drodze liofilizacji [357].

3.3.3. Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym

Fusy z kawy (15% m/v) odważono do kolby okrągłodennej, dodano wodę destylowaną z odpowiednią ilością 0,1 M roztworu HCl lub komercyjny bufor (pH 2-10) oraz olej z awokado w stosunku 19:1 (v/v). Mieszaninę ekstrakcyjną ogrzano do temperatury 40-60°C poprzez działanie promieniowaniem mikrofalowym o mocy 70-210 W pod ciśnieniem atmosferycznym. Po przesączeniu ekstraktu przez tkaninę filtracyjną i wirowaniu przez 20 minut przy prędkości obrotowej wynoszącej 4000 obr/min, rozpuszczalnik usunięto na drodze liofilizacji [358].

3.3.4. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami/promieniowaniem mikrofalowym

Fusy z kawy (15% m/v) odważono do kolby okrągłodennej, dodano wodę destylowaną z odpowiednią ilością 0,1 M roztworu HCl lub komercyjny bufor (pH 2-10) oraz olej z awokado w stosunku 19:1 (v/v). Mieszaninę ekstrakcyjną poddano działaniu ultradźwięków o mocy 120 W i częstotliwości 40 kHz przez 5-25 minut w temperaturze 40°C. Po zakończeniu pierwszego etapu mieszaninę ogrzano do temperatury 50°C pod wpływem promieniowania mikrofalowego o mocy 70-210 W pod ciśnieniem atmosferycznym. Następnie mieszaninę ekstrakcyjną ponownie poddano działaniu ultradźwięków o takich samych parametrach jak podczas pierwszego etapu. Po przesączeniu ekstraktu przez tkaninę filtracyjną i wirowaniu przez 20 minut przy prędkości obrotowej wynoszącej 4000 obr/min, rozpuszczalnik usunięto na drodze liofilizacji [359].

3.4. Metody badawcze zastosowane dla bio-czynników sieciujących

3.4.1. Analiza całkowitej zawartości polifenoli

Całkowitą zawartość polifenoli (TPC) oznaczono zmodyfikowaną metodą spektrofotometryczną [360]. Do 1 ml próbki ekstraktu dodano 5 ml 10% roztworu odczynnika Folina-Ciocalteu, a następnie po upływie 5 minut wprowadzono 4 ml 7,5% roztworu Na₂CO₃. Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności przez 60 minut, po czym zmierzono absorbancję przy długości fali 765 nm. Na podstawie krzywej kalibracyjnej wykonanej dla kwasu galusowego wyznaczono ilościową zawartość polifenoli, a wyniki wyrażono jako miligram ekwiwalentu kwasu galusowego na mililitr próbki.

3.4.2. Analiza całkowitej zawartości flawonoidów

Całkowitą zawartość flawonoidów (TFC) oznaczono metodą kolorymetryczną [361]. Do 1 ml próbki ekstraktu dodano 4 ml wody destylowanej i 0,3 ml 5% roztworu NaNO₂, a po 5 minutach inkubacji wprowadzono 0,3 ml 10% roztworu AlCl₃·6H₂O. Po upływie kolejnych 6 minut dodano 2 ml 4% roztworu NaOH i zawartość kolby rozcieńczono, dodając 2,4 ml wody destylowanej. Absorbancję mieszaniny zmierzono przy długości fali 510 nm. Całkowita zawartość flawonoidów została określona na podstawie krzywej wzorcowej otrzymanej dla kwercetyny, a wartość parametru wyrażono jako miligram ekwiwalentu kwercetyny na mililitr próbki.

3.4.3. Badanie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH

Aktywność przeciwutleniającą próbek ekstraktów zmierzono za pomocą zmodyfikowanej metody DPPH [362]. Etanolowy roztwór DPPH o stężeniu 0,5 mM rozcieńczano, tak aby wartość absorbancji przy długości fali 517 nm wynosiła ~ 0,9. Do 1,5 ml przygotowanego roztworu rodnika dodano 200 µl etanolu (A₀) lub 200 µl próbki ekstraktu (A), a następnie zmierzono absorbancję mieszaniny po 30 minutach inkubacji. Zdolność neutralizowania wolnych rodników przez próbki ekstraktów wyznaczono przy zastosowaniu wzoru:

$$\%inhibicja = \frac{A_0 - \bar{A}}{A_0} \cdot 100\% \quad (1)$$

3.4.4. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Analizę chromatograficzną (HPLC) przeprowadzono przy zastosowaniu chromatografu cieczowego Dionex UltiMate 300, który zawierał pompę automatyczną, iniektor, autosampler, komorę kolumny i detektor UV-Vis z matrycą diodową PDA. Oprogramowanie Chromeleon 6.8 pozwoliło na sterowanie urządzeniem, a także gromadzenie i przetwarzanie danych. Związki rozdzielano na kolumnie chromatograficznej Kinetex XB C18 (100 × 4,6 mm, 3,5 μm), działającej w izokratycznym układzie faz odwróconych. W komorze kolumny, przez cały czas trwania pomiarów, utrzymywano stałą temperaturę równą 30°C. W fazie ruchomej jako eluenty zastosowano 0,1% (m/m) roztwór kwasu mrówkowego oraz metanol, których stosunek wynosił 87:13. Szybkość przepływu fazy ruchomej ustalono na poziomie 0,9 ml/min, a objętość i czas nasytowania wynosiły odpowiednio 5 μl i 12 minut. Detekcja analizowanych związków miała miejsce przy następujących długościach fali: 325 nm (3-CQA, 4-CQA, kwas kawowy), 272 nm (kofeina) i 260 nm (kwas szikimowy). Identyfikacji związków w próbkach ekstraktów dokonano poprzez potwierdzenie zgodności czasów retencji i właściwości spektralnych UV-Vis z odpowiednimi wzorcami analitycznymi. Oznaczenia ilościowe wykonano na podstawie odpowiednich krzywych kalibracyjnych.

3.4.5. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej metodą mikrorozcieńczeń

Mikroorganizmy zastosowane w badaniu zakupiono/dostarczono przez ATCC (American Type Culture Collection), DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH), NCTC (National Collection of Type Cultures central Public Health Laboratory London) and NIL (Narodowy Instytut Leków w Warszawie). Wybrano dwanaście szczepów bakterii Gram-dodatnich (szczepy odporne na metycylinę: *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-1707 i *S. aureus* ATCC 43300, szczepy wrażliwe na metycylinę: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538P, i *S. aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299, *E. faecium* ATCC 19434), piętnaście szczepów bakterii Gram-ujemnych (*Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* ATCC BAA2146, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13440,

Enterobacter aerogenes ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* NIL, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19605, *Enterobacter cloacae* NIL, *Aeromonas veronii* DSM 7386) oraz jedenaście szczepów drożdży (*Candida albicans* ATCC 2091, *C. albicans* ATCC 10231, *C. auris* CDC B11903, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. glabrata* ATCC 15126, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 14243, *C. lusitaniae* ATCC 3449, *C. tropicalis* ATCC 1369, *Geotrichum candidum* ATCC 34614 i *Trichosporon asahii* - izolat kliniczny).

Wszystkie szczepy bakterii przechowywano w temperaturze -70°C w mieszaninie bulionu Brain Heart Infusion (BHI) w stosunku 1:1, natomiast szczepy grzybów w mieszaninie bulionu Sabourauda i gliceryny. W celu reaktywacji hodowano je odpowiednio na podłożu Trypticase Soy Agar (TSA) (bakterie) oraz agarze Sabourauda (drożdże), inkubując przez 18-24 godziny w temperaturze 35°C w warunkach atmosferycznych. Następnie przechowywano je w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ do czasu przygotowania i standaryzacji do badań.

Zastosowane mikroorganizmy reprezentują patogeny najczęściej występujące w zakażeniach skóry i ran, co jest zgodne z przewidywanym wykorzystaniem materiałów jako opatrunków dermatologicznych.

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzono metodą mikrorozcieńczeń zgodnie z wytycznymi EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [363], zmodyfikowanymi przez Malm i in. [364]. Oceniono minimalne stężenie hamujące (MIC), minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) i minimalne stężenie grzybobójcze (MFC). Próbkę ekstraktów (LSE, UAE, MAE i UMAE) o stężeniach końcowych z zakresu 0,125-8 mg/ml inkubowano w 96-dółkowych płytkach titracyjnych w odpowiedniej objętości pożywki Mueller-Hinton Broth (MHB) dla bakterii lub pożywki RPMI1640 dla drożdży. W badaniu wykorzystano następujące systemy kontrolne: kontrola sterylności pożywek MHA (Mueller-Hinton Agar), MHB (Mueller-Hinton Broth), RPMI 1640A i RPMI 1640B niezawierających badanych ekstraktów i mikroorganizmów referencyjnych, kontrola ekstraktów o stężeniu od 0,125 do 8 mg/ml w pożywkach MHB i RPMI 1640B oraz kontrola żywotności testowanych mikroorganizmów referencyjnych w pożywkach MHA, MHB, RPMI 1640A i RPMI 1640B bez dodatku ekstraktów.

Kontrola jakości oznaczania wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe została przeprowadzona zgodnie z zaleceniami EUCAST. Wykorzystano następujące szczepy referencyjne: *S. aureus* ATCC 29213 (bakterie Gram-dodatnie), *E. coli* ATCC 25922 (bakterie Gram-ujemne) oraz *C. albicans* ATCC 10231 (drożdże). Referencyjne środki przeciwdrobnoustrojowe (np. wankomycyna, cyprofloksacyna, flukonazol) stosowano wyłącznie wobec wskazanych szczepów kontrolnych.

Wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) dla referencyjnych substancji przeciwdrobnoustrojowych wynosiła 1 µg/ml wankomycyny dla szczepu *S. aureus* ATCC 29213, 0,5 µg/ml cyprofloksacyny dla szczepu *E. coli* ATCC 25922 i 1 µg/ml flukonazolu dla szczepu *C. albicans* ATCC 10231. Wszystkie eksperymenty, w tym oznaczenia MIC, MBC i MFC, przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Spośród uzyskanych wyników wybrano najbardziej reprezentatywne wartości dla każdego parametru oddzielnie.

3.4.6. Badanie cytotoksyczności *in vitro*

Komórki normalnych ludzkich fibroblastów skórnych NHDF (PromoCell) wysiano do 96-dółkowych płytek w ilości 4000 komórek na dołek, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Ekstrakty rozpuszczono w pożywce do hodowli komórkowych DMEM w stężeniach z zakresu 0,075-1 mg/ml. Usuniętą z płytek pożywkę zastąpiono roztworami badanych próbek, a po 72 godzinach przeprowadzono test MTS. Pożywkę zawierającą dodatek ekstraktów zastąpiono mieszaniną 80 µl DMEM pozbawionego czerwieni fenolowej i 20 µl roztworu CellTiter 96®AQueous One Solution-MTS (Promega). Po godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 490 nm w czytniku wielopłytkowym (Synergy 4, BioTek), a wyniki porównano z kontrolą negatywną (komórki nieleczone).

Badania zrealizowano w ramach stażu naukowego w Instytucie Fizyki im. Augusta Chełkowskiego na Uniwersytecie Śląskim w Chorzowie.

3.4.7. Badanie migracji komórek *in vitro*

Komórki NHDF wysiano na płytki µ-Plate 24 Well Black (Ibidi), 2-studzienkowe z wkładką silikonową o zdefiniowanej szerokości szczeliny, w ilości 30 000 komórek na dołek, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny celem otrzymania jednolitej monowarstwy. Po usunięciu wkładek za pomocą sterylnej pęsety, komórki przepłukano dwukrotnie roztworem buforowym PBS. Do dołków wprowadzono roztwór

mitomycyny C (5 µg/ml), inhibitora proliferacji komórek, który usunięto po upływie 1 godziny. Komórki przemyto dwukrotnie roztworem PBS i inkubowano w obecności badanych próbek (0,5 mg/ml, DMEM) przez 48 godzin w temperaturze 37°C. Kontrolę pozytywną stanowił roztwór adenozyiny o stężeniu 0,015 µM. Migrację komórek i gojenie rany monitorowano co 24 godziny przy zastosowaniu mikroskopu odwróconego Zeiss PrimoVert, a procent zamknięcia rany określono za pomocą oprogramowania ImageJ 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) z wtyczką „wound healing size tool” [365].

Badania zrealizowano w ramach stażu naukowego w Instytucie Fizyki im. Augusta Chełkowskiego na Uniwersytecie Śląskim w Chorzowie.

3.5. Metoda otrzymywania bazowej matrycy hydrożelowej

Roztwór żelatyny o stężeniu 7% (m/v) połączono z 5% (m/v) roztworem κ-karagenu oraz 0,1-0,4 g bio-czynnika sieciującego w postaci liofilizowanej, który otrzymano metodą ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami/promieniowaniem mikrofalowym. Roztwór lakazy o stężeniu 0,85% (m/v), przygotowany w 0,25 M roztworze KCl i 30% (v/v) roztworze H₂O₂, dodano wraz z 0,4-0,6 ml gliceryny do frakcji polimerowej, a następnie mieszano przez 30 minut w temperaturze 60°C. Przez mieszaninę reakcyjną przepuszczano tlen techniczny (99,5%) przez 20 minut, po czym mieszano ją przez 2 minuty w temperaturze 100°C. Ostatecznie mieszaninę pozostawiono na szalce Petriego na 48 godzin w celu pełnego usieciowania [366].

3.6. Metoda otrzymywania matrycy hydrożelowej modyfikowanej substancjami aktywnymi

Roztwór żelatyny o stężeniu 7% (m/v) połączono z 5% (m/v) roztworem κ-karagenu oraz 0,4 g bio-czynnika sieciującego w postaci liofilizowanej, który otrzymano metodą ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami/promieniowaniem mikrofalowym. Zastosowano również dodatek dwóch substancji aktywnych - niacynamidu (0,5 g i 1 g) oraz potrójnego kwasu hialuronowego (1 ml i 2 ml). Roztwór lakazy o stężeniu 0,85% (m/v), przygotowany w 0,25 M roztworze KCl i 30% (v/v) roztworze H₂O₂, dodano wraz z 0,4 ml gliceryny do frakcji polimerowej, a następnie mieszano przez 30 minut w temperaturze 60°C. Przez mieszaninę reakcyjną przepuszczano tlen techniczny (99,5%) przez 20 minut, po czym mieszano ją przez 2 minuty w temperaturze 100°C. Ostatecznie mieszaninę pozostawiono na szalce Petriego na 48 godzin w celu pełnego usieciowania.

3.7. Metody badawcze zastosowane dla materiałów hydrożelowych

3.7.1. Badanie stopnia usieciowania

Stopień usieciowania materiału hydrożelowego wyznaczono poprzez porównanie zawartości wolnych grup ϵ -aminowych w próbce zawierającej czynnik sieciujący oraz próbce odniesienia. Badanie przeprowadzono przy użyciu testu kolorymetrycznego [367], który opiera się na reakcji pierwszorzędowych grup aminowych z kwasem 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowym (TNBS).

Badane próbki hydrożeli o masie $2,00 \pm 0,05$ mg inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 40°C w mieszaninie 1 ml 4% roztworu NaHCO_3 i 1 ml 0,5% roztworu TNBS. Następnie dodano 2 ml 6 M roztworu HCl i ogrzewano w temperaturze 60°C przez 2 godziny, aż do całkowitego rozpuszczenia hydrożeli. Mieszaninę pozostawiono do ostygnięcia, po czym zmierzono jej absorbancję przy długości fali 345 nm względem ślepej próby [368,369]. Stopień usieciowania obliczono przy zastosowaniu równania:

$$\%DC = \left(1 - \frac{A_c}{A_0}\right) \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie A_c - absorbancja usieciowanego materiału hydrożelowego, A_0 - absorbancja nieusieciowanego materiału hydrożelowego.

3.7.2. Badanie stopnia pęcznienia

Stopień pęcznienia stanowi parametr określający zdolność materiału hydrożelowego do wchłaniania cieczy. W celu jego wyznaczenia, próbki hydrożeli o wymiarach 10x10 mm, uprzednio wysuszone do stałej masy (M_0), inkubowano w 25 ml wody destylowanej lub buforu fosforanowego (PBS) o pH 7,4 w temperaturze 25°C lub 37°C . Po upływie 1 godziny próbki wyjęto z roztworu, powierzchnię osuszone bibułą filtracyjną, a następnie zważono na wadze analitycznej (M_1). Po pomiarze próbki hydrożeli ponownie umieszczono w medium inkubacyjnym. Kolejne pomiary masy wykonano po 3, 24 i 72 godzinach od rozpoczęcia badania [370]. Stopień pęcznienia wyznaczono według wzoru:

$$\%SD = \frac{M_1 - M_0}{M_0} \cdot 100\% \quad (3)$$

3.7.3. Badanie stopnia degradacji

Badania degradacyjne materiału hydrożelowego prowadzono przez 28 dni. Próbki o wymiarach 10x10 mm inkubowano w buforze fosforanowym (pH 7,4) w temperaturze 37°C. Postęp degradacji monitorowano poprzez pomiar pH i przewodności płynu inkubacyjnego, wykonywany w siedmiodniowych odstępach czasowych [371]. Po zakończeniu badania pozostałość próbki wysuszono i zważono na wadze analitycznej, a następnie wyznaczono ubytek masy materiału zgodnie z poniższym wzorem:

$$\%WL = \frac{(M_0 - M_1)}{M_0} \cdot 100\% \quad (4)$$

gdzie M_0 – początkowa masa materiału hydrożelowego [g], M_1 – końcowa masa materiału hydrożelowego po 28 dniach degradacji [g].

3.7.4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

Analizę struktury chemicznej materiału hydrożelowego, potwierdzającą również chemiczne usieciowanie żelatyny, przeprowadzono z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Pomiary wykonano przy użyciu spektrofotometru Nicolet iS5 Thermo Scientific, wyposażonego w przystawkę ATR z kryształem diamentowym. Widmo absorbancji rejestrowano w zakresie liczby falowej 4000-600 cm^{-1} , w temperaturze pokojowej.

3.7.5. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Morfologię przekroju poprzecznego materiału hydrożelowego zbadano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) przy zastosowaniu mikroskopu Apreo 2 S LoVac (Thermo Fisher Scientific) wyposażonego w działo elektronowe z emisją polową Schottky'ego o napięciu przyspieszającym z zakresu od 200 V do 30 kV. W trybie niskiej próżni, przy ciśnieniu wynoszącym 10-500 Pa, zastosowano detektor LVD, który rejestrował bezpośrednio sygnał elektronów wtórnych (SE). Celem uzyskania lepszej jakości obrazu, badane próbki napyłano warstwą złota o grubości 2,5 nm, a następnie przymocowano ją do stolika za pomocą taśmy węglowej.

3.7.6. Skaningowa kalorymetria różnicowa

Właściwości termiczne materiału hydrożelowego analizowano metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) przy użyciu urządzenia Netzsch DSC 214 Polyma. Próbki hydrożeli o masie $8,0 \pm 0,2$ mg umieszczano w zamkniętym tyglu aluminiowym i

ogrzewano w przedziale temperaturowym od -50°C do 300°C z szybkością $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Następnie materiał ogrzewano w maksymalnej temperaturze przez 10 minut i chłodzono do temperatury pokojowej z szybkością $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Pomiar DSC prowadzono w atmosferze azotu dla próbki wysuszonej do stałej masy metodą liofilizacji w temperaturze 50°C w suszarce próżniowej Chemland. Z kolei pomiar dla próbki niesuszonej wykonano w zamkniętym tyglu ciśnieniowym.

3.7.7. Termograwimetria

Do analizy termicznego rozkładu materiałów hydrożelowych zastosowano metodę termograwimetryczną (TGA). Liofilizowane próbki hydrożeli o masie $10,0 \pm 0,2$ mg ogrzewano z szybkością $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ w zakresie temperatur $30\text{-}800^{\circ}\text{C}$ za pomocą aparatu Netzsch TG209 F1. Pomiar prowadzono przy użyciu tygla z Al_2O_3 w atmosferze azotu. Pierwsza pochodna masy (DTG) została obliczona w odniesieniu do uzyskanych krzywych zależności masy materiału od temperatury.

3.7.8. Badanie właściwości reologicznych

Właściwości reologiczne mieszanin reakcyjnych oraz materiałów hydrożelowych analizowano za pomocą reometru HAAKE MARS III, wyposażonego w układ pomiarowy o geometrii typu płytka-płytki. Dla mieszaniny reakcyjnej pomiary prowadzono w zakresie temperatur od 50°C do 25°C , przy stałej szybkości chłodzenia równej $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, naprężeniu ścinającym $\tau = 10$ Pa i częstotliwości $f = 1$ Hz. W przypadku materiału hydrożelowego analizę prowadzono w zakresie temperatur od 25°C do 50°C , przy stałej szybkości ogrzewania wynoszącej $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, naprężeniu ścinającym $\tau = 100$ Pa i częstotliwości $f = 1$ Hz. Zmiany modułu zachowawczego (G') oraz modułu stratności (G'') przedstawiono w funkcji temperatury, podobnie jak w literaturze [370,372].

3.7.9. Badanie twardości

Twardość materiału hydrożelowego badano zgodnie z normą PN-ISO 868 [373] przy użyciu twardościomierza Shore'a typu A (Insize Co., Loganville, GA, USA). Pomiary wykonywano w temperaturze otoczenia, a dane rejestrowano 15 s po dotknięciu próbki hydrożelu sondą naciskową. Każdą próbkę poddano pięciokrotnemu badaniu po obu stronach materiału, a dane przedstawiono jako średnią.

3.7.10. Badanie właściwości mechanicznych

Badania wytrzymałości na rozciąganie przeprowadzono przy użyciu maszyny wytrzymałościowej typu BIONIX (MTS), wyposażonej w siłomierz o zakresie pomiarowym 125 N. Do analizy wykorzystano próbki hydrożelowe w formie wiosełek ($n = 7$), o całkowitej długości 80 mm i przekroju poprzecznym $4,4 \times 0,3$ mm w części pomiarowej. Próby rozciągania prowadzono dla materiałów wysuszonych, w temperaturze pokojowej, przy stałej prędkości 1 mm/s, aż do momentu zerwania próbki. Podczas badania rejestrowano wartości siły i wydłużenia.

3.7.11. Badanie profilu uwalniania bio-czynnika sieciującego

Celem badania było określenie stabilności hydrolitycznej usieciowanego materiału hydrożelowego poprzez wyznaczenie profilu uwalniania kwasu chlorogenowego, głównego składnika bio-czynnika sieciującego, metodą statyczną. Zastosowana membrana z regenerowanej celulozy (Spectra/Por[®] Dialysis Membrane (MWCO 6-8000), Carl Roth[®]) służyła ograniczeniu ryzyka mechanicznego rozpadu próbki oraz niekontrolowanej migracji jej składników do medium akceptorowego.

Próbki hydrożeli o masie 150 mg umieszczono w membranie dializacyjnej, a następnie inkubowano w 150 ml wody destylowanej ($\text{pH} = 6,6$) w temperaturze 25°C przez 144 godziny. W pierwszym dniu płyn akceptorowy pobierano w odstępach czasowych przez 4 godziny od momentu rozpoczęcia badania, natomiast w kolejnych dniach raz dziennie. Stężenie uwolnionego kwasu chlorogenowego oznaczono za pomocą metody spektrofotometrycznej (Evolution 220, Thermo Fisher Scientific) przy długości fali 323 nm.

3.7.12. Badanie profilu uwalniania substancji aktywnych

Profil uwalniania substancji aktywnych z materiału hydrożelowego przeprowadzono metodą statyczną. Bufor fosforanowy (PBS) zastosowano jako symulowany płyn ustrojowy ze względu na jego fizjologiczne pH wynoszące 7,4.

Próbki hydrożeli o masie 150 mg umieszczano w 150 ml buforu fosforanowego i inkubowano w temperaturze 37°C przez 7 dni. W pierwszym dniu płyn akceptorowy pobierano w odstępach czasowych przez 4 godziny od momentu rozpoczęcia badania, natomiast w kolejnych dniach raz dziennie. Zawartość substancji czynnych w PBS oznaczono metodą spektrofotometryczną przy użyciu aparatu Evolution 220 (Thermo

Fisher Scientific). Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 262 nm dla niacynamidu, 269 nm dla kwasu hialuronowego oraz 323 nm dla kwasu chlorogenowego.

3.7.13. Badanie cytotoksyczności *in vitro*

Pierwotne ludzkie fibroblasty (GM07452, Coriell Institute for Medical Research) hodowano w podłożu Minimum Essential Medium (MEM) uzupełnionym o 10% surowicy płodowej bydlęcej (FBS), 1% antybiotyku oraz 1% aminokwasów. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C w inkubatorze z 5% zawartością CO₂. Na trzy dni przed badaniem cytotoksyczności komórki wysiano na płytki w celu osiągnięcia ponad 90% konfluencji. Materiały hydrożelowe inkubowano w sterylnej wodzie dejonizowanej (ddH₂O), a następnie przeniesiono na dno czarnych płytek 96-dołkowych. Do każdego dołka dodano 100 µL zawiesiny komórek w podłożu, zarówno w przypadku hydrożeli, jak i w dołkach kontrolnych bez hydrożeli, w trzech powtórzeniach. Cytotoksyczność oceniano za pomocą testu CytoTox-Fluor™, zgodnie z instrukcją producenta, mierząc absorbancję przy długości fali wzbudzenia 480 nm oraz emisji 525 nm po 1 godzinie inkubacji. Fluorescencję mierzono za pomocą czytnika Tecan Infinite M200 PRO (Durham, NC, USA) po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji komórek w obecności i braku hydrożeli. Sygnał fluorescencji dla próbek porównano do kontroli, a wyniki wyrażono jako procentowy wzrost względem komórek kontrolnych.

4. CZĘŚĆ BADAWCZA

4.1. Opracowanie metody otrzymywania bio-czynnika sieciującego

Początkowy etap badań polegał na porównaniu, a następnie wyborze najefektywniejszej metody pozyskiwania substancji aktywnych z zasobu roślinnego. Celem było uzyskanie jak najwyższego stężenia poszczególnych związków wykazujących duży potencjał w reakcjach sieciowania polimerów białkowych. Analizowano cztery techniki ekstrakcji: ciało stałe-ciecz (LSE), wspomaganą ultradźwiękami (UAE), wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE) oraz łączącą działanie ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego (UMAE). W celu dobrania korzystnych parametrów prowadzenia procesu, zastosowano komputerowe wspomaganie planowania i analizy statystycznej doświadczeń (DoE). Badania prowadzono na powszechnie dostępnym surowcu odpadowym pochodzenia roślinnego, czyli fusach po parzeniu ziaren kawy, będących bogatym źródłem związków polifenolowych, alkaloidów i hydroksykwasów karboksylowych, takich jak kwas chlorogenowy, kwas kawowy, kofeina i kwas szikimowy. Zastosowane fusy pochodziły z jasno palonych ziaren Arabica uprawianych w Ameryce Południowej.

4.1.1. Dobór parametrów procesu metodą DoE (Design of Experiment)

Ocenę wpływu parametrów wejściowych (zmiennych niezależnych) na parametr wyjściowy (zmienną zależną), czyli całkowitą zawartość polifenoli, przeprowadzono na podstawie analizy statystycznej. Badania bazowały na planie frakcyjnym dla trzech zmiennych niezależnych, z których każda występowała na trzech poziomach wartości (-1, 0, 1), z dodatkowym punktem w centrum planu. Istotność wpływu poszczególnych zmiennych oceniono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), przy poziomie prawdopodobieństwa równym 5% ($p < 0,05$). Analizy wykonano w programie Statistica® w wersji 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornia, USA). Na podstawie badań wstępnych określono zakres zmienności parametrów wejściowych dla czterech metod ekstrakcji (LSE, UAE, MAE i UMAE), co przedstawiono w **Tabeli 4**.

Tabela 4. Parametry wejściowe wraz z ich zakresami zmienności dla ekstrakcji LSE, UAE, MAE, UMAE.

Metoda ekstrakcji	Oznaczenie zmiennej	Zmienna niezależna	Jednostka	Zakres zmienności parametrów		
				Poziom (-1)	Poziom (0)	Poziom (1)
LSE	x ₁	Temperatura	[°C]	35	40	45
	x ₂	Czas	[min]	25	30	35
	x ₃	pH	[-]	2,2	2,7	3,2
UAE	x ₄	Temperatura	[°C]	35	40	45
	x ₅	Czas	[min]	35	40	45
	x ₆	pH	[-]	2,3	3,3	4,3
MAE	x ₇	Temperatura	[°C]	40	50	60
	x ₈	Moc mikrofal	[W]	70	140	210
	x ₉	pH	[-]	2	6	10
UMAE	x ₁₀	Czas	[min]	5	15	25
	x ₁₁	Moc mikrofal	[W]	70	140	210
	x ₁₂	pH	[-]	2	6	10

Dla każdej z badanych metod ekstrakcji, na podstawie analizy literaturowej oraz przeprowadzonych badań wstępnych, wybrano odpowiednie zmienne niezależne wraz z zakresami ich wartości, a następnie oceniono wpływ ich zmienności na wydajność procesu pozyskiwania polifenoli. Parametrami wejściowymi dla techniki LSE i UAE była temperatura, czas trwania procesu oraz pH medium ekstrakcyjnego. W metodzie wspomaganiej promieniowaniem mikrofalowym (MAE) analizowano wpływ temperatury, mocy promieniowania mikrofalowego oraz pH. Natomiast w przypadku ekstrakcji UMAE badano znaczenie czasu działania ultradźwięków, mocy promieniowania mikrofalowego oraz pH układu ekstrakcyjnego. Zmienną zależną we wszystkich metodach była całkowita zawartość polifenoli (y_1 , y_2 , y_3 , y_4). Szczegółowy plan eksperymentu, obejmujący wartości zmiennych niezależnych i otrzymane dla nich wyniki, przedstawiono w **Tabeli 5**.

Tabela 5. Plan eksperymentu i wartości zmiennej zależnej uzyskane dla ekstrakcji LSE, UAE, MAE i UMAE.

Metoda ekstrakcji	Numer próbek	Zmienne niezależne			Zmienna zależna
		x ₁	x ₂	x ₃	y ₁
LSE	1	35	25	2,2	0,378 ± 0,002
	2	35	30	3,2	0,498 ± 0,001
	3	35	35	2,7	0,546 ± 0,004
	4	40	25	3,2	0,490 ± 0,001
	5	40	30	2,7	0,479 ± 0,002
	6	40	35	2,2	0,466 ± 0,014
	7	45	25	2,7	0,563 ± 0,004
	8	45	30	2,2	0,453 ± 0,004
	9	45	35	3,2	0,563 ± 0,011
	10	40	30	2,7	0,479 ± 0,008
		x ₄	x ₅	x ₆	y ₂
UAE	1	35	35	2,3	0,332 ± 0,001
	2	35	40	4,3	0,603 ± 0,012
	3	35	45	3,3	0,565 ± 0,002
	4	40	35	4,3	0,444 ± 0,001
	5	40	40	3,3	0,623 ± 0,014
	6	40	45	2,3	0,596 ± 0,003
	7	45	35	3,3	0,410 ± 0,006
	8	45	40	2,3	0,533 ± 0,003
	9	45	45	4,3	0,563 ± 0,008
	10	40	40	3,3	0,611 ± 0,002
		x ₇	x ₈	x ₉	y ₃
MAE	1	40	70	2	0,528 ± 0,002
	2	50	210	2	0,539 ± 0,002
	3	60	140	2	0,553 ± 0,002
	4	40	210	6	0,552 ± 0,001
	5	50	140	6	0,550 ± 0,002
	6	60	70	6	0,561 ± 0,005
	7	40	140	10	0,551 ± 0,001
	8	50	70	10	0,548 ± 0,002
	9	60	210	10	0,565 ± 0,001

	10	50	140	6	0,555 ± 0,001
		x ₁₀	x ₁₁	x ₁₂	y ₄
UMAE	1	5	70	2	0,566 ± 0,002
	2	5	210	6	0,591 ± 0,001
	3	5	140	10	0,638 ± 0,011
	4	15	210	2	0,559 ± 0,002
	5	15	140	6	0,635 ± 0,001
	6	15	70	10	0,617 ± 0,002
	7	25	140	2	0,551 ± 0,003
	8	25	70	6	0,591 ± 0,003
	9	25	210	10	0,601 ± 0,004
	10	15	140	6	0,610 ± 0,001

W **Tabeli 6** przedstawiono oszacowania parametrów modelu liniowego uwzględniającego efekty główne i interakcje dwuczynnikowe oraz modelu kwadratowego. Przeprowadzona analiza wariancji (**Tabela 7**) pozwoliła statystycznie potwierdzić istotny wpływ niektórych zmiennych niezależnych oraz ich interakcji na całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach przy przyjętym poziomie istotności ($\alpha = 5\%$). Czynniki o wartości $p < \alpha$ uznano za istotne statystycznie. Zarówno w przypadku metody LSE, jak i MAE istotny statystycznie okazał się wpływ wszystkich badanych parametrów oraz ich interakcji. W przypadku ekstrakcji wspomagananej ultradźwiękami (UAE) temperatura (x_4) w funkcji liniowej nie wykazała statystycznie znaczącego wpływu na wydajność procesu. Natomiast dla techniki UMAE kluczowe okazały się wszystkie zmienne oprócz mocy promieniowania mikrofalowego (x_{11}) w funkcji liniowej. Współczynnik determinacji dla poszczególnych metod ekstrakcji wynosił 0,9672 (LSE), 0,9758 (UAE), 0,9372 (MAE) oraz 0,9257 (UMAE).

Tabela 6. Wartości współczynników modelu aproksymującego dla ekstrakcji LSE, UAE, MAE and UMAE.

Metoda ekstrakcji	Czynnik	Efekt	Błąd standardowy	p
LSE	Średnia/Stała	0,49125	0,00116	0,00000
	x ₁ (L)	0,05201	0,00299	0,00000
	x ₂ (L)	0,04775	0,00299	0,00000
	x ₃ (L)	0,08463	0,00299	0,00000
	x ₁ (L)x ₂ (L)	-0,11959	0,00448	0,00000
	x ₁ (L)x ₃ (L)	0,03785	0,00448	0,00000
	x ₂ (L)x ₃ (L)	0,03360	0,00448	0,00000
UAE	Średnia/Stała	0,62487	0,00293	0,00000
	x ₄ (L)	0,00225	0,00362	0,54129
	x ₄ (Q)	-0,09733	0,00586	0,00000
	x ₅ (L)	0,17930	0,00362	0,00000
	x ₅ (Q)	-0,19307	0,00586	0,00000
	x ₆ (L)	0,05000	0,00362	0,00000
	x ₆ (Q)	-0,03280	0,00586	0,00002
MAE	Średnia/Stała	0,55021	0,00049	0,00000
	x ₇ (L)	0,01584	0,00125	0,00000
	x ₈ (L)	0,00650	0,00125	0,00004
	x ₉ (L)	0,01454	0,00125	0,00000
	x ₇ (L)x ₈ (L)	-0,01418	0,00188	0,00000
	x ₇ (L)x ₉ (L)	-0,00426	0,00188	0,03443
	x ₈ (L)x ₉ (L)	0,01241	0,00188	0,00000
UMAE	Średnia/Stała	0,62013	0,00295	0,00000
	x ₁₀ (L)	-0,01749	0,00364	0,00009
	x ₁₀ (Q)	-0,02048	0,00589	0,00227
	x ₁₁ (L)	-0,00745	0,00364	0,05340
	x ₁₁ (Q)	-0,03360	0,00589	0,00001
	x ₁₂ (L)	0,06004	0,00364	0,00000
	x ₁₂ (Q)	-0,02686	0,00589	0,00017

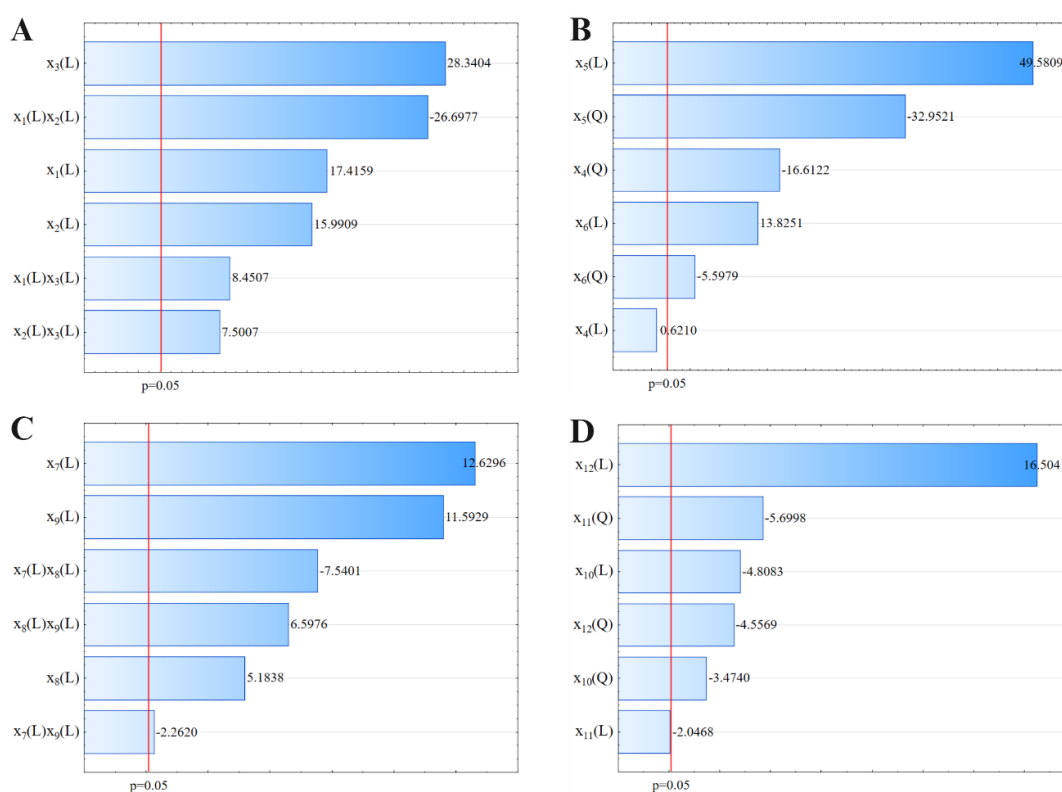
Tabela 7. Tabela ANOVA dla modelu opisującego ekstrakcję LSE, UAE, MAE i UMAE.

Metoda ekstrakcji	Czynnik	SS	df	MS	F	p	R ² /R ² _{sk.}
LSE	x ₁ (L)	0,01217	1	0,01217	303,3124	0,00000	0,9672 0,9586
	x ₂ (L)	0,01026	1	0,01026	255,7099	0,00000	
	x ₃ (L)	0,03223	1	0,03223	803,1764	0,00000	
	x ₁ (L)x ₂ (L)	0,02860	1	0,02860	712,7690	0,00000	
	x ₁ (L)x ₃ (L)	0,00287	1	0,00287	71,4136	0,00000	
	x ₂ (L)x ₃ (L)	0,00226	1	0,00226	56,2605	0,00000	
	Brak dopas.	0,00199	2	0,00100	24,7954	0,00000	
	Czysty bł.	0,00084	21	0,00004			
	Całk. SS	0,08626	29				
UAE	x ₄ (L)	0,00002	1	0,00002	0,386	0,54129	0,9758 0,9695
	x ₄ (Q)	0,01624	1	0,01624	275,966	0,00000	
	x ₅ (L)	0,14467	1	0,14467	2458,267	0,00000	
	x ₅ (Q)	0,06390	1	0,06390	1085,843	0,00000	
	x ₆ (L)	0,01125	1	0,01125	191,134	0,00000	
	x ₆ (Q)	0,00184	1	0,00184	31,337	0,00002	
	Brak dopas.	0,00519	2	0,00260	44,061	0,00000	
	Czysty bł.	0,00124	21	0,00006			
	Całk. SS	0,26545	29				
MAE	x ₇ (L)	0,00113	1	0,00113	159,5076	0,00000	0,9372 0,9208
	x ₈ (L)	0,00019	1	0,00019	26,8718	0,00004	
	x ₉ (L)	0,00095	1	0,00095	134,3947	0,00000	
	x ₇ (L)x ₈ (L)	0,00040	1	0,00040	56,8528	0,00000	
	x ₇ (L)x ₉ (L)	0,00004	1	0,00004	5,1168	0,03443	
	x ₈ (L)x ₉ (L)	0,00031	1	0,00031	43,5279	0,00000	
	Brak dopas.	0,00005	2	0,00002	3,1518	0,06353	
	Czysty bł.	0,00015	21	0,00001			
	Całk. SS	0,00308	29				
UMAE	x ₁₀ (L)	0,00138	1	0,00138	23,1194	0,00009	0,9257 0,9063
	x ₁₀ (Q)	0,00072	1	0,00072	12,0690	0,00227	
	x ₁₁ (L)	0,00025	1	0,00025	4,1892	0,05340	
	x ₁₁ (Q)	0,00194	1	0,00194	32,4882	0,00001	
	x ₁₂ (L)	0,01622	1	0,01622	272,3836	0,00000	

$x_{12}(Q)$	0,00124	1	0,00124	20,7650	0,00017
Brak dopas.	0,00061	2	0,00031	5,1516	0,01512
Czysty bł.	0,00125	21	0,00006		
Całk. SS	0,02508	29			

Objaśnienia: SS – suma kwadratów, df – stopnie swobody, MS – średnia sumy kwadratów, F – wartość testu F, p – poziom istotności, R^2 – współczynnik determinacji, R^2_{sk} – skorygowany współczynnik determinacji.

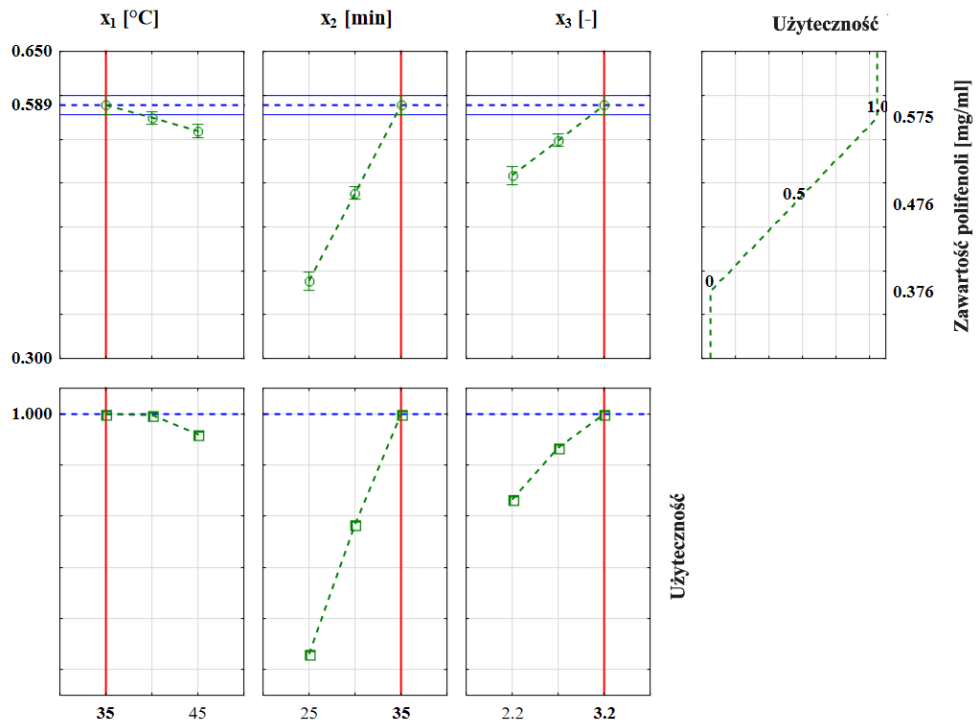
Rysunek 4 stanowi graficzne przedstawienie parametrów wejściowych oraz ich interakcji, które mają największy wpływ na wartość zmiennej zależnej. Wykresy Pareto obrazują czynniki uporządkowane zgodnie z ich znaczeniem, a czerwona linia wskazuje próg istotności na poziomie 95%, powyżej którego efekty uznaje się za istotne statystycznie.



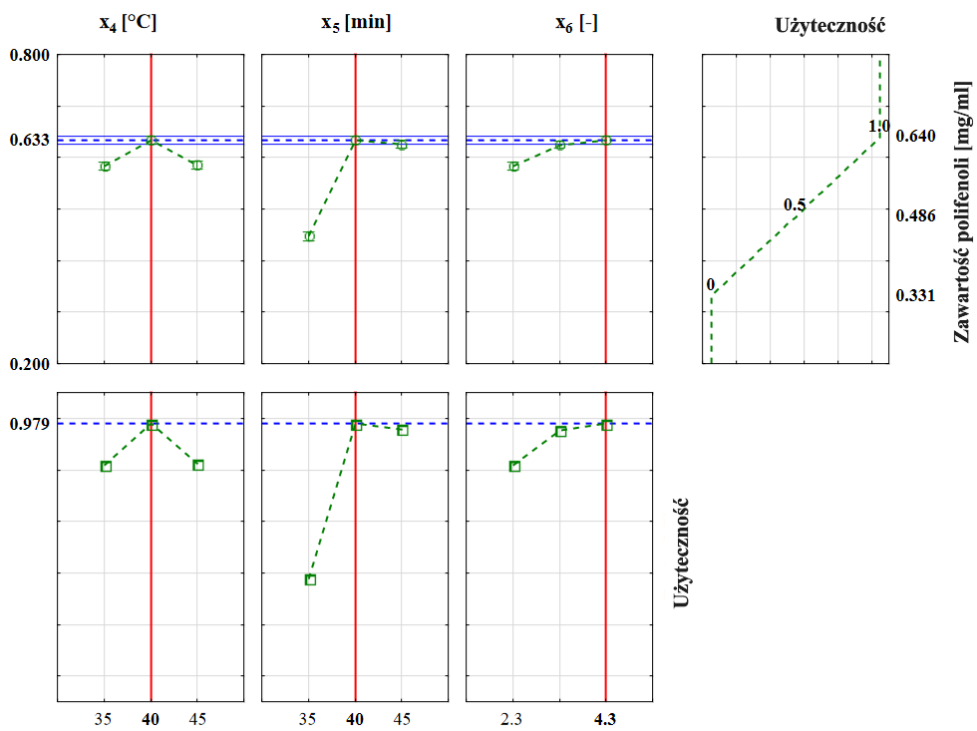
Rysunek 4. Wykresy Pareto dla czterech metod ekstrakcji: (A) LSE, (B) UAE, (C) MAE, (D) UMAE.

Przeprowadzone analizy umożliwiły wyznaczenie profili aproksymacji oraz profili użyteczności dla każdej z badanych metod ekstrakcji, które przedstawiono na **Rysunkach 5-8**. Profile aproksymacji obrazują przewidywane wartości zmiennej zależnej w funkcji zmiennych niezależnych. Natomiast profile użyteczności dostarczają informacji na temat

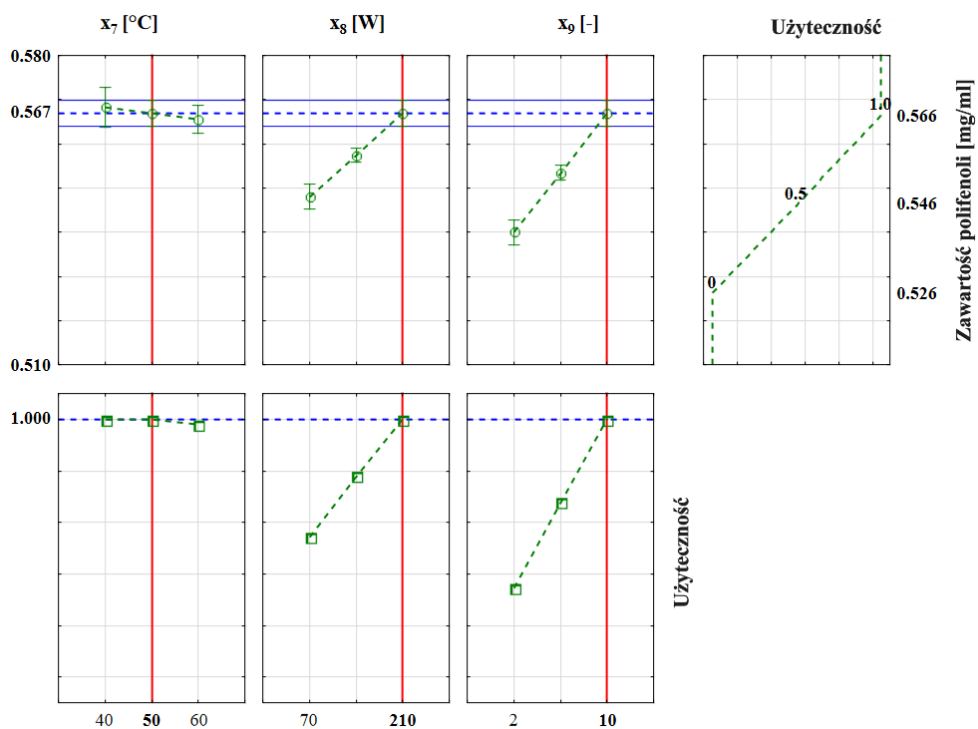
zmiany funkcji użyteczności, będącej miarą efektywności procesu ekstrakcji, w zależności od parametrów wejściowych.



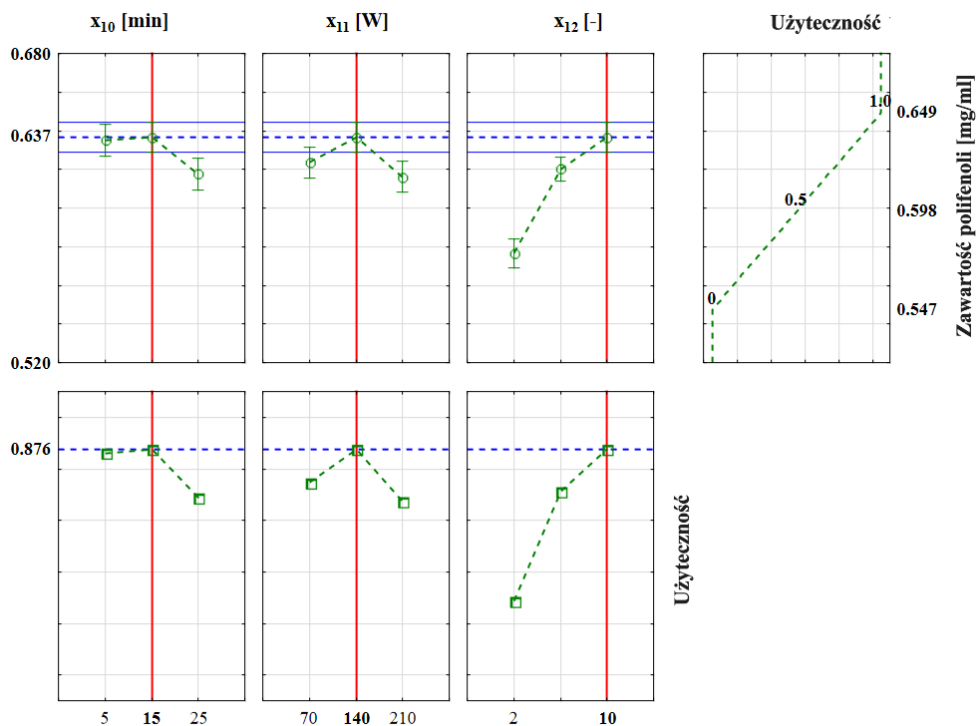
Rysunek 5. Profile aproksymacji i użyteczności dla metody ekstrakcji LSE.



Rysunek 6. Profile aproksymacji i użyteczności dla metody ekstrakcji UAE.



Rysunek 7. Profile aproksymacji i użyteczności dla metody ekstrakcji MAE.



Rysunek 8. Profile aproksymacji i użyteczności dla metody ekstrakcji UMAE.

Profile aproksymacji dla metody ekstrakcji LSE wykazały, że najwyższe stężenie polifenoli ($y_1 = 0,575$ mg/ml) uzyskano przy najniższej temperaturze ogrzewania ($x_1 = 35^\circ\text{C}$), najdłuższym czasie trwania procesu ($x_2 = 35$ minut) oraz najwyższym pH medium ekstrakcyjnego ($x_3 = 3,2$). Jak przedstawiono na wykresie, wzrost temperatury prowadził do stopniowego obniżenia zawartości polifenoli w ekstrakcie. Natomiast wydłużenie czasu trwania procesu oraz zwiększenie pH skutkowało wzrostem analizowanej zmiennej zależnej.

Najwyższą zawartość polifenoli ($y_2 = 0,640$ mg/ml) w ekstrakcie uzyskanym metodą UAE osiągnięto przy centralnej temperaturze procesu ($x_4 = 40^\circ\text{C}$), centralnym czasie trwania ekstrakcji ($x_5 = 40$ minut) oraz najwyższym pH układu ($\text{pH} = 4,3$). Na podstawie profili aproksymacji stwierdzono pozytywny wpływ pH na wartość zmiennej zależnej, przy jednoczesnym obniżeniu wartości parametru po osiągnięciu maksimum na skutek wzrostu temperatury i czasu trwania procesu.

Na podstawie profili aproksymacji dla metody MAE stwierdzono, że korzystne warunki procesu, przy których uzyskano najwyższą zawartość polifenoli ($y_3 = 0,566$ mg/ml), obejmowały centralną wartość temperatury ($x_7 = 50^\circ\text{C}$), najwyższą moc promieniowania mikrofalowego ($x_8 = 210$ W) oraz najwyższe pH medium ($x_9 = 10$). Zmniejszenie temperatury spowodowało nieznaczne obniżenie wartości zmiennej zależnej. Zarówno zwiększenie mocy promieniowania mikrofalowego, jak i podwyższenie pH skutkowało wzrostem stężenia polifenoli w ekstrakcie.

Korzystne parametry ekstrakcji metodą UMAE ($y_4 = 0,649$ mg/ml) obejmowały centralny czas trwania procesu ($x_{10} = 15$ minut), centralną moc promieniowania mikrofalowego ($x_{11} = 140$ W) oraz najwyższą wartość pH układu ($x_{12} = 10$). Wraz ze wzrostem wartości pH obserwowano wyraźne zwiększenie stężenia polifenoli w ekstrakcie. Natomiast maksymalne zwiększenie czasu trwania procesu oraz mocy promieniowania mikrofalowego prowadziło do obniżenia wartości zmiennej zależnej.

Zastosowanie metody planowania eksperymentu pozwoliło na identyfikację istotnych czynników wpływających na przebieg procesu ekstrakcji oraz określenie ich wpływu na zadany parametr wyjściowy. Na podstawie przeprowadzonych analiz dobrano korzystne warunki pozyskiwania substancji aktywnych z fusów kawy dla metody LSE (35°C , 35 minut, pH 3,2), UAE (40°C , 40 minut, pH 4,3), MAE (50°C , 210 W, pH 10) i UMAE (15 minut, 140 W, pH 10).

4.1.2. Analiza HPLC

Ekstrakty otrzymane metodami LSE, UAE, MAE i UMAE o dobranych parametrach procesu, poddano analizie chromatograficznej w celu oznaczenia zawartości głównych substancji aktywnych obecnych w fusach kawowych. Wyznaczone zostało stężenie związków z grupy polifenoli, alkaloidów i hydroksykwasów karboksylowych, tj. kwasu 3-O-kofeinochinowego (3-CQA), kwasu 5-O-kofeinochinowego (5-CQA), kwasu kawowego, kofeiny i kwasu szikimowego. Wyodrębnione anality charakteryzują się między innymi wyraźną aktywnością biologiczną, w tym właściwościami przeciwutleniającymi, przeciwzapalnymi, przeciwdrobnoustrojowymi, a także działaniem fotoochronnym i nawilżającym [105,374–376]. Wyniki analizy chromatograficznej przedstawiono w **Tabeli 8**.

Tabela 8. Zawartość 3-CQA, 5-CQA, kwasu kawowego, kofeiny i kwasu szikimowego w ekstraktach otrzymanych metodami LSA, UAE, MAE i UMAE.

Metoda ekstrakcji	3-CQA	5-CQA	Kwas kawowy	Kofeina	Kwas szikimowy
LSE	271,5 ± 1,1	185,2 ± 1,5	265,3 ± 0,7	543,4 ± 7,1	37,1 ± 1,5
	213,8 ± 2,8	159,8 ± 1,0	252,5 ± 1,2	541,1 ± 8,1	40,4 ± 1,9
UAE	550,4 ± 3,6	284,4 ± 4,4	283,2 ± 0,4	583,7 ± 2,7	39,1 ± 0,5
	382,1 ± 8,4	229,7 ± 1,1	411,5 ± 1,1	589,6 ± 1,8	40,6 ± 0,2
MAE	672,4 ± 8,9	560,9 ± 9,8	320,6 ± 1,3	665,9 ± 1,9	78,1 ± 3,2
	682,4 ± 1,4	559,9 ± 1,0	328,4 ± 1,0	673,4 ± 2,9	81,2 ± 0,8
UMAE	720,6 ± 8,7	543,5 ± 8,2	304,9 ± 7,9	607,7 ± 6,1	86,3 ± 1,7
	729,4 ± 5,9	547,0 ± 12,0	308,7 ± 6,9	614,1 ± 2,3	84,1 ± 2,4

Metoda ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami/promieniowaniem mikrofalowym okazała się najbardziej efektywna w odniesieniu do pozyskiwania pochodnych kwasu chlorogenowego (3-CQA i 5-CQA) oraz kwasu szikimowego, chociaż wiodącym składnikiem wszystkich otrzymanych ekstraktów był kwas 3-O-kofeinochinowy. Zawartość wspomnianych związków aktywnych pozyskanych w konsekwencji zastosowania techniki UMAE wynosiła odpowiednio 1270,3 mg/l i 85,2 mg/l. Wdrożenie koncepcji ekstrakcji łączonej pozwoliło zwiększyć wydajność procesu o 2,6% i 43,1% (3-CQA i 5-CQA) oraz 6,5% i 53,2% (kwas szikimowy) względem odpowiednio metody MAE i UAE. Natomiast w porównaniu do klasycznej techniki ciało stałe-ciecz

efektywność wyodrębniania związków wzrosła o 67,3% oraz 54,5%, co w sposób wyraźny potwierdza zasadność opracowywania i stosowania nowoczesnych metod pozyskiwania substancji aktywnych z zasobów roślinnych. Wszystkie warianty ekstrakcji pozwoliły jednak otrzymać porównywalne zawartości kwasu kawowego i kofeiny, które mieściły się w zakresie 258,9-347,4 mg/l oraz 542,3-669,7 mg/l. Wszystkie związki poddane analizie wykazywały wysokie stężenia.

Natomiast dane literaturowe podają, że ekstrakcja łusek ziaren kawy Arabica z wykorzystaniem metody konwencjonalnej oraz metody wspomaganiej promieniowaniem mikrofalowym umożliwiła pozyskanie kofeiny w stężeniu od 0,64 µg/ml do 0,93 µg/ml [377]. Dodatkowo, badania przeprowadzone na różnych rodzajach komercyjnie dostępnej kawy pozwoliły określić zawartość kwasu chlorogenowego i kwasu kawowego, która w przypadku odmiany Arabica wynosiła odpowiednio 59,45 mg/l oraz 4,07 mg/l [378]. Udowodniono, że stopień palenia ziaren wpływa na zawartość kofeiny i kwasu chlorogenowego, przy czym w kawie jasno palonej stężenia tych związków były równe odpowiednio 196,35 mg/l i 270,93 mg/l [379].

Ponadto przeanalizowano powtarzalność wydzielenia metabolitów z fusów kawowych w dwóch niezależnych procesach prowadzonych przy zastosowaniu czterech metod. Ekstrakty otrzymane techniką UMAE charakteryzowały się najmniejszym rozrzutem zawartości badanych związków, mieszczącym się w przedziale od 0,6 do 2,6%. Z kolei ekstrakcja ultradźwiękami wykazała najwyższą niejednorodność, stężenia kwasu 3-O-kofeinochinowego oraz kwasu kawowego w dwóch seriach różniły się o 30,6% i 31,2%.

Zarówno dostępne dane literaturowe, jak i wyniki przeprowadzonych analiz jednoznacznie potwierdzają wpływ metody ekstrakcji, parametrów procesu, ale także pochodzenia uprawy, gatunku i stopnia palenia ziaren kawy na zawartość i wzajemny stosunek substancji aktywnych w otrzymanej kompozycji [378–382].

Synergiczne działanie ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego w trakcie procesu pozwoliło uzyskać lepszą efektywność metody UMAE. Ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami opiera się na występowaniu zjawiska kawitacji akustycznej, która powoduje rozrywanie ścian komórkowych materiału roślinnego, co umożliwia głębszą penetrację rozpuszczalnika. Natomiast zastosowanie promieniowania mikrofalowego prowadzi do wewnętrznego przegrzania cząsteczek wody, a w konsekwencji naruszenia

struktury komórkowej surowca. Połączenie tych efektów wpływa na zwiększenie międzyfazowego przenoszenia masy poprzez dyfuzję substancji aktywnych [383–385].

4.1.3. Całkowita zawartość polifenoli i flawonoidów oraz aktywność przeciwutleniająca

Ekstrakty otrzymane na drodze czterech technik ekstrakcji (LSE, UAE, MAE i UMAE) scharakteryzowano pod względem całkowitej zawartości polifenoli, flawonoidów oraz aktywności przeciwutleniającej. Oznaczenia parametrów wykonano metodami spektrofotometrycznymi, a wyniki wyrażono jako mg równoważnika kwasu galusowego (GAE)/ml, mg równoważnika kwercetyny (QCE)/ml oraz procent inhibicji reakcji utleniania. Wartości parametrów przedstawiono w **Tabeli 9**.

Tabela 9. Całkowita zawartość polifenoli, flawonoidów oraz aktywność przeciwutleniająca ekstraktów otrzymanych metodami LSE, UAE, MAE i UMAE.

	LSE	UAE	MAE	UMAE
Zawartość polifenoli [mg GAE/ml] ± SD	0,441 ± 0,002	0,491 ± 0,001	0,541 ± 0,003	0,703 ± 0,031
Zawartość flawonoidów [mg QCE/ml] ± SD	2,10 ± 0,209	4,19 ± 0,079	3,61 ± 0,065	6,79 ± 0,383
Aktywność przeciwutleniająca [%inhibicji] ± SD	53,7 ± 7,8	83,2 ± 8,8	32,9 ± 13,3	59,8 ± 7,4

Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami i promieniowaniem mikrofalowym (UMAE) pozwoliła otrzymać najwyższą zawartość związków polifenolowych (0,703 mg GAE/ml) i flawonoidów (6,79 mg QCE/ml). Porównywalne ilości tych związków wyodrębniono natomiast metodą UAE i MAE, gdzie stężenie polifenoli wynosiło odpowiednio 0,491 mg GAE/ml i 0,541 mg GAE/ml, a flawonoidów 4,19 mg QCE/ml i 3,61 mg QCE/ml. Najniższe wartości parametrów zaobserwowano w przypadku ekstraktu otrzymanego techniką LSE (0,441 mg GAE/ml oraz 2,10 mg QCE/ml). Zastosowanie ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego, szczególnie w formie łączonej, pozwoliło na maksymalne zwiększenie efektywności ekstrakcji polifenoli o 37,3% oraz flawonoidów o 69,1% względem metody konwencjonalnej. Dane literaturowe wskazują, że zawartość polifenoli i flawonoidów w fusach kawowych mieści się w zakresie 6,33–28,26 mg GAE/g s.m. oraz 2,11–8,03 mg QCE/g s.m. [386,387].

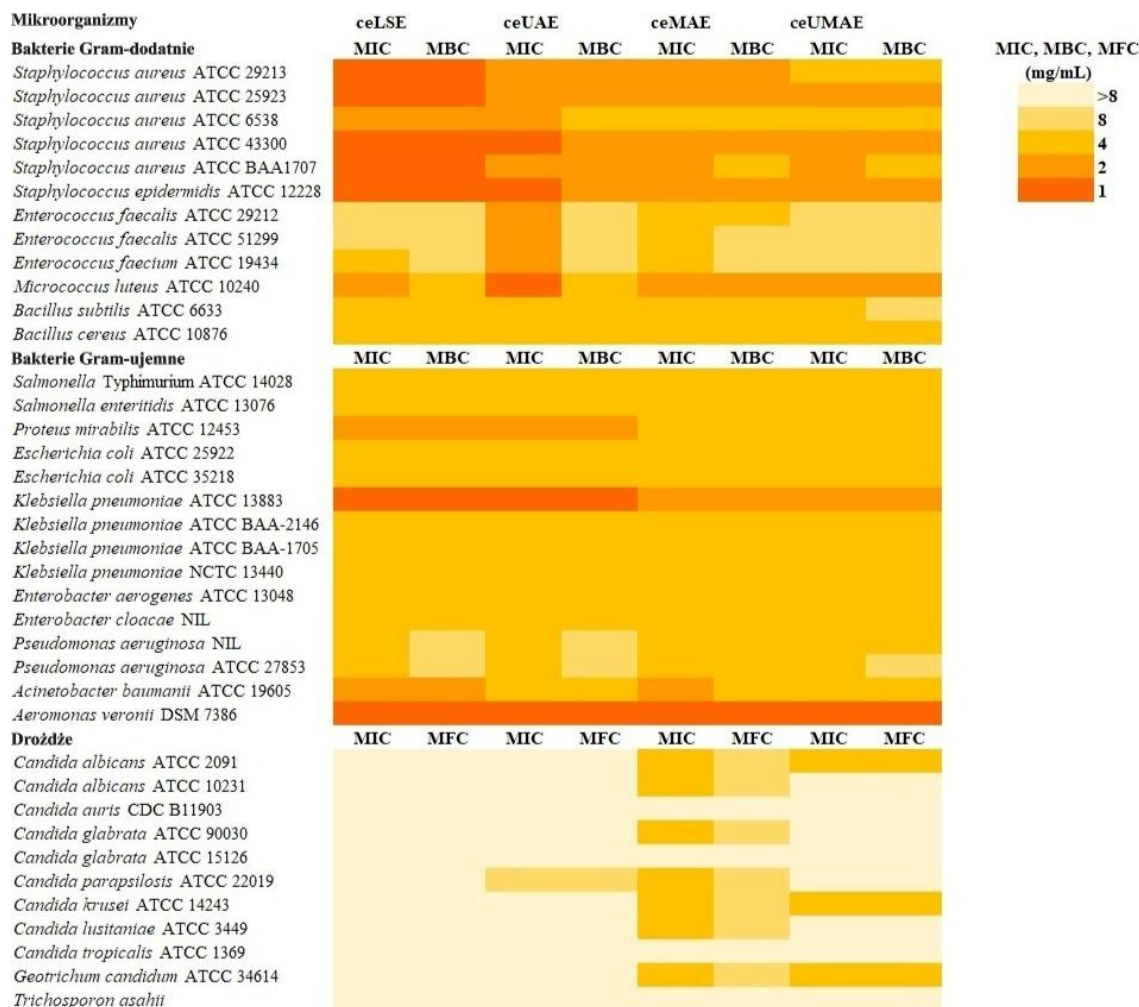
Proces wspomagany ultradźwiękami umożliwił otrzymanie kompozycji o najlepszych właściwościach antyoksydacyjnych, a poziom inhibicji reakcji utleniania osiągnął wartość 83,2%. Podejście to pozwoliło na wyizolowanie mieszaniny o specyficznym składzie, wykazującej unikalną zdolność neutralizacji rodnika DPPH. Co ważne, zastosowanie promieniowania mikrofalowego spowodowało wyraźne obniżenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu, również w przypadku metody UMAE, dla której wartość parametru wyniosła 59,8%. Z tego powodu najniższą skuteczność eliminacji wolnych rodników zaobserwowano dla roztworu otrzymanego metodą MAE (32,9%). Zgodnie z danymi literaturowymi, aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z fusów kawowych mieści się w zakresie od 27,78% do 63,96% inhibicji [388].

Ekstrakt otrzymany metodą UMAE, mimo że charakteryzował się najwyższą całkowitą zawartością polifenoli i flawonoidów, wykazywał jedną z najniższych aktywności przeciwutleniających. Powszechnie przyjmuje się, że ekstrakty uzyskane różnymi metodami ekstrakcji nie są jakościowo jednorodne. Wyższe wartości TPC i TFC niekoniecznie przekładają się na większą aktywność antyoksydacyjną, która zależy przede wszystkim od aktywności biologicznej związków obecnych w ekstrakcie. Mechanizm ekstrakcji MAE może znacząco wpływać na końcowe właściwości ekstraktu. Szybkie nagrzewanie matrycy roślinnej spowodowane działaniem promieniowania mikrofalowego może skutkować degradacją wrażliwych na temperaturę związków fenolowych, które w większym stopniu zachowują swoją strukturę podczas ekstrakcji prowadzonej w łagodniejszych warunkach z użyciem ultradźwięków.

Badania opublikowane w literaturze potwierdzają korzystny wpływ zarówno ultradźwięków, jak i promieniowania mikrofalowego na zwiększenie całkowitej zawartości polifenoli oraz flawonoidów w ekstraktach. Analizowane dane obejmowały szeregu surowców roślinnych, w tym ziaren kawy, odpadów po procesie ich parzenia oraz wybranych gatunków ziół [389–392]. Dostępne są również doniesienia wskazujące na przeciwstawny wpływ ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów w porównaniu z metodami konwencjonalnymi [377,392].

4.1.4. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Badania mikrobiologiczne dla ekstraktów otrzymanych metodami LSE (ceLSE), UAE (ceUAE), MAE (ceMAE) i UMAE (ceUMAE) wykazały zróżnicowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową w kierunku bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz drożdży. Otrzymane wyniki przedstawiono na **Rysunku 9**.



Rysunek 9. Heatmap aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z fusów kawy otrzymanych czterema metodami (ceLSE, ceUAE, ceMAE, ceUMAE) w kierunku bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz drożdży.

Wszystkie analizowane ekstrakty wykazały silniejsze działanie wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (MIC = 1-8 mg/ml) niż wobec szczepów drożdży, dla których wartości MIC mieściły się w zakresie 4->8 mg/ml.

Badania wskazały istotne różnice w aktywności przeciwbakteryjnej pomiędzy ekstraktami ceLSE i ceUAE a ceMAE i ceUMAE. Najsilniejsze działanie dwóch

pierwszych ekstraktów odnotowano wobec szczepów *Staphylococcus* spp. i *Micrococcus luteus* ATCC 10240, dla których wartości MIC wynosiły 1-2 mg/ml. Obie próbki wykazały również porównywalną aktywność przeciwbakteryjną (MIC = 1-2 mg/ml) w kierunku szczepów *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Aeromonas veronii* DSM 7386 i *Proteus mirabilis* ATCC 12453. W przypadku drożdży z rodzaju *Candida* spp., stwierdzono brak wrażliwości na oba ekstrakty (MIC \geq 8 mg/ml).

Próbka ceMAE charakteryzowała się najwyższą aktywnością bakteriobójczą (MBC/MIC \leq 4) wobec sześciu szczepów bakterii Gram-dodatnich: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC BAA-1707, *S. epidermidis* ATCC 12228 i *M. luteus* ATCC 10240 (MIC = 2 mg/ml). Ponadto odnotowano skuteczność wobec trzech szczepów bakterii Gram-ujemnych, którymi były *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19605 i *Aeromonas veronii* DSM 7386 (MIC = 1-2 mg/ml). Ekstrakt wykazał również działanie grzybobójcze (MFC/MIC \leq 4) w kierunku drożdży z rodzaju *Candida* spp. i *G. candidum* (MIC = 4 mg/ml).

Próbka ceUMAE wykazała podobną aktywność wobec pięciu szczepów bakterii Gram-dodatnich, w tym czterech szczepów *Staphylococcus* spp. oraz *M. luteus* ATCC 10240 (MIC = 2 mg/ml), a także dwóch szczepów bakterii Gram-ujemnych: *K. pneumoniae* ATCC 27853 (MIC = 2 mg/ml) i *Aeromonas veronii* DSM 7386 (MIC = 1 mg/ml). Działanie grzybobójcze ekstraktu (MFC/MIC \leq 4) stwierdzono w odniesieniu do drożdży z rodzaju *C. albicans* ATCC 2091, *C. krusei* ATCC 14243 i *G. candidum* ATCC 34614 (MIC = 4 mg/ml).

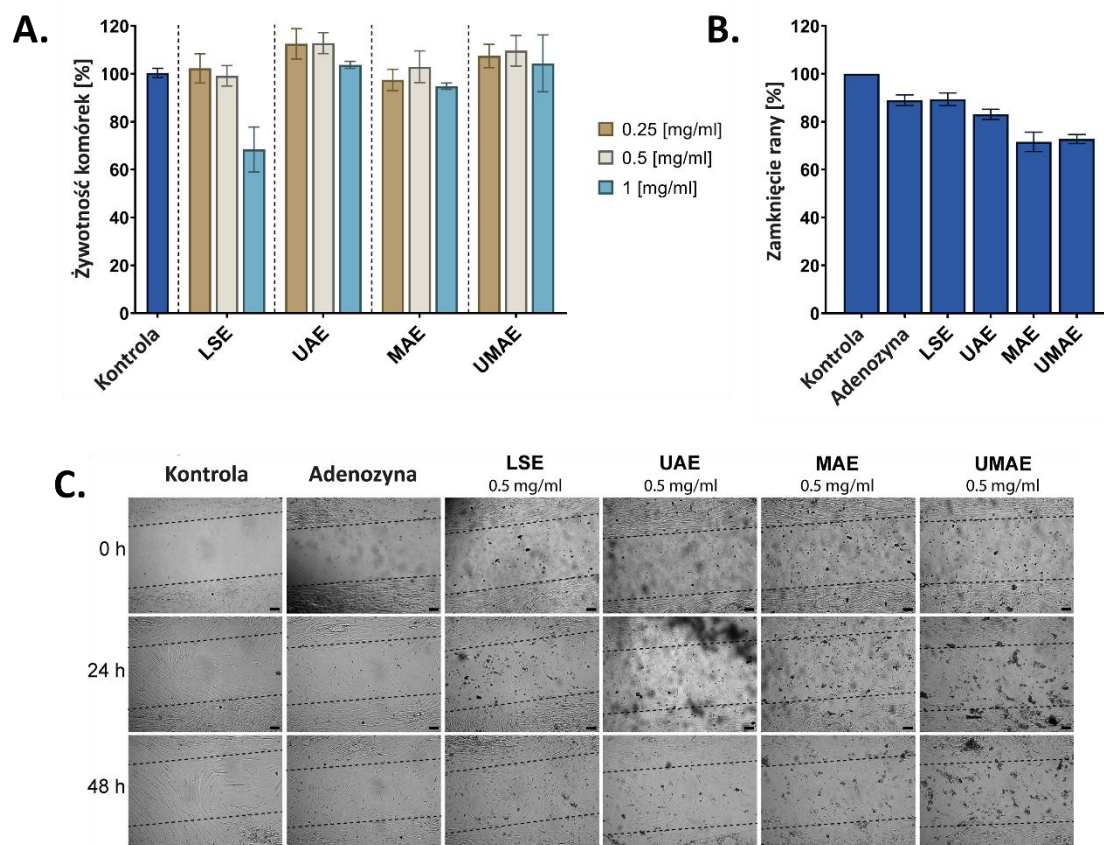
Środki przeciwdrobnoustrojowe klasyfikuje się jako bakteriobójcze lub grzybobójcze, gdy stosunek MBC/MIC lub MFC/MIC wynosi \leq 4 [393]. Wszystkie analizowane ekstrakty wykazały przynajmniej jedną z tych właściwości, współczynnik MBC/MIC mieścił się w zakresie 1-4, natomiast MFC/MIC wynosił od 1 do 2. Właściwości grzybobójcze otrzymanych ekstraktów z fusów kawy, tj. ceMAE i ceUMAE wskazują na ich potencjalną przydatność w leczeniu grzybiczych infekcji skóry.

Rosnąca oporność mikroorganizmów na konwencjonalne środki terapeutyczne, takie jak antybiotyki i chemioterapia, skłania do poszukiwania alternatywnych strategii leczenia opartych na naturalnych związkach chemicznych. Ekstrakty roślinne

pozyskiwane różnymi metodami cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na udokumentowane właściwości przeciwbakteryjne [394].

4.1.5. Cytotoksyczność i migracja komórek

Ekstrakty z fusów kawy poddano również analizie biologicznej w celu oceny ich działania toksycznego wobec komórek wzorcowych oraz określenia wpływu na ich migrację (**Rysunek 10**).



Rysunek 10. Badania biologiczne dla ekstraktów otrzymanych metodami LSE, UAE, MAE i UMAE. (A) Cytotoksyczność ekstraktów względem komórek NHDF. (B) Migracja komórek NHDF po 48 godzinach inkubacji z ekstraktami i adenozyną (kontrola pozytywna). (C) Wpływ ekstraktów i adenozyny na migrację komórek NHDF.

Analizę cytotoksyczności przeprowadzono przy zastosowaniu normalnych ludzkich fibroblastów skórnych (NHDF). Komórki NHDF inkubowano z ekstraktami z fusów kawy przez 72 godziny, po czym oceniono ich żywotność. W tym celu wykonano test MTS, oparty na pomiarze aktywności enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej, który redukuje związek tetrazolowy do barwnego produktu, jakim jest formazan. Żadna z badanych próbek, z wyjątkiem jednej, nie wykazała działania hamującego na wzrost

fibroblastów. Wskaźniki przeżywalności, przedstawione na **Rysunku 10A**, przyjęły wartości powyżej 90%. Wyjątek stanowił ekstrakt otrzymany metodą LSE o stężeniu 1 mg/ml, który obniżył przeżywalność komórek do poziomu powyżej 60%. Pozostałe próbki nie wykazały właściwości cytotoksycznych, a w większości przypadku zaobserwowano ich stymulujący wpływ na proliferację komórek.

W związku ze stymulującym wpływem ekstraktów na wzrost fibroblastów NHDF, przeprowadzono badanie ich potencjału we wspomaganie migracji komórek („gojenia rany”). W tym celu zastosowano szalki wyposażone w silikonowe wkładki o ściśle określonych wymiarach, które zabezpieczały obszar symulowanej rany przed przyleganiem komórek. Przed rozpoczęciem badania fibroblasty poddano działaniu mitomycyny C, która zahamowała ich proliferację, co umożliwiło obserwację wyłącznie procesu migracji. Adenozyna, będąca związkami o udokumentowanym działaniu przyspieszającym gojenie ran, została użyta jako kontrola pozytywna [395,396]. Fibroblasty inkubowano z ekstraktami przez 48 godzin, a obszar rany monitorowano w stałych odstępach czasowych. **Rysunek 10B** przedstawia ilościową analizę wyników, natomiast **Rysunek 10C** zawiera obrazy mikroskopowe badanego obszaru, wyznaczonego linią przerywaną. Otrzymane wyniki wskazują na zdolność ekstraktów do stymulowania migracji komórek na poziomie zbliżonym z kontrolą pozytywną. Dla każdej z próbek wskaźnik zamknięcia rany przekroczył 70%, co wspiera koncepcję ich potencjalnego zastosowania w produktach leczniczych, zwłaszcza o przeznaczeniu dermatologicznym.

Podsumowanie:

Ekstrakt, otrzymany metodą UMAE i stanowiący potencjalny bio-czynnik sieciujący, charakteryzował się najwyższą zawartością pochodnych kwasu chlorogenowego (1270,3 mg/l), jedną z wyższych wartości stężenia kofeiny (610,9 mg/l) i kwasu kawowego (306,8 mg/l) oraz najwyższą całkowitą zawartością polifenoli (0,703 mg GAE/ml) i flawonoidów (6,79 mg QCE/ml). Ponadto ekstrakt UMAE wykazał najlepsze właściwości przeciwutleniające, potwierdzoną aktywność przeciwdrobnoustrojową przy jednoczesnym braku działania cytotoksycznego i promującym wpływie na migrację komórek NHDF. W związku z tym ekstrakt otrzymany techniką wspomaganą ultradźwiękami/promieniowaniem mikrofalowym (UMAE) zastosowano w dalszych

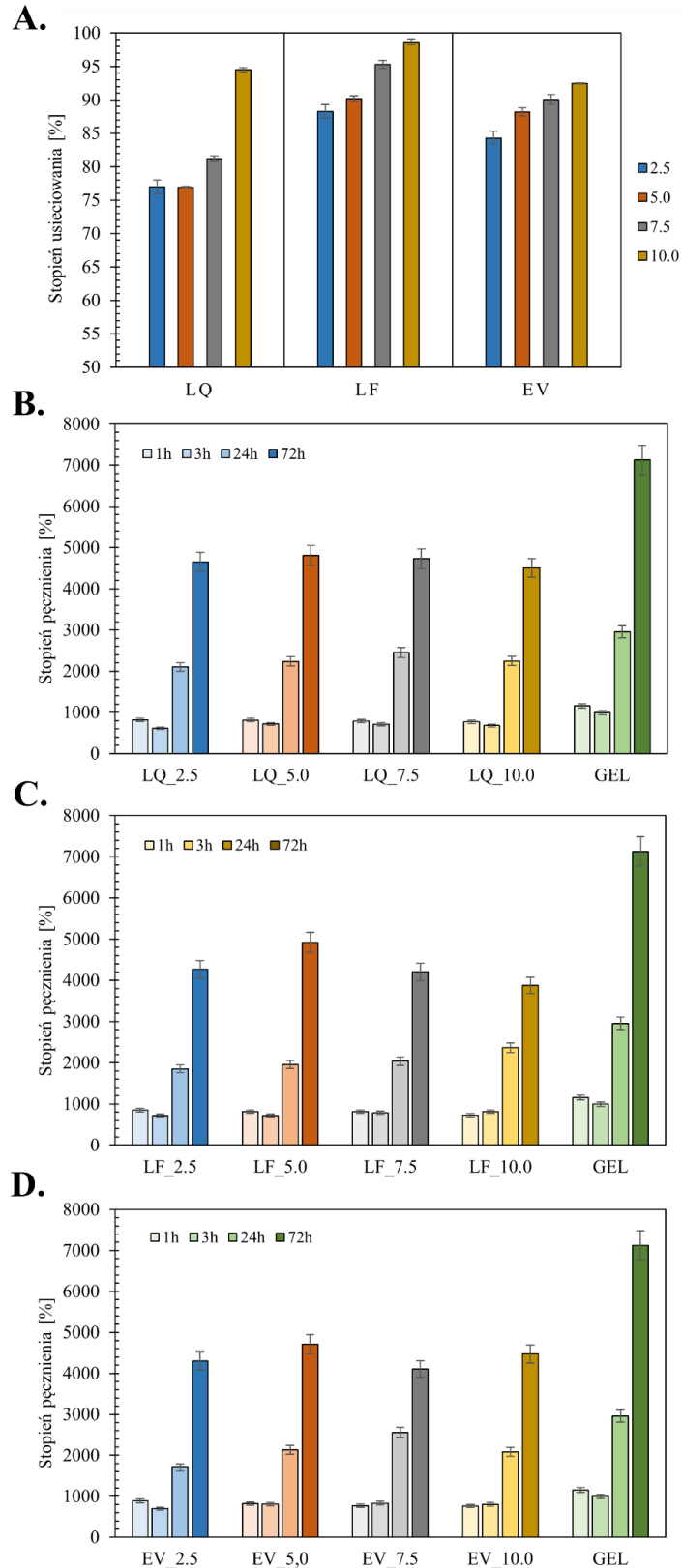
etapach badań, które polegały między innymi na opracowaniu metody sieciowania chemicznego żelatyny.

Zbadano wpływ ekstraktu w postaci ciekłej, liofilizowanej i odparowanej na wyparce próżniowej na właściwości sieciujące materiału polimerowego. Następnie dobrano skład kompozycji, tak aby otrzymać hydrożel charakteryzujący się wysokim stopniem usieciowania, korzystnymi właściwościami mechanicznymi i termicznymi.

4.2. Opracowanie metody otrzymywania bazowego materiału hydrożelowego

4.2.1. Stopień usieciowania i pęcznienia

Rysunek 11A przedstawia wykres stopnia usieciowania hydrożeli zawierających bio-czynnik sieciujący w formie ciekłej (LQ), liofilizowanej (LF) oraz odparowanej na wyparce próżniowej (EV). Ponadto dane dotyczące właściwości absorpcyjnych, opisanych stopniem pęcznienia, umieszczono na **Rysunku 11B-D**.



Rysunek 11. (A) Stopień usieciowania oraz (B-D) stopień pęcznienia materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości (2.5, 5.0, 7.5 i 10.0) bio-czynnika sieciującego: (B) LQ, (C) LF i (D) EV, oraz materiału referencyjnego: GEL.

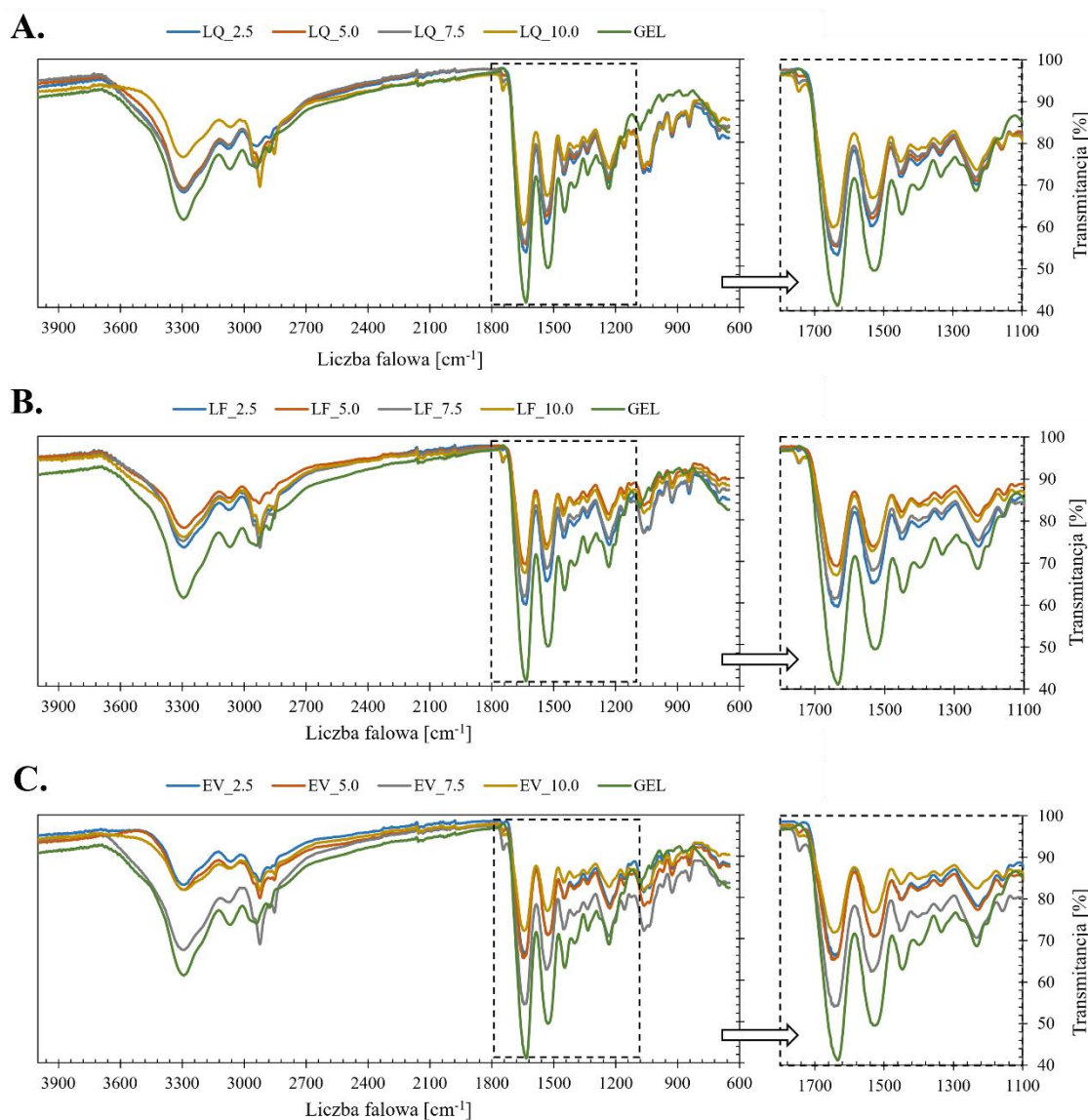
Stopień usieciowania hydrożeli określono poprzez wyznaczenie różnicy w ilości wolnych grup ϵ -aminowych obecnych w materiale referencyjnym oraz próbkach zawierających ekstrakt z odpadów kawowych [368,369]. W sposób wyraźny zaobserwowano stopniowy wzrost wartości parametru wraz z rosnącą zawartością bioczynnika sieciującego (LQ, LF, EV). W każdym przypadku najwyższym stopniem usieciowania charakteryzował się hydrożel poddany modyfikacji maksymalną ilością ekstraktu. Porównując jednak zastosowane formy czynnika sieciującego, najwyższą stabilnością odznaczała się próbka LF_10.0, dla której analizowany parametr wyniósł 98,7%.

Badania w wodzie destylowanej (pH 6,6) pozwoliły na określenie właściwości absorpcyjnych hydrożeli poprzez wyznaczenie stopnia pęcznienia. Dla wszystkich analizowanych materiałów odnotowano znaczny wzrost wartości parametru w czasie, co jest ściśle związane z charakterem zastosowanego biopolimeru. Żelatyna stanowi hydrofilowe białko, które silnie oddziałuje z cząsteczkami wody absorbując wielokrotność swojej suchej masy [397]. Z tego względu materiał referencyjny odznaczał się najwyższą wartością parametru w każdym punkcie pomiarowym, a po 72 godzinach przyjął wartość 7126%. Przeprowadzenie reakcji sieciowania wpłynęło na ograniczenie stopnia pęcznienia próbek, nastąpiło zwiększenie ich odporności hydrolitycznej w wyniku powstania wiązań kowalencyjnych stabilizujących strukturę polimerową. Maksymalna zawartość liofilizowanego ekstraktu pozwoliła na uzyskanie hydrożelu o niższej zdolności absorpcyjnej (3875%), jednak nadal utrzymującej się na bardzo wysokim poziomie, co kwalifikuje otrzymaną matrycę do potencjalnego zastosowania w obszarze materiałów chłonnych, takich jak opatrunki na rany z wysiękiem [398,399].

4.2.2. Analiza FT-IR

Analiza widm FT-IR pozwoliła określić wpływ zastosowanych ekstraktów na strukturę chemiczną otrzymanych matryc hydrożelowych oraz umożliwiła potwierdzenie reakcji sieciowania chemicznego żelatyny.

Widma FT-IR dla materiałów hydrożelowych usieciowanych zmienną ilością bioczynnika sieciującego (LQ, LF i EV) przedstawiono na **Rysunku 12A-C**.



Rysunek 12. Widma FT-IR materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości (2.5, 5.0, 7.5 i 10.0) bio-czynnika sieciującego: (A) LQ, (B) LF i (C) EV, oraz materiału referencyjnego: GEL.

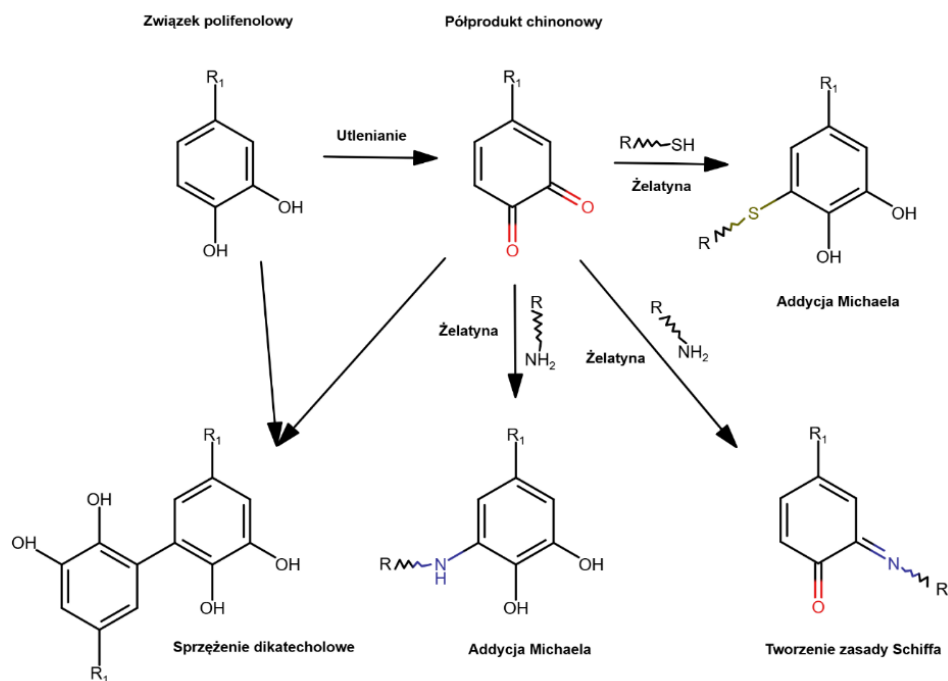
Na wszystkich widmach FT-IR otrzymanych dla materiałów hydrożelowych, zarówno zawierających czynnik sieciujący, jak i bez jego dodatku, zaobserwowano charakterystyczne pasma absorpcyjne dla struktury białka, takie jak amid A (drżania rozciągające N-H i O-H), amid I (drżania rozciągające C-O i C-N oraz zginające N-H), amid II (drżania zginające N-H i rozciągające C-N) oraz amid III (drżania rozciągające C-N i C-O oraz zginające N-H i O=C-N) [400–402]. W materiale referencyjnym powyższe pasma były widoczne odpowiednio przy następujących liczbach falowych: 3292 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} , 1526 cm^{-1} i 1233 cm^{-1} . Zastosowanie bio-czynników sieciujących

LQ, LF i EV spowodowało przesunięcie pasm absorpcyjnych w stronę wyższych liczb falowych. Sieciowanie ekstraktem LQ spowodowało pojawienie się pasm absorpcyjnych w zakresie 1634-1645 cm^{-1} dla amidu I, 1531-1538 cm^{-1} dla amidu II oraz 1231-1233 cm^{-1} dla amidu III. Bio-czynnik sieciujący w formie liofilizowanej pozwolił na otrzymanie hydrożeli, które charakteryzują się występowaniem pasm absorpcyjnych przy następujących zakresach liczb falowych: 1635-1645 cm^{-1} , 1531-1537 cm^{-1} oraz 1231-1235 cm^{-1} . Z kolei zastosowanie ekstraktu EV spowodowało pojawienie się pasm odpowiadających strukturze amidu I przy 1635-1645 cm^{-1} , amidu II przy 1531-1537 cm^{-1} , a amidu III przy 1231-1235 cm^{-1} . Położenie pasma amidu A nie uległo znaczącej zmianie, a przesunięcie w kierunku liczby falowej 3295 cm^{-1} oraz 3296 cm^{-1} zaobserwowano dla próbek uzyskanych przy użyciu ekstraktu LF i EV. Ponadto zmienna zawartość każdego z analizowanych bio-czynników sieciujących wpłynęła na stopniowe zmniejszenie intensywności pasm odpowiadających strukturze amidu I, II i III oraz amidu A. Dodatkowo w przypadku struktury amidu A zaobserwowano mniejszą szerokość pasma przy zakresie liczb falowych 3292-3296 cm^{-1} , co wynika prawdopodobnie z obecności ekstraktów. Opisane zmiany sugerują, że struktura chemiczna żelatyny uległa modyfikacji poprzez udział grup aminowych w reakcji sieciowania z utworzeniem wiązań chemicznych. Ograniczenie intensywności pasm wskazuje na możliwość przekształcenia lub zaangażowania części struktur charakterystycznych dla makrocząsteczki białka w nowe wiązania o charakterze stabilizującym i ograniczającym mobilność łańcuchów polimerowych. Zmiany pozycji, intensywności i szerokości pasm amidowych potwierdzają chemiczne usieciowanie żelatyny, co również wskazują dane literaturowe [403,404].

Ponadto dla wszystkich materiałów hydrożelowych zaobserwowano pojawienie się nowych pasm absorpcyjnych przy liczbach falowych z zakresu 843-845 cm^{-1} , 926-928 cm^{-1} i 1157-1159 cm^{-1} , które pochodziły ze struktury bio-czynnika sieciującego i κ -karagenu. Odpowiadają one między innymi drganiom zginającym pochodzącym od wiązań O-H w kwasach karboksylowych, C-H w pierścieniach aromatycznych fenoli, a także drganiom rozciągającym mostków tlenowych, wiązań C-O w 3,6-anhydrogalaktozie oraz wiązań C-O-SO₃ w siarczanie D-galaktozy [400,405]. Dodatkowo dla próbek o wyższej zawartości bio-czynnika sieciującego (LQ_10.0, LF_7.5/10.0, EV_7.5) pojawiło się pasmo przy liczbach falowych z zakresu 1745-1746 cm^{-1} , które odpowiadało drganiom rozciągającym pochodzącym od wiązań C=O w

estrach [400]. Zaobserwowane zmiany z jednej strony mogą wskazywać na utworzenie nowych wiązań estrowych pomiędzy grupami hydroksylowymi żelatyny a grupami karboksylowymi bio-czynnika sieciującego, z drugiej zaś mogą sugerować fizyczne oddziaływanie białka z κ -karagenem oraz związkami obecnymi w ekstrakcie, poprzez tworzenie wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych [406,407].

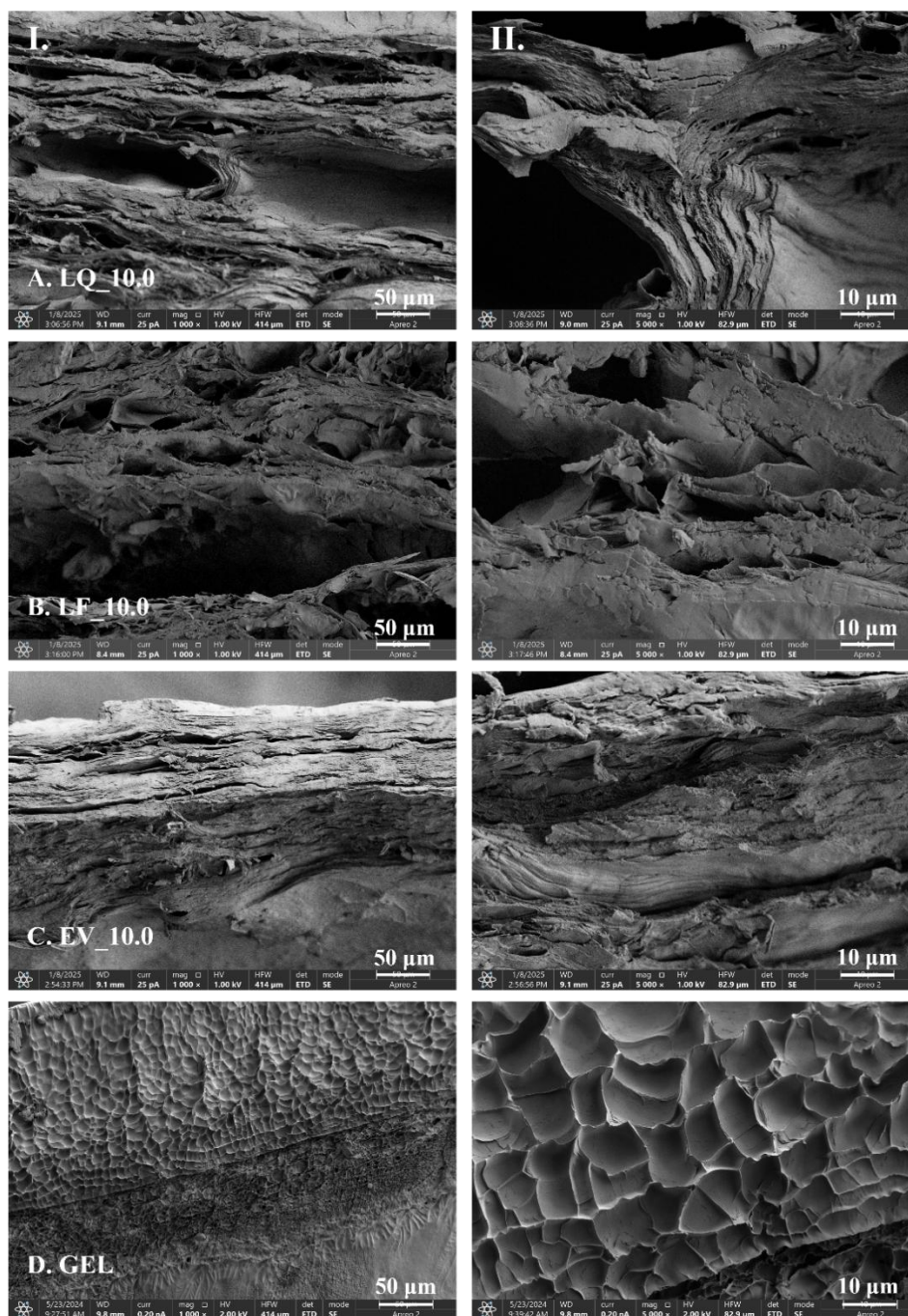
Analiza widm FT-IR potwierdziła występowanie oddziaływań fizycznych, jak i chemicznych pomiędzy żelatyną i ekstraktami zastosowanymi jako bio-czynniki sieciujące, czego efektem było utworzenie usieciowanej struktury polimerowej [402,408,409]. Świadczą o tym zmiany położenia i transmitancji pasm absorpcyjnych charakterystycznych dla struktur białkowych, między innymi amidu I, II, III oraz amidu A. Stabilizacja sieci polimerowej nastąpiła w konsekwencji zajścia reakcji pomiędzy chinonami, czyli utlenionymi postaciami związków polifenolowych, a grupami aminowymi bocznych łańcuchów żelatyny. Dodatkowo można stwierdzić, że udział wiązań estrowych był ograniczony w przebiegu sieciowania chemicznego. Natomiast mechanizm oparty na oddziaływaniach niekowalencyjnych opierał się głównie na wiązaniach wodorowych powstałych pomiędzy grupami hydroksylowymi polifenoli i grupami polarnymi polipeptydu [399,410,411]. Na **Rysunku 13** [412] przedstawiono schemat możliwych ścieżek sieciowania żelatyny w obecności usieciowanych form polifenoli.



Rysunek 13. Schemat możliwych reakcji sieciowania żelatyny przy użyciu utlenionych postaci związków fenolowych [412].

4.2.3. Analiza SEM

Mikrofotografie SEM materiału referencyjnego oraz hydrożeli usieciowanych bioczynnikami sieciującym (LQ, LF i EV) o jego maksymalnej zawartości przedstawiono na **Rysunku 14A-D**.



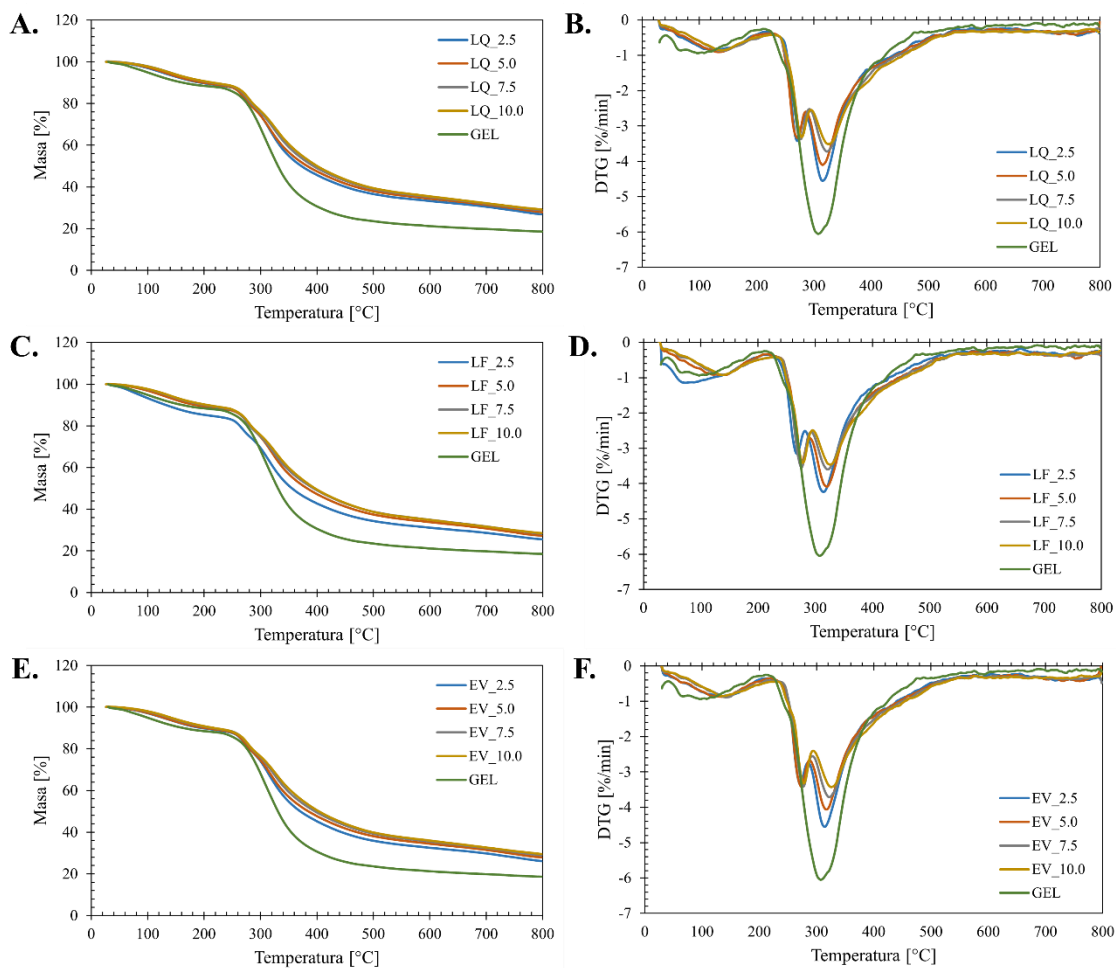
Rysunek 14. Mikrofotografie SEM przekroju poprzecznego materiałów hydrożelowych usieciowanych bio-czynnikiem sieciującym: (A) LQ_10.0, (B) LF_10.0 i (C) EV_10.0, oraz (D) materiału referencyjnego: GEL, wykonane przy powiększeniu: (I) 1 000× oraz (II) 5 000×.

Referencyjna matryca na bazie żelatyny charakteryzowała się wysoce rozwiniętą, porowatą strukturą przekroju poprzecznego. Obecne w próbce GEL otwarte przestrzenie wykazały jednolite rozmieszczenie, regularny i wydłużony kształt oraz wymiary wahające się w przedziale 5-15 μm . Wykonane obrazowanie dodatkowo potwierdziło

zdolność polimeru do absorbowania znacznych ilości płynów, w tym wysięku z rany. Przeprowadzenie procesu sieciowania naturalnym czynnikiem sieciującym wpłynęło na powstanie ścisłej, warstwowej struktury o znacznie zredukowanej porowatości. Otrzymana gęsta sieć wewnętrzna hydrożeli wpłynęła na poprawę stabilności materiałów poprzez ograniczenie ich wrażliwości hydrolytycznej czy zwiększenie odporności termicznej. Podobne obserwacje opisano dla kserożeli żelatynowych, które w konsekwencji przeprowadzenia reakcji sieciowania polifenolami i genipiną utworzyły zwartą strukturę ograniczającą ruchy wolnych łańcuchów polimeru [402].

4.2.4. Analiza TGA

Rysunek 15 przedstawia wyniki analizy termogravimetrycznej (TGA) w postaci krzywych TG i DTG dla materiałów hydrożelowych usieciowanych ekstraktem LQ (A, B), LF (C, D) i EV (E, F). Szczegółowe parametry termiczne, w tym temperatury odpowiadające 5%, 10% i 50% ubytkowi masy ($T_{5\%}$, $T_{10\%}$, $T_{50\%}$), a także wartości temperatur i odpowiadających im ubytków masy dla kolejnych etapów rozkładu (DTG_1 - DTG_3) oraz procenty pozostałości przy $T = 800^\circ\text{C}$, zestawiono w **Tabeli 10**.



Rysunek 15. Krzywe TG/DTG dla materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości (2.5, 5.0, 7.5 i 10.0) bio-czynnika sieciującego: (A, B) LQ, (C, D) LF i (E, F) EV, oraz materiału referencyjnego: GEL.

Tabela 10. Właściwości termiczne materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości (2.5, 5.0, 7.5 i 10.0) bio-czynnika sieciującego LQ, LF i EV, oraz materiału referencyjnego GEL.

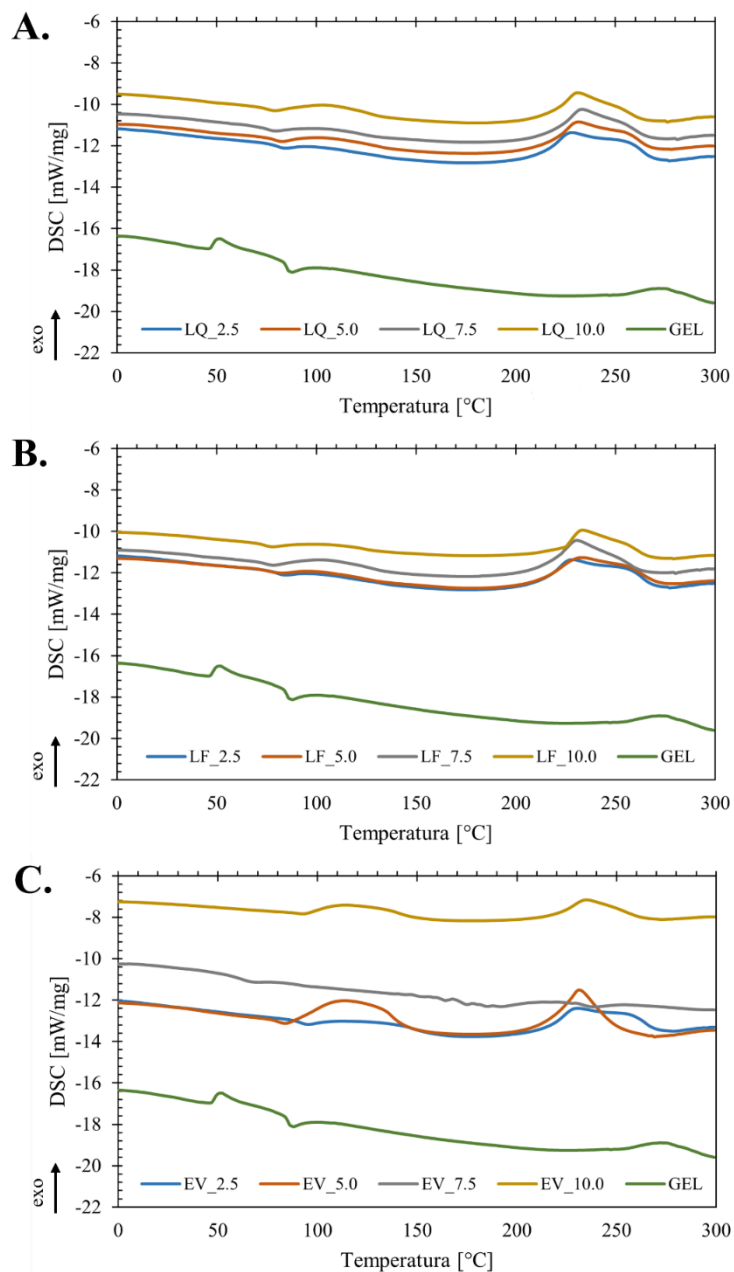
Próbki	T _{5%}	T _{10%}	T _{50%}	DTG ₁	DTG ₂	DTG ₃	Pozostałość w 800°C
	[°C]			[%/min; °C]			[%]
LQ_2.5	123,9	192,7	372,3	-0,89; 129,7	-3,43; 271,3	-4,56; 315,4	26,82
LQ_5.0	128,4	198,0	382,6	-0,91; 134,0	-3,34; 271,7	-4,10; 315,1	27,90
LQ_7.5	137,5	211,3	393,3	-0,87; 136,9	-3,38; 276,8	-3,72; 322,9	28,79
LQ_10.0	137,9	216,9	400,4	-0,86; 138,3	-3,31; 278,9	-3,51; 326,0	29,14
LF_2.5	84,8	132,6	355,4	-1,14; 72,4	-3,15; 267,8	-4,24; 314,6	25,44
LF_5.0	122,1	185,9	382,3	-0,93; 133,9	-3,39; 276,5	-4,09; 320,7	27,17
LF_7.5	131,5	201,1	394,0	-0,92; 139,2	-3,54; 276,1	-3,60; 322,0	28,23
LF_10.0	134,3	205,8	396,4	-0,93; 137,7	-3,41; 278,3	-3,64; 326,0	28,48
EV_2.5	125,2	193,8	370,0	-0,86; 128,2	-3,35; 271,5	-4,55; 313,9	26,02
EV_5.0	126,3	199,2	384,4	-0,87; 134,2	-3,42; 273,4	-4,06; 317,0	27,98
EV_7.5	139,6	215,7	402,6	-0,85; 137,2	-3,32; 277,7	-3,43; 325,7	29,43
EV_10.0	137,7	213,5	396,1	-0,89; 141,2	-3,41; 276,8	-3,71; 321,7	28,81
GEL	98,7	162,2	330,8	-0,94; 97,2	-	-6,05; 307,4	18,57

Przeprowadzone badania potwierdzają znaczne różnice w stabilności materiałów usieciowanych bio-czynnikami sieciującymi w porównaniu do próbki referencyjnej. Ponadto wzrost zawartości każdego z zastosowanych ekstraktów spowodowała stopniowy wzrost odporności termicznej oraz końcowej pozostałości materiałów w T = 800°C. Wskazuje to na lepszą stabilność termiczną hydrożeli na skutek silniejszego usieciowania chemicznego łańcuchów polipeptydowych żelatyny w obecności ekstraktów LQ, LF i EV.

Dodatek bio-czynników sieciujących spowodował zmianę charakteru procesu degradacji z dwustopniowego dla próbki referencyjnej na trzystopniowy dla analizowanych materiałów usieciowanych. Początkowy ubytek masy, obserwowany w zakresie temperatur wynoszących 40-200°C, wynika głównie z odparowania wody i substancji lotnych. Przesunięcie maksimum pików pierwszego etapu rozkładu do wyższych temperatur w porównaniu z próbką referencyjną związane jest z utworzeniem bardziej zwartej i usieciowanej struktury hydrożeli. Zastosowanie ekstraktów umożliwiło otrzymanie materiałów o ograniczonej zdolności wiązania płynów, których odparowanie przebiega wolniej i w wyższych temperaturach [413,414]. Przedstawione wyniki pozostają spójne z analizą stopnia usieciowania i właściwości absorpcyjnych, zgodnie z którymi dodatek ekstraktu doprowadził do utworzenia zwartej struktury polimerowej o obniżonym stopniu pęcznienia. Drugi etap rozkładu, niewidoczny w próbce odniesienia, występuje w zakresie $T = 260-300^{\circ}\text{C}$ i jest związany z termiczną degradacją łańcuchów polisacharydowych κ -karagenu oraz związków bioaktywnych obecnych w ekstraktach [415,416]. Główny etap degradacji zarówno dla próbki odniesienia, jak i materiałów usieciowanych odpowiada przede wszystkim denaturacji sieci peptydowej [417]. W przypadku niemodyfikowanej żelatyny szeroki pik o dużej intensywności pojawił się w zakresie $T = 210-380^{\circ}\text{C}$. Istotne zmiany w przebiegu krzywej DTG zaobserwowano dla materiałów usieciowanych ekstraktami LQ, LF i EV. Okazało się, że rozkład nastąpił w temperaturach od 300°C do 360°C, a maksimum pików przesunęło się z $T = 307^{\circ}\text{C}$ (próbka referencyjna) do maksymalnie $T = 326^{\circ}\text{C}$ w próbkach LQ_10.0 i LF_10.0. Wzrost zawartości bio-czynników sieciujących w hydrożelach spowodował zmniejszenie ich ubytku masy oraz stopniowe zwiększenie temperatury $T_{10\%}$, co świadczy o zwiększeniu stopnia usieciowania oraz poprawie stabilności termicznej materiałów.

4.2.5. Analiza DSC

Rysunek 16 przedstawia wyniki analizy kalorymetrycznej w postaci krzywych DSC dla materiałów hydrożelowych usieciowanych ekstraktem LQ (A), LF (B) i EV (C).



Rysunek 16. Krzywe DSC dla materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości (2.5, 5.0, 7.5 i 10.0) bio-czynnika sieciującego: (A) LQ, (B) LF i (C) EV, oraz materiału referencyjnego: GEL.

Przebieg krzywych DSC dla materiałów usieciowanych bio-czynnikiem sieciującym wykazał istotne różnice w porównaniu z materiałem referencyjnym. Efekt termiczny obserwowany w temperaturze 48°C można odnieść do przemiany szklistej bloków α -aminokwasów w łańcuchu peptydowym żelatyny [418]. Zastosowanie chemicznego usieciowania polimeru oraz dodatku κ -karagenu spowodowało przesunięcie temperatury zeszklenia do wyższych wartości w zakresie $T = 80\text{-}86^\circ\text{C}$ dla próbki z ekstraktem LQ,

$T = 78-84^{\circ}\text{C}$ dla LF i $T = 84-95^{\circ}\text{C}$ dla EV. Opisana zmiana wynikała przede wszystkim z ograniczenia mobilności łańcuchów polimerowych na skutek stabilizującego działania czynników sieciujących oraz obecności polimeru pomocniczego [419,420]. W przypadku niemodyfikowanej żelatyny zaobserwowano dodatkowo efekt endotermiczny w temperaturze 88°C , który można powiązać z przejściem uporządkowanej struktury spiralnej białka do formy nieuporządkowanej [421]. Efekt egzotermiczny występujący przy $T = 272^{\circ}\text{C}$ odpowiada termicznej degradacji żelatyny [422]. Krzywe DSC dla próbek zawierających ekstrakt z kawy nie wykazały obecności tych efektów, co może świadczyć o chemicznym usieciowaniu żelatyny. Natomiast dla tych hydrożeli zaobserwowano egzotermiczny efekt w zakresie $T = 228-235^{\circ}\text{C}$, który odpowiadał termicznemu rozkładowi κ -karagenu oraz bioaktywnych składników ekstraktów. Efekt ten uległ przesunięciu w kierunku wyższych temperatur wraz ze wzrostem zawartości bio-czynnika sieciującego [423,424]. Wyniki analizy potwierdzają, że zastosowanie czynników sieciujących obecnych w ekstraktach z kawy przyczynia się do poprawy stabilności termicznej białka. W przeciwieństwie do materiału modyfikowanego, żelatyna niemodyfikowana ulega denaturacji i degradacji w niższym zakresie temperatur, co może świadczyć jedynie o jej fizycznym usieciowaniu.

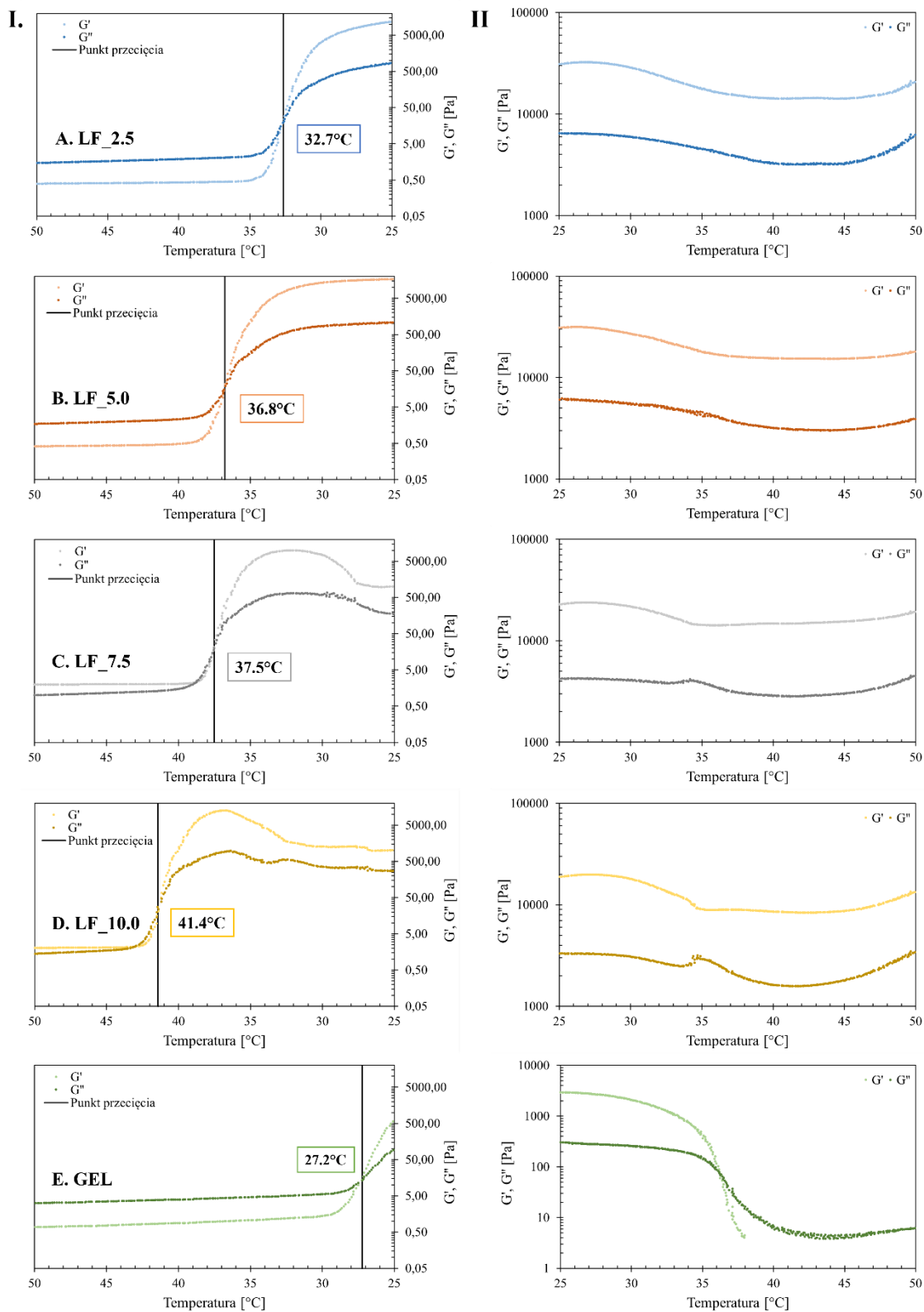
Podsumowanie:

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły wybrać najbardziej efektywny ekstrakt z kawy jako bio-czynnik sieciujący do dalszych etapów pracy. Okazało się, że hydrożele usieciowane z wykorzystaniem ekstraktu LF (poddanego liofilizacji) charakteryzowały się najwyższym stopniem usieciowania (88,3%, 90,2%, 95,3% i 98,7%), strukturą stabilizowaną wiązaniami chemicznymi oraz wysoką stabilnością termiczną. Dlatego też, próbki LF_2.5, LF_5.0, LF_7.5 i LF_10.0 poddano dalszym badaniom w celu określenia końcowego składu kompozycji matrycy bazowej.

Dla wybranych mieszanin reakcyjnych oraz usieciowanych hydrożeli przeprowadzono analizę reologiczną. Dodatkowo wyznaczono profil uwalniania kwasu chlorogenowego, czyli głównego składnika ekstraktu, z materiałów na bazie żelatyny. Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie czy wzrost zawartości ekstraktu wpływa na zwiększenie stabilności hydrolitycznej hydrożeli, czego efektem jest ograniczenie uwalniania kwasu chlorogenowego.

4.2.6. Właściwości reologiczne

Na **Rysunku 17** przedstawiono zależność modułu zachowawczego (G') i modułu stratności (G'') od temperatury dla mieszanin reakcyjnych (I, A-D) oraz usieciowanych hydrożeli (II, A-D) w odniesieniu do próbki kontrolnej, czyli niemodyfikowanej żelatyny (I-II, E). Punkt przecięcia modułów G' i G'' pozwolił wyznaczyć temperaturę przejścia fazowego zol/żel lub żel/zol w badanych próbkach.



Rysunek 17. Właściwości reologiczne: (I) mieszanin reakcyjnych i (II) materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości bio-czynnika sieciującego: (A) LF_2.5, (B) LF_5.0, (C) LF_7.5 i (D) LF_10.0 oraz (E) materiału referencyjnego: GEL.

Przeprowadzone badania miały na celu analizę wpływu bio-czynnika sieciującego oraz jego stężenia na przebieg modułów G' i G'' w funkcji temperatury. W tym celu mieszaniny reakcyjne poddano chłodzeniu w zakresie 50-25°C, a materiały hydrożelowe ogrzewano w zakresie 25-50°C. Obszar przecięcia modułu zachowawczego i stratności został utożsamiony odpowiednio z punktem żelowania podczas chłodzenia oraz punktem topnienia podczas ogrzewania [425].

Podczas chłodzenia zaobserwowano przesunięcie punktu żelowania do wyższych temperatur wraz ze wzrostem zawartości ekstraktu, tj. z $T = 32,7^{\circ}\text{C}$ dla próbki LF_2.5 do $T = 41,4^{\circ}\text{C}$ dla LF_10.0, w porównaniu z próbką referencyjną ($T = 27,2^{\circ}\text{C}$). Przemiana fazowa typu zol/żel niemodyfikowanego białka zachodzi w wyniku tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy atomem tlenu z grupy karboksylowej a atomem wodoru grupy amidowej, występujących w łańcuchach polipeptydowych [426]. Po przekroczeniu punktu przecięcia modułów nastąpił znaczny wzrost ich wartości, co wiąże się z dynamicznym wzrostem lepkości mieszaniny spowodowanym zajściem reakcji chemicznego sieciowania żelatyny przy zastosowaniu ekstraktu.

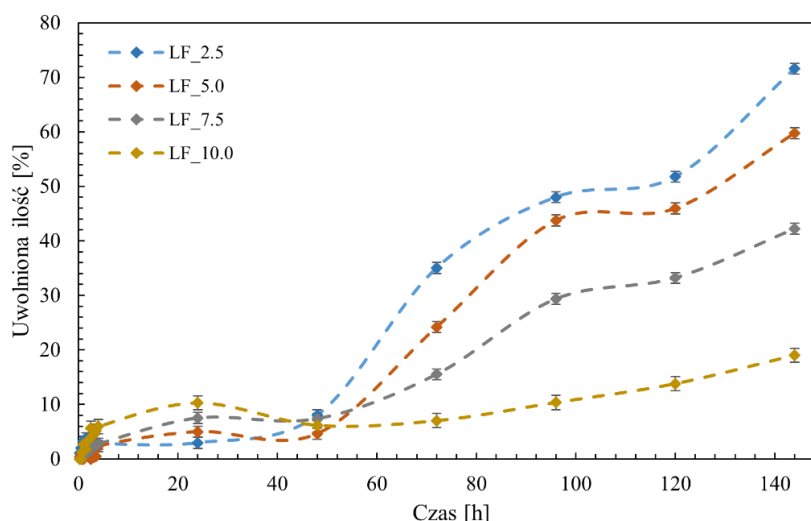
Przed osiągnięciem punktu żelowania moduł zachowawczy przyjmuje zazwyczaj niższą wartość niż moduł stratności, co jest charakterystyczne dla cieczy lepkosprężystych [427]. Taki przebieg zaobserwowano dla materiałów LF_2.5, LF_5.0 i GEL. Natomiast w przypadku próbek LF_7.5 i LF_10.0 nastąpiło odwrócenie tej tendencji. Może to świadczyć o wcześniejszym rozpoczęciu stabilizacji struktury polimeru oraz częściowym utworzeniu sieci trójwymiarowej, której ostateczne usztywnienie nastąpiło w momencie wyrównania wartości G' i G'' . Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku materiałów na bazie żelatyny i pektyny, dla których dodatek kwasu taninowego doprowadził do niemal całkowitego wyrównania modułów zachowawczego (G') i stratności (G'') przed osiągnięciem punktu żelowania, w porównaniu do materiału bazowego wykazującego właściwości typowe dla cieczy [425]. W próbkach zawierających wyższe stężenie bio-czynnika sieciującego zaobserwowano również pojawienie się maksimum modułu G' , po którym jego wartość malała, a następnie stabilizowała się. Obniżenie wartości modułu zachowawczego można powiązać z powstaniem sztywnego, kruchego materiału o wysokim stopniu usieciowania białka i ograniczonej mobilności łańcuchów polipeptydowych. Może to prowadzić do kurczenia się materiału, pęknięć oraz uszkodzeń struktury fizycznej, a w konsekwencji do obniżenia efektywności przenoszenia naprężenia przez próbkę [428].

Ogrzewanie materiałów usieciowanych bio-czynnikiem sieciującym nie spowodowało istotnych zmian wartości modułów G' i G'' , co jest charakterystyczne dla hydrożeli o trwałej strukturze sieciowej. Jedynie w przypadku próbki referencyjnej zaobserwowano przecięcie tych modułów, a punkt topnienia wystąpił w temperaturze $T = 36,3^{\circ}\text{C}$. Białko stabilizowane wyłącznie oddziaływaniami fizycznymi uległo solubilizacji. Zgodnie z dostępną literaturą, przecięcie modułów G' i G'' podczas ogrzewania zaobserwowano wyłącznie w przypadku żelatyny nieusieciowanej, natomiast próbki zawierające czynnik sieciujący nie uległy destabilizacji nawet w podwyższonej temperaturze [372,429].

Uzyskane wyniki badań reologicznych dodatkowo potwierdzają chemiczne usieciowanie żelatyny w obecności ekstraktu z odpadów kawowych oraz wskazują na wysoką odporność termiczną otrzymanych materiałów. Zastosowanie najwyższego stężenia bio-czynnika sieciującego (0,4 g) dodatkowo sprzyjało żelowaniu mieszaniny sieciującej ($G' = G''$) w najwyższej temperaturze spośród badanych próbek, wynoszącej $T = 41,4^{\circ}\text{C}$.

4.2.7. Profil uwalniania kwasu chlorogenowego

Stabilność hydrolytyczną materiałów hydrożelowych oceniono poprzez wyznaczenie profili uwalniania kwasu chlorogenowego z bazowych matryc, które zamieszono na **Rysunku 18**.



Rysunek 18. Profil uwalniania kwasu chlorogenowego z materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości bio-czynnika sieciującego: LF_2.5, LF_5.0, LF_7.5 i LF_10.0.

Analiza uwalniania czynnika sieciującego może stanowić dodatkową metodę potwierdzającą efektywność chemicznego usieciowania polimeru. Założono, że materiał hydrożelowy o korzystnych właściwościach fizykochemicznych (m.in. wyższym stopniu usieciowania, stabilności termicznej) będzie charakteryzował się zwiększoną odpornością hydrolityczną, a tym samym wydłużonym czasem degradacji wiązań kowalencyjnych powstałych w wyniku reakcji sieciowania [19].

Przeprowadzone badanie uwalniania substancji aktywnej z matrycy polimerowej pozwoliło zaobserwować wzrost stężenia kwasu chlorogenowego w płynie akceptorowym (wodzie destylowanej, pH 6,6) w funkcji czasu. Zmienna zawartość ekstraktu w materiale hydrożelowym miała znaczący wpływ na przebieg profilu uwalniania. Wzrost ilości bio-czynnika sieciującego spowodował zmniejszenie szybkości uwalniania kwasu chlorogenowego, co wynikało z utworzenia zwartej sieci polimerowej, która w sposób efektywny zatrzymywała inkorporowaną substancję aktywną. Stabilizujący wpływ zastosowanego ekstraktu pozwolił nadać hydrożelom właściwości charakterystyczne dla nośników o przedłużonym i kontrolowanym uwalnianiu. Dla każdej z analizowanych próbek uwalnianie kwasu chlorogenowego zachodziło w sposób stopniowy i przedłużony. Nie stwierdzono wystąpienia zjawiska „burst effect” polegającego na nagłym wyrzuceniu znacznych ilości analizowanego związku z matrycy, co najczęściej może być obserwowane w pierwszych godzinach pomiarowych. Uwolniona ilość związku po upływie 7 dni wynosiła 72% dla próbki LF_2.5, natomiast 43% dla LF_10.0.

W zależności od właściwości strukturalnych i fizycznych hydrożelu mechanizm uwalniania substancji aktywnych może opierać się na różnych zjawiskach, takich jak dyfuzja, pęcznienie bądź degradacja. W analizowanym przypadku uwalnianie oparte na dyfuzji stanowiło marginalny przypadek i dotyczyć mogło cząsteczek kwasu chlorogenowego, które nie uległy reakcji z łańcuchem polimerowym. W początkowym etapie badania widoczny był nieznaczny wzrost stężenia związku w płynie inkubacyjnym, co potwierdza ograniczoną rolę tego zjawiska. Uwalnianie na drodze pęcznienia, czyli absorpcji płynu do struktury hydrożelu na skutek osmozy, stanowi wariant w przypadku braku możliwości swobodnej, początkowej migracji substancji aktywnej. Dla otrzymanych materiałów mechanizm ten był spowodowany między innymi silną interakcją głównego składnika bio-czynnika sieciującego z grupami funkcyjnymi polimeru w wyniku reakcji sieciowania. Ponadto stopniowa degradacja pozwoliła

uwolnić zamkniętą w sieci nośnika substancję aktywną poprzez zajście erozji powierzchniowej wywołanej hydrolizą [340,343,430,431]. W trakcie pierwszych 48 godzin pomiarowych nie doszło do znacznego uwolnienia kwasu chlorogenowego, co jest pożądanym rezultatem i może świadczyć o chemicznym usieciowaniu żelatyny.

Podsumowanie:

Uzyskane wyniki potwierdziły właściwości sieciujące ekstraktów otrzymanych z odpadów kawowych. Usieciowane chemicznie hydrożele na bazie żelatyny charakteryzowały się wyższym stopniem usieciowania, zwartą strukturą o obniżonej porowatości oraz lepszą stabilnością termiczną względem materiału referencyjnego. Zaobserwowane zmiany świadczą o tym, że obok typowych oddziaływań fizycznych, jakie występują w łańcuchu żelatyny, pojawią się także silne wiązania kowalencyjne stabilizujące strukturę polimeru. Do dalszych badań wybrano maksymalne stężenie bio-czynnika sieciującego (0,4 g) w postaci liofilizowanej, ze względu na jego wysoką efektywność, przejawiającą się najwyższą temperaturą żelowania mieszaniny sieciującej oraz istotnie wydłużonym czasie uwalniania kwasu chlorogenowego z matrycy hydrożelowej.

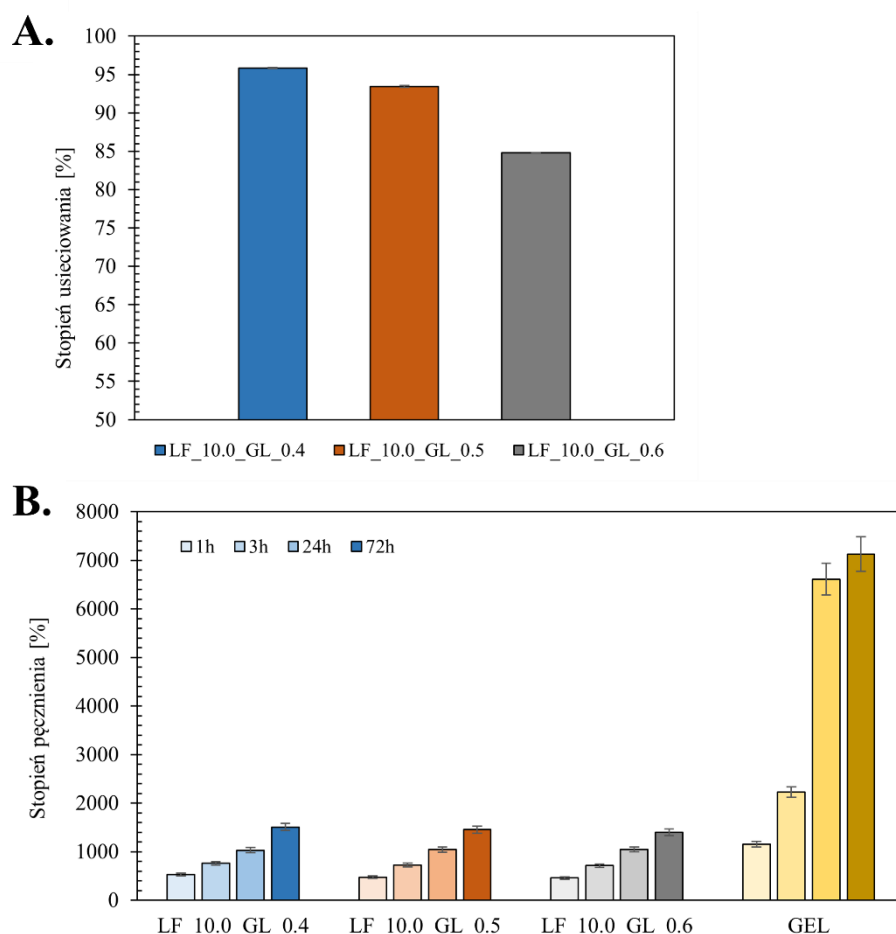
W kolejnym etapie badań skupiono się na poprawie wytrzymałości mechanicznej hydrożelu oraz jego elastyczności, niezbędnej w przypadku potencjalnego zastosowania jako materiały opatrunkowe. W tym celu przeanalizowano wpływ różnych stężeń plastyfikatora, którym była gliceryna, na parametry związane z przebiegiem reakcji sieciowania. Zastosowanie gliceryny wynikało z jej wysokiej biokompatybilności, nietoksyczności oraz biodegradowalności, jak również z korzystnego wpływu na transdermalne dostarczanie substancji czynnych oraz właściwości mechaniczne materiałów żelatynowych, przejawiającego się zmniejszeniem ich kruchości i zwiększeniem wydłużenia przy zerwaniu [432–434].

4.3. Charakterystyka materiałów hydrożelowych zawierających glicerynę

4.3.1. Stopień usieciowania, pęcznienia i analiza widm FT-IR

Zastosowanie gliceryny jako plastyfikatora pozwoliło zaobserwować istotne zmiany nie tylko w elastyczności materiałów hydrożelowych, ale także w ich charakterystyce fizykochemicznej [435]. **Rysunek 19A-B** przedstawia stopień usieciowania i właściwości absorpcyjne materiałów hydrożelowych sieciowanych ekstraktem LF oraz zawierających glicerynę w zmiennej ilości (0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml). Ponadto została

potwierdzona struktura chemiczna usieciowanych materiałów hydrożelowych na podstawie analizy widm FT-IR (**Rysunek 20**).



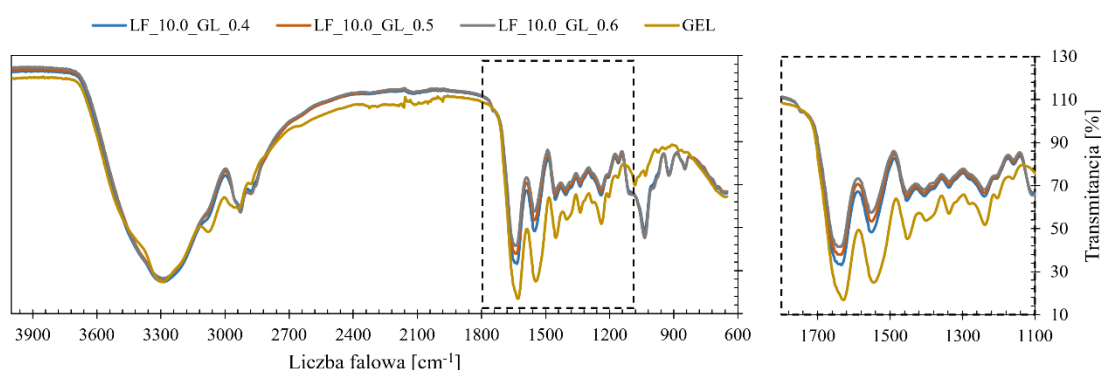
Rysunek 19. (A) Stopień usieciowania oraz (B) stopień pęcznienia otrzymanych materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości gliceryny: GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6, oraz materiału referencyjnego: GEL.

Wraz ze wzrostem zawartości gliceryny zaobserwowano obniżenie stopnia usieciowania próbek, nawet o 14%, względem materiału LF_10.0, dla którego wartość parametru oscyluje na poziomie około 99%. Najwyższym stopniem usieciowania, tj. 96%, charakteryzowała się matryca GL_0.4, natomiast zastosowanie maksymalnego stężenia gliceryny (próbka GL_0.6) spowodowało znaczne zaburzenie w strukturze polimerowej, skutkując obniżeniem wartości do 85%. Wprowadzenie plastyfikatora do kompozycji prawdopodobnie spowodowało inhibicję procesu sieciowania chemicznego żelatyny poprzez zastąpienie części wiązań kowalencyjnych oddziaływaniami fizycznymi, takimi jak wiązania wodorowe [436].

Dodatek gliceryny znacząco wpłynął również na właściwości absorpcyjne hydrożeli w porównaniu do materiału nie zawierającego plastyfikatora. Po 72 godzinach zdolność absorpcji plynów dla próbek GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6 wynosiła odpowiednio 1506%, 1455% i 1397%. Wartości były niższe odpowiednio o 61%, 62% i 64% względem materiału bazowego LF_10.0. W trakcie pierwszych 3 godzin pomiarów zaobserwowano stopniowe obniżanie stopnia pęcznienia wraz ze wzrostem zawartości plastyfikatora. Po 24 godzinach wartości parametru dla wszystkich materiałów uległy wyrównaniu, po czym nastąpił ponowny wzrost do poziomu 1506% dla GL_0.4, 1455% dla GL_0.5 oraz 1397% dla GL_0.6.

Zaobserwowane zjawisko może wynikać z właściwości gliceryny do tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczkami wody, co sprzyja zwiększeniu zawartości wilgoci w matrycach, a jednocześnie ogranicza dodatkową absorpcję plynów [437].

Analiza widm FT-IR próbek usieciowanych bio-czynnikami sieciującym z dodatkiem różnej zawartości gliceryny pozwoliła określić jej wpływ na strukturę chemiczną materiałów hydrożelowych (**Rysunek 20**).



Rysunek 20. Widma FT-IR usieciowanych materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości gliceryny: GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6, oraz materiału referencyjnego: GEL.

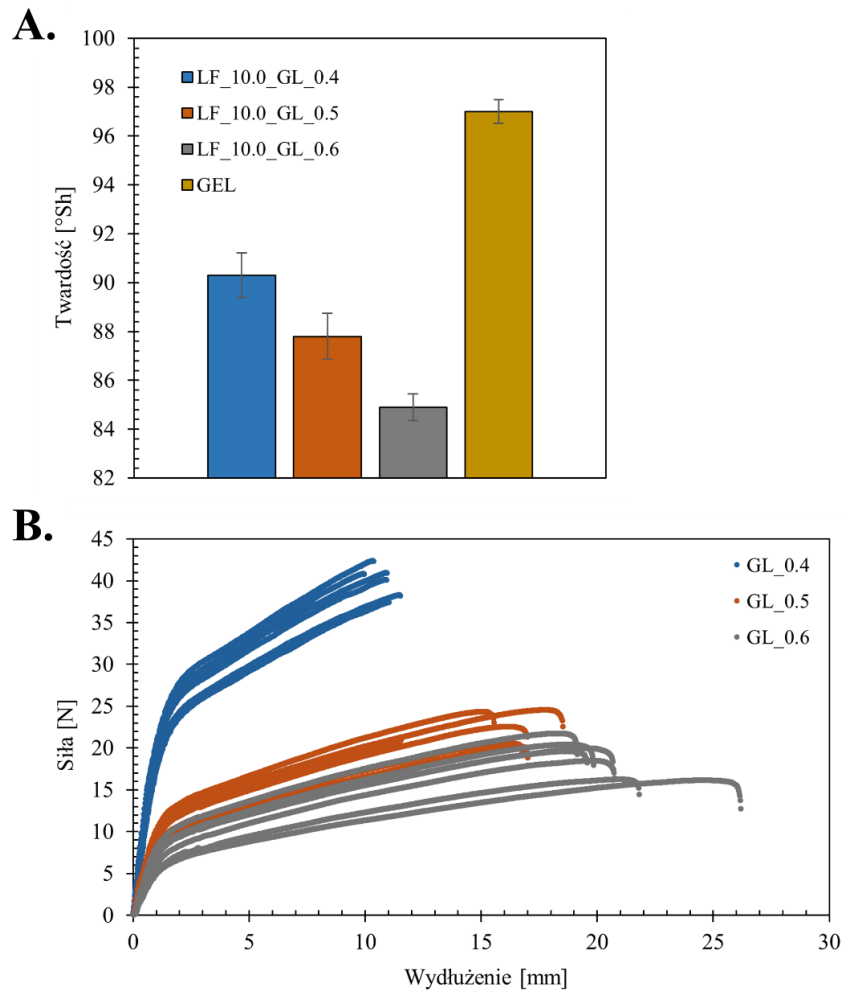
Dla wszystkich analizowanych matryc zaobserwowano istotne przesunięcie pasma absorpcyjnego odpowiadającego strukturze amidu II przy liczby falowej 1552 cm^{-1} , a także pasma amidu III przy 1239 cm^{-1} . Dodatkowo w próbce zawierającej najwyższe stężenie plastyfikatora (GL_0.6) zauważono przesunięcie pasma amidu I przy liczbie falowej 1643 cm^{-1} . Opisane zmiany wskazują na zaburzoną reakcję sieciowania chemicznego żelatyny pod wpływem obecności gliceryny. Plastyfikator, ze względu na swoje właściwości hydrofilowe i higroskopijne, może przyczyniać się do lokalnego

odwodnienia struktury białka, co skutkuje usztywnieniem sieci polipeptydowej poprzez ograniczenie mobilności łańcuchów.

Dane literaturowe potwierdzają wpływ gliceryny na zwiększenie fizycznej i chemicznej stabilności białka, między innymi poprzez spowolnienie procesów denaturacji, deamidacji i hydrolizy. Zwiększona odporność białka na degradację związana jest również z indukowaną przez plastyfikator modyfikacją trzeciorzędowej struktury żelatyny, przy jednoczesnym zachowaniu niezmienionej struktury czwartorzędowej [438].

4.3.2. Badania mechaniczne

Twardość materiałów hydrożelowych zawierających dodatek gliceryny, a także ich wytrzymałość na wydłużenie w zależności od zadanej siły oraz wartość siły zrywającej przedstawiono na **Rysunku 21A-B** i w **Tabeli 11**.



Rysunek 21. (A) Twardość oraz (B) wytrzymałość na wydłużenie w funkcji siły usieciowanych materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości gliceryny: GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6, oraz materiału referencyjnego: GEL.

Tabela 11. Siła zrywająca dla usieciowanych materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości gliceryny: GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6.

Próbka	Maksymalna wartość siły [N]							Średnia wartość \pm SD
	1	2	3	4	5	6	7	
GL_0.4	42,3	40,9	40,1	37,4	37,1	38,3	40,8	39,6 \pm 2,0
GL_0.5	24,5	23,2	23,1	22,5	20,2	24,3	20,6	22,6 \pm 1,7
GL_0.6	18,4	16,1	20,4	19,9	16,2	21,7	19,6	18,9 \pm 2,1

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że dla usieciowanych materiałów hydrożelowych GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6 zachodzi stopniowe zmniejszenie twardości matryc wraz ze wzrostem stężenia gliceryny, a wartość parametru wynosiła odpowiednio 90°Sh, 88°Sh i 85°Sh według skali A. Ponadto badania pozwoliły stwierdzić istotne zmniejszenie twardości próbek względem materiału referencyjnego, którego twardość wynosiła 97°Sh. Zastosowanie plastyfikatora spowodowało poprawę elastyczności próbek, a w konsekwencji pozwoliło nadać im lepsze właściwości użytkowe niezbędne względem potencjalnego zastosowania medycznego.

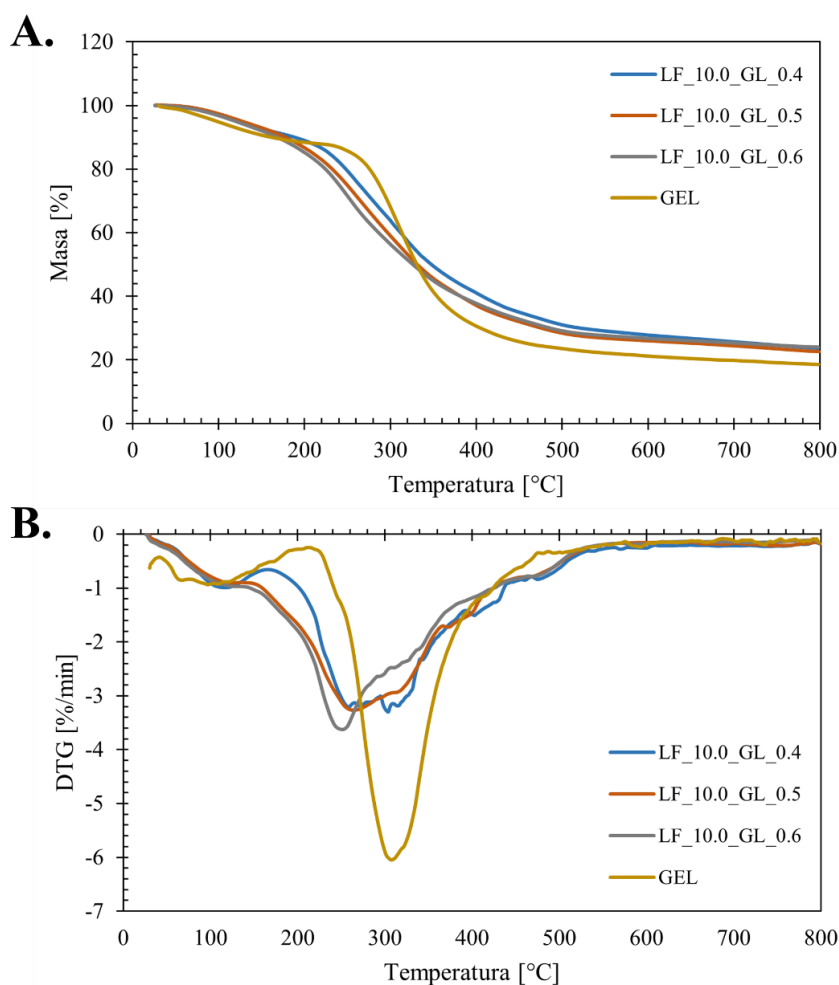
Dane literaturowe potwierdzają korzystny wpływ gliceryny na zmniejszenie kruchości i twardości materiałów na bazie żelatyny, co wynika ze zmniejszenia sztywności struktury hydrożelu [435,439,440].

Wzrost stężenia plastyfikatora wyraźnie wpłynął na zwiększenie wydłużenia przy zerwaniu materiałów hydrożelowych, a wartość parametru wynosiła 10,8 mm dla próbki GL_0.4, 16,7 mm dla GL_0.5 oraz 21,2 mm dla GL_0.6. Jednocześnie zaobserwowano stopniowe zmniejszenie siły zrywającej, która była równa odpowiednio 39,6 N, 22,6 N oraz 18,9 N. Zastosowanie średniego i maksymalnego stężenia gliceryny znacznie wpłynęło na obniżenie wytrzymałości mechanicznej w porównaniu do próbki o jej najniższej zawartości. Hydrożel GL_0.4 wykazywał korzystną elastyczność przy zachowaniu dobrych właściwości mechanicznych oraz wytrzymałości na rozciąganie.

Podobne zależności zaobserwowano dla materiałów żelatynowych, gdzie gliceryna osłabiała oddziaływania międzycząsteczkowe, zwiększając elastyczność i rozciągliwość próbek, jednocześnie ograniczając ich wytrzymałość mechaniczną [439,441,442]. Uzyskane wyniki podkreślają kluczowe znaczenie doboru stężenia plastyfikatora w kompozycji, tak aby zwiększona elastyczność nie prowadziła do istotnego obniżenia trwałości strukturalnej materiału.

4.3.3. Analiza TGA

Rysunek 22A-B przedstawia wyniki analizy termograwimetrycznej w postaci krzywych TG i DTG dla usieciowanych materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości gliceryny GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6. **Tabela 12** zawiera zestawienie charakterystycznych temperatur odpowiadających 5%, 10% i 50% ubytkowi masy ($T_{5\%}$, $T_{10\%}$, $T_{50\%}$), temperatur i odpowiadających im ubytków masy dla kolejnych etapów rozkładu (DTG_1 - DTG_3) oraz wartości pozostałości w temperaturze końcowej wynoszącej $T = 800^{\circ}\text{C}$.



Rysunek 22. Krzywe TG/DTG dla usieciowanych materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości gliceryny: GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6, oraz materiału referencyjnego: GEL.

Tabela 12. Właściwości termiczne usieciowanych materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości gliceryny: GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6, oraz materiału referencyjnego: GEL.

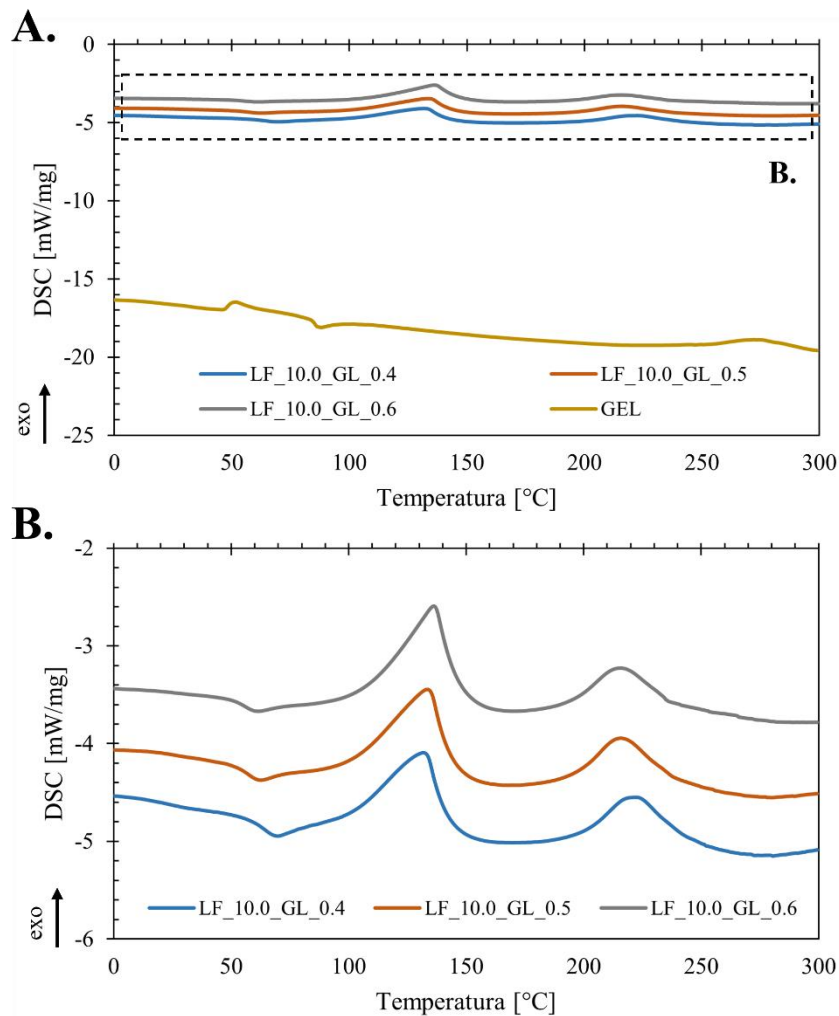
Próbki	T _{5%}	T _{10%}	T _{50%}	DTG ₁	DTG ₂	DTG ₃	Pozostałość w 800°C
	[°C]			[%/min; °C]			[%]
GL_0.4	122,8	188,1	347,7	-0,99; 116,9	-3,21; 258,8	-3,31; 303,8	23,62
GL_0.5	127,1	177,4	331,4	-0,90; 123,1	-3,27; 263,8	-2,94; 309,2	22,64
GL_0.6	120,6	168,9	326,4	-0,97; 129,0	-3,63; 251,3	-2,48; 310,7	24,00
GEL	98,7	162,2	330,8	-0,94; 97,2	-	-6,05; 307,4	18,57

Dodatek plastyfikatora spowodował obniżenie stabilności termicznej [443]. Zaobserwowano niższe temperatury dla wszystkich etapów degradacji, odpowiadających poszczególnym komponentom, w porównaniu do hydrożelu niezawierającego gliceryny (LF_10.0). Ponadto wartość pozostałości materiałów w T = 800°C obniżyła się o 4,5-6,0% w odniesieniu do próbki LF_10.0.

Pierwszy efekt cieplny z maksimum pików w zakresie temperatur 117-129°C jest związany z utratą wody i części gliceryny wskutek ich odparowania [443,444]. Piki o maksimach w zakresie T = 251-264°C i 304-311°C, podobnie jak w próbce LF_10.0, odpowiadają termicznemu rozkładowi łańcuchów κ-karagenu, składników bio-czynnika sieciującego oraz struktury żelatyny.

4.3.4. Analiza DSC

Rysunek 23A-B przedstawia wyniki analizy kalorymetrycznej w postaci krzywych DSC dla usieciowanych materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości gliceryny GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6.



Rysunek 23. (A) Krzywe DSC dla usieciowanych materiałów hydrożelowych o zmiennej zawartości gliceryny: GL_0.4, GL_0.5 i GL_0.6, oraz materiału referencyjnego: GEL. (B) Powiększony obszar wykresu z zakresu od -2 do -6 mW/mg.

Destabilizujący wpływ obecności gliceryny na stopień usieciowania materiału, tożsamy ze wzrostem zawartości wilgoci, doprowadził do stopniowego obniżenia temperatury zeszklenia żelatyny wraz ze zwiększeniem stężenia plastyfikatora [445]. Przemiana szklista miała miejsce w zakresie temperatur wynoszących $T = 55-64^{\circ}\text{C}$ i wskazała na obniżenie stabilności termicznej białka w porównaniu do próbki LF_10.0, przy jednoczesnym zachowaniu jego odporności na denaturację i degradację w analizowanym przedziale temperatur. Potwierdzeniem tej obserwacji było również przesunięcie efektu termicznego odpowiadającego rozkładowi κ -karagenu oraz składników ekstraktu do temperatury 222°C dla próbki GL_0.4 oraz $T = 216^{\circ}\text{C}$ dla próbek GL_0.5 i GL_0.6. Dodatkowo, w temperaturze $132-136^{\circ}\text{C}$ zaobserwowano efekt termiczny, który najprawdopodobniej wynikał z rozkładu struktur utworzonych w wyniku

oddziaływania pomiędzy gliceryną a żelatyną. Wnioski te potwierdzają wyniki analizy widm FT-IR, gdzie zaobserwowano zmiany w obszarze pasm amidowych.

Podsumowanie:

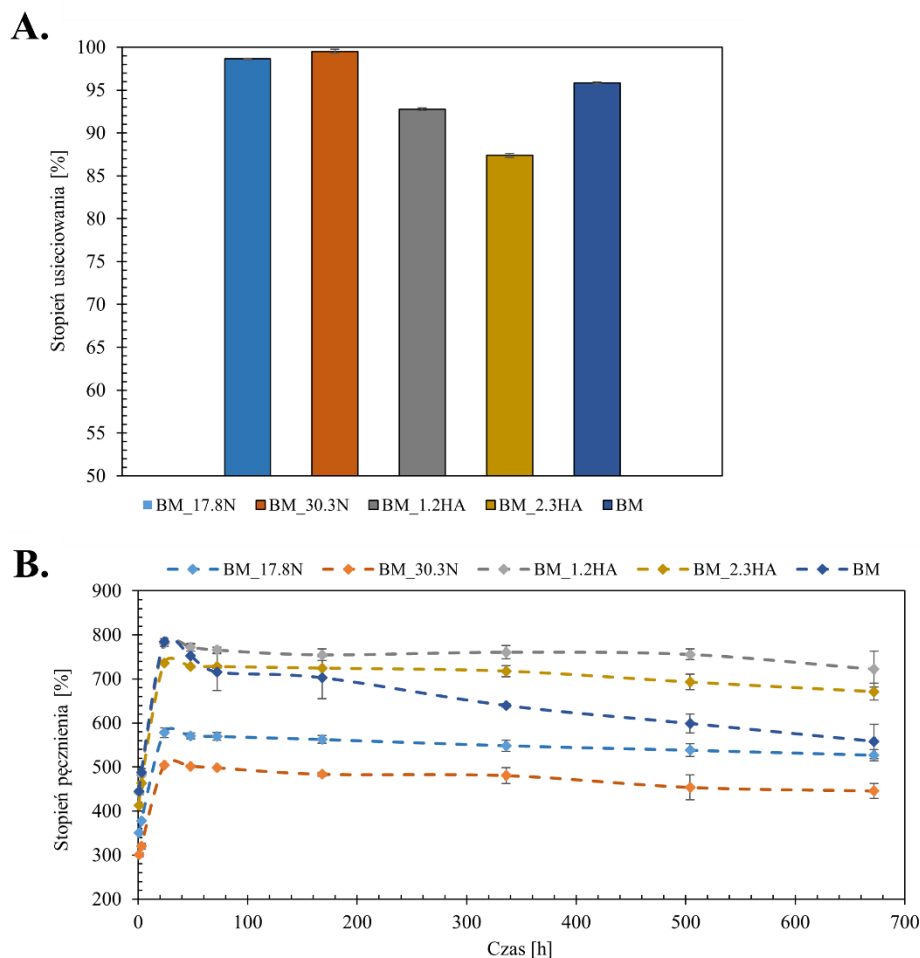
Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano bazowy materiał hydrożelowy (LF_10.0_GL_0.4), charakteryzujący się wysoko usieciowaną strukturą polimerową (96%), wytrzymałością termiczną oraz elastycznością przy zachowaniu odpowiedniej wytrzymałości mechanicznej (39,6 N).

W dalszym etapie prac badawczych matryca była modyfikowana poprzez wprowadzenie do układu substancji czynnych (niacynamid i kwas hialuronowy), których działanie przeciwzapalne, przyspieszające gojenie ran, wspomagające regenerację oraz poprawiające elastyczność skóry zostało potwierdzone w literaturze [446,447]. W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano materiały stanowiące systemy przedłużonego uwalniania substancji czynnych, które mogą pozostawać na skórze nawet przez kilka dni.

4.4. Modyfikacja bazowego materiału hydrożelowego substancjami aktywnymi

4.4.1. Stopień usieciowania, pęcznienia i degradacji

Rysunek 24A-B przedstawia stopień usieciowania oraz właściwości absorpcyjne materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem (0,5 g, 1 g) i kwasem hialuronowym (1 ml, 2ml) oraz usieciowanej matrycy bazowej LF_10.0_GL_0.4 (BM). Przebieg procesu degradacji tych materiałów oraz ubytek ich masy po 28 dniach inkubacji przedstawiono na **Rysunku 25A-C**.



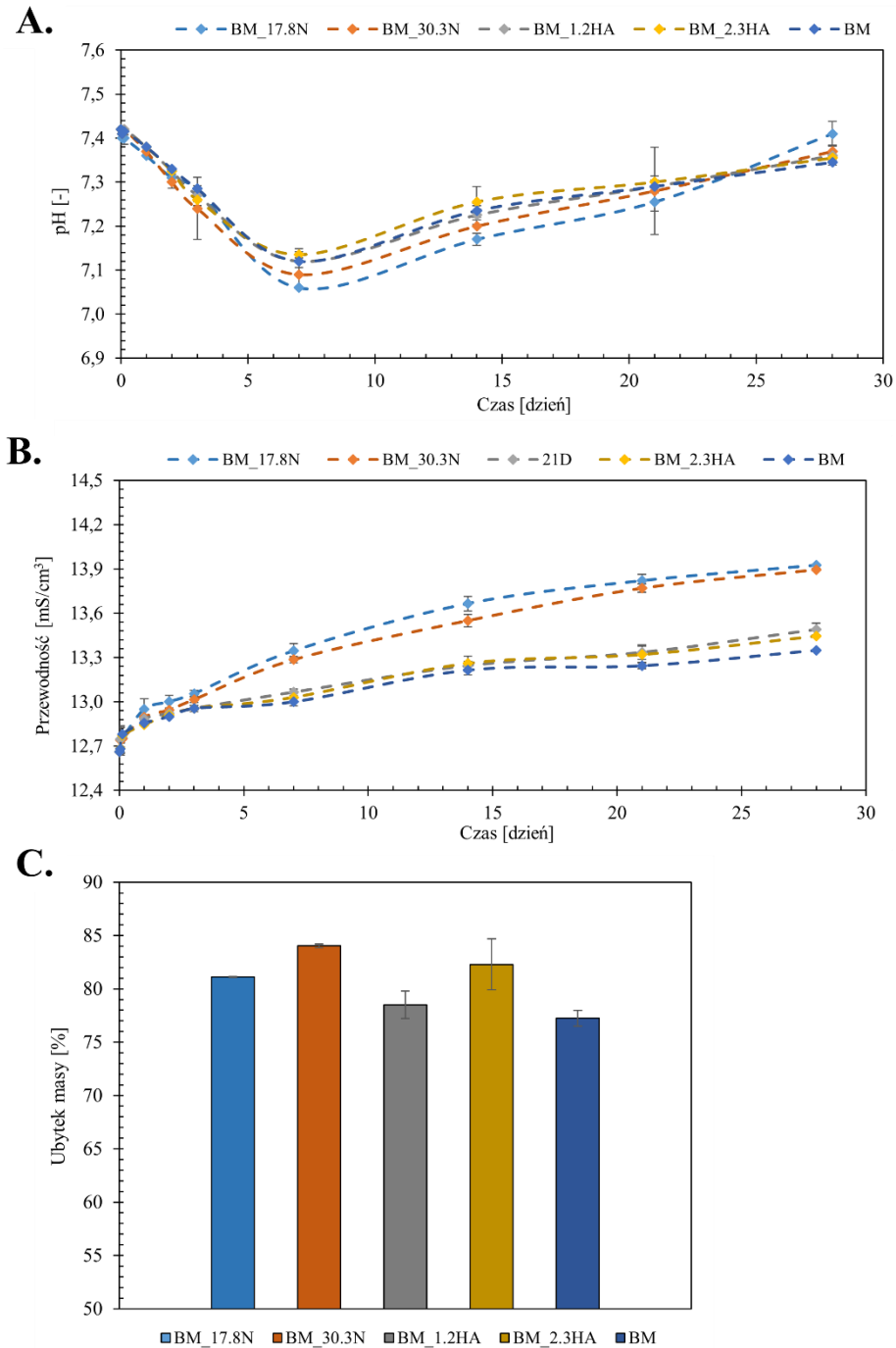
Rysunek 24. (A) Stożień usieciowania oraz (B) stożień pęcznienia usieciowanych materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem: BM_17.8N, BM_30.3N, kwasem hialuronowym: BM_1.2HA, BM_2.3HA, oraz usieciowanej matrycy bazowej: BM.

Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano wpływ obecności substancji aktywnych na właściwości fizyczne bazowej matrycy hydrożelowej usieciowanej bio-czynnikiem sieciującym.

Inkorporacja niacynamidu spowodowała nieznaczny wzrost stopnia usieciowania wraz ze zwiększaniem jego stężenia, z 95,8% dla matrycy bazowej do wartości odpowiednio 98,7% i 99,5%. Ponadto, w przypadku hydrożeli BM_17.8N i BM_30.3N, zaobserwowano obniżenie ich właściwości absorpcyjnych w roztworze buforu fosforanowego (pH = 7,4). Przeprowadzone badania wykluczają możliwość utworzenia wiązań kowalencyjnych o działaniu stabilizującym sieć polimerową. Obserwowane zjawisko może wynikać zarówno z obecności dodatkowych oddziaływań o charakterze

fizycznym pomiędzy niacynamidem a grupami funkcyjnymi żelatyny, jak i z ograniczenia dostępności wolnych przestrzeni w strukturze hydrożeli, spowodowanego wysokim stężeniem wprowadzonego związku [448,449]. Maskowanie wolnych grup aminowych żelatyny przez nietrwale interakcje z grupami funkcyjnymi niacynamidu, a także zmniejszona zdolność do absorpcji płynów wynikająca z kondensacji struktury polimerowej, mogą być przyczyną fałszywie zawyżonych wartości stopnia usieciowania [450].

Dodatek kwasu hialuronowego spowodował stopniowe obniżenie stopnia usieciowania materiałów wraz ze wzrostem jego stężenia, a wartości tego parametru wynosiły odpowiednio 92,7% i 87,4%. Zgodnie z przewidywaniami, doprowadziło to do zwiększenia zdolności absorpcyjnej hydrożeli względem płynu inkubacyjnego, co wskazuje na osłabienie struktury sieci polimerowej. Zjawisko to może być związane z obecnością substancji aktywnej, która nie wykazuje stabilizującego oddziaływania z polimerem. Wprowadzenie do kompozycji kwasu hialuronowego może prowadzić do zaburzenia istniejących wiązań sieciujących utworzonych pomiędzy bio-czynnikiem sieciującym i żelatyną [451].



Rysunek 25. Zmiany (A) pH i (B) przewodności oraz (C) ubytek masy po 28 dniach inkubacji w roztworze PBS (pH 7,4) dla usieciowanych materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem: BM_17.8N, BM_30.3N, kwasem hialuronowym: BM_1.2HA, BM_2.3HA, oraz usieciowanej matrycy bazowej: BM.

W celu scharakteryzowania postępu degradacji materiałów hydrożelowych monitorowano zmiany pH oraz przewodności płynu inkubacyjnego (PBS, pH = 7,4), w którym prowadzono badania.

Wszystkie próbki wykazywały zbliżony przebieg zmian wartości pH. W początkowej fazie inkubacji obserwowano stopniowe obniżenie wartości parametru do zakresu od 7,15 do 7,26. W kolejnych punktach pomiarowych zaobserwowano natomiast nieznaczny wzrost pH w medium, co może sugerować stabilizację układu lub dalszy, mniej intensywny rozpad struktury hydrożelu.

Analiza przewodnictwa buforu wykazała stały, powolny wzrost wartości tego parametru, z początkowych 12,7 mS/cm³ do odpowiednio 13,4 mS/cm³ dla matrycy bazowej, 13,9 mS/cm³ dla materiałów zawierających niacynamid oraz 13,5 mS/cm³ dla materiałów z dodatkiem kwasu hialuronowego. Zwiększenie przewodnictwa może być związane z uwalnianiem jonowych produktów degradacji żelatyny oraz κ -karagenu, a także substancji aktywnych, w tym składników pochodzących z bio-czynnika sieciującego, do medium inkubacyjnego.

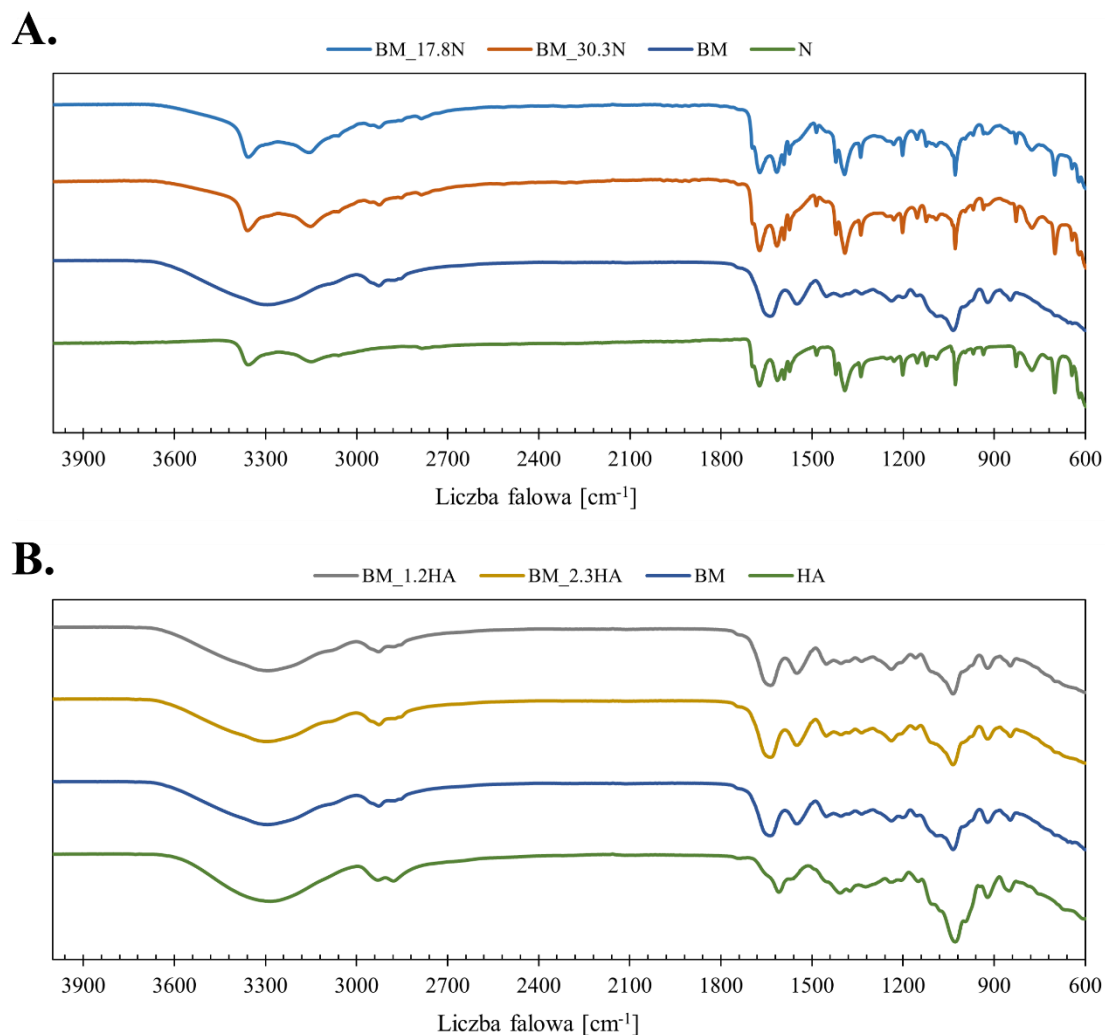
Ubytek masy próbek wskazuje na najwyższy stopień degradacji dla materiałów modyfikowanych niacynamidem. Zwiększenie zawartości substancji aktywnej prowadziło do wzrostu ubytku masy odpowiednio do 81,1% oraz 84,0%. Również hydrożele zawierające dodatek kwasu hialuronowego ulegały degradacji w większym stopniu niż matryca bazowa. Zaobserwowano wzrost wartości ubytku masy z 77,2% (dla matrycy bazowej) do odpowiednio 78,5% oraz 82,3% przy rosnącej zawartości HA.

Zarówno niacynamid, jak i kwas hialuronowy zwiększyły podatność materiału hydrożelowego na degradację hydrolityczną. Zaobserwowany wzrost ubytku masy może wskazywać na brak udziału substancji aktywnych w sieciowaniu materiału, a jedynie na ich fizyczną obecność w strukturze hydrożelu. Pomimo to, zmiany te nie miały charakteru ograniczającego możliwości aplikacyjne w obszarze materiałów opatrunkowych. Wprowadzenie substancji aktywnych do układu hydrożelowego często prowadzi do osłabienia usieciowanej struktury sieci polimerowej, co potwierdzają dane źródłowe [452]. Potwierdzona degradacja otrzymanych materiałów hydrożelowych umożliwiła uwalnianie niacynamidu, kwasu hialuronowego oraz substancji bioaktywnych obecnych w ekstrakcie z fusów kawowych.

4.4.2. Analiza FT-IR

W celu określenia wpływu niacynamidu i kwasu hialuronowego na strukturę chemiczną usieciowanej bio-czynnikiem matrycy bazowej wykonano analizę widm FT-IR.

Widma FT-IR dla materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem i kwasem hialuronowym oraz usieciowanej matrycy bazowej i czystych substancji aktywnych przedstawiono na **Rysunku 26A-B**.



Rysunek 26. Widma FT-IR usieciowanych materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem: (A) BM_17.8N, BM_30.3N, kwasem hialuronowym: (B) BM_1.2HA, BM_2.3HA, oraz usieciowanej matrycy bazowej: BM i czystych substancji aktywnych: N, HA.

Widmo FT-IR niacynamidu charakteryzuje się obecnością pasm absorpcyjnych odpowiadających drganiom rozciągającym wiązania N-H (3357 cm^{-1} i 3149 cm^{-1}), drganiom rozciągającym grupy karbonylowej C=O w strukturze amidowej (1674 cm^{-1}), drganiom zginającym N-H (1592 cm^{-1}), drganiom rozciągającym C=C w pierścieniu aromatycznym (1485 cm^{-1}) oraz drganiom rozciągającym wiązania C-N charakterystycznym dla grupy amidowej (1230 cm^{-1}) [400,453].

Modyfikacja matrycy bazowej niacynamidem (BM_17.88N i BM_30.3N) spowodowała zanik niektórych pasm absorpcyjnych obecnych w czystej matrycy. Zaobserwowano pojawienie się dwóch sygnałów w zakresie liczb falowych 3357-3359 cm^{-1} oraz 3152-3156 cm^{-1} , odpowiadających strukturze amidu A w łańcuchu żelatyny. Charakteryzowały się one wyższą intensywnością w porównaniu z czystym niacynamidem, co sugeruje, że pasma pochodzą zarówno od polimeru, jak i niacynamidu. Pasma odpowiadające strukturom amidowym I, II i III uległy wyraźnemu przesunięciu do odpowiednio 1672-1673 cm^{-1} (amid I), 1592-1593 cm^{-1} (amid II) oraz 1231 cm^{-1} (amid III). Dodatkowo w próbkach modyfikowanych pojawił się sygnał przy 1486 cm^{-1} , związany z obecnością wiązań w pierścieniu aromatycznym, charakterystycznym dla cząsteczki niacynamidu.

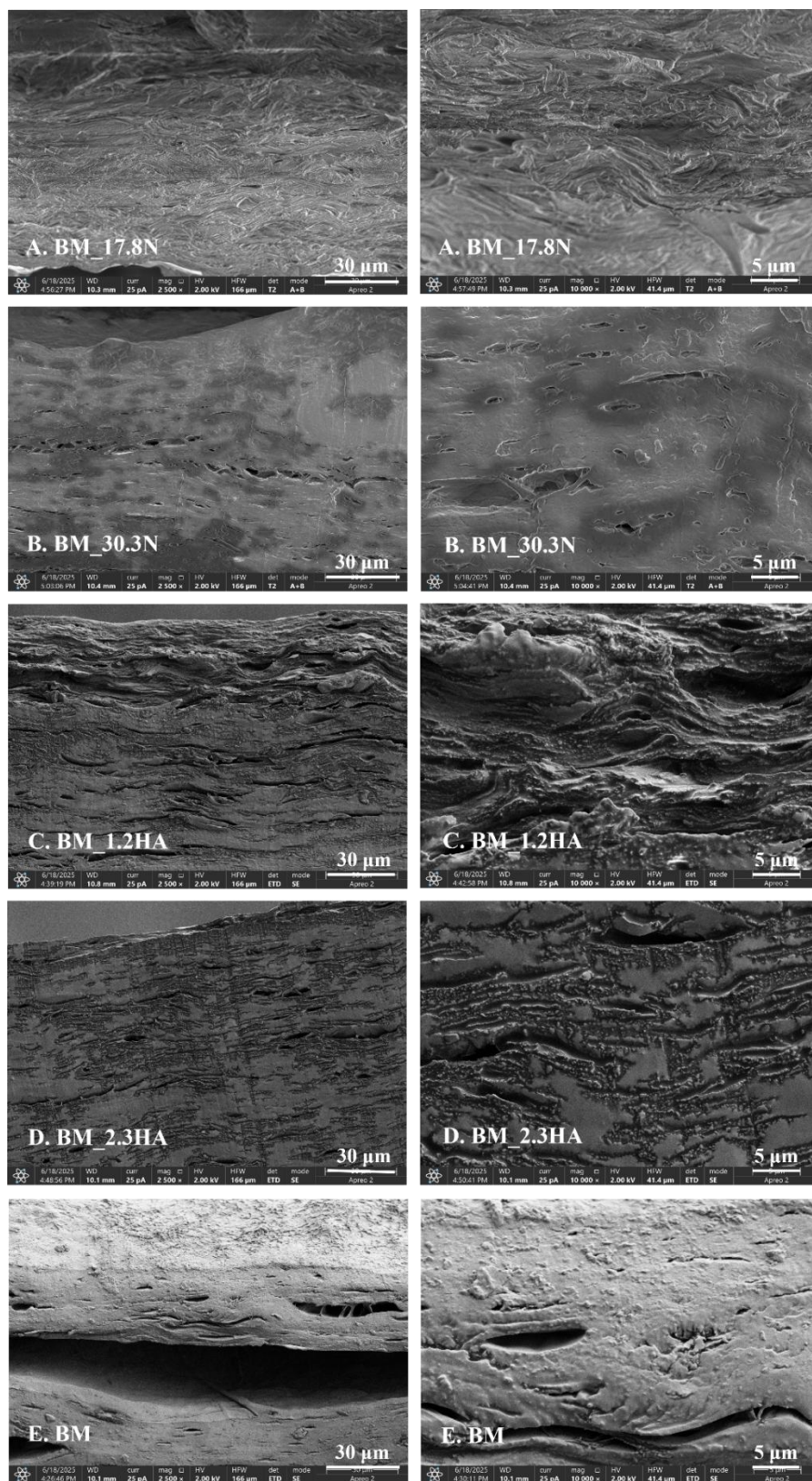
Widmo FT-IR kwasu hialuronowego charakteryzuje się obecnością pasm absorpcyjnych odpowiadających drganiom rozciągającym wiązania N-H i O-H (3283 cm^{-1}), drganiom zginającym N-H (1607 cm^{-1}), drganiom rozciągającym C-H oraz zginającym C-O (1407 cm^{-1}), a także drganiom rozciągającym grup C-O-H i mostków eterowych C-O-C (1029 cm^{-1}) [454,455].

Materiały BM_1.2HA i BM_2.3HA, zawierające kwas hialuronowy, charakteryzowały się strukturą chemiczną niemal identyczną jak matryca bazowa. Zjawisko to można tłumaczyć dużym podobieństwem widma czystego kwasu hialuronowego do widma kompozycji polimerowej, zawierającej podobne grupy funkcyjne pochodzące między innymi z żelatyny, κ -karagenu oraz bioaktywnego czynnika sieciującego. Brak wyraźnych zmian w obszarach widm, które mogłyby świadczyć o modyfikacji chemicznej, może wynikać z niskiego stężenia zastosowanego kwasu hialuronowego. Wprowadzenie małej ilości substancji aktywnej mogło skutkować rejestracją pasm o niewystarczającej intensywności, które zostały przysłonięte przez silniejsze pasma pochodzące od głównych komponentów hydrożelu, co potwierdzają również źródła literaturowe [456].

Na podstawie przeprowadzonej analizy widm FT-IR nie stwierdzono zmian w strukturze chemicznej matrycy bazowej w wyniku jej modyfikacji substancjami czynnymi.

4.4.3. Analiza SEM

Mikrofotografie SEM dla materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem i kwasem hialuronowym oraz usieciowanej matrycy bazowej przedstawiono na **Rysunku 27A-E**.



Rysunek 27. Mikrofotografie SEM przekroju poprzecznego usieciowanych materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem: (A) BM_17.8N, (B) BM_30.3N, kwasem hialuronowym: (C) BM_1.2HA, (D) BM_2.3HA, oraz usieciowanej matrycy bazowej: (E) BM. Analizy wykonane przy powiększeniu (I) 2 500× oraz (II) 10 000×.

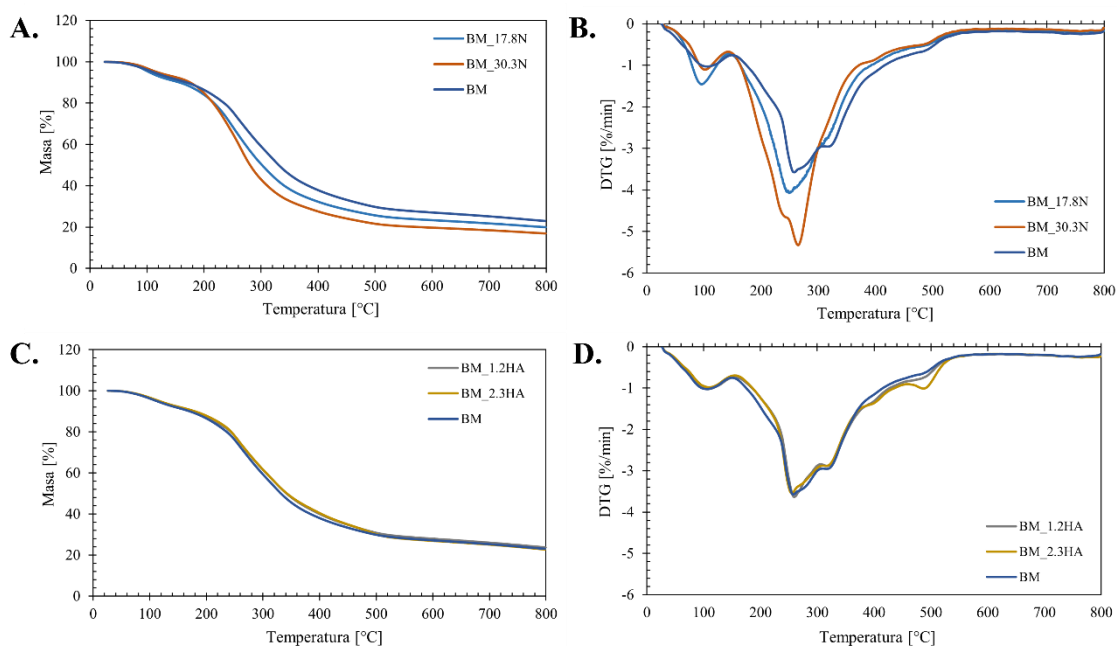
Przekrój poprzeczny usieciowanej matrycy bazowej charakteryzował się obecnością podłużnych porów o znacznych rozmiarach, rozdzielonych zwartymi warstwami, co przypomina strukturę gąbki. Wysoki stopień usieciowania żelatyny przyczynił się do powstania jednolitej struktury materiału.

W przypadku materiałów zawierających niacynamid zaobserwowano wyraźną redukcję liczby oraz rozmiaru porów. Struktura tych próbek w całej objętości przyjmowała postać ściśle ułożonych warstw. Z kolei dodatek kwasu hialuronowego spowodował powstanie większej liczby wąskich, podłużnych przestrzeni o mniejszej wielkości. Dodatkowo widoczne były liczne artefakty wskazujące na obecność substancji aktywnej zamkniętej w sieci polimerowej. Dane literaturowe potwierdzają znaczący wpływ substancji czynnych na strukturę porowatą materiałów hydrożelowych [448,457].

Zaobserwowane zmiany w strukturze przekrojów poprzecznych badanych materiałów hydrożelowych pozostają zgodne z wcześniej opisanymi wynikami dotyczącymi stopnia pęcznienia. Niacynamid ograniczał zdolność hydrożelu do absorpcji płynu, podczas gdy kwas hialuronowy rozluźniał zwartą, usieciowaną strukturę, prowadząc do zwiększenia właściwości sorpcyjnych.

4.4.4. Analiza TGA

Rysunek 28A-D przedstawia wyniki analizy termograwimetrycznej w postaci krzywych TG i DTG dla materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem i kwasem hialuronowym oraz usieciowanej matrycy bazowej. **Tabela 13** zawiera zestawienie temperatur odpowiadających 5%, 10% i 50% utracie masy ($T_{5\%}$, $T_{10\%}$, $T_{50\%}$), temperatur i odpowiadających im ubytków masy dla kolejnych etapów rozkładu (DTG₁-DTG₃) oraz wartości pozostałości przy $T = 800^{\circ}\text{C}$.



Rysunek 28. Krzywe TG/DTG dla usieciowanych materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem: (A,B) BM_17.8N, BM_30.3N, kwasem hialuronowym: (C,D) BM_1.2HA, BM_2.3HA, oraz usieciowanej matrycy bazowej: BM.

Tabela 13. Właściwości termiczne usieciowanych materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem: BM_17.8N, BM_30.3N, kwasem hialuronowym: BM_1.2HA, BM_2.3HA, oraz usieciowanej matrycy bazowej: BM.

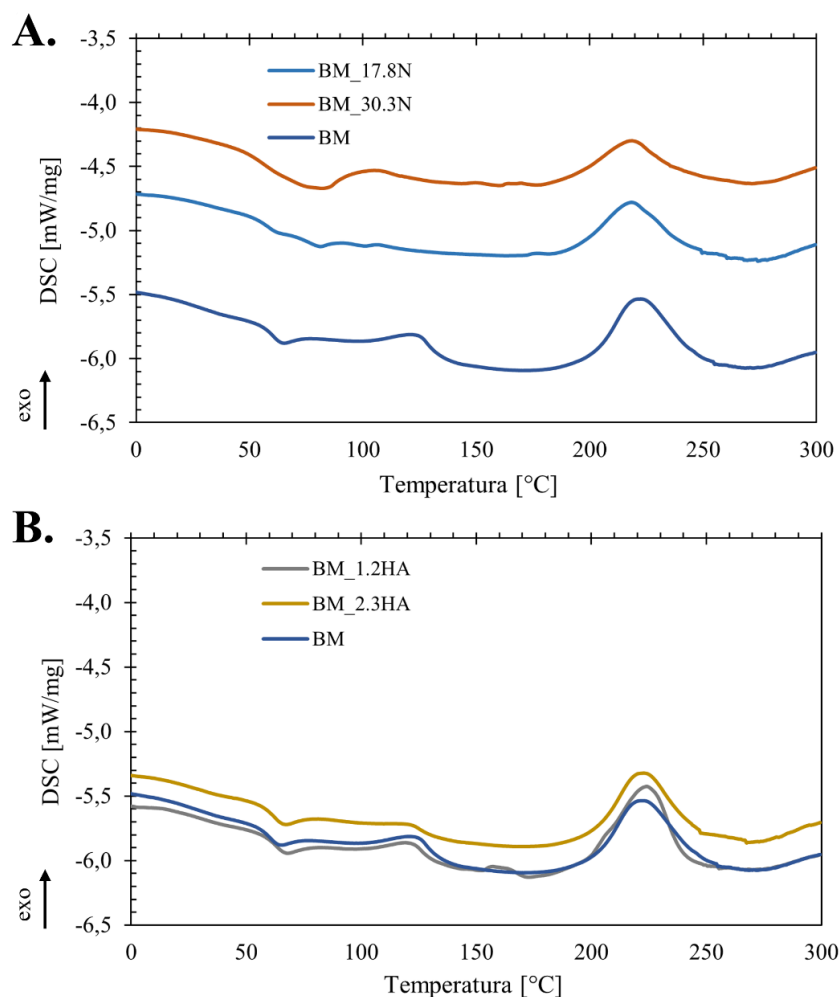
Próbki	T _{5%}	T _{10%}	T _{50%}	DTG ₁	DTG ₂	DTG ₃	Pozostałość w 800°C
	[°C]			[%/min; °C]			[%]
BM_17.8N	104,2	157,4	301,8	-1,46; 96,0	-4,09; 250,8	-	19,88
BM_30.3N	118,4	176,0	280,9	-1,10; 102,1	-5,33; 264,9	-	16,90
BM_1.2HA	113,0	172,6	341,1	-1,03; 107,8	-3,64; 260,0	-2,88; 318,8	23,66
BM_2.3HA	116,6	179,3	342,1	-0,98; 109,9	-3,55; 254,9	-2,89; 315,1	22,69
BM	111,7	170,0	331,4	-1,03; 105,9	-3,57; 258,6	-2,95; 316,3	23,00

Modyfikacja matrycy bazowej niacynamidem spowodowała wyraźne pogorszenie wytrzymałości termicznej materiałów BM_17.8N i BM_30.3N. Pozostałość po procesie ogrzewania w temperaturze końcowej $T = 800^{\circ}\text{C}$ wyniosła odpowiednio 19,9% i 16,9%, co oznacza obniżenie o 13,6-26,5% w odniesieniu do matrycy bazowej. Temperatura odpowiadająca efektom termicznym związanym z odparowaniem wody oraz usunięciem gliceryny obniżyła się do temperatur w zakresie $96-102^{\circ}\text{C}$. Dodatkowo, degradacja κ -karagenu, związków bioaktywnych ekstraktu oraz denaturacja sieci peptydowej połączyły się w jeden pik o maksimum w zakresie $T = 251-265^{\circ}\text{C}$. Wskazuje to na silny efekt destabilizujący niacynamidu na usieciowaną strukturę polimerową oraz na znacznie szybszy i bardziej intensywny rozkład termiczny badanych hydrożeli. Literatura potwierdza, że obecność niektórych substancji aktywnych, takich jak ketoprofen, może obniżać stabilność termiczną lub strukturalną materiałów polimerowych [458].

Zastosowanie kwasu hialuronowego nie wykazało istotnych zmian w przebiegu rozkładu termicznego matryc hydrożelowych. Poszczególne etapy degradacji zaobserwowano w zakresach temperatur $T = 108-110^{\circ}\text{C}$, $255-260^{\circ}\text{C}$ oraz $315-319^{\circ}\text{C}$. W próbkach BM_1.2HA i BM_2.3HA pojawił się dodatkowy pik odpowiadający termicznej degradacji struktury żelatyny. Końcowa pozostałość masy dla tych próbek wynosiła odpowiednio 23,7% i 22,7%, co jest wartością porównywalną z matrycą bazową. Brak wyraźnych zmian we właściwościach termicznych modyfikowanych hydrożeli może być związany z zastosowaniem niskiego stężenia substancji aktywnej. Wykazano, że niektóre dodatki funkcjonalne mogą poprawiać lub utrzymywać właściwości termiczne materiałów polimerowych na niezmiennym poziomie [459].

4.4.5. Analiza DSC

Rysunek 29A-B przedstawia wyniki analizy kalorymetrycznej w postaci krzywych DSC dla materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem i kwasem hialuronowym oraz usieciowanej matrycy bazowej.



Rysunek 29. Krzywe DSC dla usieciowanych materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem: (A) BM_17.8N, BM_30.3N, kwasem hialuronowym: (B) BM_1.2HA, BM_2.3HA, oraz usieciowanej matrycy bazowej: BM.

Dodatek niacynamidu do bazowej matrycy hydrożelowej spowodował obniżenie temperatury przejścia szklistego do $T = 55^{\circ}\text{C}$ dla próbki BM_17.8N oraz 54°C dla próbki BM_30.3N, co wskazuje na osłabienie oddziaływań międzyłańcuchowych w obecności tego związku. Temperatura egzotermicznego efektu cieplnego, prawdopodobnie związanego z rozpadem struktur wynikających z oddziaływań między gliceryną a żelatyną, uległa nieznacznemu przesunięciu do zakresu temperatur $119\text{--}121^{\circ}\text{C}$, w porównaniu do matrycy bazowej. Główny etap termicznego rozkładu materiału, obejmujący degradację κ -karagenu, bioaktywnych składników ekstraktu oraz niacynamidu, wystąpił w zakresie $T = 218\text{--}219^{\circ}\text{C}$. Dodatkowo zaobserwowano obecność egzotermicznych pików, których maksima znajdowały się przy $T = 177^{\circ}\text{C}$ (dla niższego stężenia niacynamidu) oraz w zakresie temperatur $150\text{--}170^{\circ}\text{C}$ (dla wyższego stężenia).

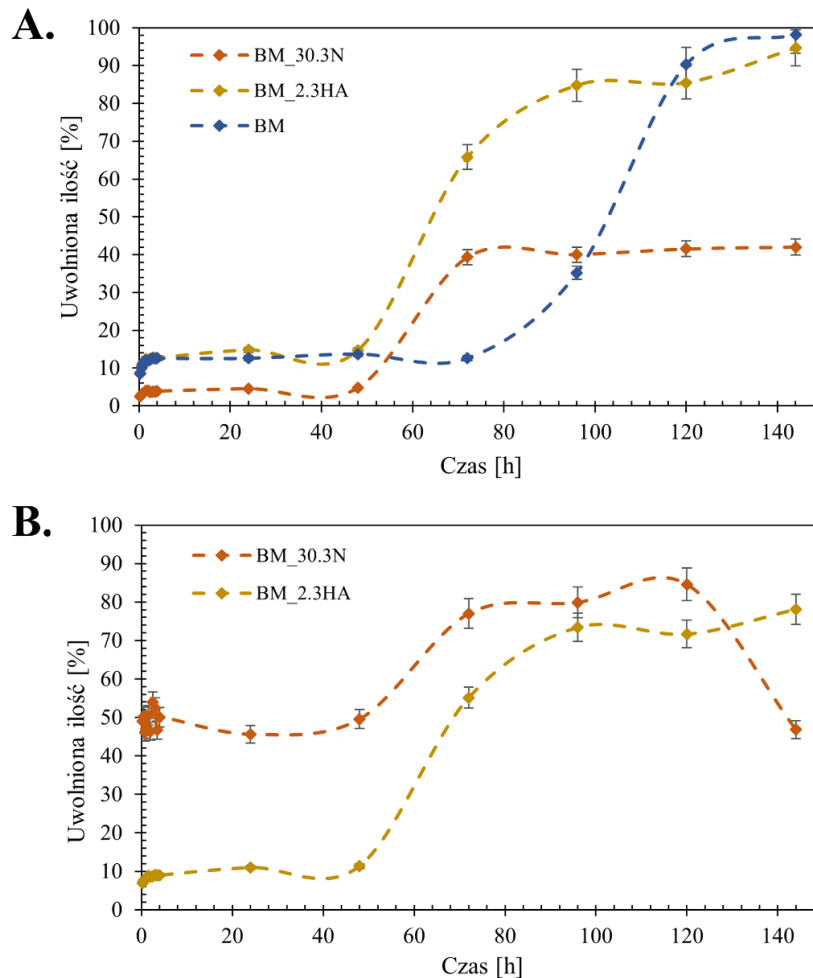
Sygnaly te mogą wskazywać na wczesny etap rozkładu niacynamidu lub jego oddziaływań z komponentami hydrożelu. Jednakże, ze względu na ograniczoną dostępność danych literaturowych, ich dokładna natura pozostaje niepotwierdzona.

Z kolei dodatek kwasu hialuronowego nie wpłynął istotnie na przebieg rozkładu termicznego badanych hydrożeli. Zaobserwowano jedynie nieznaczny wzrost temperatury przejścia szklistego, odpowiednio do $T = 62^{\circ}\text{C}$ dla próbki o niższym stężeniu oraz $T = 61^{\circ}\text{C}$ dla próbki o wyższym stężeniu. Temperatura rozpadu struktur żelatynowo-glicerynowych pozostała niezmienną i mieściła się w zakresie $T = 119\text{-}121^{\circ}\text{C}$, natomiast degradacja łańcuchów polisacharydowych, składników bio-czynnika sieciującego oraz samego kwasu hialuronowego nastąpiła w zakresie temperatur $223\text{-}224^{\circ}\text{C}$.

Wyniki analizy DSC wskazują, że obecność kwasu hialuronowego nie wpływa istotnie na stabilność termiczną hydrożeli, natomiast niacynamid działa destabilizująco.

4.4.6. Profil uwalniania substancji aktywnych

Profil uwalniania kwasu chlorogenowego, niacynamidu i kwasu hialuronowego z usieciowanej matrycy bazowej przedstawiono na **Rysunku 30A-B**.



Rysunek 30. Profile uwalniania: (A) kwasu chlorogenowego, oraz (B) substancji aktywnej z usieciowanych materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem: BM_17.8N, BM_30.3N, kwasem hialuronowym: BM_1.2HA, BM_2.3HA, oraz usieciowanej matrycy bazowej: BM.

Uwalnianie kwasu chlorogenowego, głównego składnika mieszanki bio-czynnika sieciującego, w pierwszych 48 godzinach przebiegało w podobny sposób zarówno z matrycy bazowej, jak i z materiału modyfikowanego kwasem hialuronowym. Proces ten był mniej gwałtowny w przypadku matrycy bazowej niż w próbce BM_2.3HA, wzrost stężenia substancji aktywnej w płynie akceptorowym (35%) zaobserwowano po 96 godzinach. Końcowa ilość uwolnionego związku wynosiła 98%.

W przypadku hydrożelu modyfikowanego kwasem hialuronowym intensywniejsze uwalnianie kwasu chlorogenowego rozpoczęło się po 48 godzinach, osiągając poziom 66% w 72 godzinie pomiarowej. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami

dotyczącymi stopnia usieciowania oraz zdolności pęcznienia. Ostatecznie uwolnieniu uległo 95% substancji czynnej.

Hydrożel zawierający niacynamid wykazał ograniczone uwalnianie kwasu chlorogenowego, co wynikało z niższych właściwości absorpcyjnych, spowodowanych zablokowaniem porów materiału. Znaczący wzrost ilości uwolnionego związku nastąpił dopiero w 72 godzinie badania (40%) i utrzymał się na tym poziomie do końca analizy.

Uwalnianie kwasu hialuronowego z próbki BM_2.3HA, podobnie jak kwasu chlorogenowego, gwałtownie wzrosło po 48 godzinach. Po 72 godzinach uwalniania ilość uwolnionego związku wynosiła 55%, a ostatecznie 78% po 144 godzinach. Dostarczanie obu substancji aktywnych odbywało się równolegle.

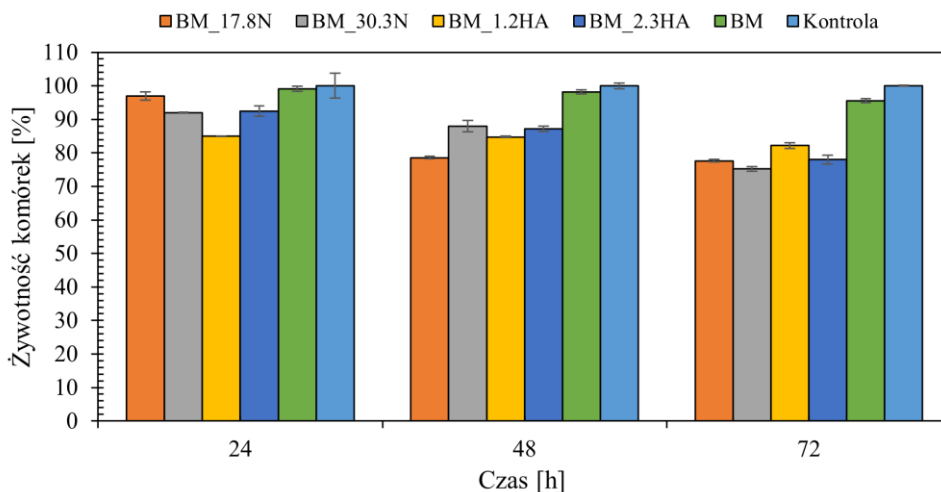
W przypadku materiału BM_30.3N już w początkowej fazie badania zaobserwowano intensywny „wyrzut” niacynamidu, jego stężenie osiągnęło 50% po zaledwie 30 minutach. Po 48 godzinach nastąpił wzrost ilości związku w płynie akceptorowym do wartości 77%. Uwolnienie większości niacynamidu z matrycy przyspieszyło uwalnianie kwasu chlorogenowego. W końcowym etapie badania stężenie niacynamidu spadło do 47%, co najprawdopodobniej było wynikiem jego degradacji w medium inkubacyjnym, spowodowanej działaniem produktów rozkładu hydrożelu.

Struktura analizowanych materiałów hydrożelowych umożliwiła uzyskanie zróżnicowanych profili uwalniania substancji aktywnych. Matryca bazowa pełniła funkcję nośnika o stopniowym, przedłużonym uwalnianiu kwasu chlorogenowego w ciągu 7 dni. Hydrożel BM_2.3HA pozwolił na jednoczesne uwalnianie niacynamidu i kwasu chlorogenowego, co sprzyja ich synergicznemu działaniu terapeutycznemu. Natomiast próbka BM_30.3N charakteryzowała się sekwencyjnym uwalnianiem, początkowo niacynamidu, a następnie kwasu chlorogenowego. Taki profil umożliwia kontrolowane wspomaganie procesu gojenia ran, początkowe działanie przeciwzapalne i wspierające regenerację zostaje z czasem zastąpione przez aktywność przeciwdrobnoustrojową i przeciwutleniającą.

Otrzymane materiały hydrożelowe wykazują odmienne profile uwalniania substancji czynnych, co umożliwia ich potencjalne zastosowanie w leczeniu ran o różnym charakterze i odmiennych wymaganiach terapeutycznych.

4.4.7. Cytotoksyczność

Materiały hydrożelowe modyfikowane niacynamidem i kwasem hialuronowym oraz usieciowaną matrycę bazową poddano analizie biologicznej w celu oceny ich działania cytotoksycznego wobec komórek GM07452 (**Rysunek 31**).



Rysunek 31. Cytotoksyczność względem komórek GM07452 usieciowanych materiałów hydrożelowych modyfikowanych niacynamidem: BM_17.8N, BM_30.3N, kwasem hialuronowym: BM_1.2HA, BM_2.3HA, oraz usieciowanej matrycy bazowej: BM.

Badanie cytotoksyczności materiałów hydrożelowych prowadzono przez 72 godziny przy zastosowaniu pierwotnych ludzkich fibroblastów, jednak analizy były wykonywane po 24, 48 i 72 godzinach. Usieciowana matryca bazowa wykazała bardzo wysoką żywotność komórek. Po 72 godzinach inkubacji żywotność komórek utrzymywała się na poziomie 96%.

Dla hydrożeli modyfikowanych niacynamidem zaobserwowano żywotność komórek na poziomie 75-78%, natomiast w przypadku kwasu hialuronowego wartość ta wynosiła 78-82%. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, żywotność komórek przekraczająca 75% kwalifikuje materiał jako nietoksyczny [460]. Próbkami BM_17.8N, BM_30.3N, BM_1.2HA oraz BM_2.3HA nie wykazały toksycznego działania nawet po 72 godzinach, pozostając bezpieczne w warunkach *in vitro*.

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania badanych materiałów hydrożelowych w zastosowaniach dermatologicznych, w tym jako opatrunki na rany i podłoża farmaceutyczne.

4.5. Podsumowanie części badawczej

W przeprowadzonych badaniach opracowano skuteczną i zrównoważoną metodę pozyskiwania związków polifenolowych z odpadowego surowca roślinnego - fusów kawowych. Zastosowanie ekstrakcji wspomaganiej ultradźwiękami i promieniowaniem mikrofalowym (UMAE) umożliwiło skrócenie czasu prowadzenia procesu, przy jednoczesnym wykorzystaniu rozpuszczalników przyjaznych dla środowiska. Metoda ta wpisuje się w założenia gospodarki o obiegu zamkniętym, promując wykorzystanie odpadów przemysłu spożywczego jako wartościowych źródeł substancji bioaktywnych.

Uzyskane ekstrakty wykazały zdolność do chemicznego sieciowania żelatyny, co potwierdzono szeregiem analiz strukturalnych, termicznych i chemicznych. Opracowane materiały hydrożelowe charakteryzowały się wysokim stopniem usieciowania, korzystnymi właściwościami fizykochemicznymi, stabilnością termiczną oraz pożądanymi parametrami mechanicznymi.

Wprowadzenie dodatkowych substancji aktywnych, takich jak niacynamid i kwas hialuronowy, pozwoliło na nadanie materiałom właściwości terapeutycznych, ukierunkowanych na wspomaganie procesów regeneracyjnych skóry. Materiały wykazywały biokompatybilność i biodegradowalność.

Podsumowując, opracowane hydrożele stanowią innowacyjne podejście do projektowania nowoczesnych biomateriałów opatrunkowych. Zastosowanie naturalnych, odpadowych źródeł substancji bioaktywnych przyczynia się do rozwoju zrównoważonych technologii w dziedzinie inżynierii materiałowej, biomedycznej i chemicznej. Otrzymane materiały wykazują wysoki potencjał aplikacyjny jako systemy opatrunkowe przeznaczone do leczenia ran o różnej etiologii.

5. WNIOSKI

W niniejszej pracy opracowano najbardziej efektywną metodę pozyskiwania substancji aktywnych z fusów kawowych, które następnie zastosowano jako bio-czynniki sieciujące do otrzymywania modyfikowanych materiałów hydrożelowych o wysokim potencjale aplikacyjnym jako opatrunki na rany. Poniżej sformułowano najważniejsze wnioski wynikające z uzyskanych wyników:

- Dobrano korzystne warunki pozyskiwania substancji aktywnych z fusów kawowych przy zastosowaniu następujących metod ekstrakcji: ciało stałe-ciecz (LSE: 35°C, 35 minut, pH 3,2), wspomagana ultradźwiękami (UAE: 40°C, 40 minut, pH 4,3), wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE: 50°C, 210 W, pH 10) oraz wspomagana ultradźwiękami i promieniowaniem mikrofalowym (UMAE: 15 minut, 140 W, pH 10).
- Synergiczne działanie ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego w trakcie procesu pozwoliło uzyskać wysoką efektywność pozyskiwania związków polifenolowych z odpadowego surowca roślinnego. Metoda ekstrakcji UMAE okazała się najbardziej efektywna w odniesieniu do pozyskiwania pochodnych kwasu chlorogenowego (1270,3 mg/l) oraz kwasu szikimowego (85,2 mg/l).
- Wszystkie uzyskane ekstrakty wykazały wyraźne działanie wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Ekstrakty otrzymane metodami MAE i UMAE charakteryzowały się dodatkowo właściwościami grzybobójczymi. Ponadto badania biologiczne potwierdziły brak działania cytotoksycznego w warunkach *in vitro* ekstraktów oraz wskazały na ich zdolność do promowania migracji komórek.
- Udowodniono zdolność ekstraktów do chemicznego sieciowania żelatyny. Spośród badanych próbek, hydrożel zawierający najwyższe stężenie liofilizowanego ekstraktu (LF_10.0) osiągnął najwyższy stopień usieciowania (98,7%), wykazując zwartą strukturę o ograniczonej porowatości oraz podwyższoną odporność hydrolityczną i termiczną.
- Dodatek gliceryny do matrycy hydrożelowej LF_10.0 wpłynął korzystnie na jej właściwości mechaniczne, w szczególności elastyczność, co umożliwiło uzyskanie materiału o lepszych parametrach użytkowych w kontekście zastosowań dermatologicznych.

- Bazowy materiał hydrożelowy został zmodyfikowany przy użyciu dwóch substancji aktywnych (niacynamidu i kwasu hialuronowego) w celu nadania mu dodatkowych właściwości biologicznych, sprzyjających jego potencjalnemu zastosowaniu jako materiału opatrunkowego wspomagającego leczenie ran.
- Modyfikowane materiały hydrożelowe wykazały zróżnicowane profile uwalniania wprowadzonych substancji aktywnych, co umożliwia ich potencjalne zastosowanie w leczeniu ran o różnym charakterze i odmiennych wymaganiach terapeutycznych. Dodatkowo, badania cytotoksyczności potwierdziły brak toksycznego działania otrzymanych modyfikowanych materiałów w warunkach *in vitro*.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv Drug Deliv Rev* 64 (2012) 223–236. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>.
- [2] J. Maitra, V. Kumar Shukla, Cross-linking in Hydrogels - A Review, *American Journal of Polymer Science* 4 (2014) 25–31. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20140402.01>.
- [3] J.A. Burdick, M.M. Stevens, Biomedical hydrogels, in: *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*, 1st ed., CRC Press, Cambridge, 2005: pp. 107–115. <https://doi.org/10.1533/9781845690861.2.107>.
- [4] S. Bashir, M. Hina, J. Iqbal, Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and their applications, *Polymers* 12 (2020) 1–60. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>.
- [5] M. Klein, E. Poverenov, Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture, *J Sci Food Agric* 100 (2020) 2337–2347. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10274>.
- [6] P. Sapuła, K. Bialik-Wąs, K. Malarz, Are Natural Compounds a Promising Alternative to Synthetic Cross-Linking Agents in the Preparation of Hydrogels?, *Pharmaceutics* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010253>.
- [7] A. Jimtaisong, N. Saewan, Plant-derived polyphenols as potential cross-linking agents for methylcellulose-chitosan biocomposites, *Solid State Phenomena* 283 (2018) 140–146. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.283.140>.
- [8] M. Abbas, F. Saeed, F.M. Anjum, M. Afzaal, T. Tufail, M.S. Bashir, A. Ishtiaq, S. Hussain, H.A.R. Suleria, Natural polyphenols: An overview, *Int J Food Prop* 20 (2017) 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>.
- [9] A.N. Badr, M.M. El-attar, H.S. Ali, M.F. Elkhadragey, H.M. Yehia, A. Farouk, Spent Coffee Grounds Valorization as Bioactive Phenolic Source Acquired Antifungal, Anti-Mycotoxigenic, and Anti-Cytotoxic Activities, *Toxins* 14 (2022) 109. <https://doi.org/10.3390/toxins14020109>.
- [10] K. Pyrzynska, Useful Extracts from Coffee By-Products: A Brief Review, *Separations* 11 (2024) 334. <https://doi.org/10.3390/separations11120334>.
- [11] Q. Wei, Y. Zhao, Y. Wei, Y. Wang, Z. Jin, G. Ma, Y. Jiang, W. Zhang, Z. Hu, Facile preparation of polyphenol-crosslinked chitosan-based hydrogels for cutaneous wound repair, *Int J Biol Macromol* 228 (2023) 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.215>.
- [12] G. Rocasalbas, A. Francesko, S. Touriño, X. Fernández-Francos, G.M. Guebitz, T. Tzanov, Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols, *Carbohydr Polym* 92 (2013) 989–996. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.045>.
- [13] P. Yammine, A. El Safadi, R. Kassab, H. El-Nakat, P.J. Obeid, Z. Nasr, T. Tannous, N. Sari-Chmayssem, A. Mansour, A. Chmayssem, Types of Crosslinkers and Their Applications in Biomaterials and Biomembranes, *Chemistry* 7 (2025). <https://doi.org/10.3390/chemistry7020061>.
- [14] A.C. Alavarse, E.C.G. Frachini, R.L.C.G. da Silva, V.H. Lima, A. Shavandi, D.F.S. Petri, Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review, *Int J Biol Macromol* 202 (2022) 558–596. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029>.
- [15] S. Grabska-Zielińska, Cross-Linking Agents in Three-Component Materials Dedicated to Biomedical Applications: A Review, *Polymers* 16 (2024) 2679. <https://doi.org/10.3390/polym16182679>.
- [16] N. Reddy, R. Reddy, Q. Jiang, Crosslinking biopolymers for biomedical applications, *Trends Biotechnol* 33 (2015) 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>.

- [17] A. Oryan, A. Kamali, A. Moshiri, Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds, *Int J Biol Macromol* 107 (2018) 678–688. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>.
- [18] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *J Mater Chem A Mater* 37 (2004) 790–802. <https://doi.org/10.1039/C6TA07211A>.
- [19] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking, *Biomaterials* 22 (2001) 763–768. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00236-2).
- [20] D.R. Smith, R.-S. Wang, Glutaraldehyde exposure and its occupational impact in the health care environment, *Environ Health Prev Med* 11 (2006) 3–10. <https://doi.org/10.1007/bf02898201>.
- [21] J.F. Martucci, R.A. Ruseckaite, A. Vázquez, Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films, *Materials Science and Engineering A* 435–436 (2006) 681–686. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2006.07.097>.
- [22] A. Talebian, S.S. Kordestani, A. Rashidi, The effect of glutaraldehyde on the properties of gelatin films, *Kemija u Industriji/Journal of Chemists and Chemical Engineers* 56 (2007) 537–541.
- [23] B. Kaczmarek-Szczepańska, O. Mazur, M. Michalska-Sionkowska, The Preparation and Characterization of Chitosan-Based Hydrogels Cross-Linked by Glyoxal Beata, *J Am Chem Soc* 14 (2021) 2449. <https://doi.org/10.1021/ja01548a040>.
- [24] C.C. Tsai, T.H. Young, G.S. Chen, Developing a glyoxal-crosslinked chitosan/gelatin hydrogel for sustained release of human platelet lysate to promote tissue regeneration, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 6451. <https://doi.org/10.3390/ijms22126451>.
- [25] E.L. Gill, W. Wang, R. Liu, Additive batch electrospinning patterning of tethered gelatin hydrogel fibres with swelling-induced fibre curling, *Addit Manuf* 36 (2020) 101456. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2020.101456>.
- [26] N. Shangari, P.J. O'Brien, The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress, *Biochem Pharmacol* 68 (2004) 1433–1442. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.06.013>.
- [27] D. Liu, J. Chen, Y. Xie, Investigating the molecular mechanisms of glyoxal-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells: Insights from network toxicology and cell biology experiments, *Environ Toxicol* 37 (2022) 2269–2280. <https://doi.org/10.1002/tox.23593>.
- [28] K. Yang, D. Qiang, S. Delaney, Differences in glyoxal and methylglyoxal metabolism determine cellular susceptibility to protein carbonylation and cytotoxicity, *Chem Biol Interact* 191 (2011) 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.02.012>.
- [29] K.C. Gupta, F.H. Jabrail, Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman, *Carbohydr Res* 341 (2006) 744–756. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.02.003>.
- [30] N. Gupta, H. Shivakumar, Preparation and Characterization of Superporous Hydrogels as pH-Sensitive Drug Delivery System for Pantoprazole Sodium, *Curr Drug Deliv* 6 (2009) 505–510. <https://doi.org/10.2174/156720109789941722>.
- [31] X. Chang, D. Chen, X. Jiap, Chitosan-based aerogels with high adsorption performance, *Journal of Physical Chemistry B* 112 (2008) 7721–7725. <https://doi.org/10.1021/jp8011359>.
- [32] H. Kiuchi, W. Kai, Y. Inoue, Preparation and Characterization of Poly(ethylene glycol) Crosslinked Chitosan Films, *J Appl Polym Sci* 107 (2007) 3823–3830. <https://doi.org/10.1002/app>.
- [33] S. Lee, X. Tong, F. Yang, The effects of varying poly(ethylene glycol) hydrogel crosslinking density and the crosslinking mechanism on protein accumulation in three-dimensional hydrogels, *Acta Biomater* 10 (2014) 4167–4174. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.023>.

- [34] H. Kono, Characterization and properties of carboxymethyl cellulose hydrogels crosslinked by polyethylene glycol, *Carbohydr Polym* 106 (2014) 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.020>.
- [35] T. Rattanawongwiboon, K. Hemvichian, P. Lertsarawut, Chitosan-poly(ethylene glycol) diacrylate beads prepared by radiation-induced crosslinking and their promising applications derived from encapsulation of essential oils, *Radiation Physics and Chemistry* 170 (2020) 108656. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.108656>.
- [36] R. Mincheva, N. Manolova, R. Sabov, Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethylene glycol) diacid as bone regeneration materials, *E-Polymers* 058 (2004) 1–11. <https://doi.org/10.1515/epoly.2004.4.1.643>.
- [37] G. Liu, Y. Li, L. Yang, Cytotoxicity study of polyethylene glycol derivatives, *RSC Adv* 7 (2017) 18252–18259. <https://doi.org/10.1039/c7ra00861a>.
- [38] Veronese M. Francesco, *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*, 1st ed., Birkhäuser Basel, 2009.
- [39] O. Catanzano, G. Gomez d’Ayala, A. D’Agostino, PEG-crosslinked-chitosan hydrogel films for in situ delivery of *Opuntia ficus-indica* extract, *Carbohydr Polym* 264 (2021) 117987. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117987>.
- [40] P.K. Sharma, M. Halder, U. Srivastava, Antibacterial PEG-Chitosan Hydrogels for Controlled Antibiotic/Protein Delivery, *ACS Appl Bio Mater* 2 (2019) 5313–5322. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00570>.
- [41] A. Altinisik, K. Yurdakoc, Synthesis, Characterization, and Enzymatic Degradation of Chitosan/PEG Hydrogel Films, *J Appl Polym Sci* 122 (2011) 1556–1563. <https://doi.org/10.1002/app.34278>.
- [42] M. Mekhail, K.K.H. Wong, D.T. Padavan, Y. Wu, D.B. O’Gorman, W. Wan, Genipin-Cross-linked Electrospun Collagen Fibers, *J Biomater Sci Polym Ed* 22 (2011) 2241–2259. <https://doi.org/10.1163/092050610X538209>.
- [43] N.T.N. Vo, L. Huang, H. Lemos, Genipin-crosslinked chitosan hydrogels: Preliminary evaluation of the in vitro biocompatibility and biodegradation, *J Appl Polym Sci* 138 (2021) e50848. <https://doi.org/10.1002/app.50848>.
- [44] Y. Yu, S. Xu, S. Li, Genipin-cross-linked hydrogels based on biomaterials for drug delivery: A review, *Biomater Sci* 9 (2021) 1583–1597. <https://doi.org/10.1039/d0bm01403f>.
- [45] C. Mu, K. Zhang, W. Lin, Ring-opening polymerization of genipin and its long-range crosslinking effect on collagen hydrogel, *J Biomed Mater Res A* 101A (2012) 385–393. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34338>.
- [46] B. Manickam, R. Sreedharan, M. Elumalai, ‘Genipin’ – The Natural Water Soluble Cross-linking Agent and Its Importance in the Modified Drug Delivery Systems: An Overview, *Curr Drug Deliv* 11 (2014) 139–145. <https://doi.org/10.2174/15672018113106660059>.
- [47] C. Tonda-Turo, P. Gentile, S. Saracino, Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agent, *Int J Biol Macromol* 49 (2011) 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.002>.
- [48] D.M. Kirchmayer, C.A. Watson, M. Ranson, Gelapin, a degradable genipin cross-linked gelatin hydrogel, *RSC Adv* 3 (2013) 1073–1081. <https://doi.org/10.1039/c2ra22859a>.
- [49] C. Yao, B. Liu, C. Chang, Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials, *Mater Chem Phys* 83 (2004) 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.mathchemphys.2003.08.027>.

- [50] S.A. Stone, P. Gosavi, T.J. Athauda, In situ citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nanofibers, *Mater Lett* 112 (2013) 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.08.100>.
- [51] R. Salihu, S.I. Abd Razak, N. Ahmad Zawawi, Citric acid: A green cross-linker of biomaterials for biomedical applications, *Eur Polym J* 146 (2021) 110271. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110271>.
- [52] J. Uranga, B.T. Nguyen, T.T. Si, The Effect of Cross-Linking with Citric Acid on the Properties of Agar/Fish Gelatin Films, *Polymers* 12 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3390/polym12020291>.
- [53] H. Saito, T. Taguchi, H. Kobayashi, Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative, *Materials Science and Engineering C* 24 (2004) 781–785. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2004.08.039>.
- [54] M. Inoue, M. Sasaki, T. Taguchi, Unusual degradation behavior of citric acid-crosslinked gelatin in vitro and in vivo, *Polym Degrad Stab* 95 (2010) 2088–2092. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.029>.
- [55] H.Y. Lee, C.H. Hwang, H.E. Kim, Enhancement of bio-stability and mechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by tannic acid treatment, *Carbohydr Polym* 186 (2018) 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.056>.
- [56] W. Ge, S. Cao, F. Shen, Rapid self-healing, stretchable, moldable, antioxidant and antibacterial tannic acid-cellulose nanofibril composite hydrogels, *Carbohydr Polym* 224 (2019) 115147. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115147>.
- [57] F. Azadikhah, A.R. Karimi, G.H. Yousefi, Dual antioxidant-photosensitizing hydrogel system: Cross-linking of chitosan with tannic acid for enhanced photodynamic efficacy, *Int J Biol Macromol* 188 (2021) 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.006>.
- [58] C. Chen, H. Yang, X. Yang, Tannic acid: A crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: A review, *RSC Adv* 12 (2022) 7689–7711. <https://doi.org/10.1039/d1ra07657d>.
- [59] L. Zhou, L. Fan, X. Yi, Soft Conducting Polymer Hydrogels Cross-Linked and Doped by Tannic Acid for Spinal Cord Injury Repair, *ACS Nano* 12 (2018) 10957–10967. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b04609>.
- [60] L.Y. Zheng, J.M. Shi, Y.H. Chi, Tannic Acid Physically Cross-Linked Responsive Hydrogel, *Macromol Chem Phys* 219 (2018) 1800234. <https://doi.org/10.1002/macp.201800234>.
- [61] J. Xu, Y. Li, Y. Chen, Preparation and characterization of a novel polysialic acid/gelatin composite hydrogels cross-linked by tannic acid to improve wound healing after cesarean section dressing, *J Biomater Sci Polym Ed* 32 (2021) 1927–1943. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1950961>.
- [62] Z. Li, Z. Chen, H. Chen, Polyphenol-based hydrogels: Pyramid evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design, *Bioact Mater* 17 (2022) 49–70. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.038>.
- [63] A. Bhattacharyya, V.N.K. Priya, J. Kim, Nanodiamond enhanced mechanical and biological properties of extrudable gelatin hydrogel cross - linked with tannic acid and ferrous sulphate, *Biomater Res* 26 (2022) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00285-3>.
- [64] S. Ge, N. Ji, S. Cui, Coordination of Covalent Cross-Linked Gelatin Hydrogels via Oxidized Tannic Acid and Ferric Ions with Strong Mechanical Properties, *J Agric Food Chem* 67 (2019) 11489–11497. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03947>.
- [65] J.P.D. Garcia, M.F. Hsieh, B.T. Doma, Synthesis of gelatin- γ -Polyglutamic acid-based hydrogel for the in vitro controlled release of epigallocatechin gallate (EGCG) from *Camellia sinensis*, *Polymers* 6 (2014) 39–58. <https://doi.org/10.3390/polym6010039>.
- [66] E. Kim, K. Hwang, J. Lee, Skin protective effect of epigallocatechin gallate, *Int J Mol Sci* 19 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms19010173>.

- [67] A. Pinheiro, A. Cooley, J. Liao, Comparison of natural crosslinking agents for the stabilization of xenogenic articular cartilage, *Journal of Orthopaedic Research* 34 (2016) 1037–1046. <https://doi.org/10.1002/jor.23121>.
- [68] Y. Jin, R.H. Koh, S.H. Kim, Injectable anti-inflammatory hyaluronic acid hydrogel for osteoarthritic cartilage repair, *Materials Science and Engineering C* 115 (2020) 111096. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111096>.
- [69] J. Li, S. Munir, X. Yu, Double-crosslinked effect of TGase and EGCG on myofibrillar proteins gel based on physicochemical properties and molecular docking, *Food Chem* 345 (2021) 128655. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128655>.
- [70] H. Liu, Z. Jiao, S. Guo, Effect of epigallocatechin gallate on the properties of gelatin, *Int J Food Prop* 17 (2014) 2119–2130. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.784329>.
- [71] C. Ruan, Y. Zhang, J. Wang, Preparation and antioxidant activity of sodium alginate and carboxymethyl cellulose edible films with epigallocatechin gallate, *Int J Biol Macromol* 134 (2019) 1038–1044. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.143>.
- [72] I. Karakurt, K. Ozaltin, E. Vargun, Controlled release of enrofloxacin by vanillin-crosslinked chitosan-polyvinyl alcohol blends, *Materials Science and Engineering C* 126 (2021) 112125. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112125>.
- [73] Q. Zou, J. Li, Y. Li, Preparation and characterization of vanillin-crosslinked chitosan therapeutic bioactive microcarriers, *Int J Biol Macromol* 79 (2015) 736–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.037>.
- [74] R.L.C.G. da Silva, O.D. Bernardinelli, E.C.G. Frachini, Vanillin crosslinked chitosan films: The states of water and the effect of carriers on curcumin uptake, *Carbohydr Polym* 292 (2022) 119725. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119725>.
- [75] M. Fache, B. Boutevin, S. Caillol, Vanillin, a key-intermediate of biobased polymers, *Eur Polym J* 68 (2015) 488–502. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.050>.
- [76] L. Xu, F. Liaqat, J. Sun, M.I. Khazi, R. Xie, D. Zhu, Advances in the vanillin synthesis and biotransformation: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 189 (2024) 113905. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113905>.
- [77] A. Sionkowska, M. Michalska-Sionkowska, M. Walczak, Preparation and characterization of collagen/hyaluronic acid/chitosan film crosslinked with dialdehyde starch, *Int J Biol Macromol* 149 (2020) 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.262>.
- [78] C. Yang, Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking, *Bulletin of Materials Science* 35 (2012) 913–918. <https://doi.org/10.1007/s12034-012-0376-5>.
- [79] M.S. Manjari, K.P. Aaron, C. Muralidharan, C. Rose, Highly biocompatible novel polyphenol cross-linked collagen scaffold for potential tissue engineering applications, *React Funct Polym* 153 (2020) 104630. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104630>.
- [80] I. Erdogan, M. Demir, O. Bayraktar, Olive Leaf Extract as a Crosslinking Agent for the Preparation of Electrospun Zein Fibers, *J Appl Polym Sci* 132 (2015). <https://doi.org/10.1002/app.41338>.
- [81] Y. Zhao, Z. Li, W. Yang, C. Xue, Y. Wang, J. Dong, Y. Xue, Modification of Gelatine with Galla chinensis Extract, a Natural Crosslinker, *Int J Food Prop* 19 (2016) 731–744. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1013633>.
- [82] Y. Ren, F.Y. Wang, R.T. Lan, W.Q. Fu, Z.J. Chen, H. Lin, S. Huang, R.M. Gul, J. Wang, J.Z. Xu, Z.M. Li, Polyphenol-Assisted Chemical Crosslinking: A New Strategy to Achieve Highly Crosslinked, Antioxidative, and Antibacterial Ultrahigh-Molecular-Weight Polyethylene for Total Joint Replacement, *ACS Biomater Sci Eng* 7 (2021) 373–381. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c01437>.

- [83] D. Calheiros, M.I. Dias, R.C. Calhella, L. Barros, I.C.F.R. Ferreira, C. Fernandes, T. Gonçalves, Antifungal Activity of Spent Coffee Ground Extracts, *Microorganisms* 11 (2023) 242. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020242>.
- [84] International Coffee Organization, World coffee consumption, 2021.
- [85] International Coffee Organization, Imports By Selected Importing Countries From All Sources, 2021.
- [86] E. Bevilacqua, V. Cruzat, I. Singh, R.B. Rose'Meyer, S.K. Panchal, L. Brown, The Potential of Spent Coffee Grounds in Functional Food Development, *Nutrients* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/nu15040994>.
- [87] A. Forcina, Petrillo A, Travagliani M, A comparative life cycle assessment of different spent coffee ground reuse strategies and a sensitivity analysis for verifying the environmental convenience based on the location of sites, *J Clean Prod* 385 (2023) 135727. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135727>.
- [88] L.F. Ballesteros, J.A. Teixeira, S.I. Mussatto, Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin, *Food Bioproc Tech* 7 (2014) 3493–3503. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>.
- [89] K. Johnson, Y. Liu, M. Lu, A Review of Recent Advances in Spent Coffee Grounds Upcycle Technologies and Practices, *Frontiers in Chemical Engineering* 4 (2022) 838605. <https://doi.org/10.3389/fceng.2022.838605>.
- [90] J. McNutt, Q. (Sophia) He, Spent coffee grounds: A review on current utilization, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 71 (2019) 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.11.054>.
- [91] R. Campos-Vega, G. Loarca-Piña, H.A. Vergara-Castañeda, B. Dave Oomah, Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects, *Trends Food Sci Technol* 45 (2015) 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.012>.
- [92] A. Kovalcik, S. Obruca, I. Marova, Valorization of Spent Coffee Grounds: A review, *Food and Bioprocess Processing* 110 (2018) 104–119. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.002>.
- [93] C. V. Garcia, Y.T. Kim, Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin as Potential Materials for Packaging: A Review, *J Polym Environ* 29 (2021) 2372–2384. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02067-9>.
- [94] R. Głowacka, A. Górska, M. Wirkowska-Wojdyła, R. Wołosiak, E. Majewska, D. Derewiaka, The influence of brewing method on bioactive compounds residues in spent coffee grounds of different roasting degree and geographical origin, *Int J Food Sci Technol* 54 (2019) 3008–3014. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14213>.
- [95] F.L. Partelli, H.D. Vieira, Coffee Breeding and Stress Biology, *Plants* 13 (2024) 1912. <https://doi.org/10.3390/plants13141912>.
- [96] H. Chen, *Biotechnology of Lignocellulose*, Springer, Dordrecht, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7>.
- [97] R. Roy, M.S. Rahman, D.E. Raynie, Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* 3 (2020) 100035. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100035>.
- [98] J.P. Lange, Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1 (2007) 39–48. <https://doi.org/10.1002/bbb.7>.
- [99] M.S. Singhvi, S. Chaudhari, D. V. Gokhale, Lignocellulose processing: a current challenge, *RSC Adv* 4 (2014) 8271–8277. <https://doi.org/10.1039/c3ra46112b>.

- [100] S. Malherbe, T.E. Cloete, Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications, *Rev Environ Sci Biotechnol* 1 (2002) 105–114. <https://doi.org/10.1023/A:1020858910646>.
- [101] N. Zhao, Z. Liu, T. Yu, F. Yan, Spent coffee grounds: Present and future of environmentally friendly applications on industries-A review, *Trends Food Sci Technol* 143 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104312>.
- [102] A.F. Bondam, D. Diolinda da Silveira, J. Pozzada dos Santos, J.F. Hoffmann, Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries, *Trends Food Sci Technol* 123 (2022) 172–186. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.03.013>.
- [103] G.C. Díaz-Hernández, P. Alvarez-Fitz, Y.I. Maldonado-Astudillo, J. Jiménez-Hernández, I. Parra-Rojas, E. Flores-Alfaro, R. Salazar, M. Ramírez, Antibacterial, Antiradical and Antiproliferative Potential of Green, Roasted, and Spent Coffee Extracts, *Applied Sciences* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/app12041938>.
- [104] M. Balzano, M.R. Loizzo, R. Tundis, P. Lucci, O. Nunez, D. Fiorini, A. Giardinieri, N.G. Frega, D. Pacetti, Spent espresso coffee grounds as a source of anti-proliferative and antioxidant compounds, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 59 (2020) 102254. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102254>.
- [105] M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas, A.A. Kamboh, G.J. Khan, M. Shumzaid, F. Ahmad, D. Babazadeh, X. FangFang, F. Modarresi-Ghazani, L. WenHua, Z. XiaoHui, Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 97 (2018) 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>.
- [106] R. Upadhyay, L.J. Mohan Rao, An Outlook on Chlorogenic Acids-Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities, *Crit Rev Food Sci Nutr* 53 (2013) 968–984. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.576319>.
- [107] V. Nguyen, E.G. Taine, D. Meng, T. Cui, W. Tan, Chlorogenic Acid: A Systematic Review on the Biological Functions, Mechanistic Actions, and Therapeutic Potentials, *Nutrients* 16 (2024) 924. <https://doi.org/10.3390/nu16070924>.
- [108] S. Meng, J. Cao, Q. Feng, J. Peng, Y. Hu, Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/801457>.
- [109] Saxena R, Laddha H, Bhoi R.G., Sustainable management of spent coffee grounds: applications, decompositions techniques and structural analysis, *J Mater Cycles Waste Manag* 27 (2025) 19–33. <https://doi.org/10.1007/s10163-024-02113-3>.
- [110] M. Stylianou, A. Agapiou, M. Omirou, I. Vyrides, I.M. Ioannides, G. Maratheftis, D. Fasoula, Converting environmental risks to benefits by using spent coffee grounds (SCG) as a valuable resource, *Environmental Science and Pollution Research* 25 (2018) 35776–35790. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2359-6>.
- [111] G. Dattatraya Saratale, R. Bhosale, S. Shobana, J.R. Banu, A. Pugazhendhi, E. Mahmoud, R. Sirohi, S. Kant Bhatia, A.E. Atabani, V. Mulone, J.J. Yoon, H. Seung Shin, G. Kumar, A review on valorization of spent coffee grounds (SCG) towards biopolymers and biocatalysts production, *Bioresour Technol* 314 (2020) 123800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123800>.
- [112] S. Angeloni, M. Freschi, P. Marrazzo, S. Hrelia, D. Beghelli, A. Juan-García, C. Juan, G. Caprioli, G. Sagratini, C. Angeloni, Antioxidant and Anti-Inflammatory Profiles of Spent Coffee Ground Extracts for the Treatment of Neurodegeneration, *Oxid Med Cell Longev* 2021 (2021). <https://doi.org/10.1155/2021/6620913>.
- [113] Y. Zhou, A. Camisasca, S. Dominguez-Gil, M. Bartkowski, K.D. Rochfort, M. Piletti, A. White, D. Krizsan, R. O'Connor, S.J. Quinn, D. Iacopino, A.J. Eustace, S. Giordani, Synthesis of carbon dots from spent coffee grounds: transforming waste into potential biomedical tools, *Nanoscale* 17 (2025) 9947–9962. <https://doi.org/10.1039/d4nr05186f>.

- [114] M. Kanlayavattanakul, N. Lourith, P. Chaikul, Valorization of spent coffee grounds as the specialty material for dullness and aging of skin treatments, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 8 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00252-5>.
- [115] M. Alharbi, R.D. Bairwan, W.Y. Rizg, H.P.S.A. Khalil, S.S.A. Murshid, A.M. Sindi, M. Alissa, N.I. Saharudin, C.K. Abdullah, Enhancement of spent coffee grounds as biofiller in biodegradable polymer composite for sustainable packaging, *Polym Compos* 45 (2024) 9317–9334. <https://doi.org/10.1002/pc.28411>.
- [116] X.J. Lee, H.C. Ong, W. Gao, Y.S. Ok, W.H. Chen, B.H.H. Goh, C.T. Chong, Solid biofuel production from spent coffee ground wastes: Process optimisation, characterisation and kinetic studies, *Fuel* 292 (2021) 120309. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120309>.
- [117] Milanković V, Tasić T, Brković S, Potkonjak N, Unterweger C, Spent coffee grounds-derived carbon material as an effective adsorbent for removing multiple contaminants from wastewater: A comprehensive kinetic, isotherm, and thermodynamic study, *Journal of Water Process Engineering* 63 (2024) 105507. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.105507>.
- [118] Y. Jin, W. Tang, J. Wang, Z. Chen, F. Ren, Z. Sun, F. Wang, P.G. Ren, High photocatalytic activity of spent coffee grounds derived activated carbon-supported Ag/TiO₂ catalyst for degradation of organic dyes and antibiotics, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 655 (2022) 130316. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130316>.
- [119] Y. Liu, X. Bai, S. Li, Y. Liu, A. Keightley, Y. Wang, Molecular weight and galloylation affect grape seed extract constituents' ability to cross-link dentin collagen in clinically relevant time, *Dental Materials* 31 (2015) 814–821. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.04.006>.
- [120] L. Wen, Z. Zhang, D.W. Sun, S.P. Sivagnanam, B.K. Tiwari, Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds, *Crit Rev Food Sci Nutr* 60 (2020) 1826–1841. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1602823>.
- [121] A.M. Ciko, S. Jokić, D. Šubarić, I. Jerković, Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae, *Mar Drugs* 16 (2018). <https://doi.org/10.3390/md16100348>.
- [122] K. Ameer, H.M. Shahbaz, J.H. Kwon, Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review, *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19 (2017) 295–315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>.
- [123] J.F. Osorio-Tobón, Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds, *J Food Sci Technol* 57 (2020) 4299–4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>.
- [124] M. Vinatoru, T.J. Mason, I. Calinescu, Ultrasonically Assisted Extraction (UAE) and Microwave Assisted Extraction (MAE) of Functional Compounds from Plant Materials, *Trends in Analytical Chemistry* 97 (2017) 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>.
- [125] Y. Chen, X. Gu, S. quan Huang, J. Li, X. Wang, J. Tang, Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities, *Int J Biol Macromol* 46 (2010) 429–435. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.003>.
- [126] P. Garcia-Salas, A. Morales-Soto, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples, *Molecules* 15 (2010) 8813–8826. <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>.
- [127] A.K. Jha, N. Sit, Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review, *Trends Food Sci Technol* 119 (2022) 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.019>.

- [128] W. Routray, V. Orsat, Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review, *Food Bioproc Tech* 5 (2012) 409–424. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0573-z>.
- [129] N. Mehta, J. S, P. Kumar, A.K. Verma, P. Umaraw, S.K. Khatkar, A.B. Khatkar, D. Pathak, U. Kaka, A.Q. Sazili, Ultrasound-Assisted Extraction and the Encapsulation of Bioactive Components for Food Applications, *Foods* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11192973>.
- [130] S.S. Belokurov, I.A. Narkevich, E. V. Flisyuk, I.E. Kaukhova, M. V. Aroyan, Modern Extraction Methods for Medicinal Plant Raw Material, *Pharm Chem J* 53 (2019) 559–563. <https://doi.org/10.1007/s11094-019-02037-5>.
- [131] I. Usman, M. Hussain, A. Imran, M. Afzaal, F. Saeed, M. Javed, A. Afzal, I. Ashfaq, E. Al Jbawi, S. A. Saewan, Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive compounds, *Int J Food Prop* 25 (2022) 1215–1233. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2074030>.
- [132] H. V. Chuyen, M.H. Nguyen, P.D. Roach, J.B. Golding, S.E. Parks, Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts, *Food Sci Nutr* 6 (2018) 189–196. <https://doi.org/10.1002/fsn3.546>.
- [133] L. Galvan D'Alessandro, K. Kriaa, I. Nikov, K. Dimitrov, Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Sep Purif Technol* 93 (2012) 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.024>.
- [134] S. Şahin, R. Şamli, Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology, *Ultrason Sonochem* 20 (2013) 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.029>.
- [135] C. Carrera, A. Ruiz-Rodríguez, M. Palma, C.G. Barroso, Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes, *Anal Chim Acta* 732 (2012) 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>.
- [136] E. Martino, I. Ramaiola, M. Urbano, F. Bracco, S. Collina, Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction, *J Chromatogr A* 1125 (2006) 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.032>.
- [137] F. Dahmoune, G. Spigno, K. Moussi, H. Remini, A. Cherbal, K. Madani, Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction, *Ind Crops Prod* 61 (2014) 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.035>.
- [138] S. Pimentel-Moral, I. Borrás-Linares, J. Lozano-Sánchez, D. Arráez-Román, A. Martínez-Férez, A. Segura-Carretero, Microwave-assisted extraction for *Hibiscus sabdariffa* bioactive compounds, *J Pharm Biomed Anal* 156 (2018) 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.050>.
- [139] M. Gallo, R. Ferracane, G. Graziani, A. Ritieni, V. Fogliano, Microwave Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Four Different Spices, *Molecules* 15 (2010) 6365–6374. <https://doi.org/10.3390/molecules15096365>.
- [140] M. Garcia-Vaquero, V. Ummat, B. Tiwari, G. Rajauria, Exploring Ultrasound, Microwave and Ultrasound-Microwave Assisted Extraction Technologies to Increase the Extraction of Bioactive Compounds and Antioxidants from Brown Macroalgae, *Mar Drugs* 18 (2020) 172. <https://doi.org/10.3390/md18030172>.
- [141] Z. Lianfu, L. Zelong, Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, *Ultrason Sonochem* 15 (2008) 731–737. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.12.001>.
- [142] M. Cheng, J. He, H. wang, C. Li, G. Wu, K. Zhu, X. Chen, Y. Zhang, L. Tan, Comparison of microwave, ultrasound and ultrasound-microwave assisted solvent extraction methods on phenolic

profile and antioxidant activity of extracts from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) pulp, *LWT* 173 (2023) 114395. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114395>.

- [143] N.B. Ma, N.M.N. Ton, N.L. Le, Co-optimization of polysaccharides and polyphenols extraction from mangosteen peels using ultrasound-microwave assisted extraction (UMAE) and enzyme-ultrasound assisted extraction (EUAE) and their characterization, *Food Measure* 18 (2024) 6379–6393. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02656-x>.
- [144] Herrero M, Mendiola J, Cifuentes A, Ibáñez E, Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *J Chromatogr A* 1217 (2010) 2495–2511. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019>.
- [145] R.P.F.F. da Silva, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds, *Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016) 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>.
- [146] C.G. Pereira, M.A.A. Meireles, Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives, *Food Bioproc Tech* 3 (2010) 340–372. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>.
- [147] M.M.R. De Melo, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva, Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology, *Journal of Supercritical Fluids* 92 (2014) 115–176. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>.
- [148] L. Santos-Zea, J.A. Gutiérrez-Urbe, J. Benedito, Effect of ultrasound intensification on the supercritical fluid extraction of phytochemicals from *Agave salmiana* bagasse, *J Supercrit Fluids* 144 (2019) 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.013>.
- [149] A. Chafer, M.C. Pascual-Martí, A. Salvador, A. Berna, Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin, *J Sep Sci* 28 (2005) 2050–2056. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500128>.
- [150] S. Atwi-Ghaddar, L. Zerwette, E. Destandau, E. Lesellier, Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Polar Compounds from *Camellia sinensis* Leaves: Use of Ethanol/Water as a Green Polarity Modifier, *Molecules* 28 (2023) 5485. <https://doi.org/10.3390/molecules28145485>.
- [151] Y. Gao, Z. Ding, Y. Liu, Y.J. Xu, Aqueous enzymatic extraction: A green, environmentally friendly and sustainable oil extraction technology, *Trends Food Sci Technol* 144 (2024) 104315. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104315>.
- [152] A. Krakowska-Sieprawska, K. Rafinska, J. Walczak-Skierska, B. Buszewski, The Influence of Plant Material Enzymatic Hydrolysis and Extraction Conditions on the Polyphenolic Profiles and Antioxidant Activity of Extracts: A Green and Efficient Approach, *Molecules* 25 (2020) 2074. <https://doi.org/10.3390/molecules25092074>.
- [153] M. Mat Yusoff, M.H. Gordon, O. Ezeh, K. Niranjana, Aqueous enzymatic extraction of *Moringa oleifera* oil, *Food Chem* 211 (2016) 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.050>.
- [154] H. Shahram, S.T. Dinani, Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of β -carotene from orange processing waste, *J Food Process Eng* 42 (2019). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13042>.
- [155] M. Ferri, A. Happel, G. Zanaroli, M. Bertolini, S. Chiesa, M. Commisso, F. Guzzo, A. Tassoni, Advances in combined enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran, *N Biotechnol* 56 (2020) 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.10.010>.
- [156] O. Gligor, A. Mocan, C. Moldovan, M. Locatelli, G. Crişan, I.C.F.R. Ferreira, Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review, *Trends Food Sci Technol* 88 (2019) 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.029>.
- [157] K. Rafińska, O. Wrona, A. Krakowska-Sieprawska, J. Walczak-Skierska, A. Kielbasa, Z. Rafiński, P. Pomastowski, M. Kolankowski, B. Buszewski, Enzyme-assisted extraction of plant material –

- New functional aspects of the process on an example of *Medicago sativa* L., *Ind Crops Prod* 187 (Part B) (2022) 115424. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115424>.
- [158] R. Ravindran, C. Desmond, S. Jaiswal, A.K. Jaiswal, Optimisation of organosolv pretreatment for the extraction of polyphenols from spent coffee waste and subsequent recovery of fermentable sugars, *Bioresour Technol Rep* 3 (2018) 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.05.009>.
- [159] M.R. Meini, I. Cabezudo, C.E. Boschetti, D. Romanini, Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process, *Food Chem* 283 (2019) 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.037>.
- [160] N. Stanek, M. Zarebska, Ł. Biłos, K. Barabosz, E. Nowakowska-Bogdan, I. Semeniuk, J. Błaszkiwicz, R. Kulesza, R. Matejuk, K. Szkutnik, Influence of coffee brewing methods on the chromatographic and spectroscopic profiles, antioxidant and sensory properties, *Sci Rep* 11 (2021) 21377. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01001-2>.
- [161] L. Wu, H. Shao, Z. Fang, Y. Zhao, C.Y. Cao, Q. Li, Mechanism and Effects of Polyphenol Derivatives for Modifying Collagen, *ACS Biomater Sci Eng* 5 (2019) 4272–4284. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00593>.
- [162] O. Gligor, S. Clichici, R. Moldovan, D. Muntean, A.M. Vlase, G.C. Nadăș, I.A. Matei, G.A. Filip, L. Vlase, G. Crișan, The Effect of Extraction Methods on Phytochemicals and Biological Activities of Green Coffee Beans Extracts, *Plants* 12 (2023) 712. <https://doi.org/10.3390/plants12040712>.
- [163] S. Hibbert, K. Welham, S.H. Zein, An innovative method of extraction of coffee oil using an advanced microwave system: in comparison with conventional Soxhlet extraction method, *SN Appl Sci* 1 (2019). <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1457-5>.
- [164] L. Wen, C. Álvarez, Z. Zhang, M.M. Poojary, M.N. Lund, D.W. Sun, B.K. Tiwari, Optimisation and characterisation of protein extraction from coffee silverskin assisted by ultrasound or microwave techniques, *Biomass Convers Biorefin* 11 (2021) 1575–1585. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00712-2>.
- [165] R. Upadhyay, K. Ramalakshmi, L. Jagan Mohan Rao, Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans, *Food Chem* 130 (2012) 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.057>.
- [166] M.M.R. De Melo, H.M.A. Barbosa, C.P. Passos, C.M. Silva, Supercritical fluid extraction of spent coffee grounds: Measurement of extraction curves, oil characterization and economic analysis, *Journal of Supercritical Fluids* 86 (2014) 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.12.016>.
- [167] Q. Chen, W. Dong, C. Wei, R. Hu, Y. Long, Combining integrated ultrasonic-microwave technique with ethanol to maximise extraction of green coffee oil from Arabica coffee beans, *Ind Crops Prod* 151 (2020) 112405. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112405>.
- [168] F.S. Almeida, F.F.G. Dias, M.W. Ford, S. Bogusz Junior, A.C.K. Sato, J.M.L.N. de Moura Bell, Exploring the nutritional and biological properties of green coffee extracts: A comparative study of aqueous and enzymatic extraction processes, *Curr Res Food Sci* 9 (2024) 100890. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2024.100890>.
- [169] J. Menzio, A. Binello, A. Barge, G. Cravotto, Highly-efficient caffeine recovery from green coffee beans under ultrasound-assisted SC-CO₂ extraction, *Processes* 8 (2020) 1062. <https://doi.org/10.3390/pr8091062>.
- [170] A.B.A. de Azevedo, T.G. Kieckbush, A.K. Tashima, R.S. Mohamed, P. Mazzafera, S.A.B.V. de Melo, Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 44 (2008) 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.11.004>.
- [171] A. Tsukui, H.M. Santos Júnior, S.S. Oigman, R.O.M.A. De Souza, H.R. Bizzo, C.M. Rezende, Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC, *Food Chem* 164 (2014) 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.039>.

- [172] B.E. Mojica, L.E. Fong, D. Biju, A. Muharram, I.M. Davis, K.O. Vela, D. Rios, E. Osorio-Camacena, B. Kaur, S.M. Rojas, S.C. Forester, The Impact of the Roast Levels of Coffee Extracts on their Potential Anticancer Activities, *J Food Sci* 83 (2018) 1125–1130. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14102>.
- [173] G.R. Lopes, C.P. Passos, C. Rodrigues, J.A. Teixeira, M.A. Coimbra, Impact of microwave-assisted extraction on roasted coffee carbohydrates, caffeine, chlorogenic acids and coloured compounds, *Food Research International* 129 (2020) 108864. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108864>.
- [174] A. Loukri, C. Sarafera, A.M. Goula, K. Gardikis, I. Mourtzinis, Green extraction of caffeine from coffee pulp using a deep eutectic solvent (DES), *Applied Food Research* 2 (2022) 100176. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100176>.
- [175] G.M. González-González, L. Palomo-Ligas, S.D. Nery-Flores, J.A. Ascacio-Valdés, A. Sáenz-Galindo, A.C. Flores-Gallegos, Z.A. Zakaria, C.N. Aguilar, R. Rodríguez-Herrera, Coffee pulp as a source for polyphenols extraction using ultrasound, microwave, and green solvents, *Environmental Quality Management* 32 (2022) 451–461. <https://doi.org/10.1002/tqem.21903>.
- [176] L. Wen, Z. Zhang, D. Rai, D.W. Sun, B.K. Tiwari, Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from coffee silverskin: Impact on phenolic content, antioxidant activity, and morphological characteristics, *J Food Process Eng* 42 (2019). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13191>.
- [177] M. de O. Silva, J.N.B. Honfoga, L.L. de Medeiros, M.S. Madruga, T.K.A. Bezerra, Obtaining Bioactive Compounds from the Coffee Husk (*Coffea arabica* L.) Using Different Extraction Methods, *Molecules* 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26010046>.
- [178] M. Rebollo-Hernanz, S. Cañas, D. Taladrid, V. Benítez, B. Bartolomé, Y. Aguilera, M.A. Martín-Cabrejas, Revalorization of Coffee Husk: Modeling and Optimizing the Green Sustainable Extraction of Phenolic Compounds, *Foods* 10 (2021) 653. <https://doi.org/10.3390/foods10030653>.
- [179] T. Chatzimitakos, V. Athanasiadis, K. Kotsou, D. Palaiogiannis, E. Bozinou, S.I. Lalas, Optimized Isolation Procedure for the Extraction of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds, *Applied Sciences* 13 (2023) 2819. <https://doi.org/10.3390/app13052819>.
- [180] S.I. Mussatto, L.F. Ballesteros, S. Martins, J.A. Teixeira, Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds, *Sep Purif Technol* 83 (2011) 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.036>.
- [181] N. Cordoba, M. Fernandez-Alduenda, F.L. Moreno, Y. Ruiz, Coffee extraction: A review of parameters and their influence on the physicochemical characteristics and flavour of coffee brews, *Trends Food Sci Technol* 96 (2020) 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.004>.
- [182] K.S. Andrade, R.T. Goncalvez, M. Maraschin, R.M. Ribeiro-Do-Valle, J. Martínez, S.R.S. Ferreira, Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition, *Talanta* 88 (2012) 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.031>.
- [183] B. Ahangari, J. Sargolzaei, Extraction of lipids from spent coffee grounds using organic solvents and supercritical carbon dioxide, *J Food Process Preserv* 37 (2012) 1014–1021. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00757.x>.
- [184] H. Xu, W. Wang, X. Liu, F. Yuan, Y. Gao, Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction, *Ind Crops Prod* 76 (2015) 946–954. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.054>.
- [185] M.T. Torres-Mancera, I. Baqueiro-Peña, A. Figueroa-Montero, G. Rodríguez-Serrano, E. González-Zamora, E. Favela-Torres, G. Saucedo-Castañeda, Biotransformation and Improved Enzymatic Extraction of Chlorogenic Acid from Coffee Pulp by Filamentous Fungi, *Biotechnol Prog* 29 (2013) 337–345. <https://doi.org/10.1002/btpr.1696>.

- [186] W. Dong, D. Wang, R. Hu, Y. Long, L. Lv, Chemical composition, structural and functional properties of soluble dietary fiber obtained from coffee peel using different extraction methods, *Food Research International* 136 (2020) 109497. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109497>.
- [187] B. Prandi, M. Ferri, S. Monari, C. Zurlini, I. Cigognini, S. Verstringe, D. Schaller, M. Walter, L. Navarini, A. Tassoni, S. Sforza, T. Tedeschi, Extraction and Chemical Characterization of Functional Phenols and Proteins from Coffee (*Coffea arabica*) By-Products, *Biomolecules* 11 (2021) 1571. <https://doi.org/10.3390/biom11111571>.
- [188] J.A. Serna-Jiménez, L.S. Torres-Valenzuela, A. Sanín Villarreal, C. Roldan, M.A. Martín, J.A. Siles, A.F. Chica, Advanced extraction of caffeine and polyphenols from coffee pulp: Comparison of conventional and ultrasound-assisted methods, *LWT* 177 (2023) 114571. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114571>.
- [189] N.A. Al-Dhabi, K. Ponmurugan, P. Maran Jeganathan, Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds, *Ultrason Sonochem* 34 (2017) 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>.
- [190] B. Prandi, M. Di Massimo, T. Tedeschi, L. Rodríguez-Turienzo, Ó. Rodríguez, Ultrasound and Microwave-assisted Extraction of Proteins from Coffee Green Beans: Effects of Process Variables on the Protein Integrity, *Food Bioproc Tech* 15 (2022) 2712–2722. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02907-z>.
- [191] J. Montenegro, L.S. dos Santos, R.G.G. de Souza, L.G.B. Lima, D.S. Mattos, B.P.P.B. Viana, A.C.S. da Fonseca Bastos, L. Muzzi, C.A. Conte-Júnior, E.R.P. Gimba, O. Freitas-Silva, A.J. Teodoro, Bioactive compounds, antioxidant activity and antiproliferative effects in prostate cancer cells of green and roasted coffee extracts obtained by microwave-assisted extraction (MAE), *Food Research International* 140 (2021) 110014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110014>.
- [192] M.D. Pavlović, A. V. Buntić, S.S. Šiler-Marinković, S.I. Dimitrijević-Branković, Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee, *Sep Purif Technol* 118 (2013) 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.07.035>.
- [193] M. Pettinato, A.A. Casazza, P. Perego, The role of heating step in microwave-assisted extraction of polyphenols from spent coffee grounds, *Food and Bioproducts Processing* 114 (2019) 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.01.006>.
- [194] L. Wen, Z. Zhang, M. Zhao, R. SenthamaraiKannan, R.B. Padamati, D.W. Sun, B.K. Tiwari, Green extraction of soluble dietary fibre from coffee silverskin: impact of ultrasound/microwave-assisted extraction, *Int J Food Sci Technol* 55 (2020) 2242–2250. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14477>.
- [195] W. Dong, Q. Chen, C. Wei, R. Hu, Y. Long, Y. Zong, Z. Chu, Comparison of the effect of extraction methods on the quality of green coffee oil from Arabica coffee beans: Lipid yield, fatty acid composition, bioactive components, and antioxidant activity, *Ultrason Sonochem* 74 (2021) 105578. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105578>.
- [196] V.K. Thakur, M.K. Thakur, Recent advances in green hydrogels from lignin: A review, *Int J Biol Macromol* 72 (2015) 834–847. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.044>.
- [197] F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil, Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Materials Science and Engineering C* 57 (2015) 414–433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>.
- [198] K. Varaprasad, G.M. Raghavendra, T. Jayaramudu, A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications, *Materials Science and Engineering C* 79 (2017) 958–971. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.096>.
- [199] W. Hu, Z. Wang, Y. Xiao, Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels, *Biomater Sci* 7 (2019) 843–855. <https://doi.org/10.1039/c8bm01246f>.

- [200] Y.S. Zhang, A. Khademhosseini, *Advances in engineering hydrogels*, *Science* 356 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3627>.
- [201] M. Lim, H. Lee, M. Kang, Azide-alkyne cycloaddition reactions in water: Via recyclable heterogeneous Cu catalysts: Reverse phase silica gel and thermoresponsive hydrogels, *RSC Adv* 8 (2018) 6152–6159. <https://doi.org/10.1039/c8ra00306h>.
- [202] C.A. Deforest, E.A. Sims, K.S. Anseth, Peptide-functionalized click hydrogels with independently tunable mechanics and chemical functionality for 3D cell culture, *Chemistry of Materials* 22 (2010) 4783–4790. <https://doi.org/10.1021/cm101391y>.
- [203] N.T. Huynh, Y.S. Jeon, M. Zrinyi, Preparation of “click” hydrogels from polyaspartamide derivatives, *Polym Int* 62 (2013) 266–272. <https://doi.org/10.1002/pi.4295>.
- [204] K. Tanaka, C. Kageyama, K. Fukase, Acceleration of Cu(I)-mediated Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition by histidine derivatives, *Tetrahedron Lett* 48 (2007) 6475–6479. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.07.055>.
- [205] H. Woo, H. Kang, A. Kim, Azide-Alkyne Huisgen [3+2] Cycloaddition Using CuO Nanoparticles, *Molecules* 17 (2012) 13235–13252. <https://doi.org/10.3390/molecules171113235>.
- [206] M. Montiel-Herrera, A. Gandini, F.M. Goycoolea, N.E. Jacobsen, J. Lizardi-Mendoza, M.T. Recillas-Mota, W.M. Argüelles-Monal, Furan–chitosan hydrogels based on click chemistry, *Iranian Polymer Journal* 24 (2015) 349–357. <https://doi.org/10.1007/s13726-015-0325-4>.
- [207] V. Crescenzi, L. Cornelio, C. Di Meo, Novel hydrogels via click chemistry: Synthesis and potential biomedical applications, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1844–1850. <https://doi.org/10.1021/bm0700800>.
- [208] A. Koschella, M. Hartlieb, T. Heinze, A “click-chemistry” approach to cellulose-based hydrogels, *Carbohydr Polym* 86 (2011) 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.031>.
- [209] B.S. Min, S.Y. Kim, Kinetics of In situ Robust Chain-Ends Crosslinked Polymeric Networks Formed Using Catalyst- and Solvent-Free Huisgen Cycloaddition Reaction, *Macromol Res* 25 (2017) 249–254. <https://doi.org/10.1007/s13233-017-5038-4>.
- [210] D.A. Ossipov, J. Hilborn, Poly(vinyl alcohol)-Based Hydrogels Formed by “Click Chemistry,” *Macromolecules* 39 (2006) 1709–1718. <https://doi.org/10.1021/ma052545p>.
- [211] S. Piluso, R. Vukićević, U. Nöchel, S. Braune, A. Lendlein, A.T. Neffe, Sequential alkyne-azide cycloadditions for functionalized gelatin hydrogel formation, *Eur Polym J* 100 (2018) 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.01.017>.
- [212] S.M. Morozova, Recent Advances in Hydrogels via Diels–Alder Crosslinking: Design and Applications, *Gels* 9 (2023). <https://doi.org/10.3390/gels9020102>.
- [213] C. García-Astrain, A. Gandini, C. Peña, Diels-Alder “click” chemistry for the cross-linking of furfuryl-gelatin-polyetheramine hydrogels, *RSC Adv* 4 (2014) 35578–35587. <https://doi.org/10.1039/c4ra06122e>.
- [214] S. Kirchhof, A. Strasser, H.J. Wittmann, New insights into the cross-linking and degradation mechanism of Diels-Alder hydrogels, *J Mater Chem B* 3 (2015) 449–457. <https://doi.org/10.1039/c4tb01680g>.
- [215] C.M. Madl, S.C. Heilshorn, Rapid Diels-Alder Cross-linking of Cell Encapsulating Hydrogels, *Chemistry of Materials* 31 (2019) 8035–8043. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b02485>.
- [216] H.L. Wei, Z. Yang, H.J. Chu, J. Zhu, Z.C. Li, J.S. Cui, Facile preparation of poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogels via aqueous Diels-Alder click reaction, *Polymer* 51 (2010) 1694–1702. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.02.008>.

- [217] D. qiang Li, S. ya Wang, Y.J. Meng, Fabrication of self-healing pectin/chitosan hybrid hydrogel via Diels-Alder reactions for drug delivery with high swelling property, pH-responsiveness, and cytocompatibility, *Carbohydr Polym* 268 (2021) 118244. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118244>.
- [218] B. Bi, M. Ma, S. Lv, In-situ forming thermosensitive hydroxypropyl chitin-based hydrogel crosslinked by Diels-Alder reaction for three dimensional cell culture, *Carbohydr Polym* 212 (2019) 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.058>.
- [219] C.M. Nimmo, S.C. Owen, M.S. Shoichet, Diels-alder click cross-linked hyaluronic acid hydrogels for tissue engineering, *Biomacromolecules* 12 (2011) 824–830. <https://doi.org/10.1021/bm101446k>.
- [220] L.J. Smith, S.M. Taimoory, R.Y. Tam, A.E.G. Baker, N. Binth Mohammad, J.F. Trant, M.S. Shoichet, Diels-Alder Click-Cross-Linked Hydrogels with Increased Reactivity Enable 3D Cell Encapsulation, *Biomacromolecules* 19 (2018) 926–935. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01715>.
- [221] O. Guaresti, C. García-Astrain, R.H. Aguirresarobe, A. Eceiza, N. Gabilondo, Synthesis of stimuli-responsive chitosan-based hydrogels by Diels–Alder cross-linking ‘click’ reaction as potential carriers for drug administration, *Carbohydr Polym* 183 (2018) 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.034>.
- [222] X. Li, Q. Sun, Q. Li, Functional hydrogels with tunable structures and properties for tissue engineering applications, *Front Chem* 6 (2018) 1–20. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00499>.
- [223] Z.Q. Liu, Z. Wei, X.L. Zhu, Dextran-based hydrogel formed by thiol-Michael addition reaction for 3D cell encapsulation, *Colloids Surf B Biointerfaces* 128 (2015) 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.005>.
- [224] X. Sui, L. Van Ingen, M.A. Hempenius, Preparation of a Rapidly Forming Poly(ferrocenylsilane)-Poly(ethylene glycol)- based Hydrogel by a Thiol-Michael Addition Click Reaction, *Macromol Rapid Commun* 31 (2010) 2059–2063. <https://doi.org/10.1002/marc.201000420>.
- [225] Y. Zhou, W. Nie, J. Zhao, Rapidly in situ forming adhesive hydrogel based on a PEG-maleimide modified polypeptide through Michael addition, *J Mater Sci Mater Med* 24 (2013) 2277–2286. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4987-1>.
- [226] M.C. Hacker, H.A. Nawaz, Multi-functional macromers for hydrogel design in biomedical engineering and regenerative medicine, *Int J Mol Sci* 16 (2015) 27677–27706. <https://doi.org/10.3390/ijms161126056>.
- [227] A.T. Neffe, C. Löwenberg, A. Lendlein, Hydrogel networks by aliphatic dithiol Michael addition to glycidylmethacrylated gelatin, *MRS Adv* 6 (2021) 796–800. <https://doi.org/10.1557/s43580-021-00136-8>.
- [228] O. Guaresti, S. Basasoro, K. González, In situ cross-linked chitosan hydrogels via Michael addition reaction based on water-soluble thiol-maleimide precursors, *Eur Polym J* 119 (2019) 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.08.009>.
- [229] R. Li, Z. Cai, Z. Li, Synthesis of in-situ formable hydrogels with collagen and hyaluronan through facile Michael addition, *Materials Science and Engineering C* 77 (2017) 1035–1043. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.046>.
- [230] R. Jin, L.S.M. Teixeira, A. Krouwels, P.J. Dijkstra, C.A. Van Blitterswijk, M. Karperien, J. Feijen, Synthesis and characterization of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: An injectable biomaterial for cartilage repair, *Acta Biomater* 6 (2010) 1968–1977. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.024>.

- [231] J. Pupkaite, J. Rosenquist, J. Hilborn, A. Samanta, Injectable Shape-Holding Collagen Hydrogel for Cell Encapsulation and Delivery Cross-linked Using Thiol-Michael Addition Click Reaction, *Biomacromolecules* 20 (2019) 3475–3484. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00769>.
- [232] S. Liao, L. Tang, J. Qu, Schiff-base-functionalized polymeric hydrogel with high stretchability and multifunction, *Polym Adv Technol* 32 (2021) 1844–1852. <https://doi.org/10.1002/pat.5225>.
- [233] C. Mo, L. Xiang, Y. Chen, Advances in Injectable and Self-healing Polysaccharide Hydrogel Based on the Schiff Base Reaction, *Macromol Rapid Commun* 42 (2021) 1–18. <https://doi.org/10.1002/marc.202100025>.
- [234] Y. Li, C. Liu, Y. Tan, In situ hydrogel constructed by starch-based nanoparticles via a Schiff base reaction, *Carbohydr Polym* 110 (2014) 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.058>.
- [235] J. Xu, Y. Liu, S. hui Hsu, Hydrogels based on schiff base linkages for biomedical applications, *Molecules* 24 (2019) 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules24163005>.
- [236] J. Liu, J. Li, F. Yu, In situ forming hydrogel of natural polysaccharides through Schiff base reaction for soft tissue adhesive and hemostasis, *Int J Biol Macromol* 147 (2020) 653–666. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.005>.
- [237] Z. Emami, M. Ehsani, M. Zandi, Modified hydroxyapatite nanoparticles reinforced nanocomposite hydrogels based on gelatin/oxidized alginate via Schiff base reaction, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2 (2021) 100056. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100056>.
- [238] C. Xu, W. Zhan, X. Tang, F. Mo, L. Fu, B. Lin, Self-healing chitosan/vanillin hydrogels based on Schiff-base bond/hydrogen bond hybrid linkages, *Polym Test* 66 (2018) 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.01.016>.
- [239] M. Vahedi, J. Barzin, F. Shokrolahi, P. Shokrollahi, Self-Healing, Injectable Gelatin Hydrogels Cross-Linked by Dynamic Schiff Base Linkages Support Cell Adhesion and Sustained Release of Antibacterial Drugs, *Macromol Mater Eng* 303 (2018). <https://doi.org/10.1002/mame.201800200>.
- [240] K.L.M. Taaca, E.I. Prieto, M.R. Vasquez, Current Trends in Biomedical Hydrogels: From Traditional Crosslinking to Plasma-Assisted Synthesis, *Polymers* 14 (2022) 2560. <https://doi.org/10.3390/polym14132560>.
- [241] M. Bustamante-Torres, D. Romero-Fierro, B. Arcentales-Vera, K. Palomino, H. Magaña, E. Bucio, Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials, *Gels* 7 (2021). <https://doi.org/10.3390/gels7040182>.
- [242] E. Park, J.H. Ryu, D. Lee, H. Lee, Freeze-Thawing-Induced Macroporous Catechol Hydrogels with Shape Recovery and Sponge-like Properties, *ACS Biomater Sci Eng* 7 (2021) 4318–4329. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01767>.
- [243] E. Tamahkar, B. Ozkahraman, Potential Evaluation of PVA-Based Hydrogels for Biomedical Applications, *Hittite Journal of Science and Engineering* 2 (2015) 165–171. <https://doi.org/10.17350/HJSE19030000021>.
- [244] P. Zhang, O. Gourgas, A. Lainé, M. Murshed, D. Mantovani, M. Cerruti, Coacervation Conditions and Cross-Linking Determines Availability of Carbonyl Groups on Elastin and its Calcification, *Cryst Growth Des* 20 (2020) 7170–7179. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00759>.
- [245] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 27–46. [https://doi.org/S0939-6411\(00\)00090-4](https://doi.org/S0939-6411(00)00090-4).
- [246] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *Eur Polym J* 65 (2015) 252–267. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>.

- [247] N.H. Thang, T.B. Chien, D.X. Cuong, Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview, *Gels* 9 (2023) 523. <https://doi.org/10.3390/gels9070523>.
- [248] S. Jiang, S. Liu, W. Feng, PVA hydrogel properties for biomedical application, *J Mech Behav Biomed Mater* 4 (2011) 1228–1233. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.04.005>.
- [249] M.J. Ansari, R.R. Rajendran, S. Mohanto, U. Agarwal, K. Panda, K. Dhotre, R. Manne, A. Deepak, A. Zafar, M. Yasir, S. Pramanik, Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels for Biomedical Applications: A Review of the State-of-the-Art, *Gels* 8 (2022) 454. <https://doi.org/10.3390/gels8070454>.
- [250] S.A. Munim, Z.A. Raza, Poly(lactic acid) based hydrogels: formation, characteristics and biomedical applications, *Journal of Porous Materials* 26 (2019) 881–901. <https://doi.org/10.1007/s10934-018-0687-z>.
- [251] C.Y. Liaw, S. Ji, M. Guvendiren, Engineering 3D Hydrogels for Personalized In Vitro Human Tissue Models, *Adv Healthc Mater* 7 (2018) 1701165. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701165>.
- [252] P. Ghasemiyeh, S. Mohammadi-Samani, Hydrogels as Drug Delivery Systems; Pros and Cons, *Trends in Pharmaceutical Sciences* 5 (2019) 7–24. <https://doi.org/10.30476/TIPS.2019.81604.1002>.
- [253] M.C. Catoira, L. Fusaro, D. Di Francesco, Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications, *J Mater Sci Mater Med* 30 (2019) 115. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>.
- [254] T. Garg, S. Singh, A.K. Goyal, Stimuli-Sensitive Hydrogels: An Excellent Carrier for Drug and Cell Delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 30 (2013) 369–409. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013007259>.
- [255] G. Jiang, G. Wang, Y. Zhu, A Scalable Bacterial Cellulose Ionogel for Multisensory Electronic Skin, *Research* 2022 (2022) 9814767. <https://doi.org/10.34133/2022/9814767>.
- [256] D. Filip, D. Macocinschi, M.F. Zaltariov, Hydroxypropyl Cellulose/Pluronic-Based Composite Hydrogels as Biodegradable Mucoadhesive Scaffolds for Tissue Engineering, *Gels* 8 (2022) 519. <https://doi.org/10.3390/gels8080519>.
- [257] N. Hasan, J. Lee, H.J. Ahn, Nitric Oxide-Releasing Bacterial Cellulose/Chitosan Crosslinked Hydrogels for the Treatment of Polymicrobial Wound Infections, *Pharmaceutics* 14 (2022) 22. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010022>.
- [258] J.H. Xie, M.L. Jin, G.A. Morris, Advances on Bioactive Polysaccharides from Medicinal Plants, *Crit Rev Food Sci Nutr* 56 (2016) S60–S84. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1069255>.
- [259] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Adv Drug Deliv Rev* 60 (2008) 1650–1662. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.001>.
- [260] R. Pawar, W. Jadhav, S. Bhusare, Polysaccharides as carriers of bioactive agents for medical applications, in: *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications*, 1st ed., Apple Academic Press, New York, 2008: pp. 3–53. <https://doi.org/10.1533/9781845694814.1.3>.
- [261] P.A.G. Soares, A.I. Bourbon, A.A. Vicente, Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Policaju and chitosan, *Materials Science and Engineering C* 42 (2014) 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.009>.
- [262] M. Suneetha, K.M. Rao, S.S. Han, Mechanically improved porous hydrogels with polysaccharides via polyelectrolyte complexation for bone tissue engineering, *Int J Biol Macromol* 144 (2020) 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.096>.
- [263] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht, Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review, *Biomacromolecules* 12 (2011) 1387–1408. <https://doi.org/10.1021/bm200083n>.

- [264] W. Shi, R. He, Y. Liu, 3D printing scaffolds with hydrogel materials for biomedical applications, *European Journal of BioMedical Research* 1 (2015) 3–8. <https://doi.org/10.18088/ejbmr.1.3.2015.pp3-8>.
- [265] M. Soleimanpour, S.S. Mirhaji, S. Jafari, H. Derakhshankhah, F. Mamashli, H. Nedaei, M.R. Karimi, H. Motasadzadeh, Y. Fatahi, A. Ghasemi, M.S. Nezamtaheri, M. Khajezade, M. Teimouri, B. Goliaei, C. Delattre, A.A. Saboury, Designing a new alginate-fibrinogen biomaterial composite hydrogel for wound healing, *Sci Rep* 12 (2022) 7213. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11282-w>.
- [266] H. Hu, F. Luo, Q. Zhang, M. Xu, X. Chen, Z. Liu, H. Xu, L. Wang, F. Ye, K. Zhang, B. Chen, S. Zheng, J. Jin, Berberine coated biocomposite hemostatic film based alginate as absorbable biomaterial for wound healing, *Int J Biol Macromol* 209 (Part B) (2022) 1731–1744. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.132>.
- [267] E. Marsich, M. Borgogna, I. Donati, P. Mozetic, B.L. Strand, S.G. Salvador, F. Vittur, S. Paoletti, Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: A bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation, *J Biomed Mater Res A* 84 (2008) 364–376. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31307>.
- [268] C.J. Panebianco, S. Rao, W.W. Hom, J.H. Meyers, T.Y. Lim, D.M. Laudier, A.C. Hecht, M.D. Weir, J.R. Weiser, J.C. Iatridis, Genipin-crosslinked fibrin seeded with oxidized alginate microbeads as a novel composite biomaterial strategy for intervertebral disc cell therapy, *Biomaterials* 287 (2022) 121641. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121641>.
- [269] M. Ghosh, M. Halperin-Sternfeld, I. Grinberg, L. Adler-Abramovich, Injectable Alginate-Peptide Composite Hydrogel as a Scaffold for Bone Tissue Regeneration, *Nanomaterials* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/nano9040497>.
- [270] M.C.G. Pellá, M.K. Lima-Tenório, E.T. Tenório-Neto, Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications, *Carbohydr Polym* 196 (2018) 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>.
- [271] S. Peers, A. Montembault, C. Ladavière, Chitosan hydrogels for sustained drug delivery, *Journal of Controlled Release* 326 (2020) 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.012>.
- [272] N. Sereni, A. Enache, G. Sudre, Dynamic Structuration of Physical Chitosan Hydrogels, *Langmuir* 33 (2017) 12697–12707. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02997>.
- [273] M. Rajabi, M. McConnell, J. Cabral, Chitosan hydrogels in 3D printing for biomedical applications, *Carbohydr Polym* 260 (2021) 117768. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117768>.
- [274] A.K. Mahanta, V. Mittal, N. Singh, D. Dash, S. Malik, M. Kumar, P. Maiti, Polyurethane-Grafted Chitosan as New Biomaterials for Controlled Drug Delivery, *Macromolecules* 48 (2015) 2654–2666. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b00030>.
- [275] J.-Y. Lee, S.-H. Nam, S.-Y. Im, Y.-J. Park, Y.-M. Lee, Y.-J. Seol, C.-P. Chung, S.-J. Lee, Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials, *Journal of Controlled Release* 78 (2002) 187–197. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00498-9](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00498-9).
- [276] G. Wang, Q. Ao, K. Gong, A. Wang, L. Zheng, Y. Gong, X. Zhang, The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells, *Acta Biomater* 6 (2010) 3630–3639. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.039>.
- [277] H.W. Chen, Y.S. Chou, T.H. Young, N.C. Cheng, Inhibition of melanin synthesis and melanosome transfer by chitosan biomaterials, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 108 (2020) 1239–1250. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74860-w> <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34472>.
- [278] V. Uskoković, G. Abuna, P. Ferreira, V.M. Wu, L. Gower, F.C.P. Pires-de-Souza, R.M. Murata, M.A.C. Sinhoreti, S. Geraldeli, Synthesis and characterization of nanoparticulate niobium- and zinc-doped bioglass-ceramic/chitosan hybrids for dental applications, *J Solgel Sci Technol* 97 (2021) 245–258. <https://doi.org/10.1007/s10971-020-05442-5>.

- [279] Z. Zhou, J. Chen, C. Peng, T. Huang, H. Zhou, B. Ou, J. Chen, Q. Liu, S. He, D. Cao, H. Huang, L. Xiang, Fabrication and physical properties of gelatin/sodium alginate/hyaluronic acid composite wound dressing hydrogel, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* 51 (2014) 318–325. <https://doi.org/10.1080/10601325.2014.882693>.
- [280] A. Abou-Okeil, H.M. Fahmy, M.K. El-Bisi, Hyaluronic acid/Na-alginate films as topical bioactive wound dressings, *Eur Polym J* 109 (2018) 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.09.003>.
- [281] E. Larrañeta, M. Henry, N.J. Irwin, Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels crosslinked using a solvent-free process for potential biomedical applications, *Carbohydr Polym* 181 (2018) 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.015>.
- [282] L. Pescosolido, W. Schuurman, J. Malda, P. Matricardi, F. Alhaique, T. Coviello, P.R. Van Weeren, W.J.A. Dhert, W.E. Hennink, T. Vermonden, Hyaluronic acid and dextran-based semi-IPN hydrogels as biomaterials for bioprinting, *Biomacromolecules* 12 (2011) 1831–1838. <https://doi.org/10.1021/bm200178w>.
- [283] S.A. Shah, M. Sohail, M.U. Minhas, S. Khan, Z. Hussain, A. Mahmood, M. Kousar, H.E. Thu, M. Abbasi, M. ur R. Kashif, Curcumin-laden hyaluronic acid-co-Pullulan-based biomaterials as a potential platform to synergistically enhance the diabetic wound repair, *Int J Biol Macromol* 185 (2021) 350–368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.119>.
- [284] E. Sturabotti, V.G. Moldoveanu, A. Camilli, A. Martinelli, G. Simonetti, A. Valletta, I. Serangeli, A. Giustini, E. Miranda, L.M. Migneco, F. Vetica, F. Leonelli, Thymol-Functionalized Hyaluronic Acid as Promising Preservative Biomaterial for the Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation, *ACS Macro Lett* 12 (2023) 1079–1084. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.3c00208>.
- [285] C.G. Pfeifer, A. Berner, M. Koch, W. Krutsch, R. Kujat, P. Angele, M. Nerlich, J. Zellner, Higher Ratios of Hyaluronic Acid Enhance Chondrogenic Differentiation of Human MSCs in a Hyaluronic Acid-Gelatin Composite Scaffold, *Materials* 9 (2016). <https://doi.org/10.3390/ma9050381>.
- [286] J. Youn, J.H. Choi, S. Lee, W. Lee, S.W. Lee, W. Kim, Y. Song, N.E. Tumursukh, J.E. Song, G. Khang, Fabrication and Evaluation of Gellan Gum/Hyaluronic Acid Hydrogel for Retinal Tissue Engineering Biomaterial and the Influence of Substrate Stress Relaxation on Retinal Pigment Epithelial Cells, *Molecules* 27 (2022) 5512. <https://doi.org/10.3390/molecules27175512>.
- [287] M.E. Culica, A.L. Chibac-Scutaru, T. Mohan, Cellulose-based biogenic supports, remarkably friendly biomaterials for proteins and biomolecules, *Biosens Bioelectron* 182 (2021) 113170. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113170>.
- [288] M. Kostag, O.A. El Seoud, Sustainable biomaterials based on cellulose, chitin and chitosan composites - A review, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2 (2021) 100079. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100079>.
- [289] Y. Yang, Y.T. Lu, K. Zeng, Recent Progress on Cellulose-Based Ionic Compounds for Biomaterials, *Advanced Materials* 33 (2021) 2000717. <https://doi.org/10.1002/adma.202000717>.
- [290] D.J. Modulevsky, C.M. Cuerrier, A.E. Pelling, Biocompatibility of Subcutaneously Implanted Plant-Derived Cellulose Biomaterials, *PLoS One* 11 (2016) 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157894>.
- [291] R.J. Hickey, A.E. Pelling, Cellulose biomaterials for tissue engineering, *Front Bioeng Biotechnol* 7 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00045>.
- [292] K. Missoum, M.N. Belgacem, J. Bras, Nanofibrillated cellulose surface modification: A review, *Materials* 6 (2013) 1745–1766. <https://doi.org/10.3390/ma6051745>.
- [293] K.J. Kim, M.J. Hwang, W.G. Shim, Y.N. Youn, S. Do Yoon, Sustained drug release behavior of captopril-incorporated chitosan/carboxymethyl cellulose biomaterials for antihypertensive therapy, *Int J Biol Macromol* 255 (2024) 128087. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128087>.

- [294] H. Wu, G.R. Williams, J. Wu, J. Wu, S. Niu, H. Li, H. Wang, L. Zhu, Regenerated chitin fibers reinforced with bacterial cellulose nanocrystals as suture biomaterials, *Carbohydr Polym* 180 (2018) 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.022>.
- [295] C. Palo-Nieto, A. Blasi-Romero, C. Sandström, D. Balgoma, M. Hedeland, M. Strømme, N. Ferraz, Functionalization of cellulose nanofibrils to develop novel ROS-sensitive biomaterials, *Mater Adv* 4 (2023) 1555–1565. <https://doi.org/10.1039/d2ma01056a>.
- [296] D. Atila, A. Karataş, A. Evcin, D. Keskin, A. Tezcaner, Bacterial cellulose-reinforced boron-doped hydroxyapatite/gelatin scaffolds for bone tissue engineering, *Cellulose* 26 (2019) 9765–9785. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02741-1>.
- [297] J. Bhandari, H. Mishra, P.K. Mishra, R. Wimmer, F.J. Ahmad, S. Talegaonkar, Cellulose nanofiber aerogel as a promising biomaterial for customized oral drug delivery, *Int J Nanomedicine* 12 (2017) 2021–2031. <https://doi.org/10.2147/IJN.S124318>.
- [298] M.L. López-Castejón, C. Bengoechea, M. García-Morales, Effect of plasticizer and storage conditions on thermomechanical properties of albumen/tragacanth based bioplastics, *Food and Bioproducts Processing* 95 (2015) 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.11.002>.
- [299] D.C. Hwang, S. Damodaran, Chemical modification strategies for synthesis of protein-based hydrogel, *J Agric Food Chem* 44 (1996) 751–758. <https://doi.org/10.1021/jf9503826>.
- [300] A.A. Cuadri, C. Bengoechea, A. Romero, A natural-based polymeric hydrogel based on functionalized soy protein, *Eur Polym J* 85 (2016) 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.10.026>.
- [301] P.A. Janmey, J.P. Winer, J.W. Weisel, Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications, *J R Soc Interface* 6 (2009) 1–10. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0327>.
- [302] C. Schneider-Barthold, S. Baganz, M. Wilhelmi, Hydrogels based on collagen and fibrin - Frontiers and applications, *BioNanoMaterials* 17 (2016) 3–12. <https://doi.org/10.1515/bnm-2015-0025>.
- [303] T. Aper, M. Wilhelmi, C. Gebhardt, Novel method for the generation of tissue-engineered vascular grafts based on a highly compacted fibrin matrix, *Acta Biomater* 29 (2016) 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.012>.
- [304] A.J. Buwalda, Bio-based composite hydrogels for biomedical applications, *Multifunctional Materials* 3 (2020) 022001. <http://dx.doi.org/10.1088/2399-7532/ab80d6>.
- [305] M.G. Patino, M.E. Neiders, S. Andreana, B. Noble, R.E. Cohen, Collagen : An Overview, *Implant Dent* 11 (2002) 280–285. <https://doi.org/10.1097/01.ID.0000019547.50849.3B>.
- [306] C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee, Biomedical applications of collagen, *Int J Pharm* 221 (2001) 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3).
- [307] A. Ahmed, I.M. Joshi, M. Mansouri, Engineering fiber anisotropy within natural collagen hydrogels, *Am J Physiol Cell Physiol* 320 (2021) C1112–C1124. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00036.2021>.
- [308] N.J.R. Blackburn, T. Sofrenovic, D. Kuraitis, A. Ahmadi, B. McNeill, C. Deng, K.J. Rayner, Z. Zhong, M. Ruel, E.J. Suuronen, Timing underpins the benefits associated with injectable collagen biomaterial therapy for the treatment of myocardial infarction, *Biomaterials* 39 (2015) 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.004>.
- [309] Y. Yang, A. Campbell Ritchie, N.M. Everitt, Recombinant human collagen/chitosan-based soft hydrogels as biomaterials for soft tissue engineering, *Materials Science and Engineering C* 121 (2021) 111846. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111846>.
- [310] B.D. James, P. Guerin, Z. Iverson, J.B. Allen, Mineralized DNA-Collagen Complex-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering, *Int J Biol Macromol* 161 (2020) 1127–1139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.126>.

- [311] A.M. Wojtowicz, A. Shekaran, M.E. Oest, K.M. Dupont, K.L. Templeman, D.W. Hutmacher, R.E. Guldberg, A.J. García, Coating of biomaterial scaffolds with the collagen-mimetic peptide GFOGER for bone defect repair, *Biomaterials* 31 (2010) 2574–2582. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.008>.
- [312] S. Heinemann, T. Coradin, H. Worch, H.P. Wiesmann, T. Hanke, Possibilities and limitations of preparing silica/collagen/hydroxyapatite composite xerogels as load-bearing biomaterials, *Compos Sci Technol* 71 (2011) 1873–1880. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2011.08.023>.
- [313] A. Motta, C. Migliaresi, F. Faccioni, Fibroin hydrogels for biomedical applications: Preparation, characterization and in vitro cell culture studies, *J Biomater Sci Polym Ed* 15 (2004) 851–864. <https://doi.org/10.1163/1568562041271075>.
- [314] N. Guziewicz, A. Best, B. Perez-Ramirez, Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies, *Biomaterials* 32 (2011) 2642–2650. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.023>.
- [315] A.N. Mitropoulos, B. Marelli, C.E. Ghezzi, Transparent, Nanostructured Silk Fibroin Hydrogels with Tunable Mechanical Properties, *ACS Biomater Sci Eng* 1 (2015) 964–970. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00215>.
- [316] H. Thakar, S.M. Sebastian, S. Mandal, Biomolecule-Conjugated Macroporous Hydrogels for Biomedical Applications, *ACS Biomater Sci Eng* 5 (2019) 6320–6341. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00778>.
- [317] H. Zheng, B. Zuo, Functional silk fibroin hydrogels: preparation, properties and applications, *J Mater Chem B* 9 (2021) 1238–1258. <https://doi.org/10.1039/d0tb02099k>.
- [318] X. Tang, F. Ding, Y. Yang, N. Hu, H. Wu, X. Gu, Evaluation on in vitro biocompatibility of silk fibroin-based biomaterials with primarily cultured hippocampal neurons, *J Biomed Mater Res A* 91A (2009) 166–174. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32212>.
- [319] T. Hashimoto, K. Kojima, Y. Tamada, Higher Gene Expression Related to Wound Healing by Fibroblasts on Silk Fibroin Biomaterial than on Collagen, *Molecules* 25 (2020) 1939. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74860-w10.3390/molecules25081939>.
- [320] T.L. Liu, J.C. Miao, W.H. Sheng, Y.F. Xie, Q. Huang, Y.B. Shan, J.C. Yang, Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing, *J Zhejiang Univ Sci B* 11 (2010) 10–16. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0900163>.
- [321] J. Liu, H. Chen, Y. Wang, G. Li, Z. Zheng, D.L. Kaplan, X. Wang, X. Wang, Flexible Water-Absorbing Silk-Fibroin Biomaterial Sponges with Unique Pore Structure for Tissue Engineering, *ACS Biomater Sci Eng* 6 (2020) 1641–1649. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01721>.
- [322] S. Gokila, T. Gomathi, K. Vijayalakshmi, A. Faleh A., A. Sukumaran, P.N. Sudha, Development of 3D scaffolds using nanochitosan/silk-fibroin/hyaluronic acid biomaterials for tissue engineering applications, *Int J Biol Macromol* 120 (2018) 876–885. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.149>.
- [323] J. Baukum, J. Pranjan, A. Kaolaor, The potential use of cross-linked alginate/gelatin hydrogels containing silver nanoparticles for wound dressing applications, *Polymer Bulletin* 77 (2020) 2679–2695. <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02873-1>.
- [324] Y. Wen, B. Yu, Z. Zhu, Synthesis of antibacterial gelatin/sodium alginate sponges and their antibacterial activity, *Polymers* 12 (2020) 1926. <https://doi.org/10.3390/POLYM12091926>.
- [325] A. Saarai, V. Kasparikova, T. Sedlacek, On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatin hydrogels, *J Mech Behav Biomed Mater* 18 (2013) 152–166. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.11.010>.

- [326] B. Salahuddin, S. Wang, D. Sangian, Hybrid Gelatin Hydrogels in Nanomedicine Applications, *ACS Appl Bio Mater* 4 (2021) 2886–2906. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01630>.
- [327] M.B. Łabowska, K. Cierluk, A.M. Jankowska, A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting, *Materials* 14 (2021) 858. <https://doi.org/10.3390/ma14040858>.
- [328] R. Rodríguez-Rodríguez, H. Espinosa-Andrews, C. Velasquillo-Martínez, Composite hydrogels based on gelatin, chitosan and polyvinyl alcohol to biomedical applications: a review, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 69 (2020) 1–20. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1581780>.
- [329] S. Ullm, A. Krüger, C. Tondera, T.P. Gebauer, A.T. Neffe, A. Lendlein, F. Jung, J. Pietzsch, Biocompatibility and inflammatory response in vitro and in vivo to gelatin-based biomaterials with tailorable elastic properties, *Biomaterials* 35 (2014) 9755–9766. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.023>.
- [330] K. Ullah, S. Ali Khan, G. Murtaza, M. Sohail, Azizullah, A. Manan, A. Afzal, Gelatin-based Hydrogels as Potential Biomaterials for Colonic Delivery of Oxaliplatin, *Int J Pharm* 556 (2019) 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.020>.
- [331] Y. Liu, S. Cheong NG, J. Yu, W.B. Tsai, Modification and Crosslinking of Gelatin-Based Biomaterials as Tissue Adhesives, *Colloids Surf B Biointerfaces* 174 (2019) 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.077>.
- [332] Q. Lu, X. Zhang, X. Hu, D.L. Kaplan, Green Process to Prepare Silk Fibroin/Gelatin Biomaterial Scaffolds, *Macromol Biosci* 10 (2010) 289–298. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900258>.
- [333] M. Mehrali, A. Thakur, F.B. Kadumudi, M.K. Pierchala, J.A.V. Cordova, M.A. Shahbazi, M. Mehrali, C.P. Pennisi, G. Orive, A.K. Gaharwar, A. Dolatshahi-Pirouz, Pectin Methacrylate (PEMA) and Gelatin-Based Hydrogels for Cell Delivery: Converting Waste Materials into Biomaterials, *ACS Appl Mater Interfaces* 11 (2019) 12283–12297. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b00154>.
- [334] F. Mushtaq, Z.A. Raza, S.R. Batool, M. Zahid, O.C. Onder, A. Rafique, M.A. Nazeer, Preparation, properties, and applications of gelatin-based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors, *Int J Biol Macromol* 218 (2022) 601–633. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.168>.
- [335] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M.M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, A. Khademhosseini, Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels, *Biomaterials* 73 (2015) 254–271. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.045>.
- [336] P. Jaipan, A. Nguyen, R.J. Narayan, Gelatin-based hydrogels for biomedical applications, *MRS Commun* 7 (2017) 416–426. <https://doi.org/10.1557/mrc.2017.92>.
- [337] S. Tang, L. Zhao, J. Yuan, Y. Chen, Y. Leng, Physical hydrogels based on natural polymers, in: *Hydrogels Based on Natural Polymers*, Elsevier, 2019: pp. 51–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00003-3>.
- [338] Z. Sun, C. Song, C. Wang, Y. Hu, J. Wu, Hydrogel-Based Controlled Drug Delivery for Cancer Treatment: A Review, *Mol Pharm* 17 (2020) 373–391. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74860-w10.1021/acs.molpharmaceut.9b01020>.
- [339] B. Tian, S. Hua, Y. Tian, J. Liu, Chemical and physical chitosan hydrogels as prospective carriers for drug delivery: A review, *J Mater Chem B* 8 (2020) 10050–10064. <https://doi.org/10.1039/d0tb01869d>.
- [340] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat Rev Mater* 1 (2016) 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.

- [341] A. Vashist, A. Vashist, Y.K. Gupta, S. Ahmad, Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body, *J Mater Chem B* 2 (2014) 147–166. <https://doi.org/10.1039/c3tb21016b>.
- [342] L.A. Sharpe, A.M. Daily, S.D. Horava, N.A. Peppas, Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery, *Expert Opin Drug Deliv* 11 (2014) 901–915. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.902047>.
- [343] Umeyor C, Uronnachi E, Nayak A, Okeke T, Shah P, The Potentials and Challenges of Hydrogels for Ocular Therapy, in: *Hydrogels and Nanogels - Applications in Medicine*, Intech Open, 2024. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1000374>.
- [344] M. Rizwan, R. Yahya, A. Hassan, M. Yar, A.D. Azzahari, V. Selvanathan, F. Sonsudin, C.N. Abouloula, pH Sensitive Hydrogels in Drug Delivery: Brief History, Properties, Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications Muhammad, *Polymers* 9 (2017) 137. <https://doi.org/10.3390/polym9040137>.
- [345] H. Mehdi-Sefiani, C.M. Granados-Carrera, A. Romero, E. Chicardi, J. Domínguez-Robles, V.M. Perez-Puyana, Chitosan–Type-A–Gelatin Hydrogels Used as Potential Platforms in Tissue Engineering for Drug Delivery, *Gels* 10 (2024) 419. <https://doi.org/10.3390/gels10070419>.
- [346] X. Sun, X. Zhao, L. Zhao, Q. Li, M. D’Ortenzio, B. Nguyen, X. Xu, Y. Wen, Development of a hybrid gelatin hydrogel platform for tissue engineering and protein delivery applications, *J Mater Chem B* 3 (2015) 6368–6376. <https://doi.org/10.1039/c5tb00645g>.
- [347] R.T. Annamalai, P.A. Turner, W.F. Carson, B. Levi, S. Kunkel, J.P. Stegemann, Harnessing macrophage-mediated degradation of gelatin microspheres for spatiotemporal control of BMP2 release, *Biomaterials* 161 (2018) 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.040>.
- [348] S. Gnavi, L. di Blasio, C. Tonda-Turo, A. Mancardi, L. Primo, G. Ciardelli, G. Gambarotta, S. Geuna, I. Perroteau, Gelatin-based hydrogel for vascular endothelial growth factor release in peripheral nerve tissue engineering, *J Tissue Eng Regen Med* 11 (2017) 459–470. <https://doi.org/10.1002/term.1936>.
- [349] Y.Y. Hsu, K.L. Liu, H.H. Yeh, H.R. Lin, H.L. Wu, J.C. Tsai, Sustained release of recombinant thrombomodulin from cross-linked gelatin/hyaluronic acid hydrogels potentiate wound healing in diabetic mice, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 135 (2019) 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.12.007>.
- [350] Y. Bao, H. qiang Zhang, L. Chen, H.H. Cai, Z.L. Liu, Y. Peng, Z. Li, F.Y. Dai, Artemisinin-loaded silk fibroin/gelatin composite hydrogel for wound healing and tumor therapy, *Arabian Journal of Chemistry* 16 (2023) 104782. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104782>.
- [351] T. Kushibiki, Y. Mayumi, E. Nakayama, R. Azuma, K. Ojima, A. Horiguchi, M. Ishihara, Photocrosslinked gelatin hydrogel improves wound healing and skin flap survival by the sustained release of basic fibroblast growth factor, *Sci Rep* 11 (2021) 23094. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02589-1>.
- [352] M. Tummalapalli, M. Berthet, B. Verrier, B.L. Deopura, M.S. Alam, B. Gupta, Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing, *Int J Pharm* 505 (2016) 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.007>.
- [353] S. Patel, S. Srivastava, M.R. Singh, D. Singh, Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing, *Int J Biol Macromol* 107 (2018) 1888–1897. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.056>.
- [354] X. Zhang, M.D. Do, P. Casey, Chemical cross-linking gelatin with natural phenolic compounds as studied by high-resolution NMR spectroscopy, *Biomacromolecules* 11 (2010) 1125–1132. <https://doi.org/10.1021/bm1001284>.

- [355] Y. Huang, A. Li, C. Qiu, Y. Teng, Y. Wang, Self-assembled colloidal complexes of polyphenol-gelatin and their stabilizing effects on emulsions, *Food Funct* 8 (2017) 3145–3154. <https://doi.org/10.1039/c7fo00705a>.
- [356] P. Sapuła, K. Bialik-Wąs, Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego, P.446030, 2023.
- [357] P. Sapuła, K. Bialik-Wąs, Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego, P.446029, 2023.
- [358] P. Sapuła, K. Bialik-Wąs, Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego, P.446028, 2023.
- [359] P. Sapuła, K. Bialik-Wąs, Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego, P.446027, 2023.
- [360] J. Esparza, M. Stone, C. Stushnoff, Effects of Ascorbic Acid Applied by Two Hydrocooling Methods on Physical and Chemical Properties of Green Leaf Lettuce Stored at 5 °C, *J Food Sci* 71 (2006) 270–276. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb15653.x>.
- [361] D.O. Kim, O.K. Chun, Y.J. Kim, H.Y. Moon, C.Y. Lee, Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums, *J Agric Food Chem* 51 (2003) 6509–6515. <https://doi.org/10.1021/jf0343074>.
- [362] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *LWT - Food Science and Technology* 28 (1995) 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [363] European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution, *Clinical Microbiology and Infection* 9 (2003) ix–xv. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>.
- [364] A. Malm, A. Grzegorzczak, A. Biernasiuk, T. Baj, E. Rój, K. Tyśkiewicz, A. Dębczak, M.J. Stolarski, M. Krzyżaniak, E. Olba-Zięty, Could Supercritical Extracts from the Aerial Parts of *Helianthus salicifolius* A. Dietr. and *Helianthus tuberosus* L. Be Regarded as Potential Raw Materials for Biocidal Purposes?, *Agriculture* 11 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010010>.
- [365] A. Suarez-Arnedo, F.T. Figueroa, C. Clavijo, P. Arbeláez, J.C. Cruz, C. Muñoz-Camargo, An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays, *PLoS One* 15 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232565>.
- [366] P. Sapuła, K. Bialik-Wąs, Sposób otrzymywania materiału hydrożelowego przy zastosowaniu naturalnego czynnika sieciującego, P.449047, 2024.
- [367] W.A. Bubnis, C.M. Ofner, The Determination of C-Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzenesulfonic Acid, *Anal Biochem* 207 (1992) 129–133. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90513-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90513-7).
- [368] A. Chetouani, M. Elkolli, H. Haffar, H. Chader, F. Riahi, T. Varacavoudin, D. Le Cerf, Multifunctional hydrogels based on oxidized pectin and gelatin for wound healing improvement, *Int J Biol Macromol* 212 (2022) 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.082>.
- [369] P. Coimbra, M.H. Gil, M. Figueiredo, Tailoring the properties of gelatin films for drug delivery applications: Influence of the chemical cross-linking method, *Int J Biol Macromol* 70 (2014) 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.021>.
- [370] I. Van Nieuwenhove, A. Salamon, K. Peters, G.J. Graulus, J.C. Martins, D. Frankel, K. Kersemans, F. De Vos, S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, Gelatin- and starch-based hydrogels. Part A: Hydrogel development, characterization and coating, *Carbohydr Polym* 152 (2016) 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.098>.

- [371] A. Rasyida, S. Halimah, I.D. Wijayanti, S.T. Wicaksono, H. Nurdiansah, Y.M.T. Silaen, Y.L. Ni'mah, H. Ardhyanta, A. Purniawan, A Composite of Hydrogel Alginate/PVA/r-GO for Scaffold Applications with Enhanced Degradation and Biocompatibility Properties, *Polymers (Basel)* 15 (2023) 534. <https://doi.org/10.3390/polym15030534>.
- [372] Y. Liu, R. Weng, W. Wang, X. Wei, J. Li, X. Chen, Y. Liu, F. Lu, Y. Li, Tunable physical and mechanical properties of gelatin hydrogel after transglutaminase crosslinking on two gelatin types, *Int J Biol Macromol* 162 (2020) 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.185>.
- [373] PN-ISO 868:2005, Tworzywa sztuczne i ebonit — Twardość metodą wciskania z zastosowaniem twardościomierza (twardość metodą Shore'a), 2005.
- [374] R. Rodrigues, M.B.P.P. Oliveira, R.C. Alves, Chlorogenic Acids and Caffeine from Coffee By-Products: A Review on Skincare Applications, *Cosmetics* 10 (2023). <https://doi.org/10.3390/cosmetics10010012>.
- [375] X. Zhao, Z. Liu, H. Liu, J. Guo, S. Long, Hybrid molecules based on caffeic acid as potential therapeutics: A focused review, *Eur J Med Chem* 243 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114745>.
- [376] M. Batory, H. Rotsztejn, Shikimic acid in the light of current knowledge, *J Cosmet Dermatol* 21 (2022) 501–505. <https://doi.org/10.1111/jocd.14136>.
- [377] S. Thaiphanit, W. Wedprasert, A. Srabua, Conventional and microwave-assisted extraction for bioactive compounds from dried coffee cherry peel by-products and antioxidant activity of the aqueous extracts, *ScienceAsia* 46S (2020) 12–18. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2020.S002>.
- [378] K. Belguidoum, H. Amira-Guebailia, Y. Boulmouk, O. Houache, HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market, *J Taiwan Inst Chem Eng* 45 (2014) 1314–1320. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2014.03.014>.
- [379] S. Awwad, R. Issa, L. Alnsour, D. Albals, I. Al-Momani, Quantification of Caffeine and Chlorogenic Acid in Green and Roasted Coffee Samples Using HPLC-DAD and Evaluation of the Effect of Degree of Roasting on Their Levels, *Molecules* 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26247502>.
- [380] A.S. Caballero-Galván, D.L. Restrepo-Serna, M. Ortiz-Sánchez, C.A. Cardona-Alzate, Analysis of Extraction Kinetics of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds (*Coffea arabica*), *Waste Biomass Valorization* 9 (2018) 2381–2389. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0332-8>.
- [381] S. Angeloni, F.K. Nzekoue, L. Navarini, G. Sagratini, E. Torregiani, S. Vittori, G. Caprioli, An analytical method for the simultaneous quantification of 30 bioactive compounds in spent coffee ground by HPLC-MS/MS, *Journal of Mass Spectrometry* 55 (2020). <https://doi.org/10.1002/jms.4519>.
- [382] P. Köseoglu Yilmaz, U. Kolak, SPE-HPLC Determination of Chlorogenic and Phenolic Acids in Coffee, *J Chromatogr Sci* 55 (2017) 712–718. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx025>.
- [383] L. Shi, W. Zhao, Z. Yang, V. Subbiah, H.A.R. Suleria, Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities, *Environmental Science and Pollution Research* 29 (2022) 81112–81129. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6>.
- [384] C. Picot-Allain, M.F. Mahomoodally, G. Ak, G. Zengin, Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective, *Curr Opin Food Sci* 34 (2020) 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>.
- [385] J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafour, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from

- plant materials: A review, *J Food Eng* 117 (2013) 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.
- [386] A. Panusa, A. Zuurro, R. Lavecchia, G. Marrosu, R. Petrucci, Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds, *J Agric Food Chem* 61 (2013) 4162–4168. <https://doi.org/10.1021/jf4005719>.
- [387] M. Ramón-Gonçalves, E. Gómez-Mejía, N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, Y. Madrid, Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses, *Waste Management* 96 (2019) 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.009>.
- [388] R.D. Vargas Sánchez, M. Esqueda, B. del M. Torres Martínez, G.R. Torrecano Urrutia, A. Sánchez Escalante, Antioxidant activity of the aqueous extract from spent coffee grounds fermented with *Pleurotus ostreatus*, *Sci Fungorum* 54 (2023) e1433. <https://doi.org/10.33885/sf.2023.54.1433>.
- [389] V.A. Pimpley, P.S. Murthy, Influence of green extraction techniques on green coffee: Nutraceutical compositions, antioxidant potential and in vitro bio-accessibility of phenolics, *Food Biosci* 43 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101284>.
- [390] R. Macías-Garbett, J.E. Sosa-Hernández, H.M.N. Iqbal, J.C. Contreras-Esquivel, W.N. Chen, E.M. Melchor-Martínez, R. Parra-Saldívar, Combined Pulsed Electric Field and Microwave-Assisted Extraction as a Green Method for the Recovery of Antioxidant Compounds with Electroactive Potential from Coffee Agro-Waste, *Plants* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/plants11182362>.
- [391] S.H. Nile, A.S. Nile, Y.S. Keum, Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods, *3 Biotech* 7 (2017). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0706-9>.
- [392] I. Okur, B. Soyler, P. Sezer, M.H. Oztop, H. Alpas, Improving the Recovery of Phenolic Compounds from Spent Coffee Grounds (SCG) by Environmentally Friendly Extraction Techniques, *Molecules* 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26030613>.
- [393] G.A. Pankey, L.D. Sabath, Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections, *Clinical Infectious Diseases* 38 (2004) 864–870. <https://doi.org/10.1086/381972>.
- [394] T. Stefani, E. Garza-González, V.M. Rivas-Galindo, M.Y. Rios, L. Alvarez, M.D.R. Camacho-Corona, *Hechtia glomerata* Zucc: Phytochemistry and Activity of Its Extracts and Major Constituents Against Resistant Bacteria, *Molecules* 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24193434>.
- [395] M.C. Montesinos, A. Desai, J.F. Chen, H. Yee, M.A. Schwarzschild, J.S. Fink, B.N. Cronstein, Adenosine Promotes Wound Healing and Mediates Angiogenesis in Response to Tissue Injury Via Occupancy of A2A Receptors, *American Journal of Pathology* 160 (2002) 2009–2018. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61151-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61151-0).
- [396] P.A. Borges, I. Waclawiak, J.L. Georgii, V. da S. Fraga-Junior, J.F. Barros, F.S. Lemos, T. Russo-Abrahão, E.M. Saraiva, C.M. Takiya, R. Coutinho-Silva, C. Penido, C. Mermelstein, J.R. Meyer-Fernandes, F.B. Canto, J.S. Neves, P.A. Melo, C. Canetti, C.F. Benjamim, Adenosine Diphosphate Improves Wound Healing in Diabetic Mice Through P2Y12 Receptor Activation, *Front Immunol* 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.651740>.
- [397] Q. Xing, K. Yates, C. Vogt, Z. Qian, M.C. Frost, F. Zhao, Increasing Mechanical Strength of Gelatin Hydrogels by Divalent Metal Ion Removal, *Sci Rep* 4 (2014). <https://doi.org/10.1038/srep04706>.
- [398] S. Wang, K. Li, Q. Zhou, High strength and low swelling composite hydrogels from gelatin and delignified wood, *Sci Rep* 10 (2020) 17842. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74860-w>.

- [399] G. Strauss, S.M. Gibson, Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients, *Food Hydrocoll* 18 (2004) 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00045-6).
- [400] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, Third Edition, Wiley, Chichester, 2004.
- [401] M. Xu, L. Wei, Y. Xiao, H. Bi, H. Yang, Y. Du, Physicochemical and functional properties of gelatin extracted from Yak skin, *Int J Biol Macromol* 95 (2017) 1246–1253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.020>.
- [402] Y. Zhao, Z. Sun, Effects of gelatin-polyphenol and gelatin–genipin cross-linking on the structure of gelatin hydrogels, *Int J Food Prop* 20 (2018) S2822–S2832. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1381111>.
- [403] Q. Wang, J. Cao, H. Yu, J. Zhang, Y. Yuan, X. Shen, C. Li, The effects of EGCG on the mechanical, bioactivities, cross-linking and release properties of gelatin film, *Food Chem* 271 (2019) 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.168>.
- [404] L. Dou, B. Li, K. Zhang, X. Chu, H. Hou, Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols, *Int J Biol Macromol* 118 (2018) 1377–1383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.121>.
- [405] S. Selvakumaran, I.I. Muhamad, Evaluation of kappa carrageenan as potential carrier for floating drug delivery system: Effect of cross linker, *Int J Pharm* 496 (2015) 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.005>.
- [406] S. Kim, M.E. Nimni, Z. Yang, B. Han, Chitosan/Gelatin-Based Films Crosslinked by Proanthocyanidin, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75B (2005) 442–450. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30324>.
- [407] H. Chen, D. Wu, W. Ma, C. Wu, J. Liu, M. Du, Strong fish gelatin hydrogels double crosslinked by transglutaminase and carrageenan, *Food Chem* 376 (2022) 131873. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131873>.
- [408] E. Tavassoli-Kafrani, S.A.H. Goli, M. Fathi, Fabrication and characterization of electrospun gelatin nanofibers crosslinked with oxidized phenolic compounds, *Int J Biol Macromol* 103 (2017) 1062–1068. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.152>.
- [409] Z. Wang, S. Zhao, R. Song, W. Zhang, S. Zhang, J. Li, The synergy between natural polyphenol-inspired catechol moieties and plant protein-derived bio-adhesive enhances the wet bonding strength, *Sci Rep* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10007-8>.
- [410] A. Erge, B.Z. Güler, Ö. Eren, Optimization and characterization of biodegradable films from chicken gelatin crosslinked with oxidized phenolic compounds, *Food Chem* 438 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137923>.
- [411] I. Choi, S.E. Lee, Y. Chang, M. Lacroix, J. Han, Effect of oxidized phenolic compounds on cross-linking and properties of biodegradable active packaging film composed of turmeric and gelatin, *LWT - Food Science and Technology* 93 (2018) 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.065>.
- [412] H. Montazerian, R.R. Sampath, N. Annabi, A. Khademhosseini, P.S. Weiss, Polyphenolic Gelatin-Based Bioadhesives, *Acc Mater Res* 4 (2023) 627–640. <https://doi.org/10.1021/accountsmr.3c00055>.
- [413] J. Skopinska-Wisniewska, M. Tuszynska, E. Olewnik-Kruszkowska, Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents, *Materials* 14 (2021) 396. <https://doi.org/10.3390/ma14020396>.

- [414] S. Magli, L. Rossi, C. Consentino, S. Bertini, F. Nicotra, L. Russo, Combined analytical approaches to standardize and characterize biomaterials formulations: Application to chitosan-gelatin cross-linked hydrogels, *Biomolecules* 11 (2021) 683. <https://doi.org/10.3390/biom11050683>.
- [415] B. Kokkuvayil Ramadas, J.W. Rhim, S. Roy, Recent Progress of Carrageenan-Based Composite Films in Active and Intelligent Food Packaging Applications, *Polymers* 16 (2024) 1001. <https://doi.org/10.3390/polym16071001>.
- [416] F.M. Mehaya, A.A. Mohammad, Thermostability of bioactive compounds during roasting process of coffee beans, *Heliyon* 6 (2020) e05508. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05508>.
- [417] W. Zhang, J. Liu, T. Zhang, B. Teng, A High-Performance Food Package Material Prepared by the Synergistic Crosslinking of Gelatin with Polyphenol–Titanium Complexes, *Antioxidants* 13 (2024) 167. <https://doi.org/10.3390/antiox13020167>.
- [418] S.M. Pawde, K. Deshmukh, Characterization of polyvinyl alcohol/gelatin blend hydrogel films for biomedical applications, *J Appl Polym Sci* 109 (2008) 3431–3437. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31307>.
- [419] Y. Pranoto, C.M. Lee, H.J. Park, Characterizations of fish gelatin films added with gellan and κ-carrageenan, *LWT* 40 (2007) 766–774. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.04.005>.
- [420] K.N. Catalan, T.P. Corrales, J.C. Forero, C.P. Romero, C.A. Acevedo, Glass Transition in Crosslinked Nanocomposite Scaffolds of Gelatin/Chitosan/Hydroxyapatite, *Polymers* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/polym11040642>.
- [421] H. Staroszczyk, J. Pielichowska, K. Sztuka, J. Stangret, I. Kołodziejaska, Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase, *Food Chem* 130 (2012) 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.047>.
- [422] B. Li, J.F. Kennedy, Q.G. Jiang, B.J. Xie, Quick dissolvable, edible and heatsealable blend films based on konjac glucomannan - Gelatin, *Food Research International* 39 (2006) 544–549. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.015>.
- [423] K.S. Postolović, M.D. Antonijević, B. Ljujić, S. Radenković, M. Miletić Kovačević, Z. Hiezl, S. Pavlović, I. Radojević, Z. Stanić, Curcumin and Diclofenac Therapeutic Efficacy Enhancement Applying Transdermal Hydrogel Polymer Films, Based on Carrageenan, Alginate and Poloxamer, *Polymers* 14 (2022) 4091. <https://doi.org/10.3390/polym14194091>.
- [424] I. Montenegro, C. Pérez, B. González, Á. Domínguez, E. Gómez, Thermal Characterization and Heat Capacities of Seven Polyphenols, *Molecules* 30 (2025) 199. <https://doi.org/10.3390/molecules30010199>.
- [425] B. Muhoza, S. Xia, X. Zhang, Gelatin and high methyl pectin coacervates crosslinked with tannic acid: The characterization, rheological properties, and application for peppermint oil microencapsulation, *Food Hydrocoll* 97 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105174>.
- [426] S.R. Derkach, Y.A. Kuchina, D.S. Kolotova, N.G. Voron'ko, Polyelectrolyte Polysaccharide-Gelatin Complexes: Rheology and Structure, *Polymers* 12 (2020) 266. <https://doi.org/10.3390/polym12020266>.
- [427] J. Enrione, C. Char, M. Peczynska, C. Padilla, A. González-Muñoz, Y. Olguín, C. Quinzio, L. Iturriaga, P. Díaz-Calderón, Rheological and Structural Study of Salmon Gelatin with Controlled Molecular Weight, *Polymers* 12 (2020) 1587. <https://doi.org/10.3390/polym12071587>.
- [428] S.R. Derkach, N.G. Voron'ko, Y.A. Kuchina, D.S. Kolotova, V.A. Grokhovsky, A.A. Nikiforova, I.A. Sedov, D.A. Faizullin, Y.F. Zuev, Rheological Properties of Fish and Mammalian Gelatin Hydrogels as Bases for Potential Practical Formulations, *Gels* 10 (2024) 486. <https://doi.org/10.3390/gels10080486>.

- [429] A. Straksys, A. Abouhagger, M. Kirsnytė-Šniokė, T. Kavleiskaja, A. Stirke, W.C.M.A. Melo, Development and Characterization of a Gelatin-Based Photoactive Hydrogel for Biomedical Application, *J Funct Biomater* 16 (2025). <https://doi.org/10.3390/jfb16020043>.
- [430] D. Rocha-García, A. Guerra-Contreras, S. Rosales-Mendoza, G. Palestino, Role of porous silicon/hydrogel composites on drug delivery, *Open Material Sciences* 3 (2016) 93–101. <https://doi.org/10.1515/mesbi-2016-0011>.
- [431] C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Effects of Surfactants on Gel Behavior, *American Journal of Drug Delivery* 1 (2003) 77–101. <https://doi.org/10.2165/00137696-200301020-00001>.
- [432] A. Mortensen, F. Aguilar, R. Crebelli, A. Di Domenico, B. Dusemund, M.J. Frutos, P. Galtier, D. Gott, U. Gundert-Remy, J.C. Leblanc, O. Lindtner, P. Moldeus, Re-evaluation of glycerol (E 422) as a food additive, *EFSA Journal* 15 (2017). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.4720>.
- [433] A. Karydis-Messinis, D. Moschovas, M. Markou, K. Tsirka, C. Gioti, E. Bagli, C. Murphy, A.E. Giannakas, A. Paipetis, M.A. Karakassides, A. Avgeropoulos, C.E. Salmas, N.E. Zafeiropoulos, Hydrogel Membranes from Chitosan-Fish Gelatin-Glycerol for Biomedical Applications: Chondroitin Sulfate Incorporation Effect in Membrane Properties, *Gels* 9 (2023) 844. <https://doi.org/10.3390/gels9110844>.
- [434] S.M. Koch, C.H. Dreimol, C. Goldhahn, A. Maillard, A. Stadler, T. Künninger, P. Grönquist, M. Ritter, T. Keplinger, I. Burgert, Biodegradable and Flexible Wood-Gelatin Composites for Soft Actuating Systems, *ACS Sustain Chem Eng* 12 (2024) 8662–8670. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c00306>.
- [435] R. Rosmawati, S.F. Sari, A. Asnani, W. Embe, A. Asjun, D. Wibowo, I. Irwan, N. Huda, M. Nurdin, A.A. Umar, Influence of Sorbitol and Glycerol on Physical and Tensile Properties of Biodegradable–Edible Film From Snakehead Gelatin and κ -Carrageenan, *Int J Food Sci* 2025 (2025). <https://doi.org/10.1155/ijfo/7568352>.
- [436] F. Liu, B. Sen Chiou, R.J. Avena-Bustillos, Y. Zhang, Y. Li, T.H. McHugh, F. Zhong, Study of combined effects of glycerol and transglutaminase on properties of gelatin films, *Food Hydrocoll* 65 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.004>.
- [437] X. Chen, B. Bhandari, P. Zhou, Insight into the Effect of Glycerol on Stability of Globular Proteins in High Protein Model System, *Food Chem* 278 (2019) 780–785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.117>.
- [438] I. Ramm, A. Sanchez-Fernandez, J. Choi, C. Lang, J. Fransson, H. Schagerlöf, M. Wahlgren, L. Nilsson, The Impact of Glycerol on an Affibody Conformation and Its Correlation to Chemical Degradation, *Pharmaceutics* 13 (2021) 1853. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111853>.
- [439] N. Suderman, N.M. Sarbon, Optimization of chicken skin gelatin film production with different glycerol concentrations by response surface methodology (RSM) approach, *J Food Sci Technol* 57 (2020) 463–472. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74860-w10.1007/s13197-019-04074-0>.
- [440] N. Mohammed Manshor, M.I. Rezali, J. Jai, A. Yahya, Effect of Plasticizers on Physicochemical and Mechanical Properties of Chitosan-Gelatin Films, *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 358 (2018). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/358/1/012040>.
- [441] Z.A. Nur Hanani, J. McNamara, Y.H. Roos, J.P. Kerry, Effect of plasticizer content on the functional properties of extruded gelatin-based composite films, *Food Hydrocoll* 31 (2013) 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.009>.
- [442] X. Qiang, S. Zhou, Z. Zhang, Q. Quan, D. Huang, Synergistic effect of halloysite nanotubes and glycerol on the physical properties of fish gelatin films, *Polymers* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/polym10111258>.
- [443] M.B. de Vilhena, R.M. Matos, G.S. da S. Ramos Junior, B.M. Viegas, C.A.B. da Silva Junior, E.N. Macedo, M.V. da S. Paula, J.A. da Silva Souza, V.S. Candido, E.J. de Sousa Cunha, Influence of

- Glycerol and SISAL Microfiber Contents on the Thermal and Tensile Properties of Thermoplastic Starch Composites, *Polymers* 15 (2023) 4141. <https://doi.org/10.3390/polym15204141>.
- [444] Y. Wang, S. Jiang, Y. Chen, D. Qiu, Y. Weng, Synthesis and Characterization of a Novel Composite Edible Film Based on Hydroxypropyl Methyl Cellulose Grafted with Gelatin, *Gels* 9 (2023) 332. <https://doi.org/10.3390/gels9040332>.
- [445] S. Rivero, M.A. García, A. Pinotti, Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11 (2010) 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.005>.
- [446] R.R. Ong, C.F. Goh, Niacinamide: a review on dermal delivery strategies and clinical evidence, *Drug Deliv Transl Res* 14 (2024) 3512–3548. <https://doi.org/10.1007/s13346-024-01593-y>.
- [447] B. Bravo, P. Correia, J.E. Gonçalves Junior, B. Sant’Anna, D. Kerob, Benefits of topical hyaluronic acid for skin quality and signs of skin aging: From literature review to clinical evidence, *Dermatol Ther* 35 (2022) 15903. <https://doi.org/10.1111/dth.15903>.
- [448] T. Pinthong, M. Yooyod, J. Daengmankhong, N. Tuancharoensri, S. Mahasaranon, J. Viyoch, J. Jongjitwimol, S. Ross, G.M. Ross, Development of Natural Active Agent-Containing Porous Hydrogel Sheets with High Water Content for Wound Dressings, *Gels* 9 (2023) 459. <https://doi.org/10.3390/gels9060459>.
- [449] A. Abou-Okeil, G.M. Taha, Investigation and kinetics of hydrogel scaffold with sustained release ciprofloxacin hydrochloride, *Polymer Bulletin* 81 (2024) 17393–17411. <https://doi.org/10.1007/s00289-024-05495-4>.
- [450] F. Rashid, M. Albayati, K. Dodou, Novel Crosslinked HA Hydrogel Films for the Immediate Release of Active Ingredients, *Cosmetics* 10 (2023). <https://doi.org/10.3390/cosmetics10010006>.
- [451] R.S.H. Wong, K. Dodou, Effect of Drug Loading Method and Drug Physicochemical Properties on the Material and Drug Release Properties of Poly(Ethylene Oxide) Hydrogels for Transdermal Delivery, *Polymers* 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/polym9070286>.
- [452] G. Tronci, P. Buiga, A. Alhilou, T. Do, S.J. Russell, D.J. Wood, Hydrolytic and lysozymic degradability of chitosan systems with heparin-mimicking pendant groups, *Mater Lett* 188 (2017) 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.11.109>.
- [453] Lee S, Yun Y, Ahn G, Yoon S, Preparation of niacinamide imprinted starch-based biomaterials for treating of hyperpigmentation, *Int J Biol Macromol* 232 (2023) 123382. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123382>.
- [454] J.A. Alkrad, Y. Mrestani, D. Stroehl, S. Wartewig, R. Neubert, Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies, *J Pharm Biomed Anal* 31 (2003) 545–550. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(02\)00682-9](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00682-9).
- [455] X. Xuejun, P.A. Netti, L. Ambrosio, L. Nicolais, A. Sannino, Preparation and Characterization of a Hydrogel from Low-molecular Weight Hyaluronic Acid, *J Bioact Compat Polym* 19 (2004) 5–15. <https://doi.org/10.1177/0883911504041608>.
- [456] C. V. Kulkarni, Z. Moinuddin, Y. Patil-Sen, R. Littlefield, M. Hood, Lipid-hydrogel films for sustained drug release, *Int J Pharm* 479 (2015) 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.013>.
- [457] Y. Li, Y. Chen, Y. Xue, J. Jin, Y. Xu, W. Zeng, J. Liu, J. Xie, Injectable Hydrogel Delivery System with High Drug Loading for Prolonging Local Anesthesia, *Advanced Science* 11 (2024) 2309482. <https://doi.org/10.1002/advs.202309482>.
- [458] V. Andonova, P. Peneva, G.S. Georgiev, V.T. Toncheva, E. Apostolova, Z. Peychev, S. Dimitrova, M. Katsarova, N. Petrova, M. Kassarova, Ketoprofen-loaded polymer carriers in bigel formulation:

An approach to enhancing drug photostability in topical application forms, *Int J Nanomedicine* 12 (2017) 6221–6238. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140934>.

- [459] N.M. Ainali, E. Tarani, A. Zamboulis, K.P. Črešnar, L.F. Zemljič, K. Chrissafis, D.A. Lambropoulou, D.N. Bikiaris, Thermal Stability and Decomposition Mechanism of PLA Nanocomposites with Kraft Lignin and Tannin, *Polymers* 13 (2021) 2818. <https://doi.org/10.3390/polym13162818>.
- [460] R. Silva, M. Medeiros, C.T.B. Paula, S. Saraiva, R.C. Rebelo, P. Pereira, J.F.J. Coelho, A.C. Serra, A.C. Fonseca, Light-Mediated 3D-Printed Wound Dressings Based on Natural Polymers with Improved Adhesion and Antioxidant Properties, *Polymers* 17 (2025). <https://doi.org/10.3390/polym17081114>.

7. DOROBEK NAUKOWY

PUBLIKACJE NAUKOWE

1. Bialik-Wąs, K., **Sapula, P.** i Pielichowski, K. (2020). Studies on the encapsulation of model active substance using thermosensitive polymeric nanocarriers. *Engineering of Biomaterials* 158, 35.
2. Bialik-Wąs, K., Miastkowska, M., **Sapula, P.**, Pluta, K., Malina, D., Chwastowski, J. i Barczewski, M. (2022). Bio-Hybrid Hydrogels Incorporated into a System of Salicylic Acid-pH/Thermosensitive Nanocarriers Intended for Cutaneous Wound-Healing Processes. *Pharmaceutics* 14(4), 773.
3. **Sapula, P.**, Bialik-Wąs, K. i Malarz, K. (2023). Are Natural Compounds a Promising Alternative to Synthetic Cross-Linking Agents in the Preparation of Hydrogels?. *Pharmaceutics* 15(1), 253.
4. Bialik-Wąs, K. i **Sapula, P.** (2023). In vitro release studies of poorly water-soluble compounds using the flow-through cell USP4 apparatus. *Chemical and Process Engineering: New Frontiers* 44(3), e14.
5. Bialik-Wąs, K., Miastkowska, M., **Sapula, P.**, Sycz, A., Pluta, K., Malina, D. i Chwastowski, J. (2024). Kinetic analysis of in vitro release profiles of salicylic acid and fluocinolone acetonide from dual delivery systems composed of polymeric nanocarriers and a hydrogel matrix. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 92, 105355.
6. **Sapula, P.**, Zając, P., Pielichowski, K., Raftopoulos, K.N. i Bialik-Wąs, K. (2024). Impact of a Bio-Cross-Linking Agent Obtained from Spent Coffee Grounds on the Physicochemical and Thermal Properties of Gelatin/K-Carrageenan Hydrogels. *Materials* 17(19), 4724.

ZGŁOSZENIA PATENTOWE

1. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (2023). Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego. Zgłoszenie patentowe nr PL446027, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki.
2. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (2023). Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego. Zgłoszenie patentowe nr PL446028, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki.

3. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (2023). Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego. Zgłoszenie patentowe nr PL446029, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki.
4. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (2023). Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego. Zgłoszenie patentowe nr PL446030, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki.
5. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (2024). Sposób otrzymywania materiału hydrożelowego przy zastosowaniu naturalnego czynnika sieciującego. Zgłoszenie patentowe nr PL449047, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki.
6. Bialik-Wąs, K., Malinowska, M., **Sapula, P.**, Miastkowska, M. (2025). Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego. Zgłoszenie patentowe nr PL451902, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki.
7. Bialik-Wąs, K., Malinowska, M., **Sapula, P.**, Miastkowska, M. (2025). Naturalny czynnik sieciujący i sposób otrzymywania naturalnego czynnika sieciującego. Zgłoszenie patentowe nr PL451903, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki.
8. Bialik-Wąs, K., Malinowska, M., **Sapula, P.**, Miastkowska, M. (2025). Sposób otrzymywania materiału hydrożelowego przy zastosowaniu naturalnego czynnika sieciującego. Zgłoszenie patentowe nr PL451904, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki.
9. Bialik-Wąs, K., Malinowska, M., **Sapula, P.**, Miastkowska, M. (2025). Sposób otrzymywania materiału hydrożelowego przy zastosowaniu naturalnego czynnika sieciującego. Zgłoszenie patentowe nr PL451905, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki.

KONFERENCJE NAUKOWE

1. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (styczeń 2022, Kraków) Czynniki sieciujące stosowane do otrzymywania hydrożeli o przeznaczeniu medycznym. Komunikat ustny, II Ogólnopolska Studencka Konferencja Naukowa Bliżej Chemii.
2. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (kwiecień 2022, Kraków) Nowoczesne metody ekstrakcji związków naturalnych. Komunikat ustny, IV Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne.

3. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (październik 2022, Lublin) Biomateriały stosowane w leczeniu chorób skóry. Komunikat ustny, VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Biopolimery – źródło nowych materiałów”.
4. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (styczeń 2023, Kraków) Zastosowanie ekstraktów roślinnych w kosmetyce i farmacji. Komunikat ustny, III Ogólnopolska Studencka Konferencja Naukowa Bliżej Chemii.
5. **Sapula, P.**, Malarz, K., Mrozek-Wilczkiewicz, A. i Bialik-Wąs, K. (styczeń 2024, Lublin) Coffee extract as a potential agent for wound healing and skin regeneration. Plakat, 10th Lublin International Medical Congress.
6. **Sapula, P.** i Bialik-Wąs, K. (marzec 2024, Kraków) Preparation of hydrogel materials using a bio-crosslinking agent. Komunikat ustny, 2nd Interdisciplinary Annual PhD Conference on Material Science and Innovative Technologies.
7. **Sapula, P.**, Malarz, K., Mrozek-Wilczkiewicz, A. i Bialik-Wąs, K. (czerwiec 2024, Katowice) Coffee waste as a source of active substances for dermatological applications. Plakat, EuroScience Open Forum.
8. **Sapula, P.**, Malarz, K., Mrozek-Wilczkiewicz, A., Grzegorzczak, A., Stanek-Wandzel, N., Kulesza, R., Raftopoulos, K.N. i Bialik-Wąs, K. (wrzesień 2024, Poznań) Statystyczne metody analizy danych w procesie otrzymywania bio-czynnika sieciującego dla materiałów hydrożelowych. Komunikat ustny, XI Kongresu Technologii Chemicznej.
9. **Sapula, P.**, Michałowski, S., Barczewski, M., Kotowski, P. i Bialik-Wąs, K. (maj 2025, Zabrze) Studies on the cross-linking reaction with spent coffee grounds extract and analysis of mechanical properties of hydrogels for dermatological applications. Plakat, Silesian Meeting on Polymer Materials „POLYMAT2025”.

STAŻE NAUKOWE I PRZEMYSŁOWE

1. Staż przemysłowy, Jurajska SP z o.o., Polska, 07.2018-08.2018.
2. Staż przemysłowy, Instytut Nafty i Gazu - Państwowy Instytut Badawczy, Polska, 07.2019-08.2019.
3. Staż naukowy, Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych, Uniwersytet Śląski, Polska, 08.2023-10.2023.
4. Staż przemysłowy, SyVento BioTech, Polska, 09.2024-09.2024.

5. Staż przemysłowy, Chemiczno-Farmaceutyczna Spółdzielnia Pracy ESPEFA, Polska, 12.2023-01.2025.

PROJEKTY

1. LIDER/41/0146/L-9/17/NCBR/2018, Podwykonawca projektu, Development of a method for obtaining bio-hybrid hydrogel materials incorporated with the nanocarrier-drug system as multi-compartment dressings for the treatment of Psoriasis, 02.2021-11.2021.
2. PK/2022/DS-M, Kierownik projektu, Próby pozyskania wybranych bio-czynników sieciujących z zasobów naturalnych, 01.2022-12.2022.
3. PK/2023/DS-M, Kierownik projektu, Sieciowanie biopolimerów naturalnymi czynnikami sieciującymi, 01.2023-12.2023.
4. FutureLabPK/2023/66, Opiekun pomocniczy, Cykl życia polimerowych nośników leków – od projektowania do utylizacji, 01.2023-12.2023.
5. FutureLabPK/2024/96, Opiekun pomocniczy, Opracowanie modelu badawczego dla wybranych formułacji hybrydowych względem linii komórkowych Psoriasis 3D, 01.2024-12.2024.

KURSY I SZKOLENIA

1. General English course, ISIS Education, 06.2015.
2. First Certificate in English (FCE), University of Cambridge, 08.2015.
3. Spektroskopia podczerwieni FTIR w skali mikro i makro, MS Spektrum, 05.2022.
4. MATLAB Onramp, MathWorks, 01.2023.
5. Wprowadzenie do oceny zgodności wg Rozporządzenia 2017/745, Polskie Centrum Badań i Certyfikacji, 02.2023.
6. Wymagania dotyczące badań oraz ocena zgodności wyrobów medycznych, TÜV Rheinland, 06.2023.
7. 3D Epidermal Model Workshop, MatTek, 09.2023.
8. Statystyka w farmacji – porównywanie profili uwalniania, StatSoft Polska, 12.2023.
9. Wymagania dotyczące wprowadzania kosmetyków i wyrobów medycznych, ACC Chemicals, 03.2024.
10. MedChem Program: From Organic Chemistry to Pharmaceutical Drugs, Uniwersytet w Porto, 07.2024.

11. ICH E6 (R2) Dobra Praktyka Kliniczna, Agencja Badań Medycznych, 01.2025.
12. Drug Delivery: Approaches and Technologies for Delivering Therapeutics, Harvard Medical School, 03.2025.
13. ICH E6 (R3) Dobra Praktyka Kliniczna, The Global Health Network, 08.2025.

DZIAŁALNOŚĆ DODATKOWA

1. Małopolska Noc Naukowców, Współorganizacja wydarzenia, 09.2019.
2. Wydziałowa Sesja Studenckich Kół Naukowych, Udział w wydarzeniu, 06.2021.
3. Naukowa Sesja Mistrzów, Udział w wydarzeniu, 06.2022.
4. Małopolska Noc Naukowców, Współorganizacja wydarzenia, 09.2022.
5. Adapciak - Gra Miejska, Współorganizacja wydarzenia, 09.2022.
6. Dzień Otwarty Politechniki Krakowskiej, Współorganizacja wydarzenia, 04.2023.
7. Praktyki zawodowe dla uczniów technikum, Opieka merytoryczna, 03-05.2023.
8. Dzień Otwarty Politechniki Krakowskiej, Współorganizacja wydarzenia, 04.2025.