

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Chemii

Centrum Zaawansowanych Technologii



UNIwersYTET
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU

Praca doktorska

**Wytwarzanie i charakterystyka
trójwymiarowych konstruktyw
chitynowo-chitozanowych**

Izabela Dziedzic

Promotor: Prof. dr hab. Hermann Ehrlich

Poznań, 2026

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu
OPUS 19 nr. 2020/37/B/ST5/01909 „Bioinspirowane materiały: chityna, izolowana z
gąbek morskich, jako wielozadaniowy biomateriał strukturalny”.

Podziękowania

Chciałabym wyrazić głęboką wdzięczność promotorowi, profesorowi Hermannowi Ehrlichowi, za pomoc, wsparcie i wskazówki podczas mojej drogi doktorskiej. Jego ogromna wiedza i doświadczenie były dla mnie prawdziwą inspiracją.

Chciałabym również podziękować dr. Annie Szczurek oraz doktorantom z Zakładu Biomateriałów i Biomimetyki za życzliwość oraz wsparcie na wszystkich etapach realizacji pracy.

Chciałabym także podziękować dr. Alonie Voronkinie, dr. Tomaszowi Machałowskiemu, dr. Krzysztofowi Nowackiemu, dr. Marcinowi Wysokowskiemu oraz prof. Robertowi Przekopowi za przychyłność okazaną na różnych etapach pracy.

Serdecznie dziękuję dr. Agnieszce Martyła za pomoc przy analizach XRD oraz dr. Markowi Nowickiemu za wsparcie przy analizach SEM i EDX.

Bardzo dziękuję pani Grażynie Weręzy za pomoc organizacyjną oraz wsparcie administracyjno-techniczne.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego ukochanego Mikołaja za to, że zawsze mnie wspierał, motywował i dopilnował, żebym się nigdy nie poddała.

Na koniec jestem wdzięczna mojej rodzinie i przyjaciołom, którzy zawsze we mnie wierzyli i byli przy mnie. Dziękuję Wam wszystkim.

Spis treści

1	Streszczenie	11
2	Abstract	13
3	Wprowadzenie	15
3.1	Chityna i chitozan: tło historyczne	16
3.2	Chityna: źródła i metody izolacji	20
3.2.1	Źródła chityny	23
3.2.1.1	Gąbki jako źródło chityny	26
3.2.2	Chityna: metody izolacji	28
3.2.3	Metody izolacji chityny z gąbek	33
3.3	Charakterystyka strukturalna chityny	36
3.4	Skafoldy chitynowe Porifera: od makro do nanoskali	39
3.5	Zastosowania chityny z gąbek	41
3.5.1	Inżynieria tkankowa	41
3.5.2	Biomimetyka ekstremalna	43
3.5.3	Sorpcja uranu	45
3.6	Metody otrzymywania chitozanu	45
3.7	Patentologia chityny	48
4	Teza oraz cel pracy	51
5	Materiały i metody	53
5.1	Gąbki użyte w niniejszej pracy	53
5.1.1	Gąbka <i>Aplysina aerophoba</i>	53
5.1.2	Gąbka <i>Ianthella basta</i>	54

5.2	Izolacja chityny	54
5.2.1	Gąbka <i>Aplysina aerophoba</i>	54
5.2.2	Gąbka <i>Ianthella basta</i>	55
5.3	Przygotowanie kompozytów chitynowo-chitozanowych	56
5.4	Synteza nanokryształów Cu	57
5.5	Procedura redukcji 4-nitrofenolu do 4-aminofenolu	58
5.6	Rozpuszczanie skafoldów chitynowych gąbek	58
5.7	Otrzymywanie wodnego ekstraktu zawierającego bromotyrozyny	59
5.8	Badania mikrobiologiczne	60
5.9	Techniki charakteryzacji	62
5.9.1	Spektroskopia w podczerwieni z całkowitym osłabionym odbiciem (ATR-FTIR)	62
5.9.2	Mikroskopia cyfrowa	63
5.9.3	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) z analizą rentgenowską z dyspersją energii (EDX)	63
5.9.4	Dyfrakcja rentgenowska (XRD)	63
5.9.5	Mikroskopia fluorescencyjna	63
5.9.6	Metody barwienia	64
5.9.6.1	Barwienie izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC)	64
5.9.6.2	Próba jodowa	64
5.9.6.3	Barwienie czerwienią brylantową Cibacron	64
5.9.6.4	Barwienie Calcofluor White (CFW)	64
5.9.7	Testy potencjału zeta	65
5.9.8	Monotoniczny test ściskania	65
5.9.9	Nanoindentacja	66
5.9.10	Oszacowanie stopnia acetylacji	66
5.9.11	Optyczna spektroskopia emisyjna (OES)	68
6	Wyniki i dyskusja	69
6.1	Charakterystyka trójwymiarowych skafoldów kompozytowych z chityny i chitozanu	69
6.1.1	Wyniki	70

6.1.2	Wnioski	89
6.2	Rozpuszczanie chitynowych skafoldów z gąbki <i>Aplysina aerophoba</i>	90
6.2.1	Wyniki	92
6.2.2	Wnioski	101
6.3	Właściwości mechaniczne chitynowych skafoldów z gąbek	103
6.3.1	Wyniki	106
6.3.2	Dyskusja	112
6.4	Chitynowa matryca oraz bromotyrozyny z gąbki <i>Ianthella basta</i>	115
6.4.1	Ocena aktywności przeciwbakteryjnej	117
6.4.2	Bromotyrozyny z gąbki <i>I. basta</i>	119
6.4.3	Dyskusja	122
6.5	Patentologia chitozanu	125
6.5.1	Analiza opisów patentów związanych z chitozanem	126
6.5.2	Podsumowanie	142
7	Podsumowanie i perspektywy	145
8	Bibliografia	147
9	Aktywność naukowa	185
10	Aneks	189

1 Streszczenie

Niniejsza praca koncentruje się na trójwymiarowych skafoldach chitynowych uzyskanych z wybranych gąbek z rzędu Verongiida (Demospongiae: Porifera) i ich deacetylacji do chitozanu, w celu stworzenia nowatorskiego, nigdy wcześniej nieopisanego hybrydowego materiału kompozytowego. Gąbki z tego rzędu posiadają unikalną zdolność regeneracji swoich chitynowych szkieletów, co czyni je zrównoważonym źródłem prefabrykowanych trójwymiarowych skafoldów chitynowych, również na dużą skalę. Ich naturalnie gotowa do użycia struktura oferuje liczne możliwości dalszej funkcjonalizacji. W niniejszej pracy po raz pierwszy skafoldy chitynowe pochodzące z gąbek poddano deacetylacji przy użyciu stężonego wodorotlenku sodu, aby stworzyć mikroporowaty kompozyt zawierający zarówno chitynę, jak i chitozan bez utraty architektury 3D. Rdzeń chitynowy zachowuje integralność strukturalną, a chitozanowa powierzchnia kompozytu oferuje wszechstronność funkcjonalną dzięki swojej reaktywności i rozpuszczalności, umożliwiając zastosowanie, np. w katalizie. Ponadto zbadano również właściwości mechaniczne skafoldów chitynowych pochodzących z wybranych gatunków gąbek. Po raz pierwszy wykazano także, że trójwymiarowy skafold α -chitynowy z gąbek można rozpuścić w rozcieńczonym roztworze wodorotlenku litu bez żadnych zmian chemicznych. W niniejszej pracy przedstawiono kompleksową analizę danych, omówiono właściwości fizykochemiczne i strukturalne badanych skafoldów chitynowych oraz zaprezentowano ich potencjalne zastosowania.

Słowa kluczowe: chityna, chitozan, skafoldy, gąbki morskie

2 Abstract

This work focuses on 3D chitin scaffolds obtained from selected sponges of Verongiida order (Demospongiae: Porifera) and their deacetylation to chitosan with the aim to create novel hybrid composite material previously never reported. Sponges from this order possess the unique ability to regenerate their chitin-based skeletons, making them a sustainable source of pre-fabricated 3D chitin scaffolds including on the large scale. Their naturally ready-to-use structure offers numerous opportunities for further functionalization. In this work, for the first time, chitin scaffolds of sponges origin were deacetylated using concentrated sodium hydroxide to create a microporous composite containing both chitin and chitosan without loss of 3D architecture. The chitin core retains its structural integrity, while the chitosan surface of the composite offers functional versatility due to its reactivity and solubility, enabling applications, such as catalysis. Furthermore, the mechanical properties of chitin scaffolds from selected sponges species were also investigated. It was also demonstrated for the first time, that a 3D α -chitin-based scaffold from sponges can be dissolved in a dilute lithium hydroxide solution without any chemical changes. This work presents a comprehensive analysis of the analytical data, discusses the physicochemical and structural properties of the chitin scaffolds under study, and represents their potential applications.

Keywords: chitin, chitosan, scaffolds, marine sponges

3 Wprowadzenie

Materiały biologiczne pojawiły się po raz pierwszy w postaci egzoszkieletów u wielu organizmów wodnych zamieszkujących starożytne oceany. Odniosły one tak duży sukces ewolucyjny, że obecnie otacza nas ich wyjątkowa różnorodność, obejmująca zarówno organizmy jednokomórkowe (protisty, okrzemki, promienice), jak i wielokomórkowe (gąbki, koralowce, mięczaki, szkarłupnie, stawonogi) [1].

Chityna, która jest drugim najbardziej rozpowszechnionym po celulozie polisacharydem na Ziemi, buduje struktury szkieletowe licznych organizmów. Zapewnia im sztywność i wzmocnienie mechaniczne od wielu milionów lat [2]. W przeciwieństwie do syntetycznych polimerów, których degradacja prowadzi do zanieczyszczenia środowiska mikroplastikiem [3], chityna oraz jej pochodna chitozan są biodegradowalne i nietoksyczne.

Ze względu na swoje wyjątkowe właściwości chityna i chitozan są bardzo obiecujące w biomedycynie oraz nowoczesnych technologiach. Znajdują zastosowanie w m.in. w opatrunkach na rany oraz w inżynierii tkankowej, gdzie ich unikalne właściwości – w tym biogodność i biodegradowalność – czynią je materiałami o wysokim potencjale użytkowym [4, 5]. Poza obszarem biomedycznym, chityna i chitozan wykazują zastosowanie w ochronie środowiska. Modyfikowana chityna może działać jako bioadsorbent, skutecznie usuwając barwniki ze ścieków przemysłu tekstylnego lub radionuklidy ze ścieków przemysłu jądrowego [4]. Z kolei kompozyty na bazie chitozanu mogą oczyszczać wodę poprzez eliminację zanieczyszczeń, takich jak fluor i arsen, metale ciężkie czy nadmiar glonów odpowiedzialnych za zakwity wód [5].

W ostatnich latach coraz wyraźniej zauważalny jest problem wzrostu poziomu zanieczyszczenia środowiska mikroplastikiem. Wynika to z powszechnego stosowania syntetycznych polimerów o wysokiej trwałości i ograniczonej podatności na degradację [6]. Związane z tym konsekwencje środowiskowe, a w ich następstwie zagrożenia zdrowotne sprawiają, że poszukiwane są alternatywne biodegradowalne materiały pochodzenia biologicznego

3 Wprowadzenie

[7–9]. Chityna i chitozan przyciągają uwagę jako materiały, które mogą łączyć korzystne właściwości użytkowe z ograniczonym oddziaływaniem na środowisko [10–12]. Zastosowanie naturalnie uformowanych, trójwymiarowych struktur biologicznych może stanowić istotny krok w kierunku zrównoważonych strategii projektowania nowoczesnych materiałów [13].

Chityna pozyskiwana z uprawianych w warunkach hodowli morskiej gąbek jest szczególnie użyteczna ze względu na swoją naturalnie uformowaną, trójwymiarową architekturę, która może być wykorzystywana bez konieczności dodatkowego kształtowania. W przeciwieństwie do chityny pochodzącej z innych źródeł, chityna pozyskana z gąbek nie wymaga stosowania kosztownych technik, takich jak druk 3D [14], w celu uzyskania pożądanej struktury do dalszych zastosowań jako skafoldy. Matryce chitynowe pochodzące z gąbek są zbudowane z systemu mikrorurek i połączonych ze sobą kanałów, które zapewniają sprzyjające warunki do adhezji komórek oraz transportu składników odżywczych. Co istotne, badania wykazały, że ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste są zdolne do różnicowania się podczas hodowli na chitynowych skafoldach pochodzących z gąbek [15, 16].

Pomimo rosnącego zainteresowania chityną i chitozanem jako biodegradowalnymi materiałami funkcjonalnymi, potencjał naturalnie prefabrykowanych, trójwymiarowych skafoldów chitynowych pochodzących z gąbek pozostaje w dużej mierze niewykorzystany. Dotychczas znaczna większość prac koncentruje się głównie na chitynie przetwarzanej w postaci proszków lub powłok, pomijając możliwość zachowania oraz wykorzystania jej natywnej trójwymiarowej struktury. Nowatorstwo niniejszej pracy polega na wykorzystaniu chitynowych matryc pozyskanych z gąbek z rzędu *Verongiida* bez utraty ich unikalnej trójwymiarowej architektury. Po raz pierwszy wykazano możliwość częściowej deacetylacji skafoldów chitynowych w celu otrzymania kompozytu łączącego stabilność mechaniczną rdzenia chitynowego z reaktywnością chitozanowej powierzchni. Znaczenie takich badań rośnie w kontekście aktualnych wyzwań związanych z poszukiwaniem odnawialnych, przyjaznych dla środowiska materiałów, zdolnych zastąpić syntetyczne polimery.

3.1 Chityna i chitozan: tło historyczne

Odkrycie chityny przypada na przełom XVIII i XIX wieku. Pierwsza wzmianka o chitynie pojawiła się pod koniec XVIII wieku, w 1799 roku. Wówczas angielski chemik Charles

Hatchett odkrył substancję w pancerzach bezkręgowców (krabów, krewetek, homarów i raków), która była wyjątkowo odporna na powszechnie stosowane chemikalia [17]. W 1811 roku francuski naukowiec Henri Braconnot po raz pierwszy wyizolował chitynę [18, 19]. Uzyskany produkt nazwał jednakże *funginą*, ponieważ był uzyskiwany z tzw. „grzybów wyższych”, jak ówczesnie określano grzyby wielokomórkowe. Analiza produktu wskazała, że zawierał on mieszaninę chityny oraz zanieczyszczeń. Niemniej jednak na nazwę „chityna” świat musiał poczekać jeszcze ponad 10 lat. W 1823 roku Auguste Odier [20] użył tego terminu do opisania nierozpuszczalnej pozostałości po chrząszczy majowym, prawdopodobnie w wyniku wielokrotnego działania roztworu KOH w podwyższonej temperaturze. Jednak późniejsza analiza eksperymentu Odiera sugeruje, że uzyskanym przez niego produktem był chitozan [21].

Pomimo wyizolowania chityny około 60 lat wcześniej, jej strukturę chemiczną po raz pierwszy uzyskał Ledderhose w 1876 roku [22]. Georg Ledderhose, niemiecki naukowiec, zajmował się chityną od początku swojej kariery naukowej. Jego rozprawa doktorska koncentrowała się na hydrolizie chityny. Pewnego dnia jego wujek Friedrich Wohler przyniósł mu skorupę homara, którego zjadł na obiad i kazał młodemu siostrzeńcowi „dowiedzieć się, co to jest”. Ledderhose poddał ją działaniu gorącego, stężonego kwasu solnego i wraz z Felixem Hoppe-Seylerem zidentyfikował otrzymane kryształy, którym nadał nazwę glikozamina (*glycosamin*) [23].

Na początku XX wieku Sigmund Frankel, naukowiec polskiego pochodzenia pracujący w Wiedniu, wraz z Agnes Kelly, poddali chitynę hydrolizie w 70% kwasie siarkowym w temperaturze pokojowej i uzyskali N-acetylo-D-glukozaminę jako monomer chityny [24] oraz wywnioskowali, że „chityna jest acetylowanym i aminowanym polisacharydem” [25].

W XX wieku nastąpił rozwój zaawansowanych technik analitycznych, w tym dyfrakcji rentgenowskiej, która pozwoliła na głębszy wgląd w strukturę krystalograficzną tego biopolimeru. Ponadto postęp w metodach takich jak skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa umożliwił dokładniejsze zrozumienie struktury chityny, zarówno w skali mikroskopowej, jak i nanoskopowej [21, 23].

Chitynę można analizować za pomocą różnych technik [26, 27], takich jak:

1. Metody strukturalne i spektroskopowe

- Dyfrakcja rentgenowska (XRD)

3 Wprowadzenie

- Rozpraszanie promieni rentgenowskich pod małym i szerokim kątem (SAXS i WAXS)
- Metody dyfrakcji elektronowej: wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (HRTEM)
- Spektroskopia w podczerwieni
- Spektroskopia Ramana
- Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)
- Spektroskopia absorpcji promieniowania rentgenowskiego przy krawędzi absorpcyjnej (NEXAFS)
- Kolorymetryczne metody identyfikacji glukozaminy

2. Metody chromatograficzne i elektroforetyczne

- Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)
- Chromatografia gazowa (GC)
- Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)
- Wysokosprawna elektroforeza kapilarna (HPCE)

3. Metody chemiczne

- Test chitozanowo-jodowy na obecność chityny
- Test chlorkowo-jodkowy (Test Schulzega)
- Nowoczesne techniki barwienia chityny (m.in. Calcofluor White, Trypan Blue, Ponceau S, primuline yellow)

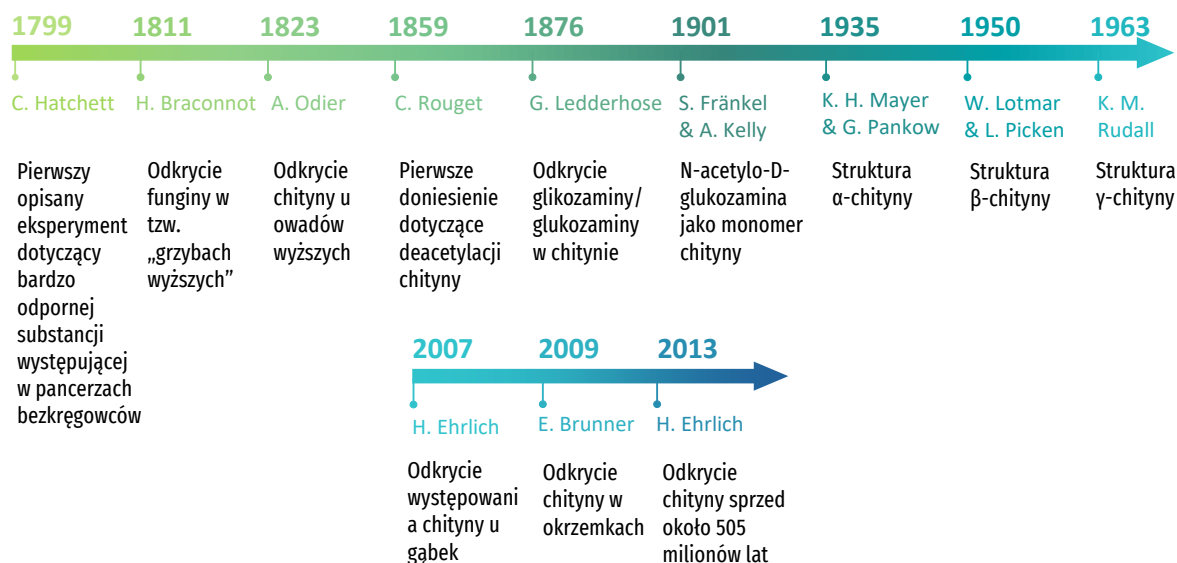
4. Metody biochemiczne i immunochemiczne

- Test chitynazowy
- Test lektynowy
- Wykrywanie chityny za pomocą białek wiążących chitynę
- Immunochemiczna detekcja chityny
- Analizy całego genomu syntaz chityny w celu jej identyfikacji

3.1 Chityna i chitozan: tło historyczne

Obecność chityny u gąbek została po raz pierwszy opisana przez Ehrlicha i współpracowników w 2007 roku [28, 29]. Autorzy wykazali, że chityna wyizolowana z szkieletowych włókien gąbek wykazuje niezwykle podobieństwo strukturalne do chityny występującej u innych organizmów. Odkrycia zasugerowały, że zdolność do wytwarzania chityny jest cechą starożytną u osobników królestwa zwierząt [28].

Rysunek 3.1 przedstawia oś czasu zawierającą wybrane odkrycia i przełomy naukowe w historii chityny.



Rysunek 3.1: Historia najważniejszych odkryć związanych z chityną.

Historia chitozanu, najważniejszej pochodnej chityny, rozpoczęła się sześćdziesiąt lat później niż historia samej chityny. W 1859 roku francuski fizjolog Charles Rouget jako pierwszy opisał deacetylację chityny, uzyskując z powodzeniem chitozan [30]. Rouget nazwał jednak produkt „modyfikowaną chityną”. W swoim eksperymencie przeprowadził reakcję chityny ze stężonym roztworem zasady (KOH), a otrzymany produkt miał inne właściwości niż oryginalna chityna – rozpuszczał się w rozcieńczonych roztworach kwasów i dawał inny kolor po zmieszaniu z roztworem jodu [30].

Nazwę „chitozan” zaproponował Hoppe-Seyler w 1894 roku, w swojej pracy nad ekstrakcją chityny z pancerzy stawonogów, takich jak kraby, skorpiony i pająki [31, 32]. Poddał chitynę działaniu roztworu wodorotlenku potasu w temperaturze 180°C, uzyskując produkt rozpuszczalny w rozcieńczonym kwasie solnym oraz rozcieńczonym kwasie octowym [31].

W 1929 roku Karrer i Hofmann odkryli, że chitozan jest polimerem składającym się za-

3 Wprowadzenie

również z jednostek glukozaminy, jak i N-acetyloglukozaminy [33]. Rok później Karrer rozwinął badania nad otrzymywaniem chitozanu, sugerując, że podczas jego syntezy niektóre grupy aminowe ulegają hydrolizie do grup hydroksylowych [34].

Produkcja chitozanu na skalę przemysłową rozpoczęła się w Japonii w 1971 roku, co stanowiło kamień milowy, który znacząco wpłynął na rozwój zastosowań tego polimeru [23]. Od tego czasu chitozan stał się przedmiotem szeroko zakrojonych badań, szczególnie w takich dziedzinach jak biomedycyna [35–37], rolnictwo [38, 39] oraz nauki o środowisku [40]. Najnowsze badania podkreślają jego rosnące znaczenie w systemach dostarczania leków [41–43], gojeniu ran [44, 45] oraz pakowaniu żywności [46, 47]. Wszechstronność chitozanu doprowadziła do znacznego wzrostu aktywności patentowej w ciągu ostatnich kilku dekad [5].

3.2 Chityna: źródła i metody izolacji

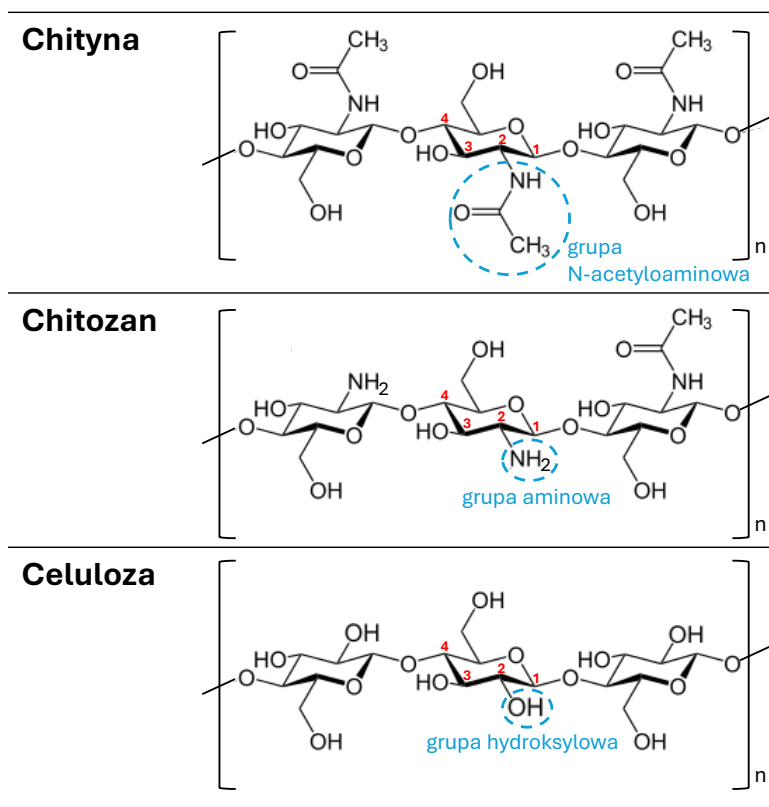
Chityna jest liniowym biopolimerem zbudowanym głównie z jednostek N-acetylo-D-glukozaminy (N-acetylo-2-amino-2-deoksy-D-glukozy) połączonych wiązaniami 1,4- β -glikozydowymi, ale jednocześnie zawierającym również deacetylowane jednostki D-glukozaminy (2-amino-2-deoksy-D-glukozy) [26]. Wzór chemiczny przedstawiono na rysunku 3.2.

Istotną cechą czystej chityny jest jej wysoka odporność chemiczna na działanie silnych zasad. Nawet w warunkach 1 M NaOH, w których wiele innych biopolimerów ulega degradacji, chityna zachowuje swoją strukturę [26].

Chityna jest nierozpuszczalna w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach, w tym w wodzie [48, 49], co stanowi istotne wyzwanie dla jej zastosowań ze względu na trudności w przetwarzaniu i charakteryzowaniu tego polisacharydu [50–54]. Wykazano jednak, że niektóre ciecze jonowe umożliwiają rozpuszczanie chityny lub modyfikację jej struktury, wpływając na porowatość, morfologię cząstek i stopień krystaliczności [55–58].

Z tego względu, że chitozan, w odróżnieniu od chityny, wykazuje rozpuszczalność w wodnych roztworach o odczynie kwaśnym, stanowi on atrakcyjny materiał do dalszych modyfikacji oraz szerokiego zakresu zastosowań [59, 60]. Chitozan, otrzymywany przez deacetylację chityny, jest biopolimerem zbudowanym z jednostek D-glukozaminy (2-amino-2-deoksy-D-glukozy) z niewielką ilością jednostek N-acetylo-D-glukozaminy (N-acetylo-2-

amino-2-deoksy-D-glukozy) [51] (rys. 3.2). Ogólnie przyjmuje się, że gdy ponad 50% jednostek ulega deacetylacji, biopolimer nazywany jest chitozaniem [61]. Wtedy też staje się rozpuszczalny w wodnych roztworach kwasów, jednak zależy to również od rozmieszczenia grup acetylowych w łańcuchu. Deacetylacja chityny polega na usunięciu grup acetylowych, czemu może towarzyszyć częściowa depolimeryzacja [62]. Cechy te mierzy się odpowiednio stopniem acetylacji lub deacetylacji oraz masą cząsteczkową polimeru [51].



Rysunek 3.2: Wzory strukturalne chityny, chitozanu i celulozy, na podstawie [63, 64].

Chityna i chitozan są biopolimerami o udokumentowanej nietoksyczności, wysokiej biokompatybilności, biodegradowalności oraz niskim potencjale alergizującym [65]. Wykazują również szereg korzystnych działań biologicznych, w tym działanie przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe [60]. Ponadto mają doskonałe właściwości filmotwórcze i mogą być przekształcone w różne formy, w tym włókna, gąbki, proszki i żele [66]. Te unikalne właściwości sprawiają, że chityna i chitozan to bardzo interesujące materiały do szerokiej gamy zastosowań, w tym dużej liczby zgłoszeń patentowych [4, 5]. Fizyczna postać biopolimeru odgrywa kluczową rolę w określaniu jego potencjału zastosowania [67].

Liczne zastosowania tych polisacharydów można znaleźć w dziedzinie biomedycyny. Na

3 Wprowadzenie

przykład materiały oparte na chitynie wykazują właściwości sprzyjające regeneracji tkanek i zostały wykorzystane w inżynierii tkankowej [15, 16, 68]. Membrany na bazie chityny wspierały wzrost komórek fibroblastów [71]. Ponadto chityna okazała się skuteczna przeciwko wirusowi Covid-19 [72]. Chityna oraz chitozan mogą promować gojenie się ran i być stosowane w opatrunkach na rany [73–75]. Oba polimery wykazują również potencjalne zastosowanie w systemach dostarczania leków [76–79]. Pochodne chitozanu z linolowymi i α -linolenowymi kwasami tłuszczowymi są obiecujące do zastosowania jako biofunkcyjne powłoki do cewników, oferując nowe możliwości zastosowań biomedycznych [80]. Dodatek chitozanu do składu cementu kostnego pozwala na uzyskanie kompozytu o zwiększonej biodegradowalności [81]. Chitozan znajduje zastosowanie w tworzeniu bioaktywnych powłok na implantach tytanowych [82–84], w tym na tytanowych implantach kości [86], o właściwościach przeciwbakteryjnych, które umożliwiają kontrolowane uwalnianie substancji [87–91].

Chityna i chitozan są również wykorzystywane jako adsorbenty w oczyszczaniu środowiska oraz w kosmetyce i przemyśle papierniczym [51, 52, 92]. Chityna i chitozan wykazują zdolność do efektywnej adsorpcji barwników zawierających jony chromu ze ścieków pochodzących z przemysłu tekstylnego [93]. Materiały oparte na chitynie mogą działać jako skuteczne sorbenty w monitorowaniu środowiska. Chityna adsorbuje zanieczyszczenia zawierające metale ze ścieków lub przepływów paliwa jądrowego [94, 95]. Ponadto materiały na bazie chityny są w stanie usunąć ropę z wody, co również podkreśla ich potencjał usuwania zanieczyszczeń ze środowiska [96, 97]. Co więcej, ten polisacharyd może oczyścić wodne roztwory z barwników kationowych i anionowych [98, 99] lub mieszanin barwników [100]. Chitynę zastosowano do syntezy włóknistej mikrosfery węglowej, które są wysoce potencjalnymi materiałami do przechwytywania CO₂ z gazów spalania paliwa kopalnego [101]. Chitozan można zastosować nie tylko do adsorpcji barwników [102–104] ale także do odzyskiwania fosforu z roztworów wodnych [105] oraz ortofosforanów i azotanów ze ścieków szklarniowych [106]. Ponadto gąbka na bazie chitozanu wykazała wysoką wydajność w pochłanianiu barwników tekstylnych z roztworów wodnych [107].

Poza tym chityna jest szeroko stosowana do immobilizacji enzymów [108, 109] oraz w biosensorach [110–113]. W branży spożywczej chityna nie tylko może być wykorzystana jako biodegradowalna folia opakowaniowa [114], ale także jako żywność funkcjonalna, np.

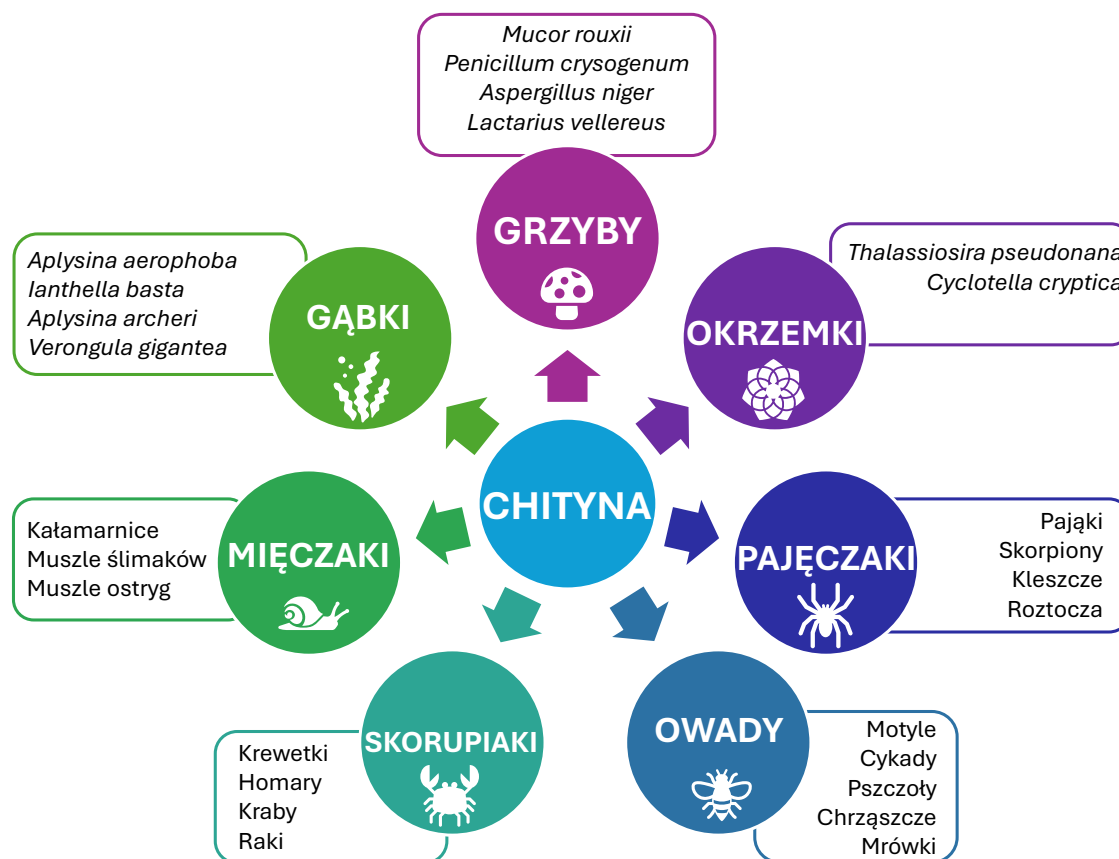
o właściwościach przeciwstarzeniowych lub do redukcji lipidów [52]. Dodatkowo chityna jest stosowana w biorafineriach do produkcji odnawialnych chemikaliów i energii [115, 116]. Chityna i chitozan wykazują potencjał w chromatografii cieczowej jako faza stacjonarna co wynika z obecności licznych grup funkcyjnych w ich łańcuchach polimerowych [117]. Kompozyty chitozanu z alkoholem poliwinylowym i tlenkiem metalu wykazują również potencjał zastosowań w urządzeniach elektronicznych, czujnikach i powłokach przewodzących, gdzie kluczowa jest równowaga między parametrami elektrycznymi a stabilnością w różnych warunkach temperaturowych [118]. Chitozan stanowi cenny surowiec do syntezy polioli wykorzystywanych w produkcji biodegradowalnych sztywnych pianek poliuretanowych. W porównaniu z klasycznymi piankami poliuretanowymi, pianki wytworzone z oligomeru chitozanu charakteryzują się korzystnymi właściwościami, takimi jak zwiększona odporność termiczna, niska absorpcja wody i wysoka wytrzymałość na ściskanie [119–121].

3.2.1 Źródła chityny

Chityna występuje w ponad 70% wszystkich organizmów żywych na świecie [122], co tłumaczy szerokie rozpowszechnienie tego biopolimeru u wielu organizmów w różnych grupach taksonomicznych [123–126]. Chitynę zidentyfikowano u grzybów, protistów, okrzemek, gąbek, a także u organizmów bardziej złożonych ewolucyjnie, takich jak mięczaki, pająki, owady i skorupiaki [127–131]. Chociaż obecność chityny również u kręgowców może wydawać się zaskakująca, wykazano jej występowanie u niektórych płazów i ryb [132].

Na rysunku 3.3 przedstawiono przykłady naturalnych źródeł chityny w różnych grupach taksonomicznych.

Chityna jest naturalną, starożytną matrycą do biomineralizacji krzemionki i wapnia [133]. Zazwyczaj jest ona związana z innymi substancjami, takimi jak białka, lipidy, pigmenty i minerały – najczęściej węglany wapnia lub magnezu, których ilość różni się w zależności od organizmu [133].



Rysunek 3.3: Wybrane przykłady naturalnych źródeł chityny.

Chitynę zidentyfikowano w skamieniałościach wielu organizmów, w tym w skamieniałościach chrząszczy sprzed prawie 25 milionów lat [134]. β -Chitynę wykryto w skamieniałościach głowonoga *Mississaepia mississippiensis* sprzed około 34 mln lat [135], a także w osłonkach jajowych ślimaków z rodziny neritimorfów sprzed 200 mln lat [136]. Skamieniałe kompleksy chitynowo-białkowe zaobserwowano w kutykuli skorpiona sprzed 310 mln lat oraz kutykuli wielkoraka (Eurypterida) sprzed 417 mln lat [137]. Ponadto chitynę zidentyfikowano w skamieniałościach gąbki *Vauxia gracilenta* sprzed 505 mln lat [138] oraz w skamieniałościach grzybów odkrytych w łupkach dolomitowych datowanych na okres od 810 do 715 mln lat [139]. Najnowsze badania wykazały także obecność chityny w skamieniałościach trylobita z rodzaju *Olenellus*, pochodzących z osadów datowanych na 514,5–506,5 mln lat [140].

Połączenie chityny z innymi cząsteczkami zwiększa sztywność strukturalną, co czyni ją kluczowym składnikiem formacji szkieletowych [133]. Chityna, występująca szczególnie w egzoszkieletach bezkręgowców, w istotnym stopniu wpływa na ich właściwości mecha-

niczne, takie jak sztywność i twardość [141]. Co więcej, gdy chityna łączy się z białkami w kutykuli bezkręgowców, staje się odporna na degradację enzymatyczną, co wyjaśnia jej utrwalenie w zapisach kopalnych. W ścianach komórkowych grzybów chityna tworzy kompozyt z glukanami, co zwiększa ich sztywność strukturalną. U mięczaków chityna występuje w różnych kompleksach w zależności od gatunku [133]. Na przykład, α -chityna jest związana z aragonitem u *Anodonta cygnea* [142], a β -chityna występuje w połączeniu z hydroksyapatytem w muszli *Lingula unguis* [143]. U skorupiaków egzoszkielet jest zmineralizowanym kompozytem składającym się z matrycy chitynowo-białkowej wzmocnionej węglanem wapnia, która jest odkładana w skręconej strukturze blaszkowej [133].

Ilość chityny i innych substancji, takich jak białka czy minerały, różni się w zależności od źródła. Tabela 3.1 przedstawia wybrane źródła wraz z zawartością chityny.

Tabela 3.1: Przykłady źródeł chityny wraz z jej zawartością, na podstawie [144–146].



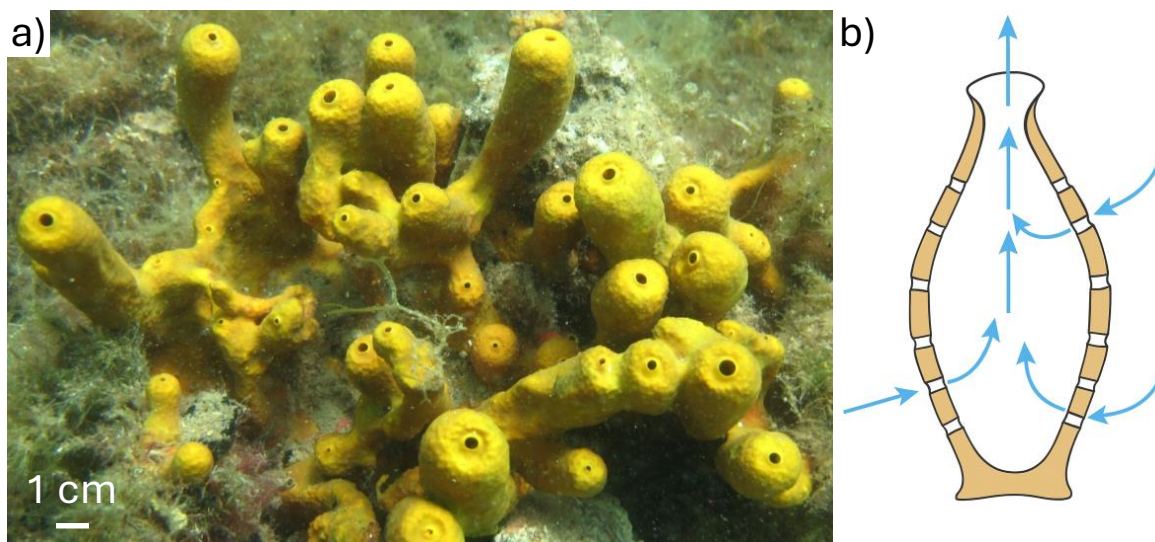
Źródło chityny	Zawartość chityny [%]
Kutykule krabów	15-30
Kutykule krewetek	30-40
Kutykule owadów	5-25
Kutykule pająków	6-9
Szkielety gąbek	5-70
Gladiusy kałamarnic	20-40
Ściany komórkowe grzybów	10-25

3 Wprowadzenie

3.2.1.1 Gąbki jako źródło chityny

Gąbki (Porifera) to najstarsze i najprostsze wielokomórkowe organizmy wodne na Ziemi [147]. Są to osiadłe, filtrujące organizmy bentoniczne, zazwyczaj występujące na dnie morskim lub przyłączone do twardej powierzchni, takich jak skały [148, 128]. Gąbki stanowią pierwszą oddzielną linię ewolucyjną wśród zwierząt wielokomórkowych w historii życia na Ziemi. Najwcześniejsze znane ślady gąbek pochodzą z osadów datowanych na 1,8 mld lat temu [148]. Ponadto najstarszy skamieniały szkielet gąbki pospolitej został znaleziony w skale sprzed 890 mln lat [147, 149].

Gąbki, jako osiadłe zwierzęta wodne, pobierają pokarm i składniki odżywcze z otaczającej je wody. Pompują przez swoje ciała ogromne ilości wody (dziennie może to być nawet 72 000 razy więcej niż ich własna objętość ciała) [129], aby wychwytywać mikroalgi, szczątki organiczne i mikroorganizmy, w tym bakterie. Całe ciało gąbki jest funkcjonalnie i strukturalnie zaprojektowane, aby skutecznie filtrować wodę [129]. Opiera się na trójwymiarowym szkielecie, który jest sztywny, aby wytrzymać przepływy wody, a także wystarczająco elastyczny, aby uniknąć pęknięć [128]. Rysunek 3.4a przedstawia podwodny obraz gąbki *Aplysina aerophoba*, a 3.4b pokazuje schematyczną reprezentację gąbki funkcjonującej jako żywa pompa, ze strzałkami wskazującymi kierunek przepływu wody.



Rysunek 3.4: Podwodny obraz gąbki morskiej *Aplysina aerophoba* (a) oraz schematyczne przedstawienie ciała gąbki jako żywej pompy i żywego filtra (b). Strzałki wskazują kierunek przepływu wody.

Typ Porifera dzieli gąbki na cztery gromady, w zależności od składu szkieletu: gąbki pospolite (Demospongiae), gąbki szkliste (Hexactinellida), gąbki wapienne (Calcarea) i Homoscleromorpha [128, 129]. Gąbki pospolite stanowią najliczniejszą gromadę w typie Porifera, obejmując 95% wszystkich żyjących gąbek. Zamieszkują one głównie wody morskie, ale mogą również występować w środowiskach słodkowodnych. Gromada Demospongiae dzieli się na kilka rzędów, z których trzy: Dictyoceratida, Dendroceratida i Verongiida wyróżniają się szkieletem o nietypowej budowie. U ich przedstawicieli krzemionkowy szkielet, charakterystyczny dla gąbek pospolitych, został zastąpiony przez białkowy, włóknisty szkielet zawierający sponginę [129].

Wykazano, że chitynę można zidentyfikować w szkieletach gąbek słodkowodnych i morskich, należących do różnych klas taksonomicznych [128]. Tabela 3.2 zawiera listę gatunków gąbek, u których zidentyfikowano chitynę.

Tabela 3.2: Gatunki gąbek, u których zidentyfikowano chitynę. Zdjęcie przedstawia wysuszony fragment gąbki *A. aerophoba* z widoczną, po usunięciu tkanki miękkiej, strukturą szkieletu zawierającą chitynę.



Gromada Demospongiae	
Rząd Verongiida (gąbki morskie)	
Gatunki gąbek	Źródło
<i>Verongula gigantea</i>	[28]
<i>Ianthella basta</i>	[150]
<i>Aiolochoia crassa</i>	
<i>Aplysina aerophoba</i>	
<i>A. cauliformis</i>	[151]
<i>A. cavernicola</i>	
<i>A. fulva</i>	
<i>A. clathrata</i>	
<i>A. revillagigedi</i>	[152]
<i>A. gerardogreeni</i>	

<i>A. fistularis</i>	[153]
<i>Suberea clavata</i>	[154]
<i>Pseudoceratina purpurea</i>	[155]
<i>P. arabica</i>	[156]
<i>A. archeri</i>	[141]
<i>Ernstilla lacunosa</i>	[157]
<i>Ianthella labyrinthus</i>	[158]
Rząd Spongillida (gąbki słodkowodne)	
<i>Spongilla lacustris</i>	[159]
<i>Lubomirskia baikalensis</i>	[160]
<i>Ochridaspongia rotunda</i>	[161]
Rząd Poecilosclerida	
<i>Mycale euplectellioides</i>	[162]
<i>Acarnus wolffgangi</i>	[163]
<i>Echinoclathria gibbosa</i>	[163]
Gromada Hexactinellida	
<i>Farrea occa</i>	[29]
<i>Euplectella aspergillum</i>	[164]
<i>Rossella fibulata</i>	[165]
<i>Sericolophus hawaiiicus</i>	[166]

Chityna odgrywa kluczową rolę strukturalną u gąbek. Ten aminopolisacharyd jest wbudowywany w szkielety gąbek, co skutkuje ich sztywniejszymi i mniej elastycznymi strukturami. Odpowiednie wzmocnienie mechaniczne jest kluczowe do utrzymania podparcia ciała podczas ciągłej filtracji wody oraz zapewnienia stabilności mechanicznej w warunkach przepływu wody [159]. Jednak u endemicznej słodkowodnej gąbki *Ochridaspongia rotunda* chityna występuje jedynie w narządzie czepnym [161], gdzie kotwiczy ciało gąbki do twardego podłoża, co jest niezbędne ze względu na jej ograniczoną ruchliwość. Ponadto w stadium larwalnym chityna ułatwia przyczepianie się do powierzchni skalistych [161].

3.2.2 Chityna: metody izolacji

W celach komercyjnych chitynę pozyskuje się głównie z odpadów przemysłu przetwórstwa owoców morza, tj. z krewetek, krabów oraz kryła [167].

Ze względu na współwystępowanie chityny razem z innymi składnikami, skuteczna izolacja czystej chityny zależy zarówno od źródła, jak i zastosowanej metody ekstrakcji. Dla-

tego też większość przemysłowych metod ekstrakcji chityny, szczególnie tych ze źródeł morskich, obejmuje obróbkę chemiczną mającą na celu deproteinizację, demineralizację i depigmentację [141].

Metody ekstrakcji chityny można podzielić na chemiczne i enzymatyczne, które zazwyczaj obejmują deproteinizację, demineralizację oraz usuwanie lipidów i pigmentów, co odbywa się głównie w pierwszych dwóch etapach. Konkretna metoda izolacji chityny zależy od użytego materiału (tab. 3.3), np. pancerze krewetek są cieńsze, co ułatwia proces izolacji w porównaniu z twardszymi pancerzami, takimi jak pancerze krabów czy homarów [51].

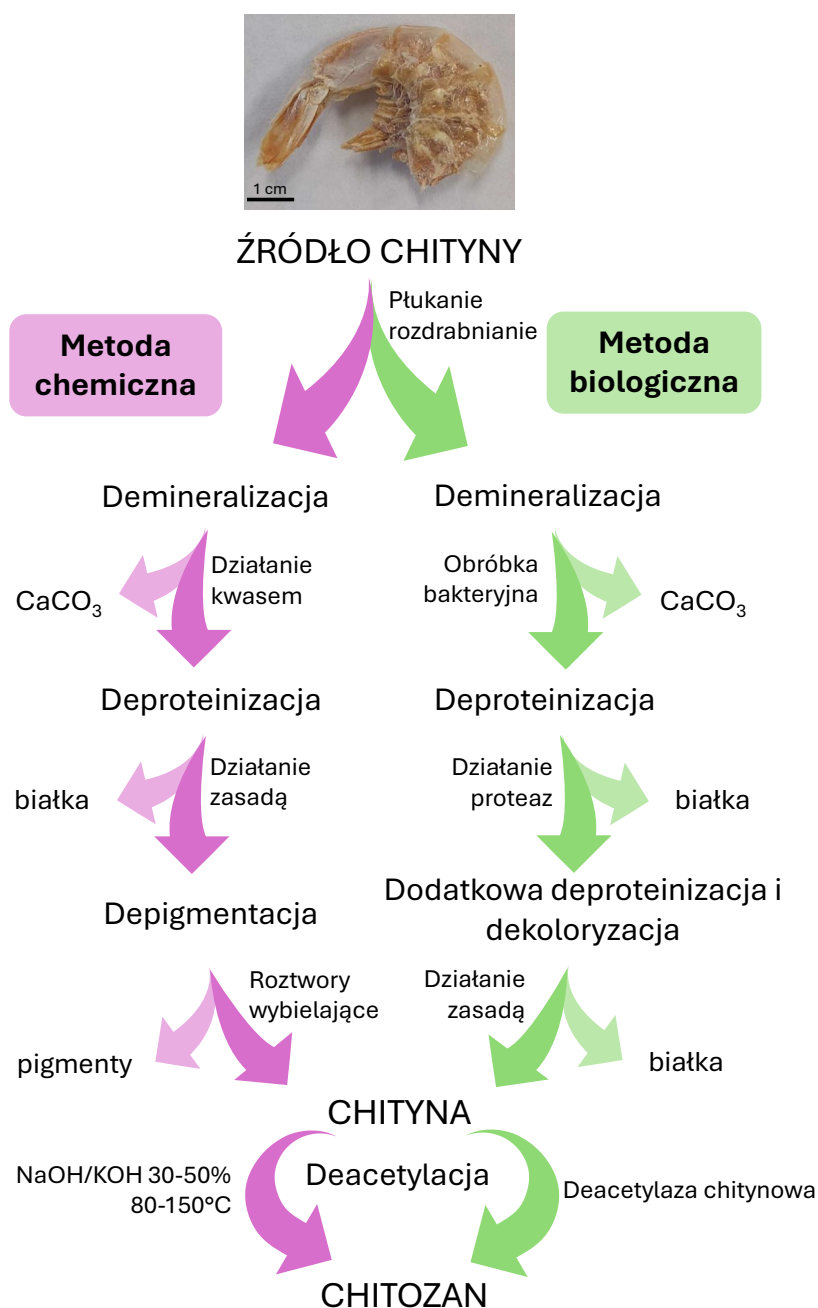
W procesie chemicznej ekstrakcji chityny deproteinizację można przeprowadzić za pomocą odczynników takich jak: NaOH, KOH, Na₂CO₃, Na₂SO₃, NaHSO₃, Na₃PO₄ lub Na₂S [168]. Warunki reakcji różnią się w zależności od literatury, jednakże preferowany jest roztwór NaOH. Używa się go w stężeniu od 0,125 do 5,0 M, czas reakcji wynosi od kilku minut do kilku dni, a temperatura do 160°C [169]. Jednak NaOH może powodować częściową deacetylację chityny i obniżać jej masę cząsteczkową [62].

Kolejny etap, demineralizacja, ma na celu usunięcie minerałów, zwłaszcza węgla wapnia. W tym celu stosuje się obróbkę kwasem, na przykład HCl, CH₃COOH, HNO₃, H₂SO₄ lub HCOOH [62]. Kwas rozpuszcza minerały obecne w materiale i wytwarza rozpuszczalne sole, które można łatwo wmyć. Warunki demineralizacji różnią się w badaniach. Długi czas demineralizacji, nawet do kilku dni, może spowodować zmniejszenie zawartości minerałów w próbce, ale również degradację polimeru [51, 170]. Ponadto wysoka temperatura reakcji może skrócić jej czas poprzez zwiększenie penetracji rozpuszczalnika do matrycy polisacharydu. Demineralizacja może jednak wpływać na stopień acetylacji i masę cząsteczkową biopolimeru [171]. W celu zachowania struktury chityny, często skuteczniejsze okazują się metody biologiczne.

Biologiczna deproteinizacja wymaga użycia enzymów proteolitycznych. Enzymy te, znane jako proteazy, pochodzą głównie ze źródeł zwierzęcych, roślinnych lub mikrobiologicznych. Proteazy odpowiadają za usuwanie białek z chityny. Jednak chityna uzyskana poprzez enzymatyczną deproteinizację nadal zawiera resztkowe ilości białka [172]. Aby osiągnąć wysoki stopień czystości, szczególnie ważny w zastosowaniach medycznych, konieczne jest poddanie chityny działaniu zasady, takiej jak NaOH. Proces ten można przeprowadzić w łagodniejszych warunkach i krótszym czasie w porównaniu z kon-

3 Wprowadzenie

wencjonalnymi metodami chemicznymi, co pomaga zachować strukturę chityny [51]. Zoptymalizowanie enzymatycznej metody pozyskiwania wysokiej jakości, czystej chityny pozwala obniżyć zawartość białka do wartości śladowych [172]. W podejściu enzymatycznym demineralizację przeprowadza się z wykorzystaniem bakterii produkujących kwasy organiczne, takie jak kwas mlekowy lub octowy, które okazały się równie skuteczne w demineralizacji pancerzy krewetek jak kwas solny [173]. Rysunek 3.5 przedstawia schematyczną reprezentację przemysłowych metod izolacji chityny.



Rysunek 3.5: Przemysłowe metody izolacji chityny, zaadaptowane z [141].

Opracowano nowe metody izolacji chityny, w tym z wykorzystaniem rozpuszczalników eutektycznych, cieczy jonowych i technik elektrochemicznych [52]. Rozpuszczalniki głęboko eutektyczne pochodzenia naturalnego mogą zapobiegać deacetylacji chityny oraz minimalizować degradację jej masy cząsteczkowej. Ponadto ułatwiają one rozpuszczanie amorficznej chityny, poprawiając strukturę krystaliczną wyekstrahowanego materiału [174]. Ciecze jonowe, które skutecznie rozkładają surową biomasę z różnych źródeł (np. odpady z przetwórstwa skorupiaków, gladiusy kałamarnic), umożliwiają ekstrakcję chityny o dużej masie cząsteczkowej poprzez rozpuszczenie polisacharydu w roztworze cieczy jonowej [175, 176].

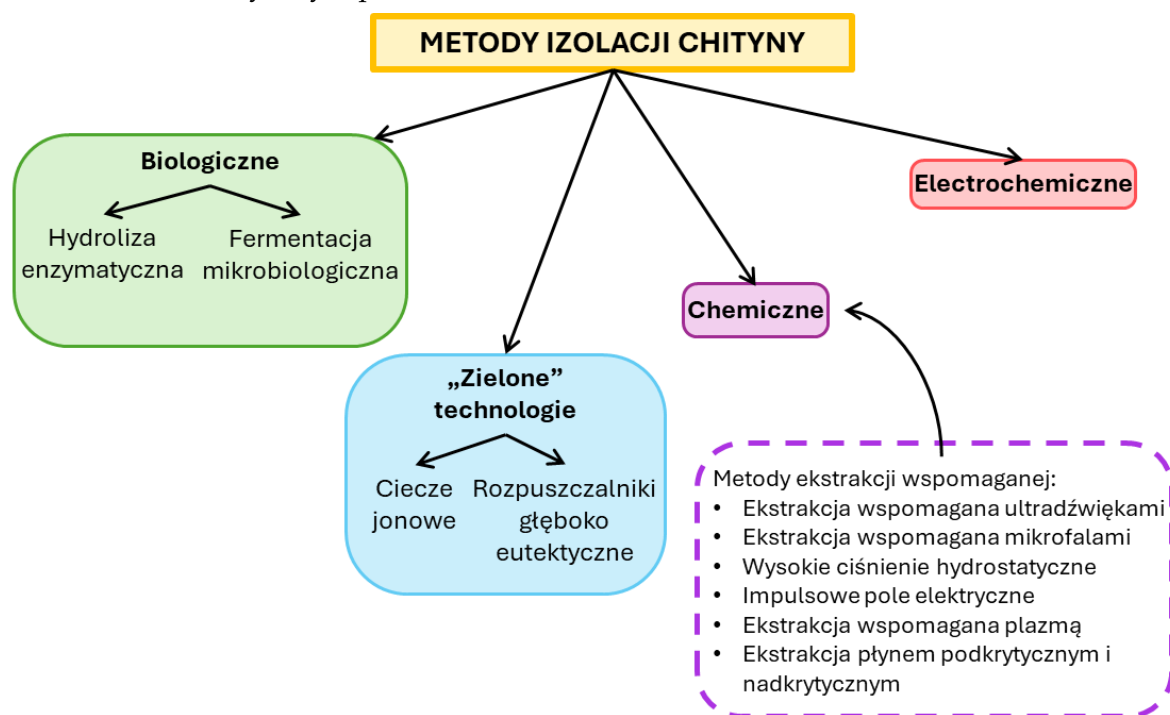
W badaniach z 2002 roku [177] opisano zastosowanie obróbki elektrochemicznej do izolacji chityny z egzoszkieletów skorupiaków. Surowiec zawierający chitynę, przygotowany w postaci wodnej emulsji soli, był przetwarzany w elektrolizerze. Etapy deproteinizacji, demineralizacji i odbarwienia zachodziły pod wpływem pola elektromagnetycznego. Elektroliza wody generowała jony, które regulowały zarówno potencjał redoks, jak i pH. To przyjazne dla środowiska podejście pozwoliło na jednoczesne przeprowadzenie wszystkich trzech etapów, przy użyciu niskich stężeń kwasów i zasad (0,05–0,1%). Proces ten wymagał jednak dłuższego czasu trwania (12–24 godz.), a uzyskana chityna charakteryzowała się zwiększoną zawartością lipidów [177].

Warto zauważyć, że biorafinacja umożliwia ekstrakcję α -chityny z odpadów z muszli krewetek [178], a także z larw owadów [179]. Biorafinacja chityny stanowi zieloną strategię przetwarzania odpadów ze skorupiaków w wartościowe produkty, takie jak chitynę, oligomery chityny oraz deacetylowane pochodne, takie jak chitozan, oligomery chitozanu i glukozamina. Warto zauważyć, że odpady z muszli skorupiaków stanowią 60–80% całkowitej biomasy pochodzącej z przetwórstwa owoców morza [115]. Technika biorafinacji umożliwia produkcję wysokiej jakości chityny i chitozanu [180].

Biorafinacja chityny wykorzystuje biologiczną obróbkę odpadów zawierających chitynę, w wyniku której powstają chityna, węglan wapnia oraz płyny zawierające białka i lipidy. Następnie, degradacja enzymatyczna może przekształcić chitynę w chitozan i jego monomeryczne elementy budulcowe. Co ważne, wszystkie produkty uboczne mają potencjalne zastosowania, na przykład w przemyśle biogazowym [181].

Tabela 3.3 podsumowuje najnowsze publikacje omawiające techniki izolacji chityny.

Tabela 3.3: Przegląd najnowszych artykułów na temat metod izolacji chityny, wraz z ich schematycznym podsumowaniem.

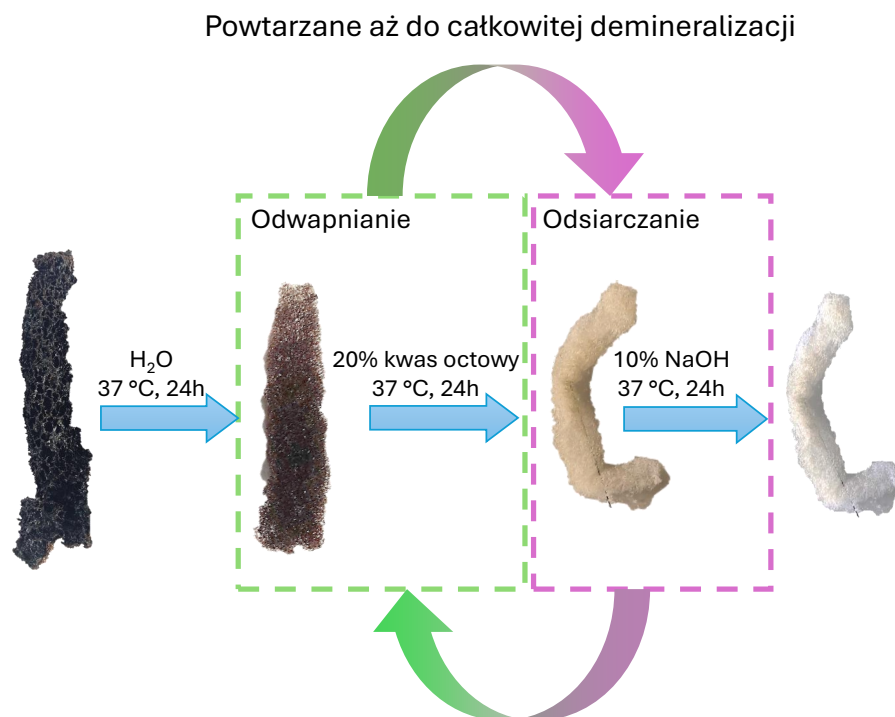


Rok	Tytuł	Źródło
2021	A Review of Various Sources of Chitin and Chitosan in Nature	[167]
2022	Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review	[182]
2022	Recent advances in extraction of chitin and chitosan	[183]
2022	Chitin, Chitosan, and Nanochitin: Extraction, Synthesis, and Applications	[184]
2023	Chitin and chitin-based biomaterials: A review of advances in processing and food applications	[52]
2023	A new era of chitin synthesis and dissolution using deep eutectic solvents- comparison with ionic liquids	[185]
2023	Crustacean shell waste derived chitin and chitin nanomaterials for application in agriculture, food, and health – A review	[53]
2024	Towards a greener future: Exploring the challenges of extraction of chitin and chitosan as bioactive polysaccharides	[186]
2024	Update on Chitin and Chitosan from Insects: Sources, Production, Characterization, and Biomedical Applications	[187]
2024	Green technologies for bio-refinery in marine crustacean shell valorisation from chitin perspective	[188]
2025	Comparative analysis of chitin isolation techniques from mushrooms: toward sustainable production of high-purity biopolymer	[189]
2025	Microbial fermentation for chitin recovery from shrimp by-products – A review	[190]
2025	Sustainable Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Insect Frass	[191]
2025	Sustainable biopolymer design: extraction of chitin and chitosan using natural deep eutectic solvents with improved antibacterial features	[192]

2025	Chitin: a comparison between its main sources	[193]
2025	Extraction of Chitin, Chitosan, and Calcium Acetate from Mussel Shells for Sustainable Waste Management	[194]
2025	Green Processes for Chitin and Chitosan Production from Insects: Current State, Challenges, and Opportunities	[62]
2025	Recovery of Chitin from <i>Agaricus bisporus</i> Mushrooms: Influence of Extraction Parameters and Supercritical CO ₂ Treatment on Fresh Mushrooms and Production Residues	[195]
2025	Unlocking Nature's Building Blocks: Emerging Advances in Chitin and Collagen Research	[196]

3.2.3 Metody izolacji chityny z gąbek

Do izolacji chityny z gąbek stosuje się metodę zaproponowaną w 2007 roku. Technika ta zapewnia nie tylko zachowanie unikalnej architektury porowatych trójwymiarowych szkieletów, ale także dokładne oczyszczenie, co jest szczególnie istotne w zastosowaniach biomedycznych [197]. Pierwszy etap polega na umieszczeniu próbki gąbki w wodzie dejonizowanej przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Faza ta zapewnia rozpuszczenie substancji rozpuszczalnych w wodzie i lizę komórek gąbki przez osmozę. Drugim etapem tej metody jest odwapnienie poprzez działanie 20% roztworem kwasu octowego przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Oprócz degradacji węglanów wapnia, etap ten rozpuszcza białka i pigmenty rozpuszczalne w kwasach. Następnie konieczne jest zubożenie próbki w wodzie dejonizowanej. W trzecim etapie wymagane jest odsiarczenie poprzez zastosowanie 2,5 M roztworu wodorotlenku sodu przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Oprócz krzemionki, rozpuszczane są również inne substancje rozpuszczalne w zasadach, takie jak lipidy, pigmenty i białka. Następnie, pozostały szkielet gąbki poddaje się zubożeniu wodą dejonizowaną. Etapy obróbki kwasem i zasadą powtarzane są naprzemiennie, do momentu całkowitego oczyszczenia matrycy chitynowej. W ostatnim etapie, w razie potrzeby, stosuje się 35% roztwór nadtlenu wodoru w celu usunięcia resztek pigmentów z matrycy chitynowej. Czas trwania całego procesu zależy od morfologii szkieletu, użytego gatunku gąbki i liczby potrzebnych powtórzeń etapów. Dlatego procedura izolacji chityny z gąbek może trwać do 7 dni [197]. Schemat metody przedstawiono na rysunku 3.6.



Rysunek 3.6: Standardowa metoda izolacji chityny, na podstawie [197].

Aby wyizolować chitynę z gąbek, konieczne jest przeprowadzenie zarówno odwapniania, jak i odsiarczania próbki. Wynika to z faktu, że chityna w wielu gąbkach występuje w biokompozytach, w połączeniu z krzemionką w gąbkach szklanych lub z węglanem wapnia i krzemionką w gąbkach pospolitych [197].

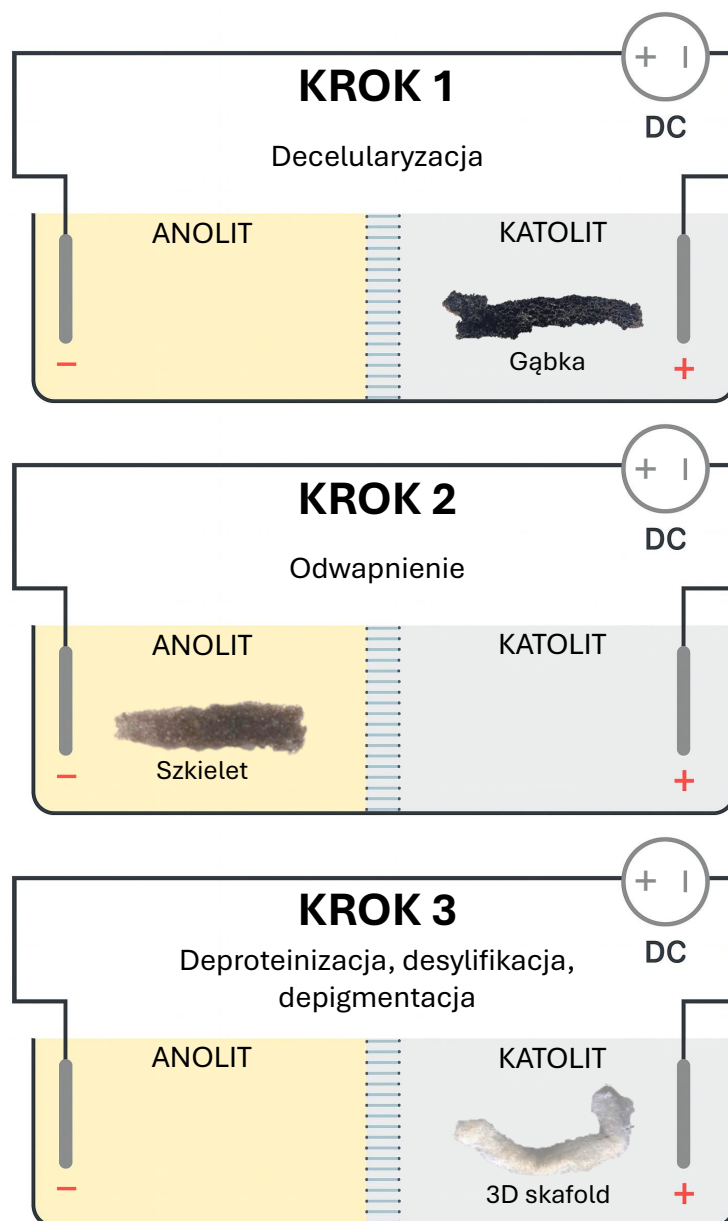
Długi czas trwania standardowej metody zainspirował społeczność naukową do poszukiwania bardziej efektywnych technik izolacji chityny z gąbek.

Jednym z ulepszeń było zastosowanie mikrofal, co znacznie skróciło czas obróbki [141, 198]. Cały proces trwa do 1 godziny, z czego większość to neutralizacja poprzez płukanie w wodzie. Ze względu na zwiększoną efektywność metoda ta może być określana jako „metoda ekspresowa” [141]. Do izolacji chityny stosuje się promieniowanie mikrofalowe (750 W i 2450 MHz) jednocześnie z wieloetapową procedurą, do której używa się wody dejonizowanej, 1% roztworu NaOH, 20% roztworu CH₃COOH i 30% roztworu H₂O₂. Metoda ta nie powoduje deacetylacji chityny i pozwala na zachowanie unikalnej trójwymiarowej architektury matrycy chitynowej [141].

Kolejnym udoskonaleniem jest zastosowanie ultradźwięków razem z naprzemiennym działaniem roztworu wodorotlenku sodu i kwasu octowego [197]. Czas obróbki i zużycie środków chemicznych różnią się w zależności od gatunku i morfologii szkieletu danej gąbki.

Generalnie metoda wspomagana ultradźwiękami skraca czas przetwarzania do około 4 godzin, jednocześnie minimalizując zużycie środków chemicznych w porównaniu z metodą standardową. Ponieważ jednak zastosowaniu ultradźwięków może towarzyszyć deacetylacja, należy ocenić jakość otrzymanej chityny [197].

Dodatkowo, izolację skafoldów chitynowych z wybranych gatunków gąbek przeprowadzono z wykorzystaniem metody wspomaganej elektrochemicznie (rys. 3.7). Metoda ta pozwala na izolację oczyszczonych matryc chitynowych w krótkim czasie, zachowując integralność sieci połączonych kanałów i zapobiegając deacetylacji chityny do chitozanu [199, 200]. Elektroliza umożliwia produkcję kwasów i zasad z wodnych roztworów soli. W tej metodzie, do izolacji skafoldów chitynowych, jako elektrolit zastosowano stężony roztwór Na_2SO_4 . Procedura obejmuje kilka etapów. Najpierw wysuszoną gąbkę poddaje się wstępnej obróbce wodą destylowaną. W celu usunięcia składników komórkowych próbkę umieszcza się w komorze katodowej, gdzie otrzymywany jest pozbawiony komórek szkielet gąbki oraz ekstrakt zawierający komórki. Następnie, szkielet przenosi się do komory anodowej, w celu odwapnienia szkieletu. Aby uzyskać bezbarwny skafold chitynowy, szkielet poddaje się deproteinizacji, odsiarczeniu i depigmentacji. Ten etap wymaga ponownego umieszczenia szkieletu w komorze katodowej, ale w innych warunkach, mianowicie przy wyższym natężeniu i napięciu prądu. W zależności od gatunku gąbki niektóre parametry procedury nieznacznie się różnią, w tym czas potrzebny na każdy z etapów, natężenie i napięcie prądu oraz liczba powtórzeń etapów niezbędnych do uzyskania produktu końcowego.



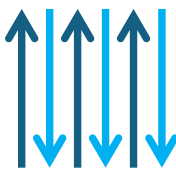
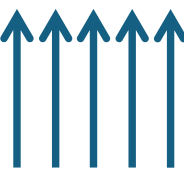
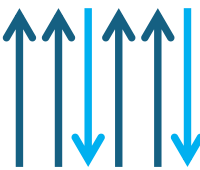
Rysunek 3.7: Schematyczny obraz metody elektrochemicznej izolacji chityny z gąbek, na podstawie [199].

3.3 Charakterystyka strukturalna chityny

Chityna występuje w trzech formach polimorficznych – α , β i γ , które charakteryzują się różnym ułożeniem łańcuchów polimerowych (tab. 3.4) [201]. Chityna w formie α jest najbardziej rozpowszechniona w przyrodzie. Występuje w ścianach komórkowych grzybów, w pancerzach skorupiaków (homarów, krabów, krewetek, kryli) oraz w kutykuli owadów. Występuje również u organizmów morskich, w tym gąbek [133, 150, 159, 163]. α -Chityna

znajduje się głównie u organizmów, których struktury wymagają dobrych właściwości mechanicznych, takich jak sztywność i twardość. Ponadto ta forma polimorficzna jest często związana z substancjami nieorganicznymi [202]. Jednym z przykładów jest biokompozyt szkieletowy z krzemionki, aragonitu i chityny u niektórych gatunków z rzędu Verongiida [203].

Tabela 3.4: Tabela przedstawiająca źródła i rozpowszechnienie wszystkich trzech form polimorficznych chityny wraz z ich schematyczną reprezentacją, na podstawie [50].

Forma polimorficzna	α -chityna	β -chityna	γ -chityna
Układ łańcuchów			
Wybrane źródła	Krewetki, kraby, homary, gąbki	<i>Gladus kałamarnic</i> , okrzemki	Larwy błonkówki i jedwabnika
Rozpowszechnienie	Duże	Mniej obfite	Mniej obfite

Włókna szkieletowe gąbki *Spongilla lacustris* składają się z α -chityny, która zmniejsza elastyczność strukturalną, a jednocześnie zwiększa odporność na nacisk mechaniczny i degradację chemiczną [159].

α -Chityna najprawdopodobniej odpowiada za przyczepność gąbki słodkowodnej *Lubomirskia baikalensis* do powierzchni skał [160]. Podobnie u słodkowodnej gąbki *Ochridaspongia rotunda*, α -chitynę zidentyfikowano wyłącznie w części mocującej, co sugeruje jej funkcjonalne znaczenie w zakotwiczeniu gąbki w twardym podłożu [161].

Ze względu na wysoką stabilność termodynamiczną, α -chityna może powstawać w wyniku rekrytalizacji form β i γ [51]. Pojedyncze łańcuchy polimerowe w włóknach α -chityny są ułożone antyrównolegle [50]. Następnie łańcuchy chityny są zorganizowane w arkusze, które są stabilizowane przez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe C(6)OH...O=C(7) wewnątrz arkusza. Ponadto α -chityna posiada międzycząsteczkowe wiązania wodorowe między arkuszami C(6)OH...HOC(6), które zapewniają gęstsza strukturę i ograniczają infiltrację rozpuszczalnika, utrudniając rozpuszczanie chityny [202, 204]. Również różnica w otoczeniu wiązań wodorowych powoduje rozszczepienie pasma amidowego I w widmach FTIR α -chityny (pasma przy 1658 cm⁻¹ i 1622 cm⁻¹) [205]. Strukturę krystaliczną α -chityny określili Minke i Blackwell w 1978 roku. Autorzy zaproponowali rombowa komórkę

3 Wprowadzenie

elementarną (wymiary: $a = 4,74 \text{ \AA}$, $b = 18,86 \text{ \AA}$ i $c = 10,32 \text{ \AA}$); oraz grupę przestrzenną $P2_12_12_1$ [206]. Spośród polimorfów chityny, α -chityna wykazuje najwyższy wskaźnik krystaliczności, wynoszący 70,8% [122]. Jednak wartości stopnia krystaliczności mogą się różnić w zależności od źródła chityny i metody jej izolacji. Na przykład wykazano, że chityna wyekstrahowana z grzybów charakteryzuje się wskaźnikiem krystaliczności wynoszącym 58,5%, podczas gdy chityna pochodząca z owadów może osiągać wskaźnik aż 84,9% [207].

Drugą formę polimorficzną – β -chitynę – można znaleźć u okrzemek [208] i w ich krzemionkowych ścianach komórkowych [209], w gladiusach (tzw. piórach) kałamarnic, w strukturach rurowych wytwarzanych przez przedstawicieli grup Vestimentifera i Pogonophora [129, 133]. Chityna w formie β występuje u okrzemek, takich jak *Thalassiosira fluviatilis* [210] i *Thalassiosira pseudonana* [211]. Ten polimorf występuje głównie u organizmów, które potrzebują zarówno wytrzymałości, jak i elastyczności [202]. Pierwszy dowód na obecność β -chityny uzyskali Lotmar i Picken na podstawie dyfraktogramu rentgenowskiego elementu budowy wieloszczeta *Aphrodite aculeata* [212]. Struktura krystaliczna β -chityny charakteryzuje się jednoskośną komórką elementarną o wymiarach $a = 4,85 \text{ \AA}$, $b = 9,26 \text{ \AA}$, $c = 10,38 \text{ \AA}$ i $\gamma = 97,5^\circ$, a także grupą przestrzenną $P2_1$ [213]. Współczynnik krystaliczności β -chityny jest najniższy spośród trzech form polimorficznych i wynosi 65,5% [122]. W β -chitynie łańcuchy polimeru charakteryzują się równoległym ułożeniem. W formie β -chityny obserwuje się jedynie wiązania wodorowe wewnątrz płaszczyzny [204]. Brak międzypłaszczyznowych wiązań wodorowych może wyjaśniać pęcznienie β -chityny w środowisku cząsteczek polarnych, które infiltrują sieć krystaliczną bez niszczenia organizacji płaszczyzny i ogólnej krystaliczności materiału. Izomorf β -chityny jest bardziej reaktywny w porównaniu z α -chityną [51]. Natywna β -chityna występuje w formie dihydratu [202]. β -Chityna charakteryzuje się mniej ścisłym upakowaniem molekularnym w porównaniu z izomorfem α , co pozwala na izolację β -chityny w podobnych, ale mniej surowych warunkach [144].

Najrzadszy polimorf, γ -chityna, został po raz pierwszy opisany przez Rudalla w 1963 roku [214]. Łańcuchy polimerowe w γ -chitynie są ułożone losowo, z jednym łańcuchem antyrównoległym i dwoma równoległymi tworzącymi strukturę [50]. Wskaźnik krystaliczności γ -chityny określono na 68,6%, co plasuje go pomiędzy wartościami odnotowanymi dla form polimorficznych α i β [122]. γ -Chityna, podobnie jak polimorf β , występuje

tam, gdzie wymagana jest elastyczność materiału. Chityna w formie γ występuje w błonach perytroficznych karaczanów, szarańczy i modliszek, we włóknach kokonów chrząszcza *Ptinus tectus*, a także w larwach błonkówki (*Phymatocera aterrima*) oraz jedwabnika (*Antheraea pernyi*) [122]. γ -Chityna wykazuje strukturę bardziej zbliżoną do α -chityny niż β -chityny [122].

Co intrygujące, polimorfy α , β i γ chityny można wyizolować z różnych części gładiusu kałamarnicy *Loligo* sp., a także z kutykuli niektórych owadów [202]. Ta niezwykle obserwacja sugeruje, że różne polimorfy nie są związane z grupą taksonomiczną, lecz z funkcją [202].

3.4 Skafoldy chitynowe Porifera: od makro do nanoskali

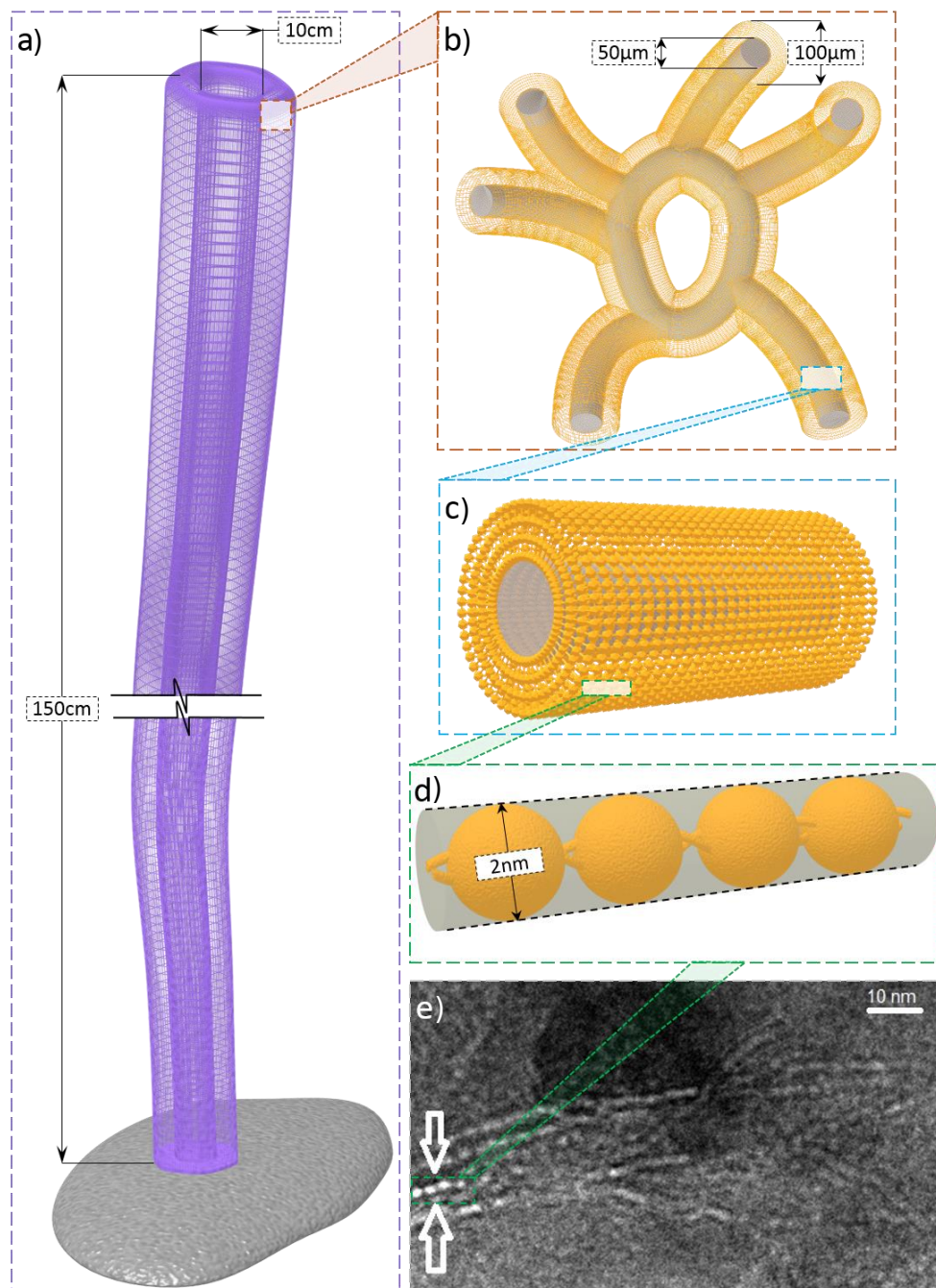
Skafoldy chitynowe pochodzące z gąbek mogą osiągać znaczne rozmiary, które ściśle odpowiadają rozmiarom żywych gąbek z rzędu Verongiida [128]. Jest to unikalna cecha, odróżniająca je od innych źródeł chityny. Co więcej, gąbki wykazują dużą różnorodność w budowie i rozmiarach ciała, a tym samym w strukturze szkieletu. Na przykład gąbka *Ianthella basta*, charakteryzująca się płaską strukturą, może osiągać średnicę do 1,5 m [215]. Natomiast *Aplysina archeri*, będąca przykładem najdłuższej znanej chityny w formie rur, może osiągać długość do 1,5 m, a średnica wewnętrzna do 10 cm [216] (rys. 3.8).

Te duże struktury zbudowane są z sieci mikrowłókien chitynowych, których średnica w skafoldach pochodzących z gąbek z rzędu Verongiida waha się od 50 do 100 μm [216]. Mikrowłókna charakteryzują się budową w kształcie rur i zdolnością do tworzenia sieci w strukturach o układzie cylindrycznym lub płaskim, w zależności od gatunku gąbki. Mikrotubularna morfologia skafoldów zapewnia efekt kapilarny, który odpowiada za zdolność pęcznienia pod wpływem różnych cieczy, w tym wody, barwników, krwi i ropy naftowej [141]. Zmierzona zdolność pęcznienia w odniesieniu do wody wyniosła $255 \pm 8\%$ [216]. U gąbek z rzędu Verongiida mikrowłókna chitynowe stanowią rezerwuar dla sferulocytów – wyspecjalizowanych komórek syntetyzujących bromowane pochodne tyrozyny, wykazujących właściwości farmaceutyczne [217, 218].

Mikrowłókna składają się z nanowłókien chitynowych, które z kolei zbudowane są z nanokryształów o średnicy około 2 nm [216]. Odkrycie wysoce uporządkowanej, nanorganizowanej chityny po raz pierwszy odnotowano w krzemionkowych igłach szkieleto-

3 Wprowadzenie

wych gąbki szklanej *Sericolophus hawaiiicus* [216]. Zawiera ona koncentrycznie ułożone warstwy kompozytu krzemionkowo-chitynowego o nanostrukturalnej budowie [166]. Nanowłókna chityny zaobserwowano również w gąbce *Ianthella basta* poddanej metalizacji nanocząstkami miedzi. Włókna nanochityny szczelnie pokryły nanokryształy metalu, tworząc kompozyt o nanoporowatej powierzchni [219].



Rysunek 3.8: Schematyczny widok organizacji szkieletu chitynowego gąbki morskiej na poziomie makro, mikro i nano: a – model rurkowego szkieletu gąbki *Aplysina archeri*; b – struktura składa się z mikrowłókien o średnicy ok. 100 μm; c – mikrowłókna składają się z nanostrukturizowanej chityny; d – która służy jako szablon do tworzenia nanokryształów; e – które są widoczne w analizie HRTEM (zdjęcie dzięki uprzejmości prof. Paula Simona) [220].

3.5 Zastosowania chityny z gąbek

3.5.1 Inżynieria tkankowa

Chityna ma znaczący potencjał w dziedzinie inżynierii tkankowej [221–225]. Jednak chitynę z takich źródeł przemysłowych, jak stawonogi czy mięczaki, pozyskuje się głównie w postaci proszków, folii lub granulek [128].

Nowoczesne zastosowania biotechnologiczne wymagają zaawansowanych strategii wytwarzania trójwymiarowych (3D) skafoldów. Jedno z podejść polega na wytwarzaniu skafoldów 3D w wieloetapowych procesach, obejmujących rozpuszczanie, ługowanie chemiczne, separację faz lub suszenie w warunkach nadkrytycznych. Następnie konieczne jest zastosowanie złożonych technologii, takich jak druk 3D. Jednak ta strategia wytwarzania skafoldów jest wymagająca technicznie, kosztowna i może być nieopłacalna ekonomicznie w przypadku zastosowań na dużą skalę. Alternatywna strategia wykorzystuje naturalne, prefabrykowane skafoldy, występujące w unikalnych, trójwymiarowych strukturach szkieletowych gąbek [13].

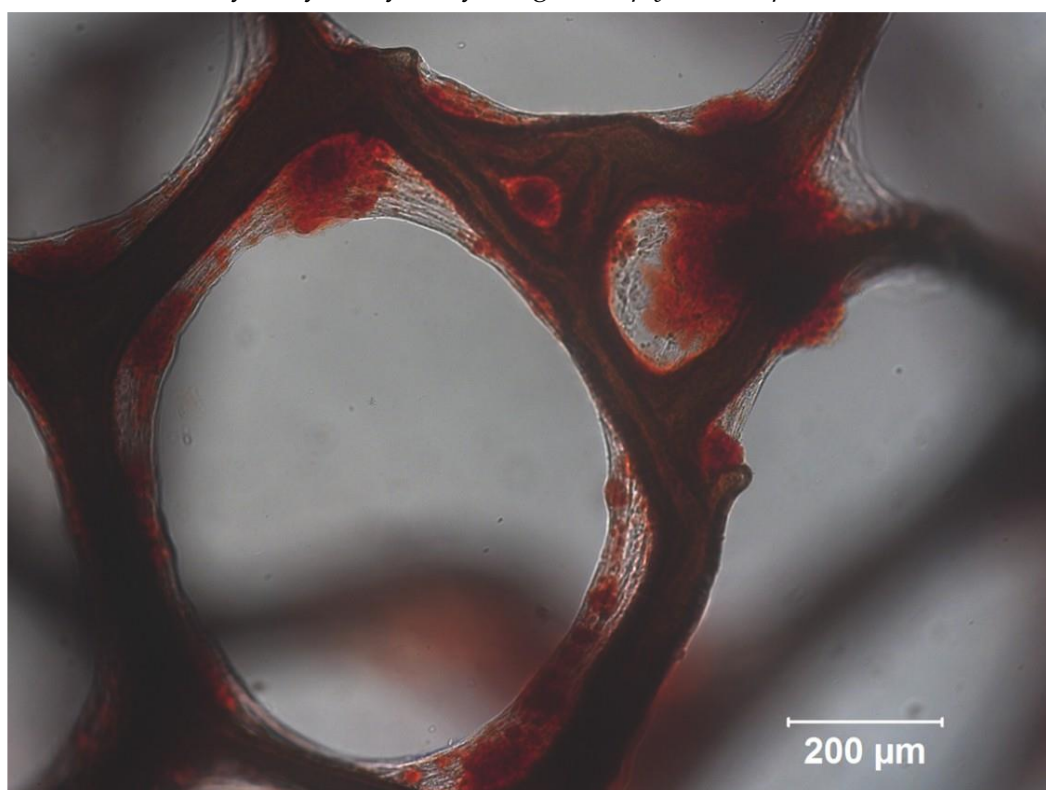
Gąbki z rzędu Verongiida posiadają unikalny szkielet zbudowany z chityny, naturalnie uformowany w trójwymiarowe skafoldy, których budowa jest bardzo zbliżona do morfologii rodzimego szkieletu gąbki. Inną ważną zaletą chityny z gąbek, z punktu widzenia inżynierii tkankowej, jest duża powierzchnia wewnętrzna chitynowych skafoldów. Dla suchej próbki o masie 3–4 g powierzchnia wewnętrzna wynosi 25–34 m² [128]. Dzięki temu matryce chitynowe z gąbek są wysoce efektywnymi konstrukcjami do absorpcji cieczy (np. pożywki hodowlanej), co odbywa się dzięki siłom kapilarnym [128]. Zdolność do nawodnienia stanowi kluczowy czynnik warunkujący adhezję komórek. Ta cecha, w połączeniu ze strukturą w formie sieci otwartych, połączonych ze sobą rurek i kanałów, sprawia, że matryce chitynowe z gąbek są wysoce odpowiednimi materiałami do podtrzymywania i hodowli szerokiej gamy typów komórek (tab. 3.5).

Badania nad różnymi typami komórek dowodzą, że skafoldy chitynowe uzyskane z gąbek mają ogromny potencjał w inżynierii tkankowej. Wykazano, że szkielet gąbki sprzyja adhezji, wzrostowi, proliferacji i żywotności ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych [15, 16, 69]. Matryca chitynowa umożliwia skuteczną adhezję chondrocytów, a nawet syntezę i depozycję macierzy zewnątrzkomórkowej w środowisku *in vivo* [226].

3 Wprowadzenie

Ponadto skafoldy chitynowe pochodzące z gąbki *Aplysina archeri* ulegają wapnieniu ex vivo z wykorzystaniem hemolimfy żywego mięczaka [146].

Tabela 3.5: Przegląd wybranych trójwymiarowych skafoldów chitynowych pochodzących z gąbek z rzędu Verongiida, już zastosowanych w inżynierii tkankowej. Obraz uzyskany metodą mikroskopii świetlnej przedstawia wzrost ludzkich komórek mezenchymalnych pochodzących z tkanki tłuszczowej na trójwymiarowym skafoldzie chitynowym uzyskanym z gąbki *Aplysina aerophoba*.



Rodzaj komórek	Źródło chitynowych skafoldów 3D	Źródło
Chondrocyty	<i>Aplysina cauliformis</i>	[226]
Mezenchymalne komórki macierzyste ludzkiej tkanki tłuszczowej	<i>Aplysina fulva</i> , <i>Aplysina aerophoba</i> , <i>Ianthella basta</i>	[227]
Mezenchymalne komórki macierzyste	<i>Aplysina aerophoba</i>	[15]
Mezenchymalne komórki macierzyste	<i>Ianthella basta</i>	[16]
Kardiomiocyty pochodzące z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych	<i>Aplysina aerophoba</i>	[228]
Hemocyty mięczaków	<i>Aplysina archeri</i>	[146]
Fibroblasty mysie (Balb/3T3), fibroblasty skóry ludzkiej (NHDF), keratynocyty ludzkie (Hacat), neurony ludzkie (SH-SY5Y)	<i>Aplysina fistularis</i>	[125]
Ludzkie płodowe osteoblasty	<i>Aplysina aerophoba</i>	[126]
Komórki macierzyste miazgi zęba	<i>Aplysina fistularis</i>	[229]

3.5.2 Biomimetyka ekstremalna

Biomimetyka ekstremalna stanowi nowoczesny obszar badań naukowych, skupiający się na analizie oraz projektowaniu rozwiązań inspirowanych naturą, które funkcjonują w warunkach wykraczających poza standardowe granice pracy człowieka, w szczególności w zakresie ekstremalnych temperatur, ciśnień, wartości pH oraz innych wymagających czynników środowiskowych [230]. Dziedzina ta obejmuje wykorzystanie naturalnie występujących, odpornych biopolimerów, które można znaleźć w ekstremalnych środowiskach, do opracowywania nowych materiałów kompozytowych. Ponadto ta dyscyplina naukowa ma na celu odkrycie i wyjaśnienie mechanizmów procesów biomineralizacji zachodzących w takich ekstremalnych warunkach [230].

W ramach biomineralizacji ekstremalnej wyróżnia się odrębną kategorię znaną jako wymuszona biomineralizacja. Termin ten odnosi się do procesu mineralizacji indukowanej, w którym wysokie stężenie jonów metali odpowiada za rozwój systemów biomineralizowanych, umożliwiających przetrwanie ekstremofilom [231].

W książce [232] zaprezentowano kompleksowe badania nad ekstremalną biomimetyką i biomineralizacją, obejmujące szeroki zakres tematów, od biosilifikacji po syntezę zaawansowanych materiałów.

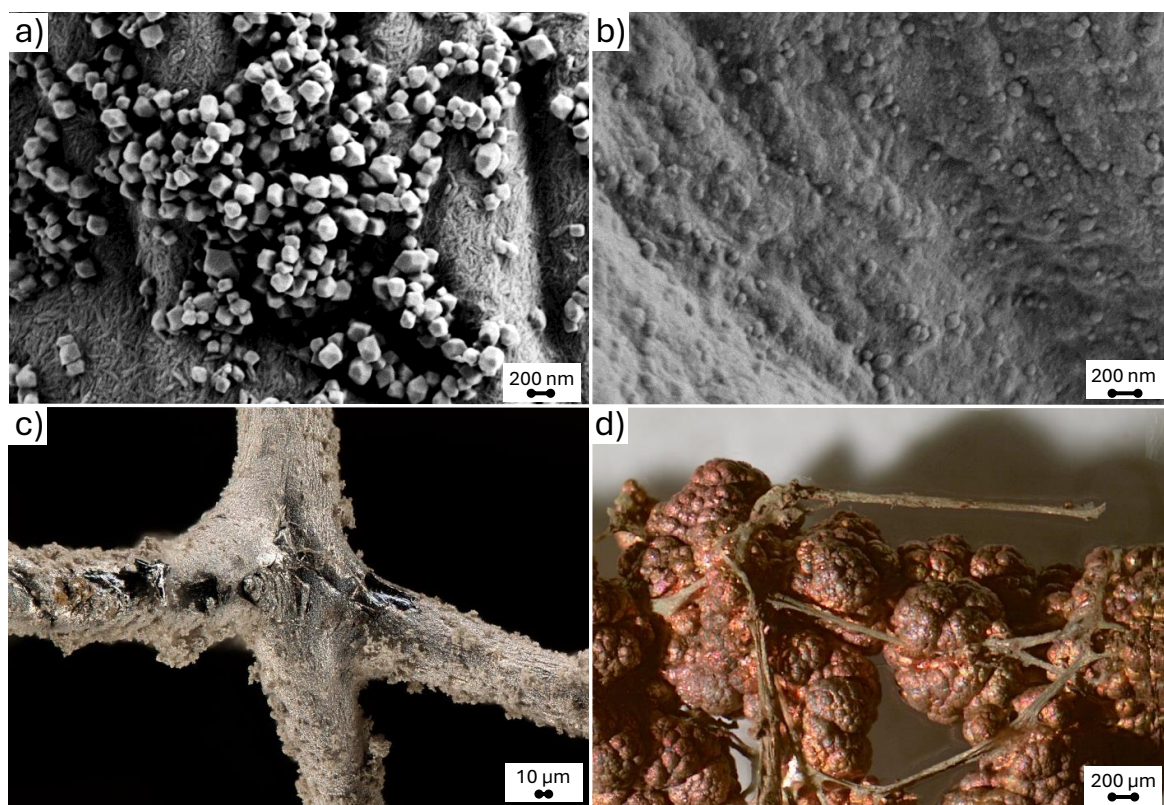
Chityna wyróżnia się nie tylko szczególnymi właściwościami mechanicznymi, w tym sztywnością i elastycznością, które można dostosować do docelowych zastosowań, ale także wysoką stabilnością termiczną, która zależy od źródła chityny [202]. Badania potwierdzają, że stabilność termiczna chityny sięga 200°C, jednak α -chityna jest bardziej stabilna termicznie niż polimorf β [202]. Chityna z gąbek jest odporna na rozkład nawet po 24 godzinach ogrzewania w temperaturze 300°C [138], co jest kluczową cechą w przypadku ekstremalnych metod biomimetycznych.

W jednym z badań, matryca chitynowa z gąbki *Ianthella basta* posłużyła do osadzania krzemionki w warunkach hydrotermalnych w temperaturach sięgających 125°C [233]. Stwierdzono, że nanocząstki krzemionki są osadzone zarówno na powierzchni, jak i wewnątrz włókien skafoldu chitynowego. Uzyskane wyniki wskazują nowe, potencjalne zastosowania kompozytów chitynowo-krzemionkowych, w tym w inżynierii tkankowej, transporcie leków czy oczyszczaniu ścieków [202].

Innym przykładem zastosowania ekstremalnej biomimetyki i matryc chitynowych z

3 Wprowadzenie

gąbek jest osadzanie tlenku cyrkonu w warunkach hydrotermalnych w temperaturze 150°C [234, 235]. W tym badaniu poddano reakcji dwa gatunki gąbek: *Aplysina aerophoba* i *Aplysina cauliformis*. Podobnie jak w poprzednich eksperymentach, nanocząstki metalu osadzono zarówno na powierzchni, jak i wewnątrz włókien chitynowych. Kompozyty chitynowo-cyrkonowe cieszą się zainteresowaniem w takich dziedzinach jak adsorbenty metali ciężkich, biosensory, a także w biomedycynie, gdzie mogą być wykorzystane do produkcji materiałów w urządzeniach specjalistycznych [202]. Ponadto skafoldy chitynowe z gąbek wykorzystano do produkcji różnorodnych kompozytów w warunkach biomimetyki ekstremalnej, w tym: hematytu [236], tlenku germanu [237], tlenków tytanu i cyrkonu [238], tlenku miedzi [219] oraz nanocząstek srebra [239]. Przykłady wybranych kompozytów przedstawiono na rys. 3.9.



Rysunek 3.9: a – obraz SEM nanokompozytu chityny z GeO_2 uzyskanego podczas reakcji hydrotermalnej α -chityny z gąbki *Aplysina cauliformis* [237]; b – obraz SEM powierzchni skafoldu α -chityny *A. aerophoba* po hydrotermalnej formacji tlenku żelaza, w wyniku której powstał kompozyt chityny z Fe_2O_3 [236]; c – obraz stereomikroskopowy chitynowego skafoldu *A. aerophoba* pokrytego nanocząstkami Ag/AgBr [239]; d – matryca chitynowa *Lanthella basta* całkowicie metalizowana nanokryształami Cu i Cu_2O [219].

3.5.3 Sorpcja uranu

W ciągu ostatniej dekady globalna produkcja uranu wahała się od około 45 000 do 65 000 ton rocznie, przy czym w 2022 roku wyniosła blisko 50 000 ton [240]. Wydobycie uranu powoduje powstawanie dużej ilości odpadów poprodukcyjnych, których zwiększenie ilości będzie skutkowało wzrostem wykorzystania uranu niskiej jakości w miarę wyczerpywania się jego zasobów [241].

Uran jest toksycznym metalem ciężkim, niezbędnym w zastosowaniach, takich jak energetyka jądrowa, medycyna onkologiczna czy paliwo do statków kosmicznych [242]. Działalność człowieka, w połączeniu z konfliktami zbrojnymi i nadmiernym stosowaniem nawozów fosforanowych, powoduje wzrost stężenia uranu w środowisku w ostatnich latach, w tym w wodach gruntowych.

Badania wykazały, że chityna jest niezwykle skuteczna w usuwaniu uranu z wody [243–245]. Przy stężeniu 2200 µg/l chityna usuwa 95% uranu, co prowadzi do stężenia uranu poniżej dopuszczalnego poziomu tego metalu ciężkiego w wodzie pitnej. Przy stężeniu 10000 µg/l chityna umożliwia usunięcie 85% uranu obecnego w próbce wody. Zdolność sorpcyjna wynosi 300 mg uranu na 1 g chityny [246].

Co więcej, wiele innych kompozytów chitynowych okazało się przydatnych w usuwaniu uranu z wody [246].

Badania pokazują, że skafoldy chitynowe uzyskane z gąbki *A. aerophoba* skutecznie absorbują uran z wody [247]. Włókna chitynowe gąbek doskonale nadają się do adsorpcji uranylu poprzez filtrację wody ze względu na dużą powierzchnię wewnętrzną, jaką zapewnia ich złożona sieć włókien w formie rur. Te chitynowe matryce umożliwiają wydajną filtrację wody w szerokim zakresie stężeń uranu. Zdolność adsorpcji uranu do 280 mg/g można uzyskać przy stężeniach do 80 mg/l. Skafoldy można ponownie wykorzystać po desorpcji uranu (uranylu) za pomocą nietoksycznego kwasu, takiego jak rozcieńczony kwas solny, octowy lub cytrynowy [247].

3.6 Metody otrzymywania chitozanu

Trudności w przetwarzaniu chityny sprawiają, że coraz większe zainteresowanie budzą jej pochodne. W procesie deacetylacji usuwane są grupy acetylowe, czemu może towarzy-

3 Wprowadzenie

szyc depolimeryzacja. Stopień tych zmian ocenia się na podstawie wartości stopnia acetylacji lub deacetylacji oraz masy cząsteczkowej polimeru.

Deacetylację chityny do chitozanu można przeprowadzić metodą chemiczną lub enzymatyczną [248]. Z chemicznego punktu widzenia do deacetylacji można stosować zarówno kwasy, jak i zasady. Jednak znacznie częściej stosuje się roztwory zasad, ponieważ kwasy niszczą wiązania glikozydowe, co prowadzi do rozerwania łańcucha polimeru [249]. Deacetylację chityny można przeprowadzić zarówno w środowisku heterogenicznym, jak i homogenicznym. W metodzie heterogenicznej, będącej bardziej powszechnym sposobem otrzymywania chitozanu, chitynę poddaje się działaniu stężonego roztworu wodorotlenku sodu w podwyższonej temperaturze przez kilka godzin. W efekcie uzyskuje się chitozan zdeacetylowany do poziomu około 85–99%. W metodzie homogenicznej chitynę najpierw dysperguje się w stężonym roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 25 °C przez co najmniej 3 godziny, a następnie rozpuszcza z kruszonym lodem w temperaturze około 0 °C [51, 250]. Proces ten prowadzi do otrzymania chitozanu o średnim stopniu deacetylacji wynoszącym około 50%. [51]. Właściwości chitozanu różnią się w zależności od warunków procesu deacetylacji [251]. Metody chemiczne pozwalają na uzyskanie materiału o pożądanych właściwościach pod względem stopnia deacetylacji, ale także analizy termogravimetrycznej, FTIR oraz XRD [251, 252]. Ponadto sposób modyfikacji procesu otrzymywania chitozanu wpływa na stopień deacetylacji, masę cząsteczkową, rozmieszczenie grup acetylowych oraz lepkość, a tym samym decyduje o właściwościach uzyskanego produktu. Stopień deacetylacji i masa cząsteczkowa chitozanu są silnie zależne od stężenia zasady, temperatury, czasu reakcji i liczby powtórzeń etapów [250, 253, 254]. Jednak w przypadku chitozanu uzyskanego z pancerzy krewetek, stężenie zasady użytej do deacetylacji jest najważniejszym parametrem [249]. Z kolei warunki reakcji, takie jak użycie azotu lub powietrza, oraz użycie środka redukującego, nie wpływają znacząco na stopień deacetylacji, jednak masa cząsteczkowa w obecności azotu i borowodoru sodu była wyższa, co wskazuje, że te warunki zapobiegają degradacji polimeru [255]. Metody chemiczne mają jednak również wady, do których należą: zużycie energii, zanieczyszczenie środowiska spowodowane stosowaniem stężonego roztworu zasady oraz powstawaniem odpadów chemicznych [250].

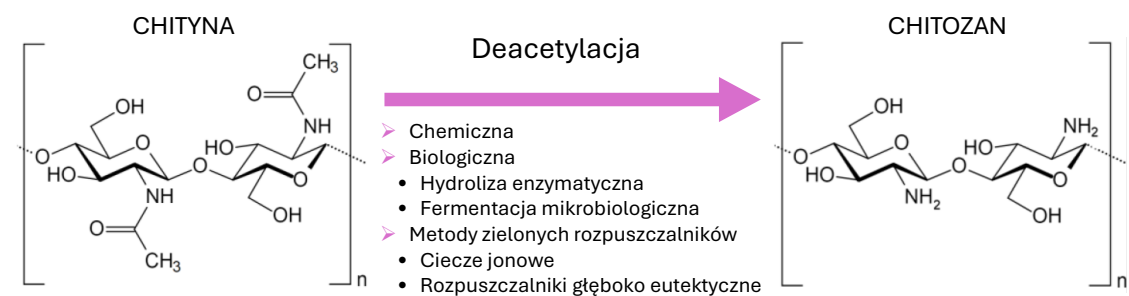
Ograniczenia metod chemicznych zmotywowały do poszukiwania bardziej ekologicznych alternatyw, w tym metod enzymatycznych i innych metod przyjaznych środowisku

[256]. Metody enzymatyczne wykorzystują deacetylazy chitynowe do otrzymywania chitozanu z chityny. Enzymy te katalizują degradację wiązań N-acetamidowych w jednostkach chityny, tworząc produkt deacetylacji – chitozan. W przeciwieństwie do obróbki chemicznej, deacetylacja enzymatyczna z wykorzystaniem deacetylaz zapobiega degradacji polimeru [257]. Pozwala to uniknąć zarówno redukcji masy cząsteczkowej chitozanu, jak i nieregularnej deacetylacji, typowej dla stosowania zasad i kwasów [258].

Deacetylaza chitynowa jest enzymem produkowanym przez różnorodne organizmy, w tym bakterie, grzyby oraz owady [259, 260]. W większości przypadków enzym ten syntetyzowany jest wewnątrzkomórkowo, jednak u niektórych gatunków grzybów stwierdzono również jego produkcję w formie zewnątrzkomórkowej. Wykazano przy tym, że forma wewnątrzkomórkowa charakteryzuje się wyższą aktywnością enzymatyczną [260]. Niektóre cieczki jonowe wykazują zdolność do zwiększania aktywności deacetylazy chitynowej [261, 262]. Kinetyka reakcji deacetylacji enzymatycznej została szczegółowo przebadana i opisana w literaturze [263–265].

Metody biologiczne wymagają zużycia mniejszej ilości energii i rozpuszczalników w porównaniu z metodami chemicznymi. Niemniej jednak, ich głównym ograniczeniem jest niska skuteczność w usuwaniu śladowych ilości białek i minerałów na skalę przemysłową [266]. Ponadto układy enzymatyczne wykazują niską wydajność deacetylacji natywnej chityny [258]. Główną przeszkodą w przekształcaniu chityny w chitozan poprzez deacetylację enzymatyczną jest wysoka krystaliczność chityny [267]. Co więcej, stosując metodę enzymatyczną, uzyskany chitozan jest niższej jakości, a koszt procesu jest wyższy w porównaniu z obróbką chemiczną. Przemysłowa metoda produkcji chitozanu opiera się na obróbce chemicznej w warunkach heterogenicznych. Niemniej jednak nie jest możliwe uzyskanie chitozanu o stopniu deacetylacji 100% w pojedynczej reakcji z zasadami, zatem w praktyce, aby uzyskać wysoki stopień deacetylacji, konieczne jest wielokrotne powtórzenie reakcji [250]. Najnowsze publikacje dotyczące przygotowania chitozanu przedstawiono w tabeli 3.6.

Tabela 3.6: Najnowsze artykuły na temat przygotowywania chitozanu, którym towarzyszy schematyczna ilustracja procesu deacetylacji.



Rok	Tytuł	Źródło
2021	Chitosan: A review of sources and preparation methods	[253]
2021	Chitin Deacetylation Using Deep Eutectic Solvents: Ab Initio-Supported Process Optimization	[268]
2022	Chitin deacetylase: from molecular structure to practical applications	[269]
2022	Chitin, Chitosan, and Nanochitin: Extraction, Synthesis, and Applications	[184]
2023	Mechanism of Heterogeneous Alkaline Deacetylation of Chitin: A Review	[250]
2023	Chitin biorefinery: A narrative and prophecy of crustacean shell waste sustainable transformation into bioactives and renewable energy	[115]
2024	Study on the deacetylation and mechanism of chitin in natural deep eutectic solvent	[270]
2024	Enzymatic deacetylation of chitin treated with ionic liquids	[257]
2024	Ionic liquid strategy for chitosan production from chitin and molecular insights	[271]
2024	Chitosan: an in-depth analysis of its extraction, applications, constraints, and future prospects	[272]
2025	Isolation and characterization of Chitosan from shrimp shell waste and the sustainable preparation of salicylic acid-loaded Chitosan nanoparticles for antibiofilm applications	[273]
2025	Functional and bioactive properties of chitosan produced from <i>Acheta domesticus</i> with fermentation, enzymatic and microwave-assisted extraction	[274]
2025	A comprehensive account of fungal chitin deacetylases: Aspects and prospects	[275]
2025	Identifying barriers to scaled-up production and commercialization of chitin and chitosan using green technologies: A review and quantitative green chemistry assessment	[276]
2025	Chitosan in modern industries: A sustainable alternative to plastics?	[277]

3.7 Patentologia chityny

Chityna cieszy się dużym zainteresowaniem naukowców z różnych dziedzin, w tym biomedycyny, technologii i materiałoznawstwa, stanowiąc źródło inspiracji dla nowatorskich

zastosowań w nowoczesnych technologiach. Potencjał różnorodnych, wielkoskalowych zastosowań przemysłowych przyczynił się do powstania wielu patentów na całym świecie. Chociaż patenty stanowią cenne źródło informacji praktycznych i technicznych, identyfikacja istotnych patentów pozostaje zadaniem czasochłonnym, ponieważ nie istnieje ujednolicona, kompleksowa baza danych. Aby sprostać temu wyzwaniu, zaproponowano termin „patentologia” (ang. *patentology*) jako podejście metodologiczne do szczegółowej analizy patentów [4].

Poddano analizie patenty, których głównym przedmiotem była chemia i modyfikacje chityny, następnie metody jej izolacji lub ekstrakcji oraz zastosowania w preparatach medycznych i formulacjach farmaceutycznych, w tym w leczeniu dermatologicznym. Ponadto niektóre patenty dotyczyły formulacji kosmetycznych oraz produkcji peptydów lub białek [4].

Spośród 268 przeanalizowanych patentów, 137 odnosiło się do chitozanu, przy czym ponad 50% dotyczyło konwersji chityny do chitozanu. Stosunkowo niewielka liczba zgłoszeń opartych na czystej chitynie sugeruje, że jej ograniczona przydatność przemysłowa może wynikać z jej obojętnej natury fizykochemicznej lub braku skutecznych metod izolacji [4].

Badania przeprowadzono na patentach opublikowanych w latach 1996–2021, które zawierały terminy „chityna” i „chitozan”. Według statystyk patentowych 45% wszystkich zarejestrowanych patentów pochodziło z Chin, następnie ze Stanów Zjednoczonych (14%) i Japonii (7%). Analiza wykazała, że materiałoznawstwo, chemia/biochemia i biotechnologia oraz farmacja stanowią obszary największej aktywności patentowej. Ponadto liczba patentów wzrosła w latach 2004–2020, co odpowiada rosnącej komercjalizacji przemysłowej chityny [4].

4 Teza oraz cel pracy

Celem pracy jest zgłębienie wiedzy na temat unikalnych, trójwymiarowych skafoldów chitynowych z gąbek. Badane materiały stanowią naturalne matryce o złożonej strukturze wykorzystywane w bioinspirowanej nauce o materiałach. Gąbki uznawane są za najstarsze organizmy wielokomórkowe na Ziemi, a historia ich ewolucji sięga ponad 800 milionów lat. Analiza właściwości i struktury ich szkieletów ma istotne znaczenie z punktu widzenia badań podstawowych.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest zbadanie naturalnie prefabrykowanych, trójwymiarowych skafoldów chitynowych z gąbek z rzędu Verongiida jako odnawialnych matryc biologicznych oraz określenie możliwości ich modyfikacji chemicznej w kierunku otrzymywania bioinspirowanych materiałów.

Ze względu na szeroki zakres badań, pracę podzielono na następujące etapy:

1. Opracowanie szybkiej i nieinwazyjnej metody izolacji chityny z wykorzystaniem ultradźwięków.
2. Charakterystyka strukturalna i fizykochemiczna odnawialnych, trójwymiarowych skafoldów chitynowych.
3. **Po raz pierwszy** otrzymanie trójwymiarowego materiału kompozytowego złożonego z chityny oraz chitozanu poprzez częściową deacetylację naturalnych skafoldów chitynowych. Charakterystyka otrzymanych biokompozytów oraz ocena możliwości ich zastosowania jako katalizatora.
4. **Po raz pierwszy** rozpuszczenie matryc chitynowych z gąbek *Aplysina aerophoba* za pomocą rozcieńzonego roztworu wodorotlenku litu.
5. Zbadanie właściwości mechanicznych matryc chitynowych pochodzących z wybranych gatunków gąbek z rzędu Verongiida.

4 Teza oraz cel pracy

6. Określenie możliwości zastosowania matryc chitynowych z gąbki *Ianthella basta* jako odnawialnych materiałów do podawania środków antyseptycznych.
7. **Po raz pierwszy** szczegółowa analiza patentów dotyczących chitozanu zgłoszonych w latach 1988–2021.

Teza:

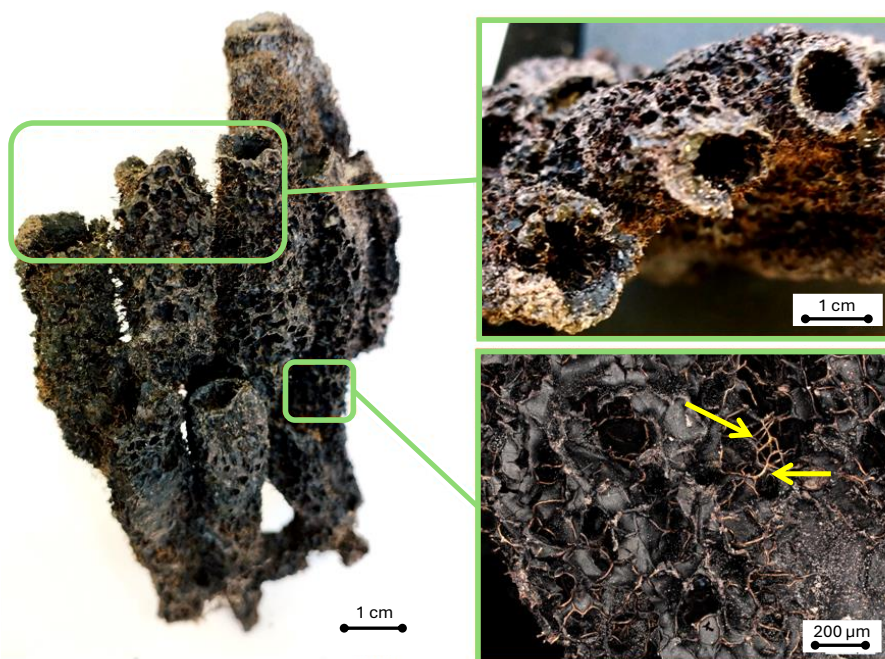
Naturalnie prefabrykowane, trójwymiarowe skafoldy chitynowe pochodzące z gąbek z rzędu Verongiida są izolowane oraz modyfikowane chemicznie bez utraty swojej struktury, co umożliwia opracowanie bioinspirowanych materiałów o szczególnych właściwościach mechanicznych.

5 Materiały i metody

5.1 Gąbki użyte w niniejszej pracy

5.1.1 Gąbka *Aplysina aerophoba*

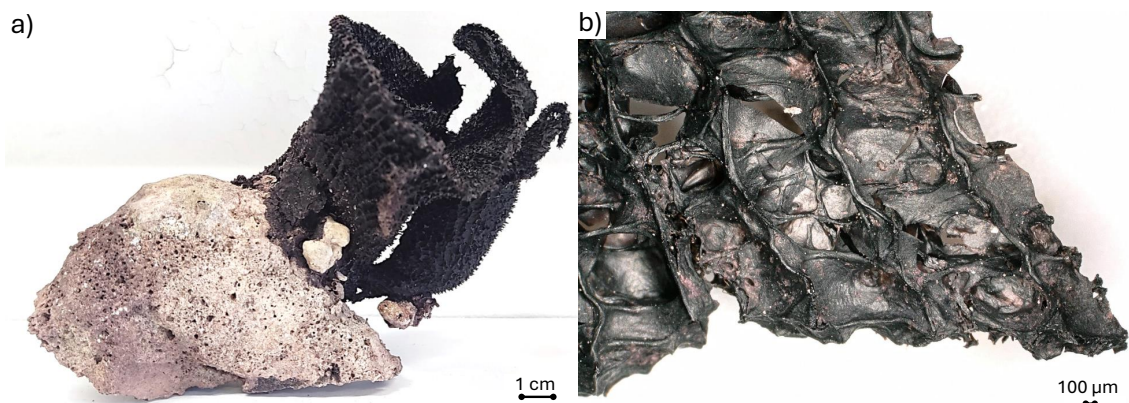
Okazy gąbki *Aplysina aerophoba* (Nardo, 1833) (rys. 5.1), zidentyfikowane przez prof. Zorana Klijaica w 2008 roku, pobrano z Zatoki Kotorskiej (Czarnogóra, Morze Adriatyckie) nurkując na głębokości 3–5 m w pobliżu stanowiska akwakultury morskiej. Pod wodą próbki umieszczono w woreczkach strunowych, przetransportowano do laboratorium i przepłukano wodą w celu usunięcia resztek soli. Następnie pozostawiono na siedem dni do wyschnięcia na powietrzu przed dalszą obróbką i przechowywano w plastikowych woreczkach strunowych.



Rysunek 5.1: Zdjęcie wysuszonego fragmentu gąbki *A. aerophoba*, ukazujące jej palczastą strukturę. Podczas procesu suszenia odsłonięte zostały chitynowe mikro-włókna szkieletowe (zaznaczone strzałkami), zaadaptowano z [278].

5.1.2 Gąbka *Ianthella basta*

Okaz wysuszonej gąbki *Ianthella basta* (Pallas, 1766) (rys. 5.2) pochodzącej z regionu Indo-Pacyfiku (Filipiny) pozyskano za pośrednictwem firmy INTIB GmbH z Freibergu w Niemczech.



Rysunek 5.2: Wysuszony okaz gąbki *Ianthella basta* na fragmencie skały (a) i obraz jego powierzchni uzyskany przy użyciu systemu mikroskopii cyfrowej (b), na podstawie [279].

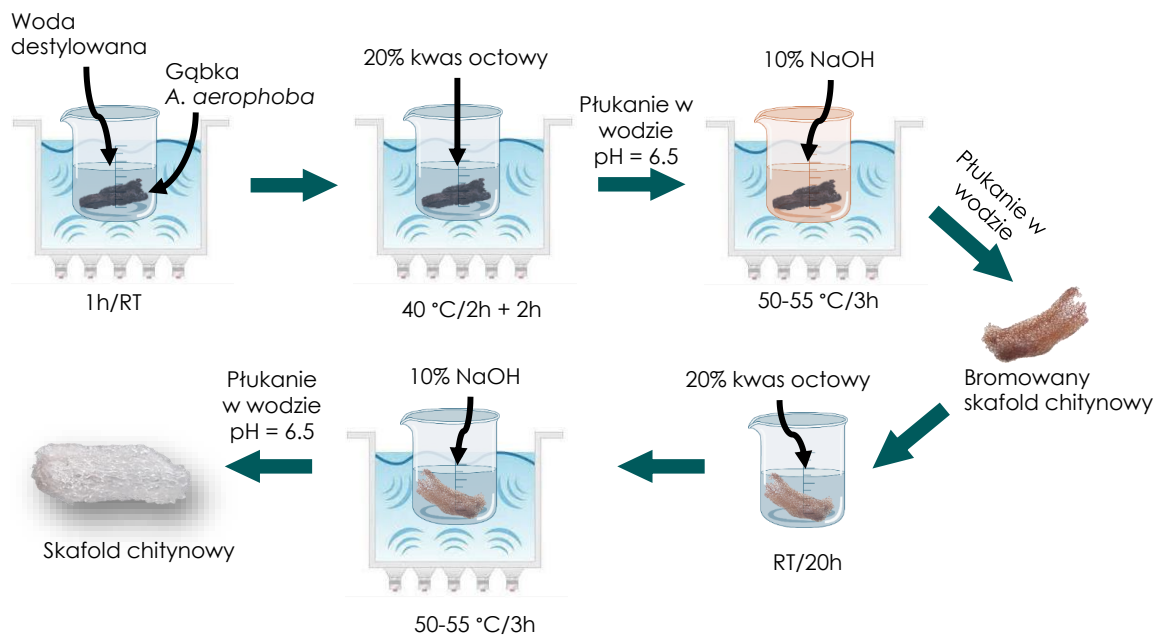
5.2 Izolacja chityny

5.2.1 Gąbka *Aplysina aerophoba*

Próbki gąbek umieszczono w 500 ml wody destylowanej i poddano działaniu ultradźwięków (Bandelin Sonorex DT 52H, Berlin, Niemcy) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie przeniesiono je do 500 ml 20% roztworu kwasu octowego (STANLAB Sp. z o.o., Lublin, Polska) i poddano działaniu ultradźwięków przez 2 godziny w temperaturze 40°C. Roztwór kwasu octowego zastąpiono świeżą porcją, a następnie poddano działaniu ultradźwięków przez kolejne 2 godziny w tych samych warunkach. Po tym etapie próbki przepłukano wodą destylowaną do momentu osiągnięcia obojętnego pH.

Następnie materiał zanurzono w 500 ml 10% roztworu NaOH (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) i poddano działaniu ultradźwięków przez 3 godziny w temperaturze 50 – 55°C. Powstałe skafoldy przemyto wodą destylowaną i umieszczono w 20% roztworze kwasu octowego na około 20 godzin w celu usunięcia resztek CaCO₃. Po opłukaniu wodą destylowaną, przeniesiono je do 200 ml roztworu NaOH o stężeniu 10% i poddano dalszemu działaniu ultradźwięków w temperaturze 50 – 55°C przez kolejne 3 godziny. Otrzymane czyste

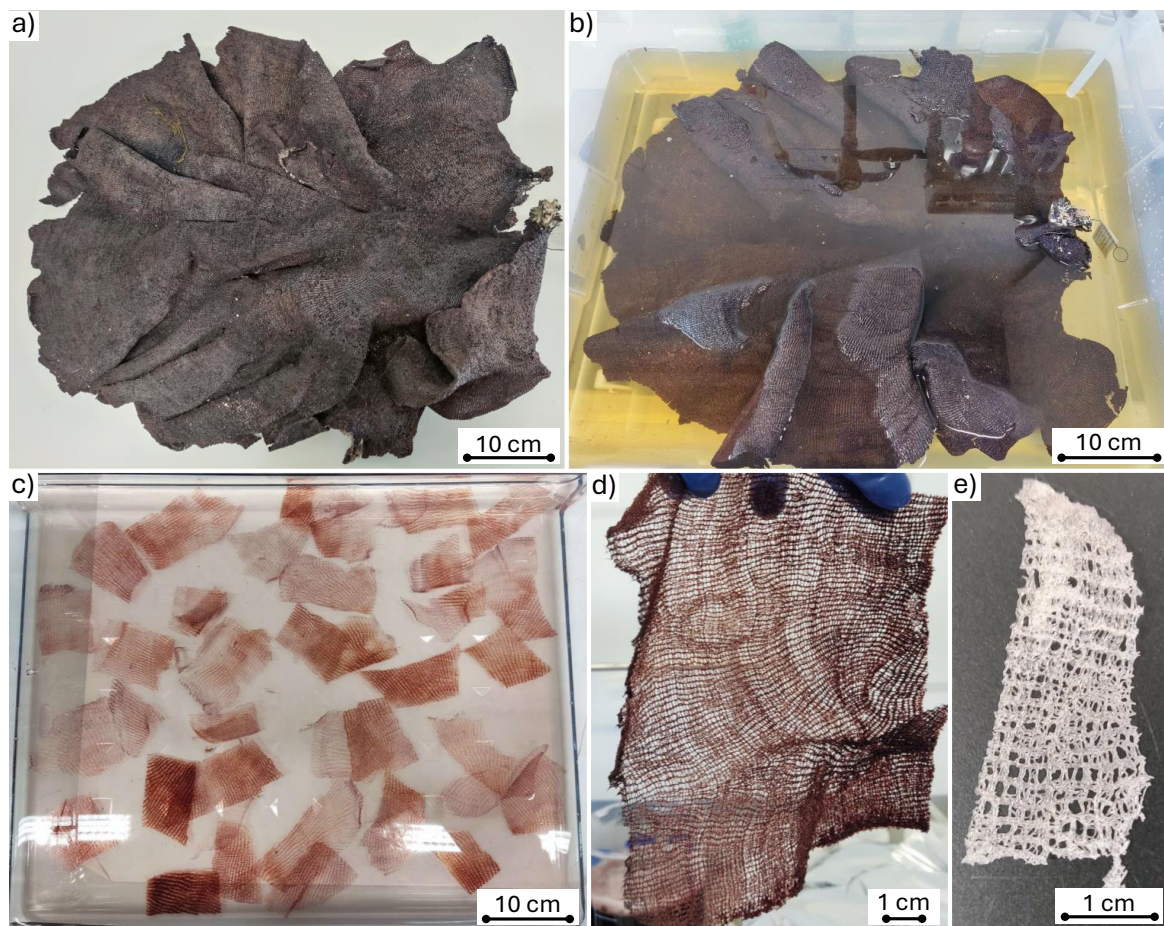
matryce chitynowe dokładnie przepłukano wodą destylowaną, aż do osiągnięcia neutralnego pH. Schemat procedury przedstawiono na rysunku 5.3.



Rysunek 5.3: Schematyczne przedstawienie procesu izolowania skafoldów chitynowych z gąbki *A. aerophoba*, na podstawie [280].

5.2.2 Gąbka *Ianthella basta*

Izolację chityny przeprowadzono zgodnie ze standardową, powszechnie uznaną metodą [141, 13]. Gąbkę *Ianthella basta* o wymiarach 50 x 35 cm (rysunek 5.4a) moczone najpierw w wodzie destylowanej przez 2 godziny w celu usunięcia soli (rys. 5.4b), a następnie pocięto na kawałki o wymiarach około 4 x 4 cm. Kawałki te zanurzono w 20% roztworze kwasu octowego w temperaturze pokojowej na 24 godziny. Następnie fragmenty szkieletu przepłukano wodą do uzyskania obojętnego pH, a następnie zanurzono w 10% roztworze NaOH w temperaturze 37°C na 48 godzin (rys. 5.4c i d). To naprzemienne działanie kwasu i zasady powtarzano przez 5 dni, aby uzyskać bezbarwne matryce chitynowe (rys. 5.4e).

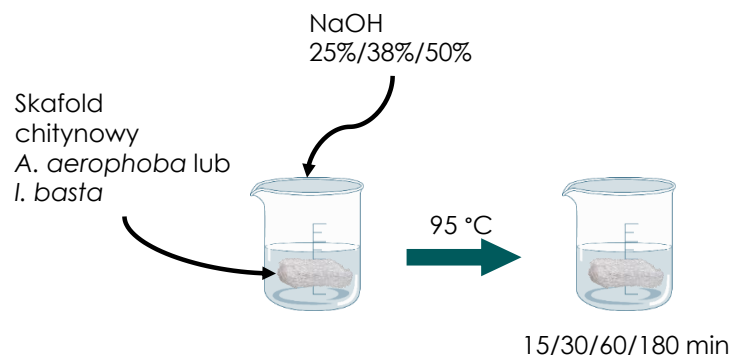


Rysunek 5.4: (a) Wysuszona gąbka *I. basta* przed izolacją chityny; (b) gąbka *I. basta* moczona w wodzie w celu zmiękczenia przed pocięciem na mniejsze kawałki; (c) pozabawione komórek, pocięte fragmenty gąbki *I. basta* (d) szkielet gąbki *I. basta* po obróbce kwasem octowym i roztworem wodorotlenku sodu; (e) otrzymany oczyszczony skafold chitynowy, na podstawie [279].

5.3 Przygotowanie kompozytów chitynowo-chitozanowych

Proces deacetylacji zastosowany do badanych próbek chityny z gąbek polegał na poddaniu ich obróbce w temperaturze 95°C z użyciem roztworów NaOH (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), o różnych stężeniach 25%, 38% i 50% (rys. 5.5). Obróbki te prowadzono przez określony czas, tj. 15, 30, 60 i 180 minut, aby ocenić zróżnicowanie efektów. Chitynę pochodzącą ze szkieletu gąbki *A. aerophoba* oraz *I. basta* poddano deacetylacji w temperaturze 95°C w wybranych czasach trwania w roztworach NaOH o stężeniu 25%, 38% i 50%, tworząc konstrukty chitynowo-chitozanowy. Zaobserwowano jednak, że próbki chityny *A. aerophoba* poddane działaniu 50% NaOH wykazywały niestabilność, tracąc integralność trójwymiarową podczas neutralizacji, podczas gdy próbki poddane działaniu 25% NaOH nie

zabarwiały się trwale podczas testu jodowego. Biorąc to pod uwagę, dalsze prace skoncentrowano na analizie skafoldów chitynowo-chitozanowych 3D, w których proces deacetylacji przeprowadzono w 38% roztworze NaOH.



Rysunek 5.5: Schematyczna reprezentacja procesu przygotowywania trójwymiarowych kompozytów chitynowo-chitozanowych, na podstawie [280].

5.4 Synteza nanokryształów Cu

Aby określić zdolności kompleksowania chityny i skafoldu chitynowo-chitozanowego otrzymanego z gąbki *A. aerophoba* z jonami miedzi(II), 10 mg każdego materiału umieszczono w 20 ml roztworu macierzystego 0,050 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{NH}_4\text{Cl}$ (Sigma-Aldrich). Oba skafoldy, zarówno z czystej chityny, jak i z chityny/chitozanu, pozostawiono w roztworze miedzi przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie oznaczono stężenie jonów Cu^{2+} za pomocą OES.

Redukcję jonów miedzi(II) przeprowadzono za pomocą fruktozy w środowisku zasadowym. 5 ml roztworu D(-)-fruktozy (Sigma-Aldrich) (150 mg/ml) ogrzano do temperatury około 60°C w szalce Petriego. Następnie dodano cztery krople 2,5 M NaOH. Po rozpoczęciu rozkładu fruktozy (pojawienie się żółtego koloru), próbki skafoldów chitynowych i chitynowo-chitozanowych, uprzednio zanurzone w badanym roztworze macierzystym i już skompleksowane z miedzią, dodano do roztworu. Następnie, uzyskane próbki dializowano wobec wody dejonizowanej, stosując membranę 14 kDa (Carl Roth, Niemcy). Próbki suszone na powietrzu badano za pomocą mikroskopu elektronowego SEM (ESEM XL 30, Phillips).

5.5 Procedura redukcji 4-nitrofenolu do 4-aminofenolu

2,5 ml wodnego roztworu 4-nitrofenolu (0,13 mM) zmieszano z 0,5 ml świeżo przygotowanego wodnego roztworu borowodorku sodu (0,1 M), uzyskując żółtą mieszaninę. Do powyższego roztworu dodano odpowiednią ilość katalizatora w celu rozpoczęcia redukcji. Reakcję prowadzono do momentu, aż roztwór stał się bezbarwny. Podczas reakcji mieszaninę stale mieszano, a postęp reakcji monitorowano za pomocą spektrofotometru UV-Vis (Jasco V-750). Widma rejestrowano po każdych 60 sekundach reakcji.

Obliczanie kinetyki redukcji:

Z uwagi na fakt, że stężenie NaBH_4 było znacznie wyższe niż stężenie 4-nitrofenolu, można je uznać za stałe w trakcie reakcji. W rezultacie reakcję uznano za model reakcji pseudo-pierwszego rzędu w odniesieniu do stężenia 4-nitrofenolu, a stałą reakcji (k) obliczono ze wzoru: $\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -kt$, gdzie C_t jest stężeniem 4-nitrofenolu w określonym czasie t , C_0 jest stężeniem początkowym, a k jest stałą szybkości reakcji pierwszego rzędu (s^{-1}).

5.6 Rozpuszczanie skafoldów chitynowych gąbek

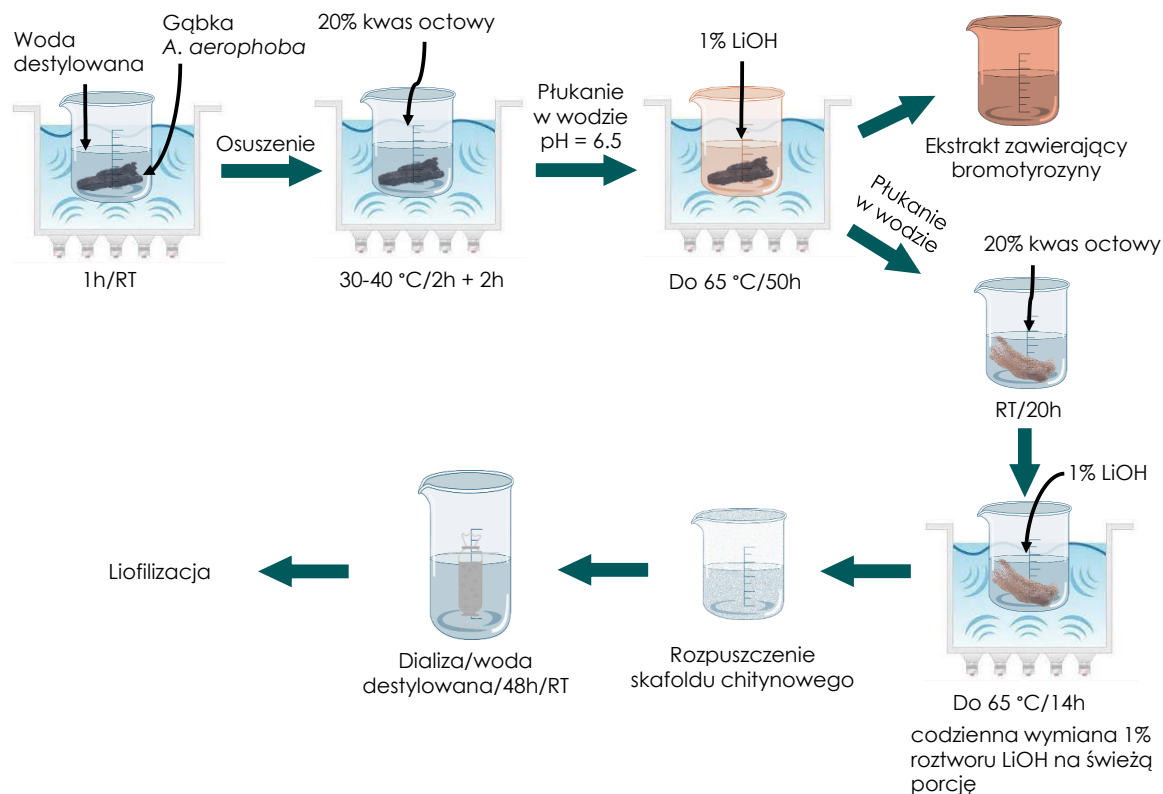
Gąbki *A. aerophoba* ostrożnie oczyszczono mechanicznie za pomocą nożyczek. Następnie umieszczono w 500 ml wody destylowanej i poddano działaniu ultradźwięków przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po delikatnym osuszeniu papierem, przeniesiono je do około 500 ml 20% kwasu octowego i poddano działaniu ultradźwięków przez 2 godziny w temperaturze 40°C . Następnie roztwór kwasu wymieniono na nowy, a proces powtórzono przez kolejne 2 godziny. Po zakończeniu procesu próbki przepłukano wodą destylowaną do momentu osiągnięcia obojętnego pH.

Gąbki zanurzono następnie w 500 ml 1% roztworu LiOH (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) i poddano działaniu ultradźwięków w temperaturze $50 - 55^\circ\text{C}$ przez 50 godzin. Powstałe skafoldy przepłukano wodą i inkubowano przez około 20 godzin w 20% kwasie octowym w celu usunięcia resztek węglanu wapnia. Następnie umieszczono je w 100 ml świeżego 1% roztworu LiOH i poddano działaniu ultradźwięków przez 15 godzin w temperaturze do 65°C , wymieniając roztwór LiOH (ok. 100 ml) codziennie.

Aby zakończyć proces, roztwór dializowano w wodzie destylowanej z użyciem membrany o gęstości 14 kDa (Carl Roth GmbH, Niemcy) przez 48 godzin w temperaturze po-

5.7 Otrzymywanie wodnego ekstraktu zawierającego bromotyrozyny

kojowej. Wodę wymieniano co 2 godziny, monitorując jednocześnie pH. Na koniec próbki liofilizowano w systemie Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ GmbH, Niemcy) przez 24 godziny w temperaturze -35°C . Schemat całej procedury przedstawiono na rysunku 5.6.



Rysunek 5.6: Schematyczna ilustracja procesu rozpuszczania szkieletu chitynowego gąbki *A. aerophoba* w LiOH, zaadaptowano z [278].

5.7 Otrzymywanie wodnego ekstraktu zawierającego bromotyrozyny

Wysuszony szkielet gąbki morskiej z gatunku *Ianthella basta* zanurzono w wodzie destylowanej na 30 minut w temperaturze pokojowej (RT) w celu zmiękczenia i usunięcia soli. Następnie pocięto go nożyczkami na kawałki o wymiarach 4 cm x 4 cm. Te fragmenty szkieletu umieszczono w 2-litrowej butelce z wodą destylowaną i inkubowano w temperaturze 50°C w komorze temperaturowej (Solid.Line FD-S 56, BINDER GmbH, Tuttlingen, Niemcy) przez 7 dni. Następnie fragmenty szkieletu oddzielono od ekstraktu wodnego za pomocą bibuły filtracyjnej. Na koniec, brązowy ekstrakt wodny suszono pod wyciągiem laboratoryjnym.

5 Materiały i metody

ryjnym w temperaturze pokojowej przez 15 dni. Z powstałej pozostałości w postaci proszku wyizolowano bromotyrozyny poprzez separację z mieszaniny przy użyciu $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ jako eluentu i chromatografii kolumnowej z żelem krzemionkowym jako fazą stacjonarną.



Rysunek 5.7: Schematyczne przedstawienie procedury ekstrakcji wodnego ekstraktu zawierającego bromotyrozyny gąbki *I. basta*.

5.8 Badania mikrobiologiczne

Przygotowane matryce chitynowe *I. basta* nasączono roztworami antyseptyków (tab. 5.1), a następnie pocięto na kwadraty o powierzchni 1 cm^2 , wysuszono na sterylnej bibule filtracyjnej, a następnie umieszczono w termostacie w temperaturze 37°C . Próbkę kontrolną umieszczono w sterylnej wodzie destylowanej lub 96% etanolu.

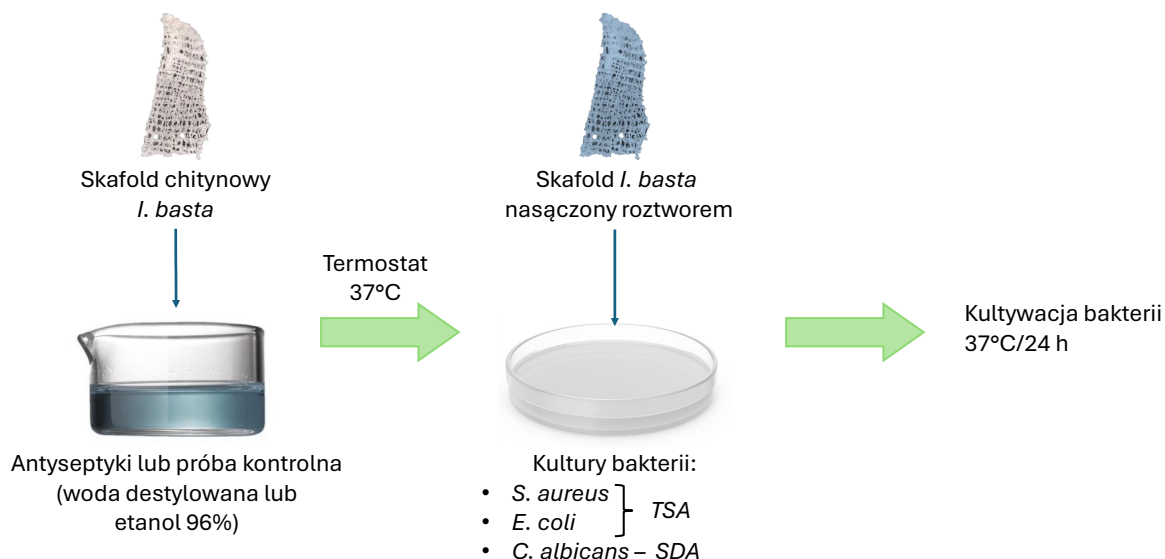
Tabela 5.1: Lista środków antyseptycznych użytych w badaniu, zaadaptowano z [279].

Środek antyseptyczny	Składnik aktywny	Rozpuszczalniki/ substancje pomocnicze	Producent	ATC WHO
Fiolet gencjanowy	1% (w/v) chlorek metylorozaniliny	etanol 96%	PPF HASCO-LEK Wrocław, Polska	D01AE02 Inne leki przeciwgrzybicze do stosowania miejscowego G01AX09 Inne leki przeciwwirusowe i antyseptyczne
Nadmanganian potasu	1% (w/v) nadmanganian potasu	woda oczyszczona	–	D08AX06 Inne środki antyseptyczne i dezynfekujące, utleniacze

Rivanol	0.1% (w/v) monohydrat mleczanu etakrydyny	woda oczyszczona	PPF HASCO-LEK Wrocław, Polska	D08AA01 Pochodne akrydyny
Jodyna	3% (w/v) jod	etanol 96% jodek potasu 1%	AVENA Osielesko, Polska	D08AG03 Produkty jodowe
Ekstrakt glicerynowy zawierający bromotyro- zyny	Ekstrakt glicerynowy z gąbki <i>A. aerophoba</i>	gliceryna	–	–
Zieleń brylantowa	1% (w/v) zieleń brylantowa	etanol 60%	BORSHCHAH- IVSKY CFP, Kijów, Ukraina	D08AX06 Inne środki antyseptyczne i dezynfekujące, barwniki
Olej rokitnikowy	Olej rokitnikowy 100%	–	FITOLIK, Iwano- Frankiowsk, Ukraina	D11A Inne preparaty dermatologiczne
Deksameta- zon	0.1% (w/v)	woda oczyszczona lub etanol 96%	YURIA- PHARM, Kijów, Ukraina	D08AJ10 Czwartorzędowe związki amoniowe
Poliheksanid	0.1% (w/v) poliamino- propylbigu- anid	woda oczyszczona	BLANIDAS, Kijów, Ukraina	D08AC05 Biguanidy

Suche próbki umieszczono na szalce Petriego ze świeżymi kulturami szczepów klinicznych bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) lub Gram-ujemnych (*Escherichia coli*) na agarze tryptozowo-sojowym (TSA) (GRASO BIOTEC, Polska) lub grzybów (*Candida albicans*) na agarze dekstrozowym Sabourauda (SDA) (GRASO BIOTEC, Polska) i hodowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po 24 godzinach obserwowano strefy zahamowania wzrostu. Próbki wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *S. aureus* przeniesiono sterylną pęsetą na szalkę Petriego ze świeżą kulturą tego samego mikroorganizmu. Hodowlę powtórzono pięciokrotnie z tymi samymi próbkami matrycy chitynowej i świeżymi kulturami bakterii. Wszystkie testy przeprowadzono z odpowiednią kontrolą sterylności środowiska odżywczego (TSA, SDA) i kontrolą wzrostu mikroorganizmów bez środka antyseptycznego. Rysunek 5.8 przedstawia schematyczną reprezentację procedury.

5 Materiały i metody



Rysunek 5.8: Schematyczna reprezentacja procedury badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych, zaadaptowano z [279].

Do oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej w matrycach eksperymentalnych wykorzystano szczepy kliniczne *S. aureus* i *E. coli* (wyizolowane z ropnych ran oparzeniowych) oraz *C. albicans* (wyizolowane od pacjenta z ostrym zapaleniem jamy ustnej). Szczepy kliniczne wyizolowano i hodowano w Zakładzie Mikrobiologii Narodowego Uniwersytetu Medycznego im. M. I. Pirogowa w Winnicy na Ukrainie.

5.9 Techniki charakteryzacji

5.9.1 Spektroskopia w podczerwieni z całkowitym osłabionym odbiciem (ATR–FTIR)

Widma w podczerwieni z transformacją Fouriera wszystkich próbek zarejestrowano za pomocą spektrometru FTIR Nicolet iS50 (Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Każda analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem wbudowanego akcesorium do pomiaru całkowitego osłabionego odbicia (ATR). Pomiary przeprowadzono w zakresie długości fal 4000 – 400 cm^{-1} . Następnie zarejestrowane widma poddano procedurom post-processingu, wykorzystując oprogramowanie OriginLab 2023 (OriginPro, wersja 2023), opracowanego przez OriginLab Corporation z siedzibą w Northampton, MA, USA. Szczegółowa analiza i interpretacja danych widmowych umożliwiła wgląd w charakterystykę strukturalną i zmienność składu próbek.

5.9.2 Mikroskopia cyfrowa

Do analizy porównawczej wykorzystano różnorodne techniki mikroskopowe. Mikroskopia cyfrowa obejmowała wykorzystanie takich systemów obrazowania, jak mikroskop cyfrowy VHX-6000 w połączeniu z obiektywami zmiennoogniskowymi VH-Z20R, zapewniającymi powiększenia do 200x, a także cyfrowy mikroskop optyczny Keyence VHX-7000 wyposażony w obiektywy zmiennoogniskowe VHX E20 (powiększenie do 100x) i VHX E100 (powiększenie do 500x), wszystkie pochodzące z firmy Keyence z Osaki w Japonii.

5.9.3 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) z analizą rentgenowską z dyspersją energii (EDX)

Skaningowa mikroskopia elektronowa została przeprowadzona za pomocą Quanta 250 FEG firmy FEI Ltd. (Czechy), wyposażonego w spektrometr rentgenowski z dyspersją energii i oprogramowaniem EDX Team Software. Pomiary wykonano w warunkach niskiej próżni, przy napięciu wynoszącym 10 kV.

5.9.4 Dyfrakcja rentgenowska (XRD)

Analizę dyfrakcji rentgenowskiej przeprowadzono za pomocą dyfraktometru proszkowego SmartLab Rigaku z Japonii z lampą CuK alfa, w zakresie 2θ od 3 do 80°, z krokiem skanowania 0,01 i prędkością skanowania 4°/min.

5.9.5 Mikroskopia fluorescencyjna

Mikroskopię fluorescencyjną próbek po barwieniu izotiocyanianem fluoresceiny przeprowadzono za pomocą mikroskopu odwróconego Olympus IX73 (Olympus, Tokio, Japonia), pracującego w zakresie widmowym Ex/Em = 460–495/510-IF nm, w celu zbadania specyficznych właściwości fluorescencyjnych próbek.

Do analizy barwienia Calcofluor White wykorzystano cyfrowy mikroskop fluorescencyjny Keyence BZ9000 (Keyence, Osaka, Japonia). Obrazy rejestrowano za pomocą obiektywów CFI Plan Apo 10x i CFI Plan Apo 40x z wykorzystaniem kanału DAPI (Ex/Em = 360/460 nm). Dla porównania wykonano również obrazowanie w jasnym polu.

5.9.6 Metody barwienia

5.9.6.1 Barwienie izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC)

Do selektywnego barwienia chitozanu użyto 5(6)-izotiocyjanianu fluoresceiny (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) o stężeniu 2 mg/ml w etanolu. Próbki chityny i chitozanu moczo w przygotowanym roztworze FITC i umieszczano w ciemności na 24 godziny. Następnie próbki płukano wodą destylowaną z ograniczonym dostępem światła, aż do momentu, gdy kolor wody płuczającej był bezbarwny. Próbki zbadano pod mikroskopem fluorescencyjnym Olympus IX73.

5.9.6.2 Próba jodowa

Zgodnie z procedurą opisaną przez Campbella [281], do próbek dodano kilka kropli 5% roztworu jodu rozpuszczonego w roztworze jodku potasu. Nadmiar roztworu usunięto, po czym dodano kilka kropli 1% roztworu kwasu siarkowego (STANLAB Sp. z o.o.). Następnie próbki dokładnie przepłukano wodą destylowaną i zbadano pod mikroskopem cyfrowym.

5.9.6.3 Barwienie czerwienią brylantową Cibacron

Pobrane próbki moczo w 0,3% roztworze czerwieni brylantowej Cibacron 3B-A (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) i dokładnie przemyto wodą destylowaną. Próbki zbadano pod mikroskopem cyfrowym.

5.9.6.4 Barwienie Calcofluor White (CFW)

Barwienie Calcofluor White (CFW) zastosowano do wykrycia wiązań glikozydowych β -(1 \rightarrow 3) i β -(1 \rightarrow 4), takich jak te występujące w chitynie. Aby przygotować próbki, dodano niewielką objętość 0,1 M mieszaniny KOH, gliceryny i wody (roztwór A), a następnie kilka kropli 0,1% roztworu CFW (Fluorescent Brightener M2R, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Przygotowane próbki przechowywano w ciemności przez 24 godziny. Po inkubacji przemyto je trzykrotnie wodą destylowaną i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej.

5.9.7 Testy potencjału zeta

Potencjał zeta powierzchni (SZP) trójwymiarowych próbek konstruktyw chitynowo-chitozanowych obliczono na podstawie pomiarów elektroosmotycznych wykonanych za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS (Malvern, Wielka Brytania) wyposażonego w akcesorium do pomiaru potencjału zeta. Jako znaczniki zastosowano 1 ml ujemnie naładowanych karboksylowanych cząstek lateksu polistyrenowego (ZTS1240 Malvern, Wielka Brytania) oraz dodatnio naładowanych amidynowych cząstek lateksu polistyrenowego (Thermo Fisher Scientific, USA), przy odpowiednio dobranym pH roztworu. Pomiary przeprowadzono przy kącie rozproszenia $12,8^\circ$ (detekcja w kierunku przednim), z tłumikiem ustawionym w pozycji 9, częstotliwość zliczeń 2500-12000 kcps. Wykonano pięć pomiarów położenia w odstępach $125\ \mu\text{m}$, każdy z pięcioma powtórzeniami dla każdego kroku (każdy pomiar obejmował 30 podcykli z 60-sekundowymi interwałami). Ruchliwość znacznika elektroosmotycznego określono na podstawie 100 kolejnych powtórzeń pomiaru. Wszystkie pomiary wykonano w temperaturze 25°C .

5.9.8 Monotoniczny test ściskania

Wybrane próbki gąbek (*Dendrilla* sp., *A. fistularis*, *A. acheri*, *A. aerophoba*, *I. basta*) podzielono na dwie grupy: bromowane (S) (pozbawione komórek, zawierające bromotyrozyny) i chitynowe (C) (pozbawione komórek i związków bromu). Następnie próbki przechowywano w dejonizowanej wodzie do testu ściskania, a następnie wysuszono, zatopiono w żywicy i pocięto (na przekroje o grubości $1\ \mu\text{m}$ i $10\ \mu\text{m}$) do badania nanoindentacji.

Zachowanie mechaniczne próbek zbadano za pomocą monotonicznych testów ściskania. Przygotowano próbki w kształcie sześciangu o wymiarach około $10 \times 10 \times 4\ \text{mm}^3$. Test ściskania przeprowadzono przy użyciu aparatu Q800 (TA Instruments, USA) wyposażonego w uchwyty do ściskania, umożliwiające badanie w zanurzeniu. Próbki obciążone wstępnie do 0,001 N badano w roztworze natywnym (woda dejonizowana, 10% metanol) i ściskano ze stałą prędkością odkształcania 5%/min. Następnie przeprowadzono cykl odciążania z tą samą prędkością odkształcania. Krzywe modułu stycznego w funkcji odkształcenia wyznaczono na podstawie nachylenia krzywej naprężenie-odkształcenie przy danym odkształceniu. Dane eksperymentalne poddano analizie statystycznej za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testowi wielokrotnych porównań par Tukeya, wyko-

5 Materiały i metody

nanych w programie Origin 8. Wartość $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotną. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe ($n = 4$).

5.9.9 Nanoindentacja

Pomiary nanomechaniczne przeprowadzono za pomocą nanoindenteru Agilent G200. Zastosowano głowicę pomiarową DCMII, wykonując wgłębienia o maksymalnej głębokości 1600 nm. Podczas pomiarów zastosowano tryb CSM (Continuous Stiffness Measurement). Użyty wgłębnik był wykonany z diamentu i posiadał geometrię typu Berkovicha. Przed pomiarem przyrząd skalibrowano metodą Olivera-Pharra [282]. Pomiary wykonywano na włóknach unieruchomionych w żywicy, w centralnej części ich przekroju poprzecznego. Każdy rodzaj włókna analizowano wykonując serię wgłębień w kilku miejscach dla kilku włóknach ($n = 10$) w danej serii pomiarowej. Podane błędy wyznaczonych parametrów odpowiadają odchyleniom standardowym uzyskanych wyników. Dane eksperymentalne podano analizie statystycznej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu wielokrotnych porównań par Tukeya. Wartość $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotną. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe ($n = 10$).

5.9.10 Oszacowanie stopnia acetylacji

Metoda oceny opiera się na wyznaczaniu stosunków między wartościami widma pochodnego zarówno dla pasma pomiarowego, jak i pasma odniesienia. Metoda pochodnych FTIR wykorzystuje minimum przy 1164 cm^{-1} jako punkt odniesienia, a maksimum przy 1364 cm^{-1} jako punkt pomiaru. Minimum przy 1164 cm^{-1} stanowi optymalny punkt odniesienia, gdyż odpowiada maksymalnemu wzrostowi asymetrycznego drgania rozciągającego mostka C–O–C i nie jest zakłócanie przez sąsiedni sygnał przy 1204 cm^{-1} . Zakres liczb falowych obejmujący tę wartość charakteryzuje się stabilną, przypominającą plateau absorpcją związaną z obecnością wody, co minimalizuje jej wpływ na wyniki pomiarów próbek.

Widma znormalizowano przy użyciu pasma odniesienia przy 1164 cm^{-1} . Tylko skrajne wartości oscylacji deformacji amidu III i symetrycznej CH_3 nadają się do pomiaru. Pasma amidu I i amidu II nie są jednak idealne ze względu na interferencję z atmosferyczną parą wodną, która powoduje znaczny szum. Maksimum przy 1364 cm^{-1} wybrano jako pasmo pomiarowe, ponieważ wykazuje ono stały spadek wraz ze wzrostem deacetylacji.

Kalibrację ATR-FTIR przeprowadzono z użyciem próbek chityny i chitozanu uzyskanych podczas deacetylacji *A. aerophoba* w 38% roztworze NaOH, wraz ze standardami chityny i chitozanu. Poziomy acetylacji mierzono metodą UV/Vis, zgodnie z metodą Zivanovic [283]. Zależność między skrajnymi stosunkami wartości a stopniem acetylacji jest wielomianem trzeciego stopnia. Punkt przegięcia krzywej znajduje się w pobliżu 50% acetylacji, co wskazuje na przejście między chityną a chitozanem.

Poziomy acetylacji badanych próbek kompozytu chityna-chitozan określono za pomocą funkcji kalibracyjnej:

$$y = (2 \cdot 10^{-6})x^3 - (2.84 \cdot 10^{-4})x^2 + (1.87 \cdot 10^{-2})x + 0.154$$

Poziomy acetylacji próbek obliczono i przedstawiono w tabeli 5.2 oraz 5.3.

Tabela 5.2: Obliczone stopnie acetylacji dla próbek chityny/chitozanu *A. aerophoba* uzyskanych podczas deacetylacji w 38% roztworach NaOH w temperaturze 95 °C oraz dla wzorców α -chityny i chitozanu, zaadaptowano z [280].

Próbka	Stopień acetylacji
α -Chityna wzorzec	86%
<i>Aplysina aerophoba</i> chityna	95%
<i>A. aerophoba</i> chityna/chitozan 38% 15 min	63%
<i>A. aerophoba</i> chityna/chitozan 38% 30 min	56%
<i>A. aerophoba</i> chityna/chitozan 38% 60 min	48%
<i>A. aerophoba</i> chityna/chitozan 38% 180 min	26%
Chitozan wzorzec	9%

Tabela 5.3: Obliczone stopnie acetylacji dla próbek chityny/chitozanu *I. basta* uzyskanych podczas deacetylacji w roztworach NaOH w temperaturze 95 °C oraz dla wzorców α -chityny i chitozanu.

Próbka	Stopień acetylacji
α -Chityna wzorzec	86%
<i>Ianthella basta</i> chityna	95%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 25% 15 min	87%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 25% 30 min	80%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 25% 60 min	74%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 25% 180 min	61%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 38% 15 min	61%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 38% 30 min	44%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 38% 60 min	35%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 38% 180 min	28%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 50% 15 min	32%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 50% 30 min	29%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 50% 60 min	21%
<i>I. basta</i> chityna/chitozan 50% 180 min	19%
Chitozan wzorzec	9%

5.9.11 Optyczna spektroskopia emisyjna (OES)

Oznaczenie stężenia miedzi przeprowadzono metodą optyczną za pomocą spektrometru emisyjnego Perkin-Elmer Optima 7000DV.

6 Wyniki i dyskusja

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych skafoldów kompozytowych z chityny i chitozanu

Brak jest doniesień dotyczących zastosowania matryc chitynowych z gąbek do produkcji chitozanu. Wynika to z faktu, że degradacja chityny o unikalnej, prefabrykowanej strukturze w formie skafoldów, w celu uzyskania sproszkowanego chitozanu jest nieuzasadniona. W przypadku surowców pochodzących z grzybów lub skorupiaków takie postępowanie jest powszechnie stosowane [184, 253]. Chitozan stanowi rodzinę polimerów składających się z wydłużonych łańcuchów jednostek N-acetyloglukozaminy. Jego klasyfikacja opiera się na stopniu deacetylacji, dzieląc go na cztery grupy: niski (55%-70%), średni (70%-85%), wysoki (85%-95%) i ultrawysoki (95%-100%) [284]. W zakresie masy cząsteczkowej od 50 do 2000 kDa chitozan jest nierozpuszczalny w wodzie i roztworach zasadowych, jednak łatwo rozpuszcza się w niemal wszystkich wodnych roztworach kwasów. Jego aktywność biologiczna jest związana z umiejscowieniem grup siarczanowych przyłączonych do reszt glukozaminy [285]. Obecność grup polarnych zapewnia doskonałą higroskopijność, retencję wilgoci [286] oraz przyciąganie elektrostatyczne, ułatwiając w ten sposób mukoadhezję [287].

Obecnie produkcja chitozanu opiera się głównie na metodach biologicznych i chemicznych [5]. Strategia biologiczna wykorzystuje deacetylazę chityny, która jest mniej szkodliwa dla środowiska. Niemniej jednak, wysokie koszty i zmienne stopnie deacetylacji (DD%) związane z tą metodą ograniczają jej atrakcyjność dla zastosowań przemysłowych [51]. Pod względem chemicznym chitozan wytwarza się poprzez obróbkę chityny silnie zasadowym roztworem, często przekraczającym 100°C, przez dłuższy czas, przy stężeniu NaOH sięgającym 50%, a w niektórych przypadkach nawet 70% [248]. Stopień deacetylacji wzrasta wraz z czasem trwania reakcji, temperaturą i stężeniem zasady. Chociaż metoda ta prowa-

dzi do redukcji masy cząsteczkowej i generuje znaczne ilości toksycznych ścieków, jej prostota i skuteczność sprawiają, że jest ona preferowanym procesem przemysłowym [288]. Co więcej, współczesne badania zgłębiają zastosowanie cieczy jonowych do deacetylacji chityny, ujawniając ich potencjał w zakresie zwiększania aktywności deacetylazy chitynowej i podnoszenia stopnia deacetylacji chitozanu [289]. Pomimo tych korzyści, wygórowane koszty, długi czas reakcji i implikacje ekologiczne związane ze stosowaniem cieczy jonowych stanowią poważne bariery dla ich szerokiej integracji w praktyce przemysłowej. Chitozan jest wykorzystywany do produkcji różnego rodzaju membran, porowatych błon i skafoldów [290–292]. Wszystko to wiąże się z użyciem dodatkowych odczynników i kosztów energii [293–295], ponieważ odpowiedni proszek chitozanowy musi zostać przekształcony w odpowiednią konstrukcję strukturalną.

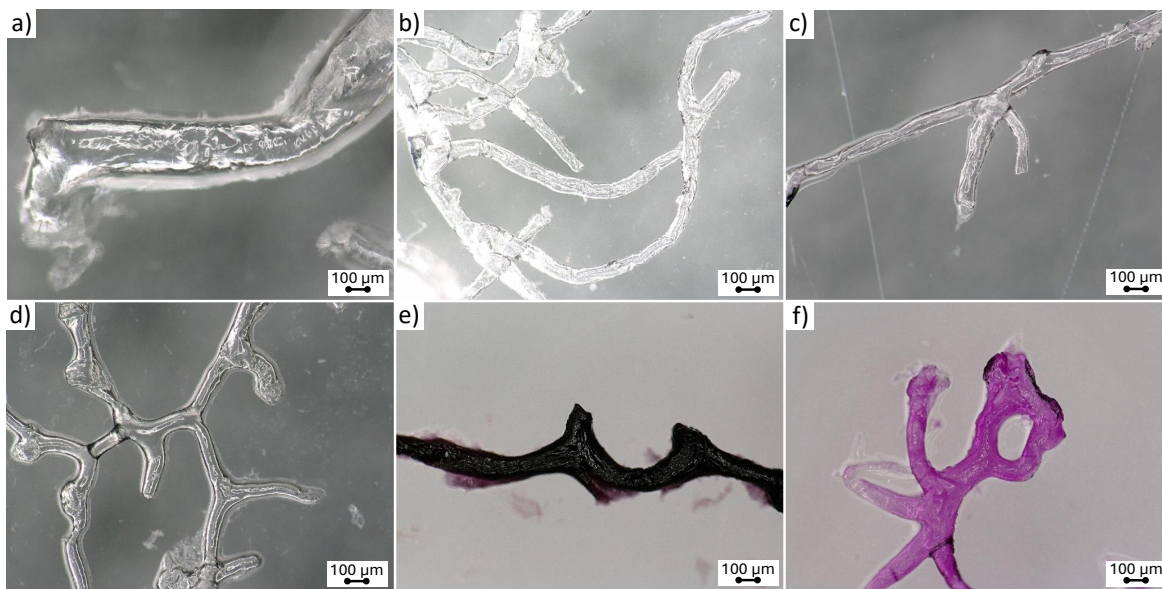
Jednak w przypadku już istniejących skafoldów z trójwymiarowej chityny problemy te nie występują. Ideą przewodnią niniejszego badania było potwierdzenie możliwości uzyskania warstw chitozanu na powierzchni mechanicznie wytrzymałych włókien chitynowych pochodzących z gąbek w taki sposób, aby architektura trójwymiarowego szkieletu chitynowego została zachowana. Celem pracy było stworzenie strukturalnej matrycy kompozytowej chityna/chitozan, która przypominałaby rozmiarem i kształtem pierwotny szkielet chitynowy hodowanej gąbki morskiej *Aplysina aerophoba* oraz *Ianthella basta*. Chociaż kompozyty chityna/chitozan zostały wcześniej opisane w nielicznych pracach naukowych [296–298], wyróżniająca się innowacja tkwi w otrzymaniu skafoldów 3D, które wykorzystują nieodłączne zalety tych biopolimerów. Potencjalna skalowalność procesu produkcyjnego, w połączeniu z możliwością adaptacji skafoldów do różnych zastosowań biomedycznych, podkreśla znaczenie tej procedury. Zbadanie skafoldów 3D na bazie chityny/chitozanu pozwoli na stworzenie podstaw dla przyszłych innowacji w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej [299], zapowiadając nową erę biokompatybilnych i zrównoważonych biomateriałów pochodzenia morskiego.

6.1.1 Wyniki

Identyfikacja warstwy chitozanu na powierzchni matrycy chitynowej nie jest prostym zadaniem. W celu uwidocznienia i rozróżnienia chityny i chitozanu została przeprowadzona analiza barwienia tych dwóch strukturalnie podobnych, ale funkcjonalnie odrębnych poli-

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych skafoldów kompozytowych z chityny i chitozanu

sacharydów. Rysunek 6.1 ukazuje serię obrazów z mikroskopii cyfrowej, przedstawiających chitynę i kompozyt chitynowo-chitozanowy *A. aerophoba* otrzymany w wyniku działania 38% roztworu NaOH przez 60 minut, analizowane zarówno za pomocą testu barwienia jodowego, jak i barwnika Cibacron Brilliant Red (CBR).



Rysunek 6.1: Zdjęcia z mikroskopii cyfrowej przedstawiające skafold chitynowy gąbki *A. aerophoba* w różnych stadiach: (a) bez obróbki, (b) po teście jodowym i (c) po barwieniu CBR. Brak widocznego zabarwienia. Natomiast zdjęcia skafoldu chitynowo-chitozanowego uzyskane po 60 minutach w temperaturze 95°C i działaniu 38% roztworem NaOH wykazują (d) brak zabarwienia w stanie bez obróbki, (e) ciemnofioletowe zabarwienie po teście jodowym i (f) różowe zabarwienie po barwieniu CBR. Podczas gdy chityna całkowicie traci kolor po przemyciu wodą, chitozan zachowuje swoje zabarwienie, zaadaptowano z [280].

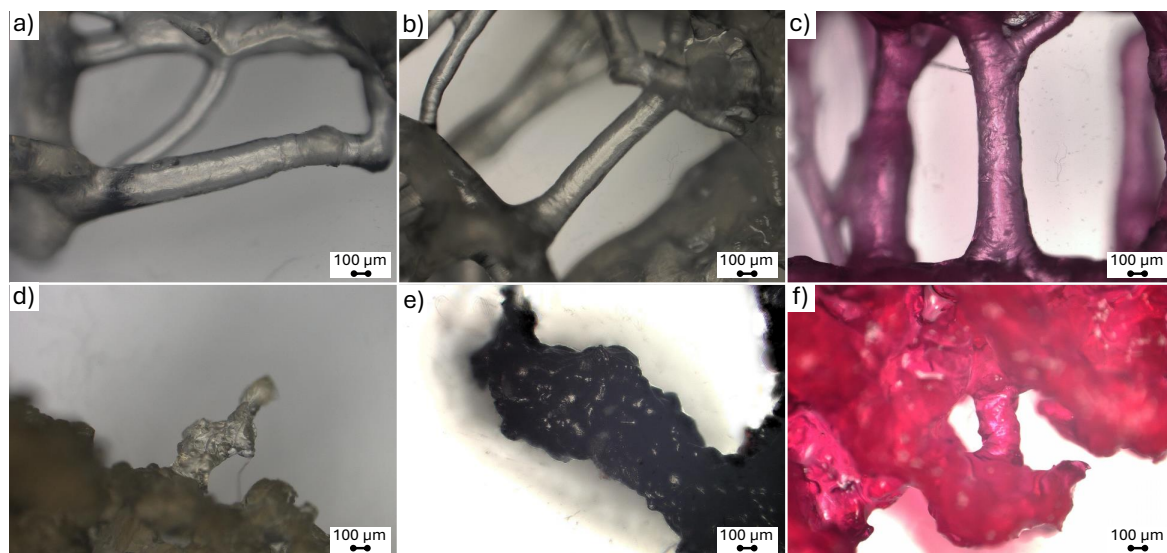
Test jodowy, znany również jako metoda van Wisselingha [281], jest kluczowy w odróżnianiu chityny od chitozanu. Rys. 6.1a i 6.1d przedstawiają początkowy wygląd skafoldów chitynowych i chitynowo-chitozanowych *A. aerophoba* przed barwieniem. Po barwieniu chitozan przyjmuje odcień od głębokiego fioletu do prawie czarnego, który pozostaje niezmienny nawet po dokładnym płukaniu wodą dejonizowaną (rys. 6.1e). Z kolei chityna początkowo ma pomarańczowe lub brązowe zabarwienie, które zanika po wielokrotnym płukaniu (rys. 6.1b).

Cibacron Brilliant Red (CBR), powszechnie znany ze swojego zastosowania w ilościowym określaniu stężenia chitozanu metodami spektrofotometrycznymi UV [300–302], pokazuje wyraźny kontrast w wynikach barwienia chitozanu i chityny. Po nałożeniu na skafoldy chi-

6 Wyniki i dyskusja

tozanowe, CBR nadaje żywe, trwałe różowe zabarwienie (rys. 6.1f). Kolor ten nie znika po przemyciu wodą destylowaną. Dla porównania, chociaż chityna początkowo absorbuje barwnik CBR i wydaje się różowa, traci to zabarwienie po płukaniu (rys. 6.1c).

Wyniki barwienia gąbki *I. basta* (rys. 6.2) wyglądają bardzo podobnie z tą różnicą, że chityna po barwieniu CBR (rys. 6.2c) nie odbarwiła się całkowicie, co świadczy o silniejszym wiązaniu tego barwnika przez chitynę z tego gatunku gąbki.



Rysunek 6.2: Zdjęcia z mikroskopii cyfrowej przedstawiające skafold chitynowy gąbki *I. basta* w różnych stadiach: (a) bez obróbki, (b) po teście jodowym i (c) po barwieniu CBR. Natomiast zdjęcia skafoldu chitynowo-chitozanowego uzyskane po 60 minutach w temperaturze 95°C i działaniu 38% roztworem NaOH wykazują (d) brak zabarwienia w stanie bez obróbki, (e) ciemnofioletowe zabarwienie po teście jodowym i (f) różowe zabarwienie po barwieniu CBR. Podczas gdy chityna traci intensywny kolor po przemyciu wodą, chitozan zachowuje swoje zabarwienie.

Chityna ze względu na swoją acetylowaną strukturę nie wchodzi w interakcje z jodem, dlatego zazwyczaj wytwarza jedynie delikatny brązowy kolor, który zanika po przepłukaniu wodą [303]. Natomiast chitozan, który zawiera wolne grupy aminowe, łatwo wiąże się z jodem. Ta interakcja tworzy kompleksy z przeniesieniem ładunku, które nadają głęboki fioletowy kolor. Kolor ten jest jednak niestabilny w temperaturze pokojowej i ma tendencję do blaknięcia z czasem [304].

Barwnik Cibacron Brilliant Red tworzy znacznie silniejsze i bardziej specyficzne wiązania z chitozanem poprzez oddziaływania elektrostatyczne. Grupy sulfonowe barwnika ($-\text{SO}_3^-$) wiążą się z protonowanymi grupami aminowymi ($-\text{NH}_3^+$) w chitozanie w środowi-

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych skafoldów kompozytowych z chityny i chitozanu

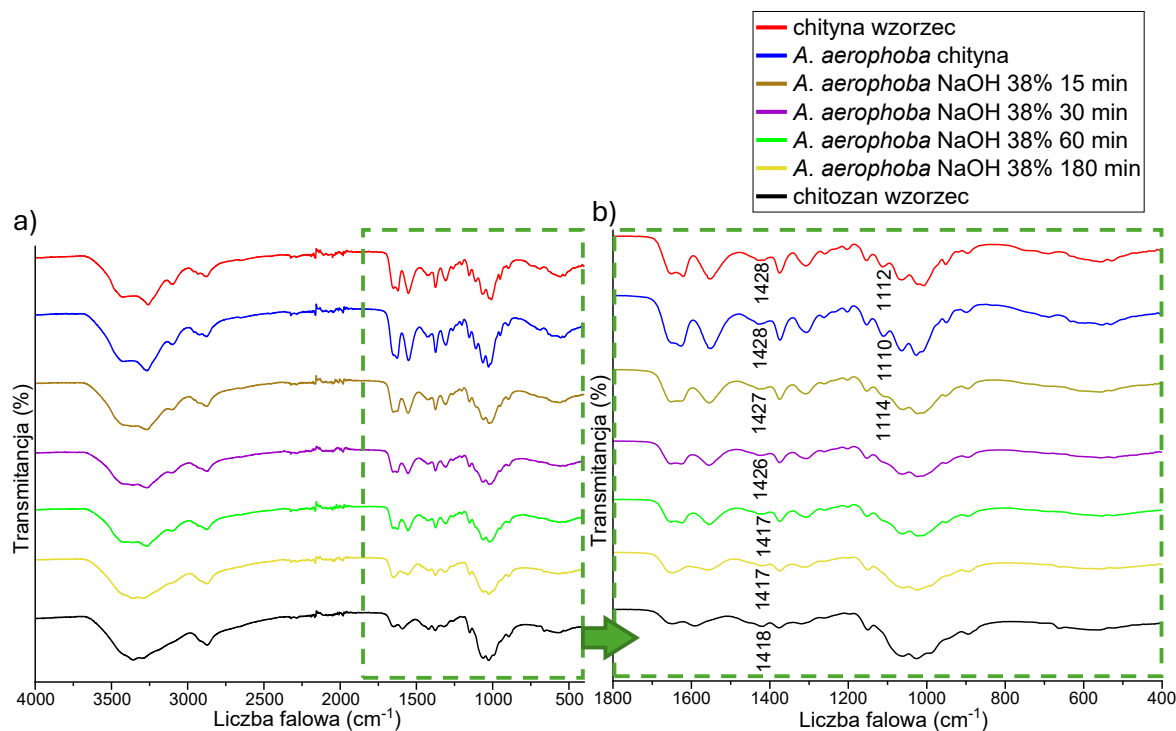
sku kwaśnym, co skutkuje trwałym zabarwieniem [302, 305].

Jak stwierdzili Giles i Hassan (1958), grupy hydroksylowe w chitynie są silnie uwodnione w wodzie, co znacznie ogranicza ich zdolność do tworzenia wiązań wodorowych z barwnikami. Niemniej jednak barwniki mogą nadal adsorbować się na chitynie poprzez wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waalsa i wymianę jonową z innymi grupami funkcyjnymi chityny [306]. Może to wyjaśniać słabsze i mniej stabilne barwienie chityny obserwowane w przypadku barwnika Cibacron Brilliant Red.

Te techniki barwienia nie tylko ułatwiają wizualne odróżnienie chityny od chitozanu, ale także podkreślają odmienne właściwości chemiczne i fizyczne tych biopolimerów. Trwałe zabarwienie chitozanu zarówno jodyną, jak i CBR umożliwia potwierdzenie jego obecności w otrzymanych skafoldach chitynowo-chitozanowych.

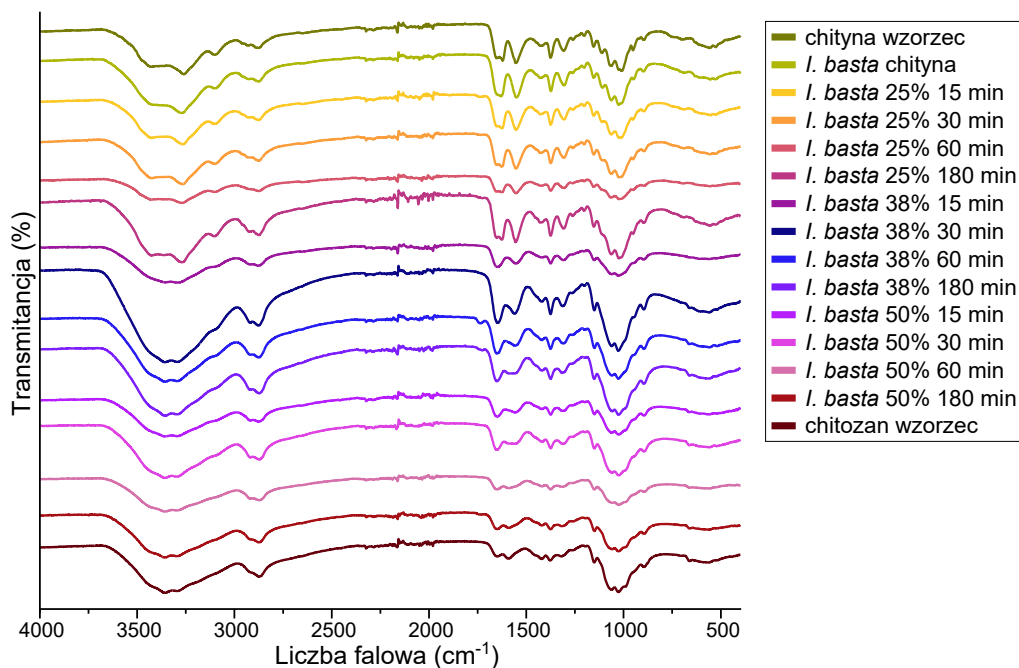
Podczas otrzymywania kompozytów zaobserwowano, że próbki chityny *A. aerophoba* poddane działaniu 50% NaOH wykazywały niestabilność, tracąc integralność trójwymiarową podczas neutralizacji. Natomiast próbki poddane działaniu 25% NaOH ulegały odbarwieniu podczas testu jodowego. Biorąc to pod uwagę, dalsze prace skoncentrowano na analizie skafoldów chitynowo-chitozanowych, w których deacetylację przeprowadzono w 38% roztworze NaOH. Rysunek 6.3 przedstawia widma w podczerwieni wszystkich próbek poddanych działaniu 38% roztworu NaOH, pokazując stopniowe zanikanie pasma około 1110 cm^{-1} oraz przesunięcie pasma charakterystycznego dla chityny z 1428 cm^{-1} do 1417 cm^{-1} w próbkach po 60 i 180 minutach, co odzwierciedla zachowanie zaobserwowane w przypadku wzorca chitozanu. Analiza FTIR sugeruje, że próbka otrzymana po 30 minutach przypomina widmo chityny, a próbka po 180 minutach – chitozan. Próbka chityny *A. aerophoba* poddana działaniu 38% roztworu NaOH przez 60 minut wskazuje na korzystną równowagę chityny i chitozanu oraz zachowuje kolor podczas testu jodowego, w przeciwieństwie do próbki otrzymanej po 15 minutach, która uległa odbarwieniu. Ze tego względu próbka chityny *A. aerophoba* poddana działaniu 38% roztworu NaOH przez 60 minut została wybrana do dalszych analiz.

6 Wyniki i dyskusja



Rysunek 6.3: Widma FTIR próbek otrzymanych w 38% roztworze NaOH, w porównaniu ze wzorcami chityny i chitozanu oraz chityną z gąbki *A. aerophoba*, w zakresach (a) 4000–400 cm^{-1} i (b) 1800–400 cm^{-1} , zaadaptowano z [280].

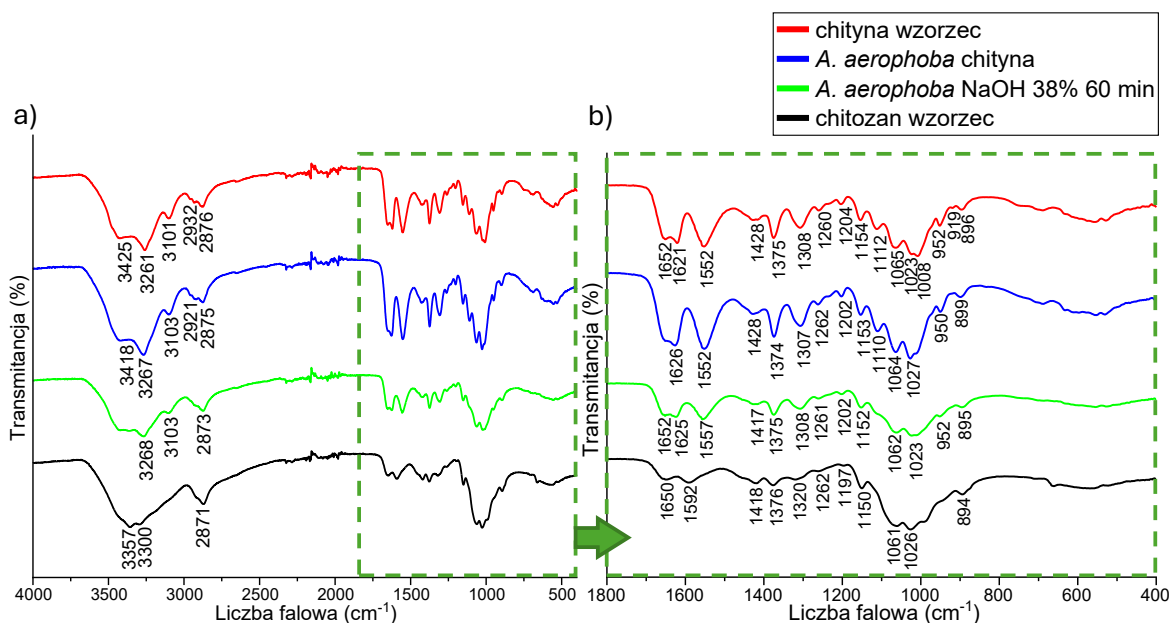
W przypadku próbek otrzymanych z gąbki *I. basta* wszystkie zachowały stabilność co pozwoliło na wykonanie ich widm FTIR (rys. 6.4).



Rysunek 6.4: Widma FTIR próbek otrzymanych w wyniku deacetylacji chityny z gąbki *I. basta*, w porównaniu ze wzorcami chityny i chitozanu oraz chityną z gąbki *I. basta*, w zakresach (a) 4000–400 cm^{-1} i (b) 1800–400 cm^{-1} .

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych szkieletów kompozytowych z chityny i chitozanu

Rysunek 6.5 przedstawia widmo FTIR kompozytu pochodzącego z gąbki *A. aerophoba* po 60-minutowym działaniu 38% roztworu NaOH w temperaturze 95°C porównywane z widmami wzorców chityny i chitozanu, a także z widmem chityny z gąbki *A. aerophoba*. Uzyskany konstrukt wykazuje charakterystykę widmową zbliżoną do wzorców chityny i chitozanu. Co godne uwagi, widmo wytworzonego chitozanu ujawnia pasma przy 3103 cm⁻¹ (wskazujące na drgania rozciągające N-H), 1625 cm⁻¹ (drgania amidu I) i 952 cm⁻¹ (drgania kołyszące CH₃), które są podobne do tych zaobserwowanych w widmie chityny, ale nie w widmie wzorca chitozanu. Natomiast pasmo przy 1417 cm⁻¹, które odpowiada drganiom zginającym CH₂, pasuje do wzorca chitozanu, różniąc się od 1428 cm⁻¹ obecnego w widmie FTIR chityny. Ponadto pasmo około 1110 cm⁻¹, związane z rozciąganiem C-O-C i C-O, jest słabo widoczne w widmie produktu, w przeciwieństwie do jego wyraźnego pojawienia się w widmie chityny i jego braku w widmie wzorca chitozanu. Szczegóły długości fal pasm i ich przypisania podano w tabeli 6.1.



Rysunek 6.5: Widma FTIR wzorca chityny, chityny *A. aerophoba*, kompozytu uzyskanego przez deacetylację chityny *A. aerophoba* przy użyciu 38% roztworu NaOH przez 60 min w temperaturze 95°C i wzorca chitozanu w zakresach (a) 4000–400 cm⁻¹ i (b) 1800–400 cm⁻¹, zaadaptowano z [280].

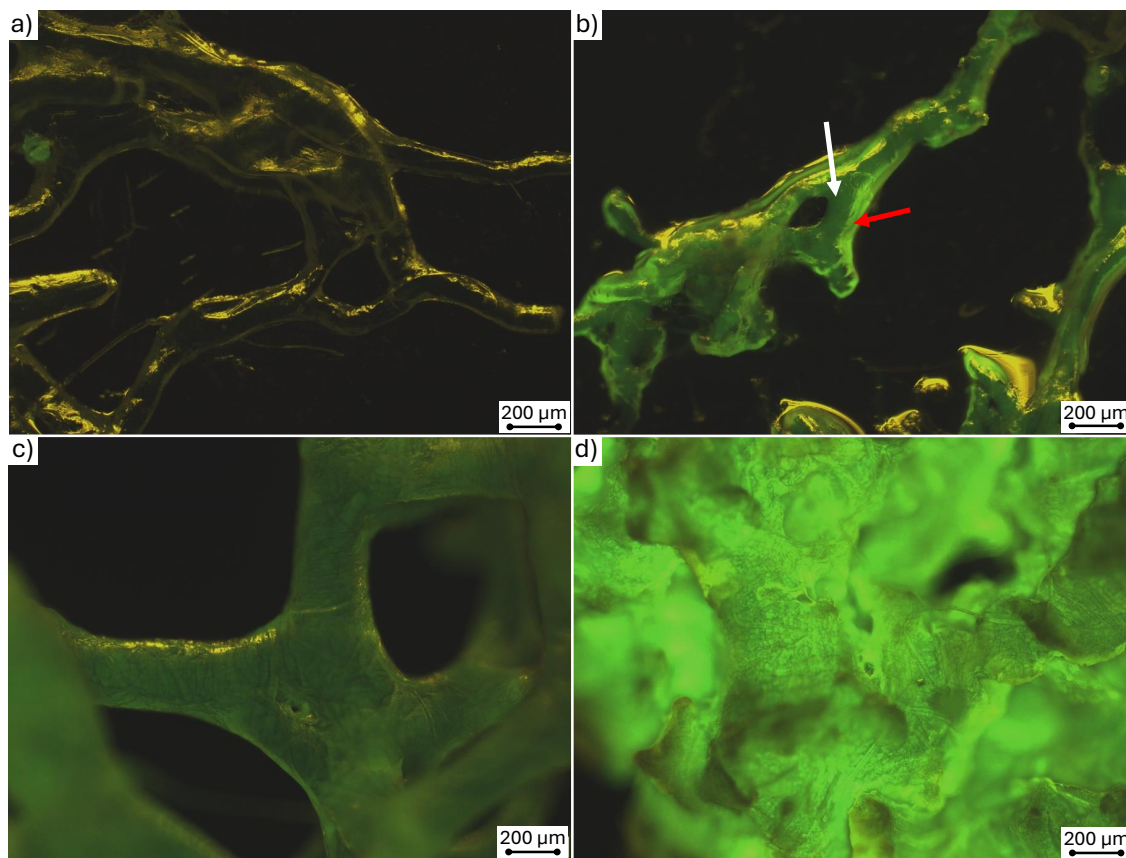
Tabela 6.1: Liczby falowe pasm FTIR wzorców chityny i chitozanu w porównaniu z chityną *A. aerophoba* i konstruktem *A. aerophoba* uzyskanym przy użyciu 38% roztworu NaOH przez 60 minut w temperaturze 95 °C oraz ich przyporządkowanie, zaadaptowano z [280].

Chityna wzorzec (cm ⁻¹)	<i>A. aerophoba</i> chityna (cm ⁻¹)	<i>A. aerophoba</i> chitozan (cm ⁻¹)	Chitozan wzorzec (cm ⁻¹)	Przypisanie pasm
3425	3418	-	3357	Drgania rozciągające O-H
3261	3267	3268	3300	Drgania rozciągające N-H
3101	3103	3103	-	Drgania rozciągające N-H
2932	2921	-	-	Drgania rozciągające CH _x
2876	2875	2873	2871	Drgania rozciągające CH _x
1652	-	1652	1650	Pasmo amidowe I
1621	1626	1625	-	Pasmo amidowe I
1552	1552	1557	1592	Pasmo amidowe II
1428	1428	1417	1418	Drgania zginające CH ₂
1375	1374	1375	1376	Drgania deformacyjne CH ₃
1308	1307	1308	1320	Pasmo amidowe III
1260	1262	1261	1262	Pasmo amidowe III
1204	1202	1202	1197	Pasmo amidowe III
1154	1153	1152	1150	Drgania rozciągające C-O-C, C-O
1112	1110	-	-	Drgania rozciągające C-O-C, C-O
1065	1064	1062	1061	Drgania rozciągające C-O-C, C-O
1023	1027	1023	1026	Drgania rozciągające C-O-C, C-O
1008	-	-	-	Drgania rozciągające C-O w pierścieniu fazowym
952	950	952	-	Drgania kołyszące CH ₃
896	899	895	894	Drgania rozciągające CH w pierścieniu

Izotiocyanian fluoresceiny (FITC) jest stosowany do specyficznej reakcji z grupami aminowymi obecnymi w chitozanie, tworząc kompleks fluorescencyjny, który ułatwia precyzyjną identyfikację chitozanu w próbkach [307–310]. W związku z tym, rozróżnienie badanych próbek chityny i kompozytu chityny/chitozanu zostało dodatkowo udoskonalone dzięki zastosowaniu mikroskopii fluorescencyjnej. W przypadku czystego skafoldu chitynowego gąbki *A. aerophoba* (rys. 6.6a) oraz *I. basta* (rys. 6.6c) nie zaobserwowano charakterystycznej fluorescencji, co potwierdza brak reaktywnych grup aminowych. Natomiast otrzymane konstrukty chitynowo-chitozanowe (rys. 6.6b i d) charakteryzowały się wyraźną zieloną fluorescencją, wskazującą na skuteczne wiązanie FITC. Co istotne, intensywność fluorescencji była wyższa wzdłuż zewnętrznych ścian włókien (rys. 6.6b, oznaczone czerwoną strzałką), podczas gdy centra włókien wykazywały stosunkowo niższą intensywność (rys. 6.6b, zaznaczone białą strzałką). Ten zróżnicowany wzór fluorescencji sugeruje konfigurację strukturalną, w której chitozan tworzy warstwę zewnętrzną wokół rdzenia z włókna chitynowego (zob. rys. 6.7). Taki układ sugeruje proces częściowej deacetylacji, w którym

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych szkieletów kompozytowych z chityny i chitozanu

zewewnętrzne obszary włókien chitynowych są bardziej dostępne dla działania NaOH, co prowadzi do ich przekształcenia w chitozan.



Rysunek 6.6: Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej (a) szkieletu chitynowego gąbki *A. aerophoba* oraz (b) powstałego kompozytu chitynowo-chitozanowego po barwieniu FITC. Czerwona strzałka wskazuje na intensywną zieloną fluorescencję warstw chitozanu; biała strzałka wskazuje na rdzeń chitynowy we włóknie; (c) szkielet chitynowy gąbki *I. basta* oraz (d) kompozyt chitynowo-chitozanowy po barwieniu FITC. Czas naświetlania: (a) 109,7 ms, (b) 109,7 ms, (c) 61,92 ms, (d) 61,92 ms, na podstawie [280].

Grubość warstw chitozanu w próbce kompozytu *A. aerophoba* zmierzono za pomocą oprogramowania ImageJ (ImageJ 1.53t, National Institutes of Health, USA), uzyskując zakres od 20 do 60 μm . Rozkład grubości warstw przedstawia się następująco: 29% warstw mieściło się w zakresie 20–30 μm , 38% w zakresie 30–40 μm , 24% w zakresie 40–50 μm i 10% w zakresie 50–60 μm .

Optymalny zakres grubości warstw chitozanu do zastosowań praktycznych różni się w zależności od zastosowania oraz pożądanych właściwości mechanicznych, biochemicznych lub interakcji komórkowych. Na przykład, w regeneracji skóry i gojeniu ran, optymalna grubość warstw chitozanu waha się od 10 μm , gdzie membrany chitozanowe w formie siatki

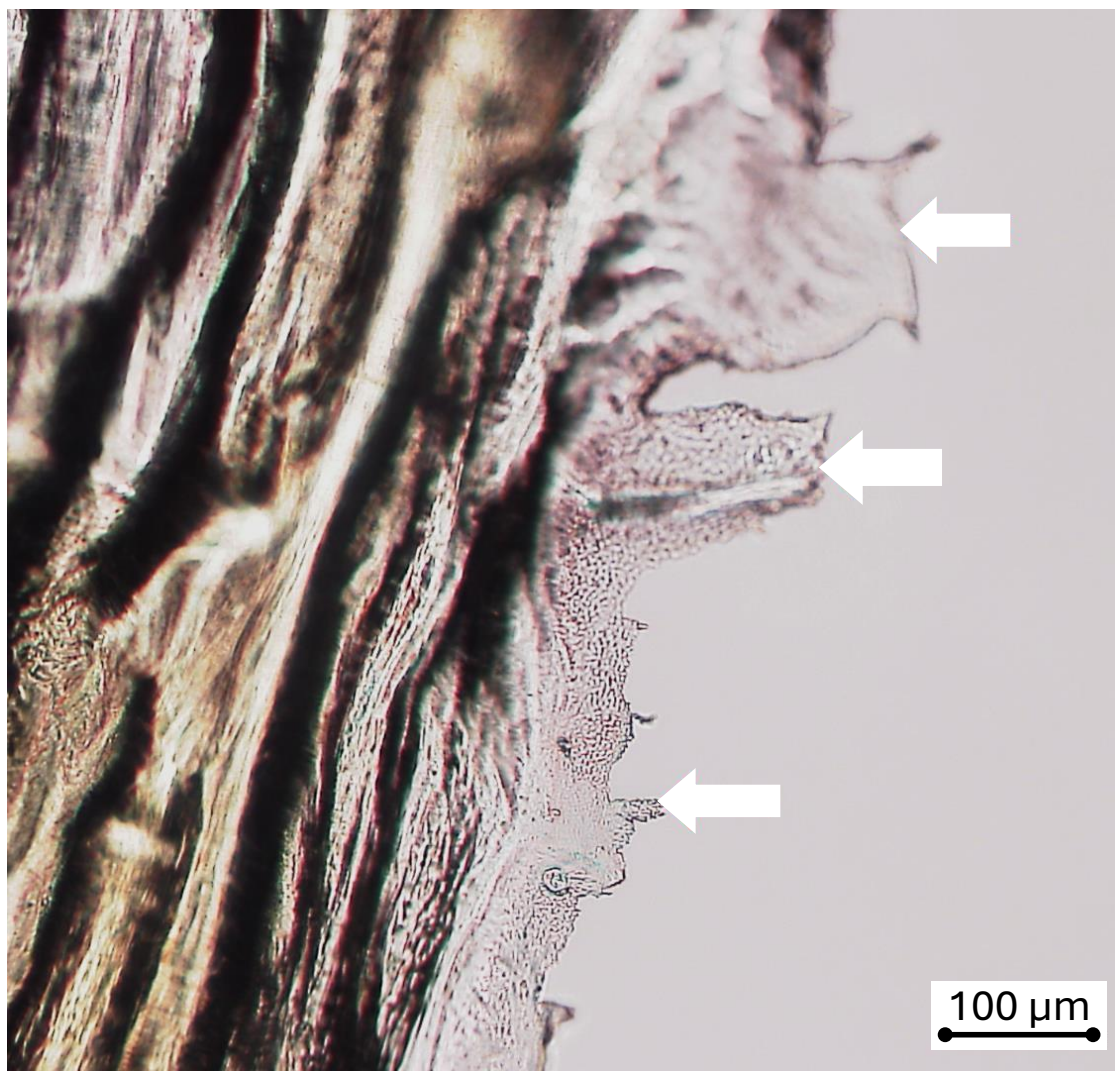
6 Wyniki i dyskusja

znacząco sprzyjają reepitalizacji (proces odtwarzania nabłonka) i regeneracji warstwy ziarnistej [311], do $60 \pm 5 \mu\text{m}$, gdzie membrany chitozanowe z glicerolem jako plastyfikatorem wykazują doskonałe właściwości gojące rany [312], aż do poniżej 1 mm w przypadku regeneracji skóry właściwej [313].

W dziedzinie dostarczania leków, szczególnie do zastosowań okulistycznych, cienka warstwa na bazie chitozanu o grubości około $3,5 \mu\text{m}$ okazuje się optymalna, zapewniając wysoką przepuszczalność rogówki i szybkie uwalnianie leku [314]. Aktywność przeciwbakteryjną i właściwości dostarczania leku można regulować poprzez modyfikację pH i stopnia deacetylacji. Najwyższa adsorpcja barwnika różu bengalskiego (stosowanego jako lek modelowy) występuje w najgrubszej warstwie kwasu hialuronowego i chitozanu, około 200 nm, ponieważ grubsze warstwy zazwyczaj sprzyjają większej penetracji leku i pojemności załadunku leku [315].

W inżynierii tkankowej wykazano, że membrany chitozanowe o grubości $60\text{--}80 \mu\text{m}$ wspomagają adhezję komórek i biodegradację, zapewniając korzystne środowisko dla wzrostu fibroblastów w inżynierii tkankowej skóry [316]. W zastosowaniach na rogówce, warstwy o grubości około $50 \mu\text{m}$ zapewniają optymalną równowagę stabilności mechanicznej, przezroczystości i przepuszczalności, co czyni je idealnymi podłożami do adhezji, proliferacji i implantacji autologicznych komórek śródbłonka rogówki i doskonale nadają się do małoinwazyjnych procedur w inżynierii tkankowej śródbłonka rogówki [317]. W badaniach proliferacji komórek, grubsze membrany chitozanowe, szczególnie te o grubości od 90 do $170 \mu\text{m}$, sprzyjają rozprzestrzenianiu się komórek, a mezenchymalne komórki macierzyste i hepatocyty reagują pozytywnie na zwiększoną grubość membrany [318].

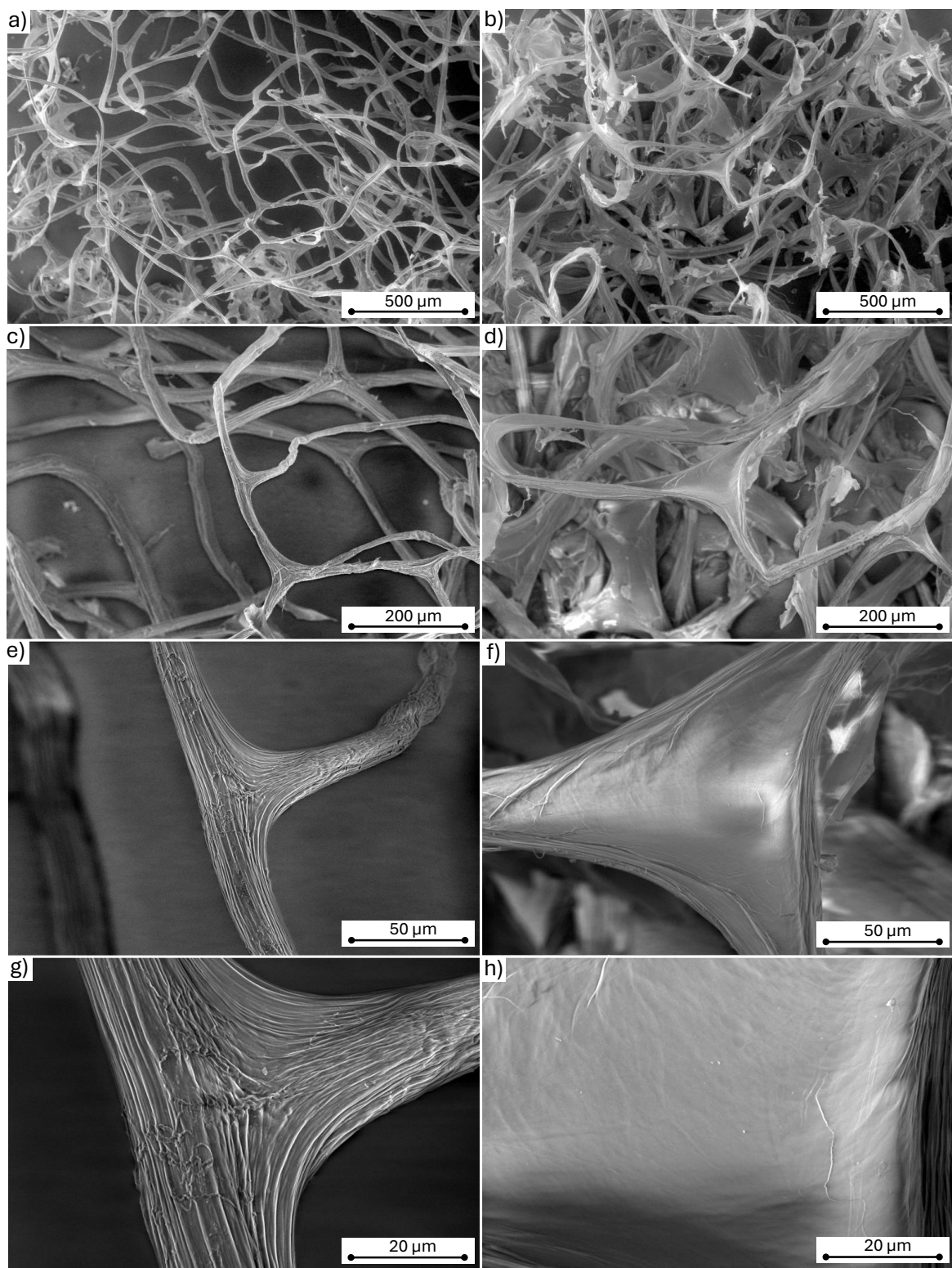
Obserwacje mikrostrukturalną przeprowadzono w celu zbadania morfologii powierzchni i cech strukturalnych otrzymanych skafoldów chitynowo-chitozanowych. Wyraźnie widoczna jest obecność cienkiej warstwy (rys. 6.7) na powierzchni materiału. Warstwa ta różni się od obserwowanej na powierzchni chityny z gąbek. Aby uzyskać bardziej szczegółowe informacje na temat zmian strukturalnych powierzchni skafoldów chitynowych w porównaniu z konstrukcjami chitynowo-chitozanowymi, przeprowadzono również badania SEM.



Rysunek 6.7: Cienka warstwa (strzałki) na powierzchni badanego konstrukt chitynowo-chitozanowego *A. aerophoba*, zidentyfikowana jako chitozan, była dobrze widoczna nawet pod mikroskopem świetlnym, zaadaptowano z [280].

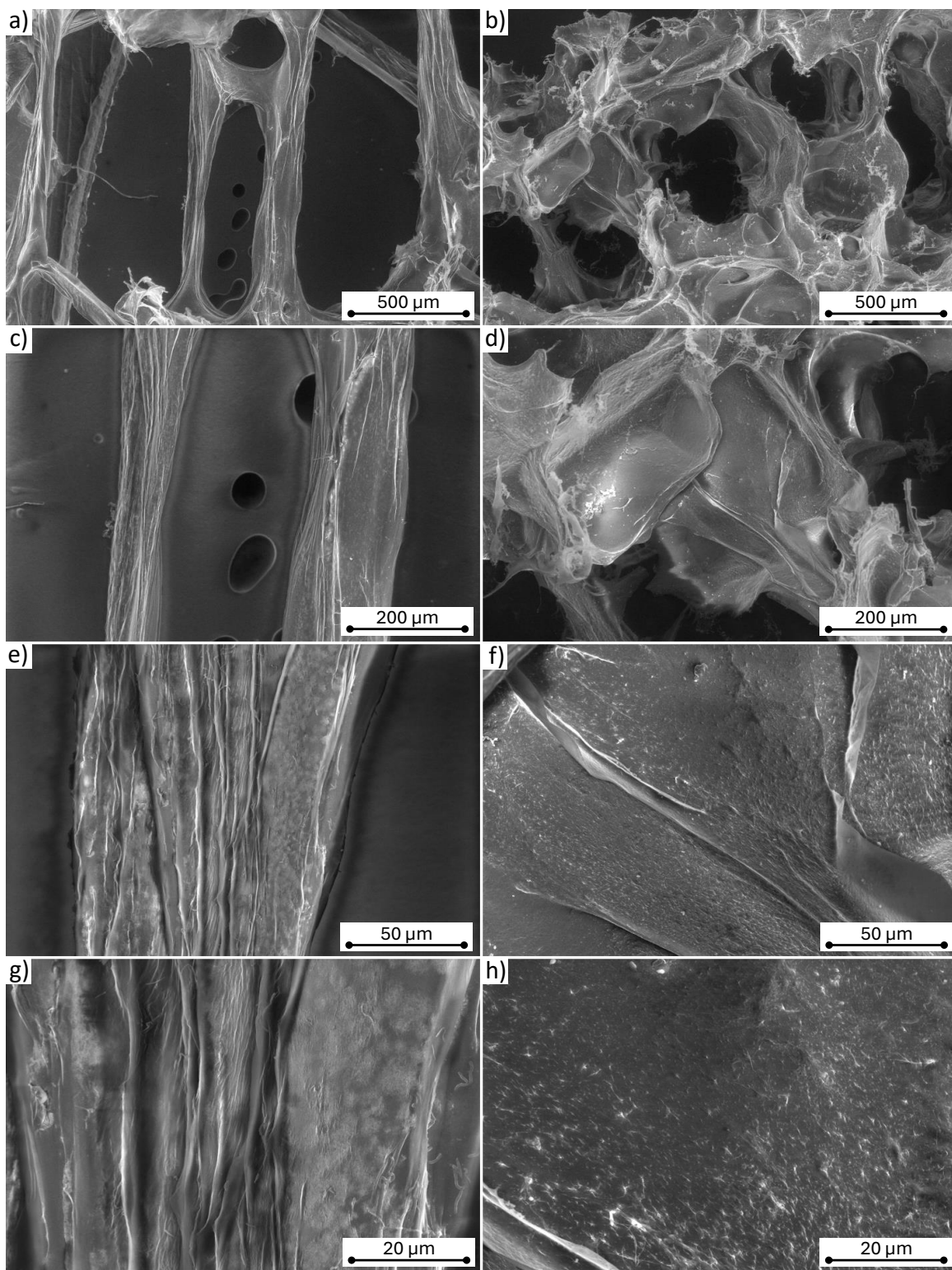
Obrazy SEM oferują porównawczą wizualizację włókien chitynowych *A. aerophoba* (rys. 6.8) oraz *I. basta* (rys. 6.9) i produktów otrzymanych w wyniku deacetylacji próbek w 38% roztworze NaOH przez 60 minut w temperaturze 95°C. Przy mniejszych powiększeniach (rys. 6.8a i 6.8c oraz rys. 6.9a i 6.9c) włókna chitynowe wykazują typowy gładki i jednolity wygląd [151], co wskazuje na ich naturalny, niezmodyfikowany stan. Natomiast włókna chitynowo-chitozanowe (rys. 6.8b i 6.8d oraz rys. 6.9b i 6.9d) charakteryzują się wyraźnie poszarpaną i nieregularną teksturą powierzchni, co pokazuje zmiany wywołane procesem deacetylacji.

6 Wyniki i dyskusja



Rysunek 6.8: Obrazy SEM gąbki chitynowej *A. aerophoba* (a, c, e, g) i skafoldu chitynowo-chitozanowego (b, d, f, h) uzyskane w wyniku obróbki 38% roztworem NaOH przez 60 minut w temperaturze 95 °C, przy różnych powiększeniach, zaadaptowano z [280].

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych skafoldów kompozytowych z chityny i chitozanu



Rysunek 6.9: Obrazy SEM chityny wyizolowanej z gąbki *I. basta* (a, c, e, g) i skafoldu chitynowo-chitozanowego (b, d, f, h) uzyskane w wyniku obróbki 38% roztworem NaOH przez 60 minut w temperaturze 95 °C, przy różnych powiększeniach.

6 Wyniki i dyskusja

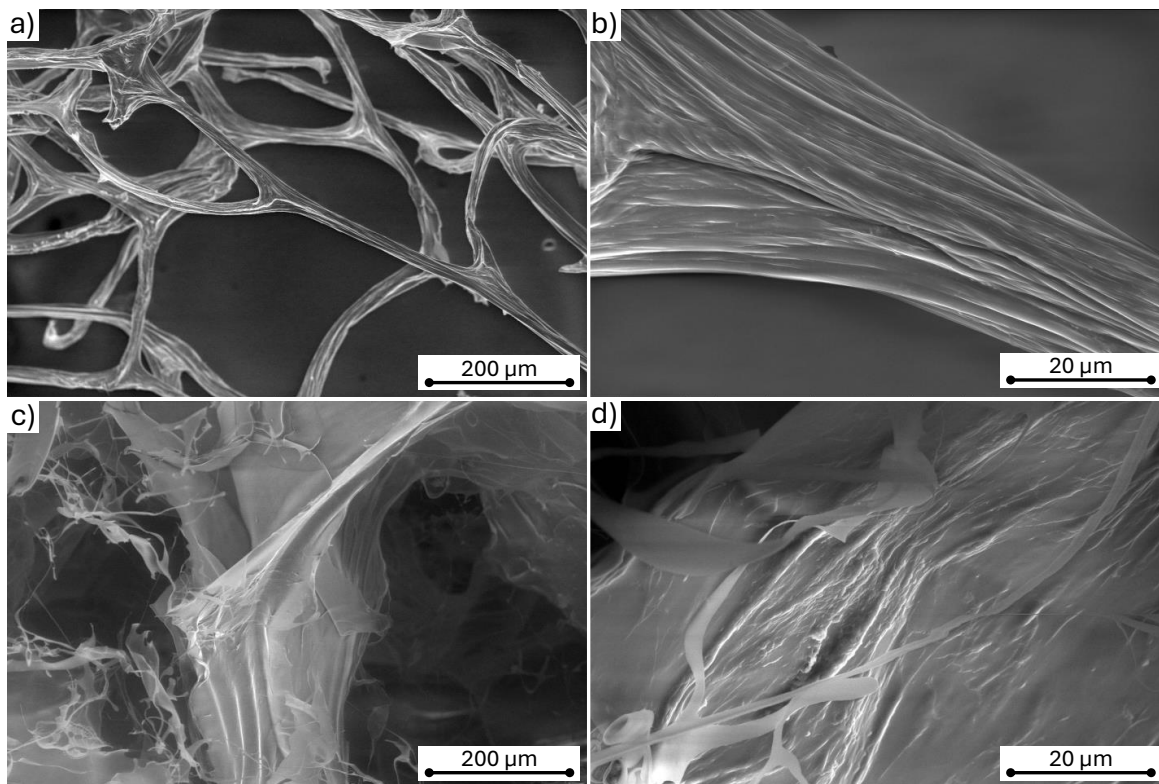
Po bliższym przyjrzeniu się w większych powiększeniach (rys. 6.8e i 6.8g oraz rys. 6.9e i 6.9g) włókna chitynowe ujawniają charakterystyczną pomarszczoną powierzchnię, ceche obserwowaną u chityny pochodzącej z gąbek [28, 151]. To pofałdowanie jest prawdopodobnie spowodowane naturalnymi właściwościami strukturalnymi chityny, które pozostają nienaruszone w swojej pierwotnej formie. Z kolei powierzchnie kompozytów chitynowo-chitozanowych wydają się znacznie gładziej w większych powiększeniach (rys. 6.8f i 6.8h oraz rys. 6.9f i 6.9h), co sugeruje efekt homogenizacji wywołany procesem modyfikacji chemicznej. Ta gładkość może być spowodowana częściowym usunięciem grup acetylowych podczas procesu deacetylacji, co prowadzi do bardziej jednolitej struktury chitozanu.

Próbki kompozytów chitynowo-chitozanowych z gąbki *A. aerophoba* oraz *I. basta*, otrzymane w wyniku działania 38% roztworu NaOH po 60 minutach, poddano dalszej obróbce poprzez rozpuszczenie jej w 1% roztworze kwasu octowego. Ten etap ma na celu rozpuszczenie składnika chitozanowego, pozostawiając rdzeń chitynowy, który następnie przepłukano wodą destylowaną i poddano liofilizacji. Obrazy SEM pozostałego szkieletu, przedstawione na rysunku 6.10, ujawniają nieregularną i szorstką powierzchnię, charakterystyczną dla chityny. Te cechy morfologiczne są istotne, ponieważ potwierdzają obecność chitynowego rdzenia otoczonego warstwą chitozanu. Nieregularny wygląd powierzchni sugeruje, że zewnętrzna warstwa chitozanu została pomyślnie rozpuszczona w roztworze kwasu, odsłaniając leżącą pod nią strukturę chityny. Ta dwuwarstwowa budowa, z wytrzymałym rdzeniem chitynowym i wszechstronną warstwą zewnętrzną z chitozanu, podkreśla integralność strukturalną i potencjał funkcjonalny materiału. Chropowata powierzchnia szkieletu chitynowego widoczna na obrazach SEM (rys. 6.10) odpowiada cechom strukturalnym rodzimej chityny z gąbek, charakteryzującej się wewnętrzną sztywnością i złożonością teksturalną.

Nieregularny charakter powierzchni dodatkowo wskazuje na częściową degradację lub zmianę struktury chityny podczas początkowego procesu deacetylacji, która nie została całkowicie wygładzona przez późniejsze procesy. Ta obserwacja chitynowego rdzenia konstruktu z warstwą chitozanu ma kluczowe znaczenie dla zastosowań wymagających połączenia wytrzymałości mechanicznej i wszechstronności chemicznej. Wytrzymały rdzeń chitynowy zapewnia wsparcie strukturalne, podczas gdy warstwa chitozanu oferuje reaktywną powierzchnię do dalszych modyfikacji chemicznych lub funkcjonalizacji. Taka

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych skafoldów kompozytowych z chityny i chitozanu

struktura kompozytowa może być korzystna w różnych zastosowaniach biomedycznych i przemysłowych, w tym w skafoldach inżynierii tkankowej, systemach dostarczania leków i powłokach bioaktywnych.



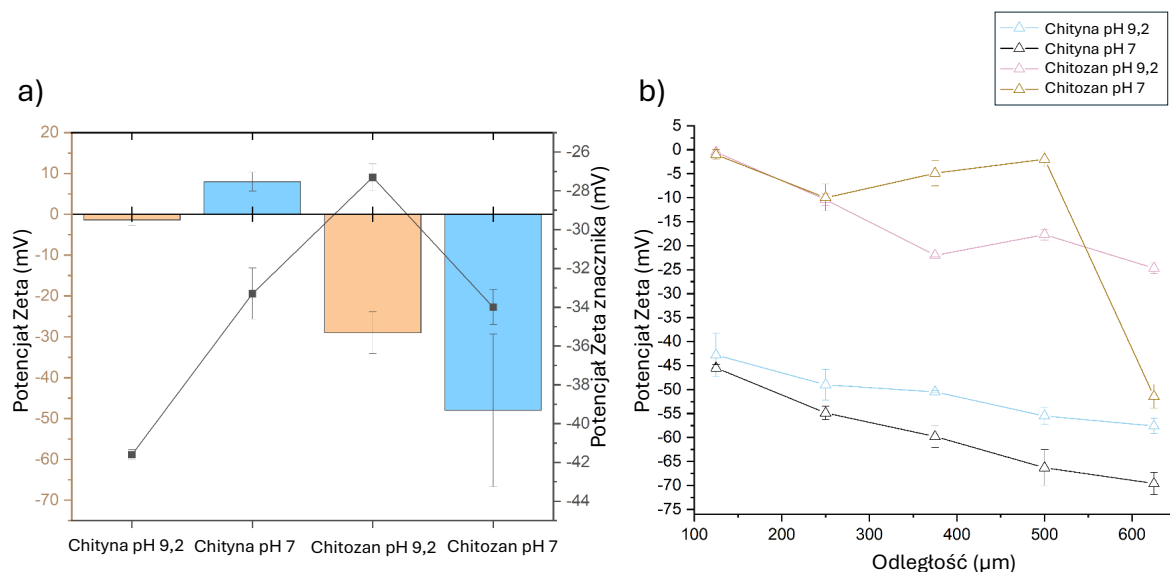
Rysunek 6.10: Mikrofotografie SEM próbki chityny/chitozanu *A. aerophoba* (a, b) oraz próbki chityny/chitozanu *I. basta* (c, d) po rozpuszczeniu w 1% kwasie octowym ukazują skafoldy chitynowe z typową nieregularną powierzchnią, na podstawie [280].

Skafoldy chitynowe *A. aerophoba* przed i po deacetylacji chityny zbadano techniką laserowej elektroforezy Dopplera (LDE). Chociaż technika ta może być wrażliwa na jednorodność powierzchni, z powodzeniem określono potencjał zeta powierzchni materiałów porowatych. Zastosowanie dwóch lateksowych cząstek wskaźnika o pH wynoszącym 9,2 i 7 pozwoliło na dogłębne zbadanie materiałów. Istotna zmiana ładunku materiału po obróbce sprawiła, że konieczne było zastosowanie dodatnio i ujemnie naładowanych cząstek wskaźnika.

Rysunek 6.11a przedstawia zmierzony potencjał zeta dla próbek chityny (pomarańczowe słupki) i chitozanu (niebieskie słupki) oraz potencjał zeta wskaźnika zmierzony w odległości 1000 μm od powierzchni w obu buforach. Wartość potencjału zeta chityny jest zbliżona do wartości podawanych w literaturze dla nanokryształów chityny [319] w obu

6 Wyniki i dyskusja

pH, z wartościami $-1,39 \text{ mV} \pm 1,39$ ($R^2 = 0,965$) dla pH = 9,2 i $7,95 \text{ mV} \pm 2,31$ ($R^2 = 0,971$) dla pH = 7. Mimo że próbka chitozanu nie była idealnie stabilna podczas pomiaru, potencjał zeta powierzchni dla pH = 9,2: $-29,0 \text{ mV} \pm 5,17$ ($R^2 = 0,933$) jest zgodny z wcześniejszymi badaniami [320]. Wartości potencjału zeta dla nanocząstek znacznika amidynowego przy pH = 7: $-48,0 \text{ mV} \pm 18,7$ ($R^2 = 0,373$) są wątpliwe i nie można ich porównać z danymi literaturowymi ze względu na niestabilność powierzchni. Widać to wyraźnie na rysunku 6.11b, gdzie przedstawiono zależność potencjału zeta od przemieszczenia. Próbka chityny była stabilna w obu warunkach, bez istotnego wpływu na pomiary. Natomiast próbki chitozanu mają tendencję do zmiany swojej morfologii (pobieranie wody, dyspersja mikrozanieczyszczeń, dyfuzja polimeru z materiału) podczas pomiaru potencjału zeta (niestabilność pomiaru, znaczny błąd pomiaru). Chociaż próbka chitozanu nie jest stabilna przy niższych wartościach pH, technika laserowej elektroforezy Dopplera została z powodzeniem zastosowana do monitorowania potencjału zeta, co potwierdza skuteczną modyfikację matrycy chitynowej.



Rysunek 6.11: Potencjał zeta (a) mierzony dla chityny i chitozanu; (b) jako funkcja przemieszczenia dla badanych materiałów, zaadaptowano z [280].

Jak wspomniano powyżej, niestabilność próbek chitozanu zaobserwowano przy niższych wartościach pH. Można zastosować kilka strategii stabilizacji powierzchni chitozanu, zachowując jednocześnie jego funkcjonalność w zastosowaniach takich jak kataliza czy transport leków. Pozwala to rozwiązać problem jego niestabilności przy niższych wartościach pH. Niestabilność ta zazwyczaj wynika z protonowania grup aminowych chitozanu w śró-

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych skafoldów kompozytowych z chityny i chitozanu

dowisku kwaśnym, co powoduje rozpuszczanie i mniejszą stabilność polimeru.

Sieciowanie jest jedną z najczęstszych metod stabilizacji chitozanu. Chemiczne środki sieciujące, takie jak glutaraldehyd, genipina czy eter diglicydowy glikolu etylenowego, mogą tworzyć wiązania kowalencyjne między łańcuchami chitozanu, zmniejszając rozpuszczalność i zwiększając stabilność mechaniczną i chemiczną. Usieciowany chitozan zachowuje dostępność swoich grup funkcyjnych, umożliwiając ciągłą interakcję z substratami w katalizie lub w celu kontrolowanego uwalniania leków. Jest również mniej wrażliwy na zmiany pH, dzięki czemu zachowuje integralność strukturalną w środowisku kwaśnym.

Alternatywnie można również zastosować sieciowanie jonowe. Procedura ta polega na wykorzystaniu anionów wielowartościowych, takich jak tripolifosforan (TPP), do interakcji z grupami aminowymi chitozanu. To podejście jest odwracalne i pozwala na tworzenie stabilnych hydrożeli. Sieciowanie jonowe nie wiąże się z tworzeniem wiązań kowalencyjnych, co pozwala zachować reaktywność grup funkcyjnych. Zapewnia ono stabilność i odporność na rozpuszczanie w niższym pH poprzez tworzenie mostków jonowych w matrycy polimerowej, które są mniej podatne na protonowanie [321].

Istnieją dwa podejścia do metalizacji miedzią badanych skafoldów chitynowych i chitynowo-chitozanowych: osadzanie metalu w postaci nanocząstek lub redukcja jonów metalu bezpośrednio na powierzchni skafoldów. Wiadomo, że zarówno chityna, jak i chitozan wykazują właściwości kompleksujące z jonami metali, zwłaszcza pierwiastkami przejściowymi, lantanowcami i aktynowcami [322]. Jednak chitozan, w porównaniu z chityną, ma znacznie większy potencjał tworzenia kompleksów, tworzy bardziej stabilne kompleksy i może wiązać większe stężenia jonów metali [323, 324]. Chitozan wykazuje szczególnie wysokie powinowactwo do jonów miedzi [325, 326]. Chitozan ma większy potencjał tworzenia kompleksów z jonami metali niż chityna ze względu na swoją unikalną strukturę chemiczną i grupy funkcyjne [327]. Przyczyną tej różnicy jest stopień deacetylacji i obecność wolnych grup aminowych w chitozanie, które są niedostępne w chitynie. Głównymi grupami funkcyjnymi chitozanu, które ułatwiają kompleksowanie z jonami metali, zwłaszcza jonami miedzi, są grupy aminowe ($-NH_2$) [328]. Grupy te znajdują się w pozycji C-2 cząsteczki glukozaminy w chitozanie. Grupy aminowe mają charakter zasadowy i mogą łatwo wiązać się z jonami metali poprzez oddawanie par elektronowych, tworząc koordynacyjne wiązania kowalencyjne. Ta interakcja jest zazwyczaj bardziej istotna w przypadku metali przejści-

6 Wyniki i dyskusja

wych, takich jak miedź, które mogą przyjmować pary elektronowe, aby uzupełnić swoją konfigurację elektronową.

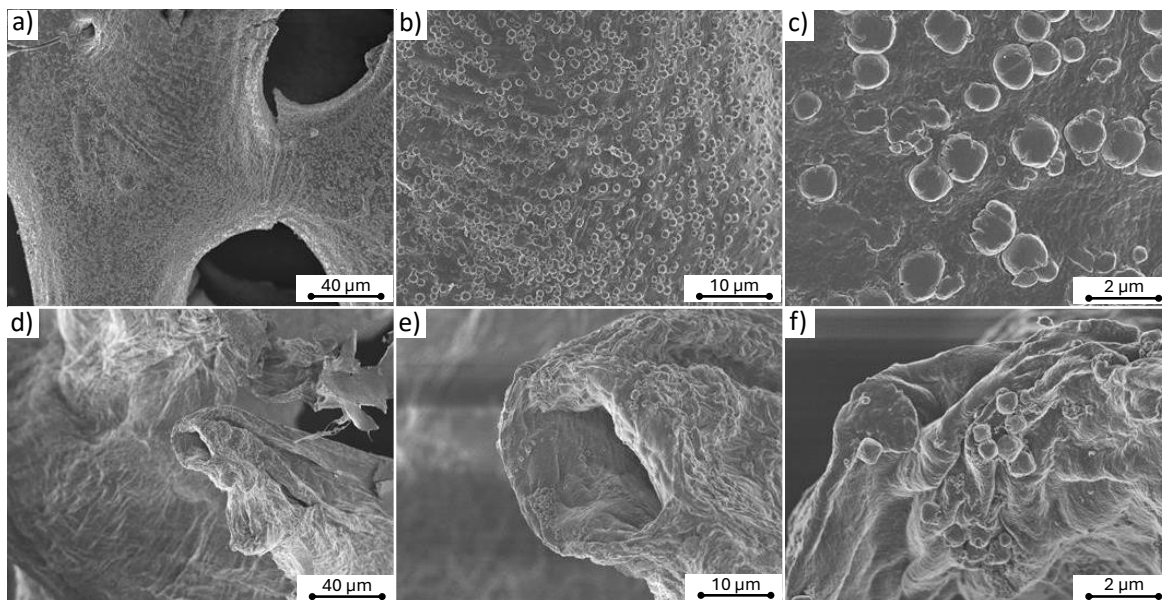
Chitozan zawiera również grupy hydroksylowe w pozycjach C-3 i C-6. Chociaż grupy te mogą również oddziaływać z jonami metali, ich rola jest bardziej pomocna w stabilizacji kompleksów jonów metali poprzez wiązania wodorowe i inne oddziaływania elektrostatyczne [329]. Istnieją dwie różne teorie dotyczące struktury kompleksu Cu-chitozan. Pierwsza teoria nazywana jest „modelem mostkowym” i opisuje czterokrotną koordynację jonu miedzi przez atomy donorowe azotu w łańcuchu polimeru lub różnych łańcuchach. „Model wiszący” opisuje prostą, jednokrotną koordynację jonu miedzi przez grupę aminową [324]. Podejrzewano tworzenie pięciocłonowego kompleksu chelatowego pierścienia z grupą hydroksylową przy atomie C3 w cząsteczce chitozanu [330], ale nie zostało to potwierdzone eksperymentalnie.

W niniejszych badaniach roztwór jonów miedzi z konstruktem chitynowo-chitozanowym wykazuje intensywne niebieskie zabarwienie po 24 godzinach. Jest to związane z powstaniem kompleksu miedzi(II) z grupami aminowymi chitozanu. Adsorpcja miedzi na matrycy chitynowej z gąbki wynosi $4,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ (2,8%), jednak w przypadku kompozytu chitynowo-chitozanowego osiąga poziom $77 \mu\text{g}/\text{mg}$ (48%). Uderzający jest fakt, że chityna kompleksuje jedynie bardzo niewielkie ilości miedzi. Jest to jednak zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, gdzie nie stwierdzono kompleksowania miedzi na powłokach chitynowych [325].

Miedź(II), na przykład w roztworach siarczanu(VI) miedzi, można zredukować wybranymi węglowodanami, uzyskując proszek miedzi [331]. W niniejszych badaniach redukcję jonów miedzi(II) przeprowadzono za pomocą fruktozy w środowisku zasadowym. Oprócz możliwych reakcji enolizacji, degradacja szkieletu węglowodanowego pozostaje istotną cechą reakcji katalizowanej zasadą. Fruktoza, podobnie jak glukoza i mannoza, występują w równowadze pośredniej 1,2-enediolu. Zachodzi ona w obecności czynników utleniających, np. Cu^{2+} , w celu utlenienia enediolu do kwasów karboksylowych. Reakcje te nie są stechiometryczne. Zachodząca reakcja może być również wykorzystana jako jakościowy dowód na obecność cukrów redukujących, znany jako reakcja Fehlinga. Ze względu na warunki zasadowe oraz wysoką temperaturę fruktoza ulega rozkładowi na produkty pośrednie, które mogą brać udział w kolejnych reakcjach redoks, umożliwiając całkowitą redukcję jonów miedzi. Zjawisko to można zaobserwować również w przypadku

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych skafoldów kompozytowych z chityny i chitozanu

badania SEM. Obrazy mikroskopowe (rys. 6.12) powierzchni chityny z gąbki i kompozytów chitynowo-chitozanowych po redukcji katalizowanej zasadą wyraźnie pokazują osadzenie się nanokrystalicznych struktur miedzi. Różnica pomiędzy dwiema badanymi matrycami jest wyraźnie widoczna.



Rysunek 6.12: Obrazowanie elektronowe powierzchni konstruktu chitynowego/chitozanowego (a, b, c) w porównaniu z powierzchnią matrycy chitynowej z gąbki (d, e, f) po metalizacji miedzią z wykorzystaniem redukcji jonów Cu^{2+} w obecności fruktozy w środowisku zasadowym, zaadaptowano z [280].

Uzyskane wyniki otwierają drogę do możliwych zastosowań trójwymiarowych kompozytów Cu-chityna/chitozan w odpowiednich katalizatorach, podobnie jak to opisano wcześniej dla podobnych kompozytów Cu-spongina [332, 333].

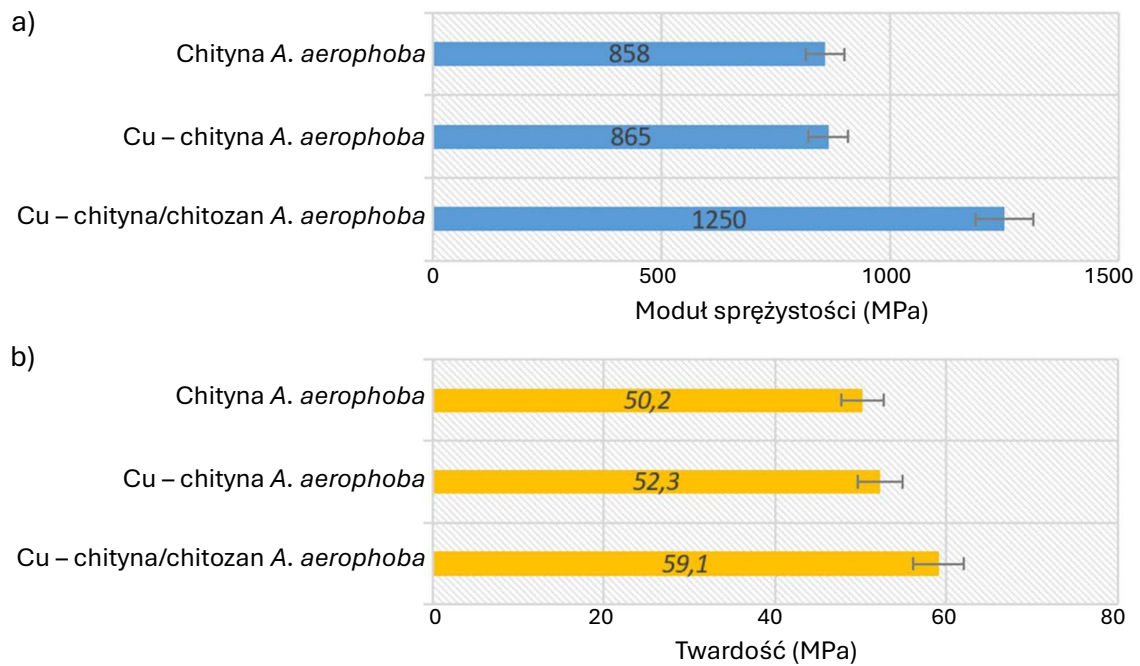
Podobnie jak w przypadku badań nad skafoldami karbonizowanej sponginy z Cu/ Cu_2O , z powodzeniem stosowanymi wcześniej jako katalizatory w reakcji redukcji 4-nitrofenolu do 4-aminofenolu [332], przeprowadzono wstępne eksperymenty z opracowanym tutaj konstruktem Cu-chityna/chitozan. Aby przewidzieć mechanizm katalitycznych właściwości materiału Cu-chityna/chitozan, trójwymiarową chitynę wyizolowano z gąbki *A. aerophoba* (rys. 6.1a), a także fragment płytki miedzianej, wykorzystano jako katalizatory w redukcji 4-nitrofenolu w tych samych warunkach eksperymentalnych. Zaobserwowano, że trójwymiarowy skafold chitynowy nie posiada zdolności katalitycznych w kierunku redukcji 4-nitrofenolu. Co ciekawe, płytka miedziana charakteryzuje się niższą zdolnością katalityczną w kierunku redukcji 4-nitrofenolu w porównaniu z katalizatorem na bazie Cu-

6 Wyniki i dyskusja

chityny/chitozanu (stała szybkości $0,0043 \text{ s}^{-1}$). Wyniki te dowodzą, że dobrze rozwinięta struktura krystaliczna Cu i Cu_2O na utworzonych skafoldach 3D zapewnia wystarczającą liczbę miejsc aktywnych niezbędnych do szybkiej redukcji 4-nitrofenolu. Można zasugerować, że katalizator na bazie Cu-chityny/chitozanu działa jako medium transferujące elektrony z anionów BH^+ zaadsorbowanych w miejscach aktywnych katalizatora do cząstek 4-nitrofenolu, w celu wytworzenia 4-aminofenolu. Podobne wyniki uzyskano w badaniach aktywności kompozytu $\text{Cu}_2\text{O-Cu-CuO}$ [334].

Metalizacja konstruktów chitynowo-chitozanowych uzyskanych w badaniu może znacząco wpływać na ich właściwości mechaniczne, w tym wytrzymałość na rozciąganie, elastyczność i trwałość. Metalizacja odnosi się do procesu wprowadzania cząstek lub jonów metalu do matrycy, często w celu poprawy jego właściwości funkcjonalnych, takich jak przewodność elektryczna czy aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Dodanie nanocząstek metalu (takich jak srebro, złoto lub miedź) do skafoldów chitozanowych może zwiększyć ich wytrzymałość na rozciąganie. Dzieje się tak dzięki tworzeniu silniejszych wiązań poprzecznych wewnątrz matrycy polimerowej oraz między łańcuchami polimeru a jonami metalu. W niektórych przypadkach nadmierna metalizacja lub słabo rozproszone cząstki metalu mogą prowadzić do aglomeracji, co prowadzi do powstawania punktów koncentracji naprężeń w skafoldzie i może zmniejszyć jego wytrzymałość na rozciąganie. Wprowadzenie sztywnych nanocząstek metalu do elastycznej matrycy polimerowej chitozanu może zmniejszyć elastyczność ze względu na usztywniające działanie metali, czyniąc skafold mniej podatnym na odkształcenia pod wpływem naprężeń. Metalizacja może zwiększyć trwałość konstruktów chitozanowych, zwłaszcza pod względem ich odporności na degradację mikrobiologiczną i czynniki stresogenne w środowisku. Rys. 6.13 przedstawia wyniki testów modułu sprężystości (rys. 6.13a) i twardości (rys. 6.13b) (nanoindentacja) dla $10 \mu\text{m}$ przekrojów chityny z gąbki *A. aerophoba*, kompozytu Cu-chityny *A. aerophoba* (rys. 6.12f) i kompozytu Cu-chityny/chitozanu *A. aerophoba* (rys. 6.12c). Najprawdopodobniej wzrost modułu sprężystości w próbce z kompozytem Cu, chityna/chitozan wynika z obecności odpowiednich warstw chitozanu, a nie z metalizacji miedzią, która występuje w postaci nanocząstek na powierzchni utworzonego materiału.

6.1 Charakterystyka trójwymiarowych skafoldów kompozytowych z chityny i chitozanu



Rysunek 6.13: Moduł sprężystości (a) i twardość (b) w megapaskalach (MPa) przekrojów o grubości 10 μm z chityny *A. aerophoba*, kompozytu Cu-chityny *A. aerophoba* i kompozytu Cu-chityna/chitozan *A. aerophoba* (\pm odchylenia standardowe), zaadaptowano z [280].

6.1.2 Wnioski

Po raz pierwszy celem badania było stworzenie warstw chitozanu na powierzchni chitynowych włókien, przy jednoczesnym zachowaniu trójwymiarowej architektury chitynowego skafoldu szkieletowego wybranych gąbek. To innowacyjne podejście ma na celu opracowanie unikalnej matrycy kompozytowej chityna/chitozan, która zachowuje rozmiar i kształt oryginalnego chitynowego szkieletu gąbki, czego przykładem jest hodowana gąbka *A. aerophoba*. Analiza barwienia pozwala na precyzyjne odróżnienie chityny od chitozanu, wykorzystując jod i barwnik Cibacron Brilliant Red (CBR). Chitozan charakteryzuje się intensywnym, trwałym zabarwieniem, podczas gdy kolor chityny wyraźnie blednie po przemyciu. Spektroskopia ATR-FTIR dodatkowo wyjaśnia różnice strukturalne, wskazując, że 60-minutowe działanie 38% roztworu NaOH zapewnia optymalną równowagę chityny i chitozanu. Mikroskopia fluorescencyjna z barwieniem FITC podkreśla pomyślny proces deacetylacji, o czym świadczy obecność grup aminowych w chitozanie. Analiza SEM ujawnia istotne różnice morfologiczne: włókna chitynowe zachowują gładką, jednolitą powierzchnię, podczas gdy włókna chitozanowe charakteryzują się nierówną teksturą, co

wskazuje na znaczące modyfikacje powierzchni. Identyfikacja struktury dwuwarstwowej, z chitozanową warstwą zewnętrzną i chitynowym rdzeniem, podkreśla wytrzymałość mechaniczną i wszechstronność chemiczną skafoldu. Pomiary potencjału zeta potwierdzają pomyślną konwersję chityny do chitozanu, pomimo obserwowanej niestabilności przy niższych wartościach pH w próbkach chitozanu. Kompozyt chityna/chitozan, po metalizacji miedzią, wykazuje zdolność katalityczną w reakcji redukcji 4-nitrofenolu.

6.2 Rozpuszczanie chitynowych skafoldów z gąbki *Aplysina aerophoba*

Biopolimery strukturalne (tj. celuloza, spongina, jedwab) są w większości nierozpuszczalne w wodzie. Stanowi to jeden z czynników ograniczających ich praktyczne zastosowanie w różnorodnych technologiach. Ponadto chityna jest nierozpuszczalna w większości powszechnie stosowanych rozpuszczalników [26, 54, 335–340]. Fakt ten utrudnia opracowanie metod przetwarzania i wykorzystania tego polimeru [328]. Problemem związanym z rozpuszczaniem chityny jest jej wysoka krystaliczność oraz silne między- i wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe [341]. Zatem ten polisacharyd może być rozpuszczony jedynie w rozpuszczalnikach niszczących wiązania wodorowe. Ponadto większość tych rozpuszczalników jest toksyczna, mutagenna, żrąca [342] lub mogąca powodować hydrolizę, depolimeryzację bądź degradację strukturalną, dlatego opracowanie nowej metody rozpuszczania chityny pozostaje ważnym wyzwaniem. W tabeli 6.2 przedstawiono przykłady już opisanych rozpuszczalników chitynowych.

Tabela 6.2: Przegląd rozpuszczalników chityny, zaadaptowano z [278].

Rozpuszczalnik	Zalety	Wady	Źródło
2-chloroetanol i kwas nieorganiczny	Szybkie rozpuszczanie chityny w temperaturze pokojowej lub lekko podwyższonej	Zachodzi degradacja hydrolityczna	[343]
Kwasy karboksylowe (mrówkowy, dichlorooctowy, trichlorooctowy)	Szybkie rozpuszczanie chityny, zazwyczaj w temperaturze pokojowej lub lekko podwyższonej	Chityna ulega powolnej degradacji; roztwory chityny w kwasie mrówkowym są niestabilne	[344, 345, 346]

6.2 Rozpuszczanie chitynowych skafoldów z gąbki *Aplysina aerophoba*

Stężony kwas fosforowy	Szybkie rozpuszczanie chityny w temperaturze pokojowej	Chityna ulega hydrolizie po długim czasie przebywania w kwasie w temperaturze pokojowej	[347]
Seskwihydrat heksafluoroacetonu	Uzyskane roztwory można poddawać przedzeniu na mokro lub sucho we włókna lub odlewać w folie lub przedmioty stałe	Toksyczność	[348]
Heksafluoro-2-propanol	Nie występuje degradacja chityny	Toksyczność	[349]
metanol nasycony $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Przejrzysty roztwór chityny, łatwy do regeneracji w różnych formach	Rozpuszczalność chityny zależy od stopnia deacetylacji i masy cząsteczkowej	[350, 351]
LiCl/N-metylo-2-pirolidon (NMP)	Rozpuszczalnik nieulegający degradacji	Toksyczność	[345, 346, 352, 353]
LiCl/dimetyloacetamid (DMA)	Rozpuszczalnik nieulegający degradacji	Nie wszystkie rodzaje chityny mogą się rozpuścić; toksyczność	[345, 346, 352, 353]
LiSCN	Brak hydrolizy	Wymagane wysokie temperatury	[345, 354]
LiI_2	Brak hydrolizy	Wymagane wysokie temperatury	[354]
LiCl/DMF	Stosunkowo krótki czas (1 godz.)	Toksyczność	[353, 355]
NaOH/kruszony lód lub zamrażanie	Chityna w środowisku alkalicznym jest stabilna pod względem degradacji	Zachodzi hydroliza	[356, 357, 358, 359, 353]
NaOH/mocznik	Niewielki wpływ na strukturę chityny; zachowuje stopień deacetylacji	Temperatura nie wyższa niż -20°C	[353, 360]
KOH/mocznik	Dobra rozpuszczalność chityny (~80%)	Zachodzi deacetylacja (ok. 12,5%); Wymagane niskie temperatury (-25°C)	[341]
Rozpuszczalniki głęboko eutektyczne	Brak degradacji strukturalnej	Wymagane wysokie temperatury; zachodzi depolimeryzacja	[361]
Ciecze jonowe	Rozpuszcza chitynę wszystkich form polimorficznych; zielone rozpuszczalniki	Wymagane podwyższone temperatury	[175, 342]

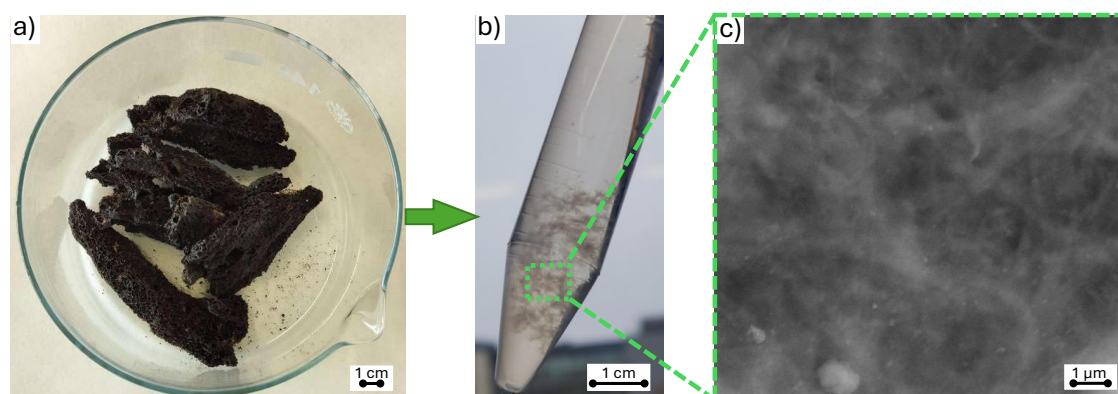
6 Wyniki i dyskusja

W pierwszym badaniu rozpuszczalników chityny [343, 344, 346] uzyskano kompleks chityny z LiCl, który ulegał koordynacji z grupą acetylową. Kompleks ten był rozpuszczalny w N-metylo-2-pirolidynie i dimetyloacetamidzie. Do rozpuszczania łańcuchów chitynowych stosowano wcześniej również kwasy karboksylowe, takie jak mrówkowy, dichlorooctowy i trichlorooctowy [343, 344, 346].

Zazwyczaj chemiczna izolacja skafoldów chitynowych z odpowiednich gąbek morskich opiera się na zastosowaniu stężonego (do 10%) NaOH lub Ba(OH)₂ [197, 362]. Jednak do izolacji skafoldów chitynowych z gąbki *Aplysina aerophoba* (rys. 5.1) hodowanej w warunkach hodowli morskiej [228] użyto 1% roztworu wodorotlenku litu (LiOH), a proces przeprowadzono z wykorzystaniem ultradźwięków. Ta metoda pozwala na rozpuszczenie chitynowych skafoldów i uzyskanie zarówno chitynowej materii amorficznej, jak i ekstraktu zawierającego bromotyrozyny.

6.2.1 Wyniki

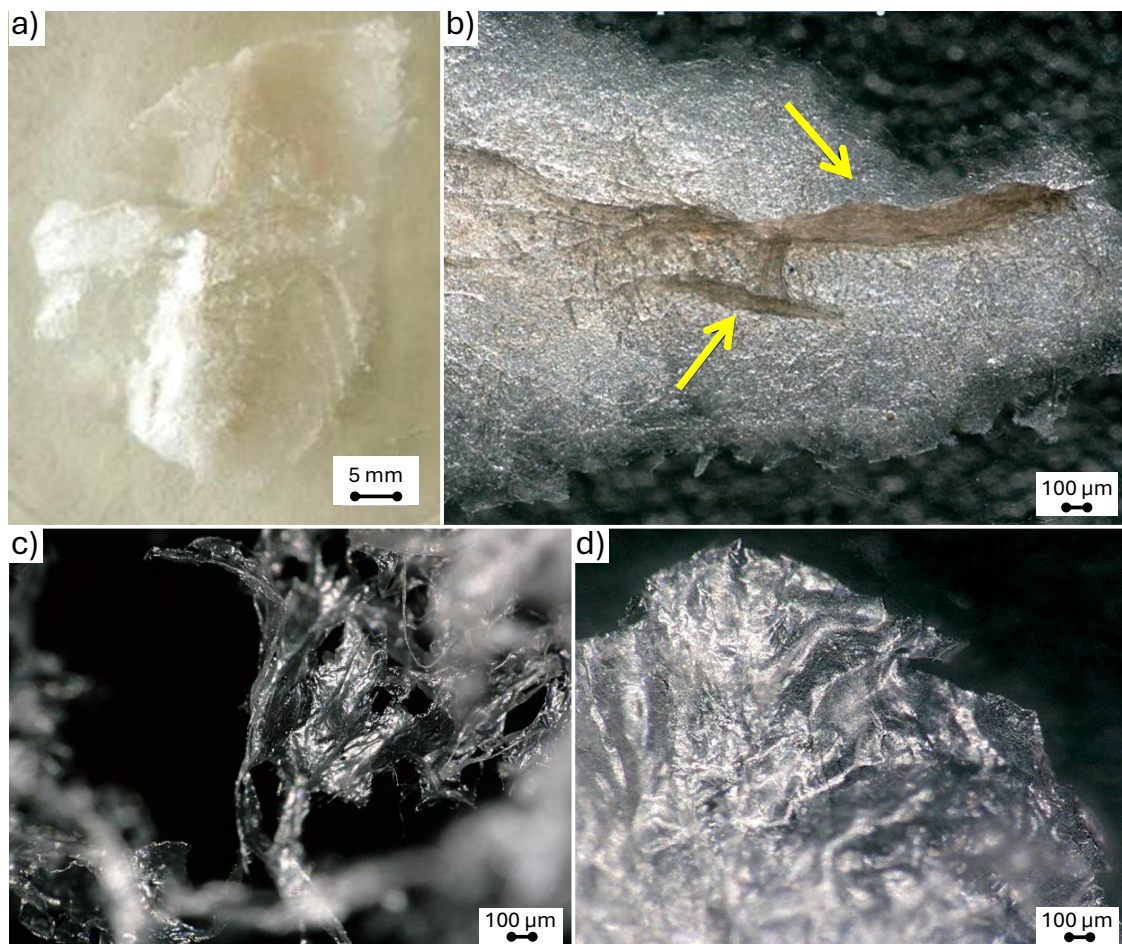
Głównym celem była izolacja trójwymiarowych skafoldów chitynowych z gąbki *A. aerophoba* (rys. 6.14a) przy użyciu 1% roztworu LiOH, podobnie jak w klasycznym podejściu opisanym wcześniej [150, 151, 226]. Jednak w trakcie procedury zaobserwowano, że ilość uzyskanych skafoldów była mniejsza niż oczekiwano, a ich integralność strukturalna uległa znacznemu pogorszeniu (rys. 6.14b). Przyczyną tego było rozpuszczanie skafoldów chitynowych w tym rozpuszczalniku w warunkach zastosowanych w badaniu (rys. 5.6).



Rysunek 6.14: Gąbki *A. aerophoba* przed reakcją (a) i po zanurzeniu w 1% roztworze LiOH, co spowodowało wyizolowanie rozdrobionych skafoldów chitynowych (b). Obraz SEM (c) ukazuje nieregularny materiał mikrowłóknisty, pozbawiony charakterystycznej mikroarchitektury skafoldu, zaadaptowano z [278].

6.2 Rozpuszczanie chitynowych skafoldów z gąbki *Aplysina aerophoba*

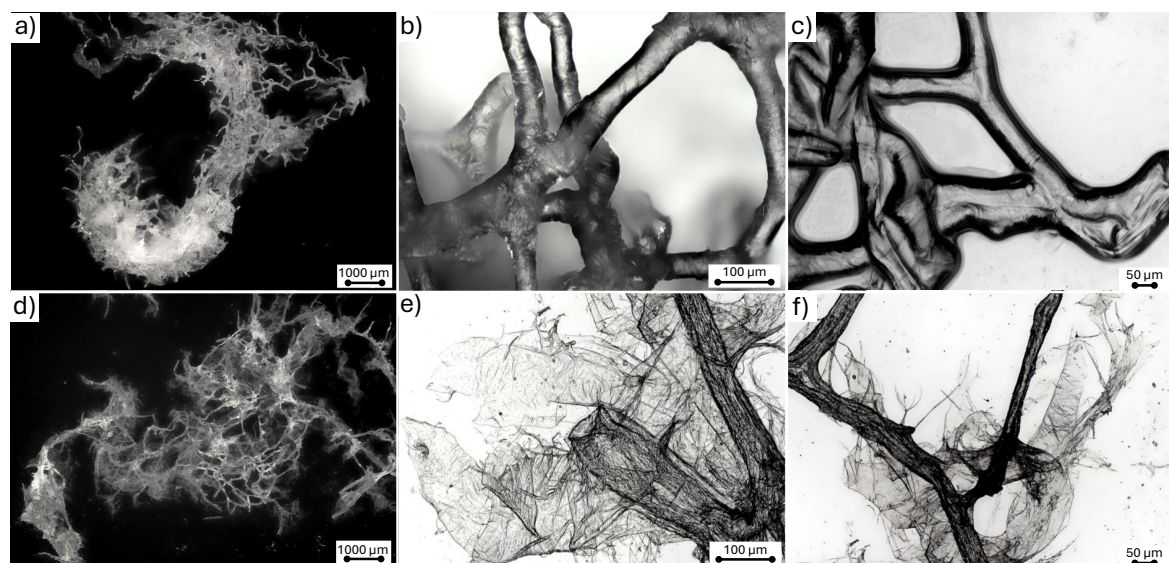
Na obrazie z mikroskopii cyfrowej (rys. 6.15) częściowo rozpuszczonego skafoldu widoczne były pozostałe, pigmentowane włókna chitynowe (rys. 6.15b, strzałki) wraz z otaczającą je strukturą. Aby zbadać tę strukturę, roztwór, w którym prowadzono reakcję, został poddany dializie i liofilizacji. Produkt miał strukturę cienkiej (ok. 1 mm) warstwy, w której wykrycie obecności włókien chitynowych nie było możliwe (rys. 6.15a, c, d).



Rysunek 6.15: Chityna z gąbki *A. aerophoba* po działaniu roztworu LiOH, następnie dializowana i liofilizowana (a). Zdjęcia z mikroskopii cyfrowej przedstawiają częściowo zdegradowany skafold chitynowy (b) z kilkoma pozostałymi pigmentowanymi mikrowłóknami chitynowymi (strzałki), a także ostateczną strukturę filmu (c, d), zaadaptowano z [278].

Proces rozpuszczania włókien chitynowych zobrazowano na rys. 6.16 jako porównanie obrazów mikroskopowych chitynowych skafoldów gąbki *A. aerophoba* uzyskanych w podobnych warunkach eksperymentalnych po działaniu 10% NaOH (rys. 6.16a, b, c) z obrazami częściowo rozpuszczonymi w 1% roztworze LiOH (rys. 6.16d, e, f). Widoczna jest utrata integralności strukturalnej skafoldu podczas jego rozpuszczania warstwa po war-

stwie w roztworze LiOH.



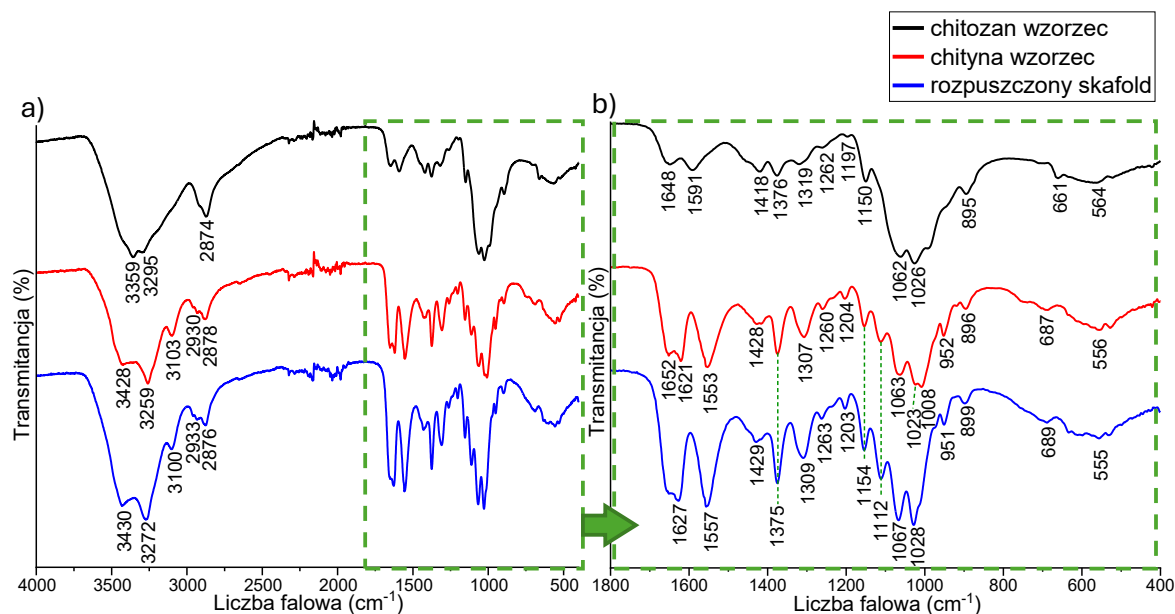
Rysunek 6.16: Obrazy mikroskopowe izolowanych skafoldów chitynowych pochodzących z gąbki *A. aerophoba* po obróbce 10% NaOH (a, b, c) w porównaniu z włóknami chitynowymi częściowo rozpuszczonymi w 1% LiOH (d, e, f), zaadaptowano z [278].

Spektroskopia w podczerwieni pozostaje dobrze znaną metodą analityczną do charakteryzacji polisacharydów, w tym zarówno chityny, jak i chitozanu [26]. Rysunek 6.17 przedstawia widma FTIR wzorców chityny i chitozanu w porównaniu z widmem chityny z gąbki poddanej działaniu LiOH. Wszystkie charakterystyczne pasma przypisywane chitynie są widoczne w widmie próbki poddanej działaniu LiOH. Widmo wzorca chitozanu i chityny z gąbki poddanej działaniu LiOH różni się znacząco, co oznacza, że w trakcie badania nie doszło do deacetylacji. Brak przesunięcia pasm wskazuje na stabilność chemiczną polisacharydu [361]. Ponieważ nie ma zauważalnych różnic w widmach FTIR wzorca chityny i rozpuszczonej chityny, wskazuje to, że rozpuszczenie chityny w LiOH nie powoduje modyfikacji chemicznych biopolimeru na poziomie molekularnym.

Na widmie rozpuszczonego skafoldu chitynowego pasma amidowe przypisane drganiom wibracyjnym grupy CONH znajdują się przy 1627 cm^{-1} (amid I), 1557 cm^{-1} (amid II) i między 1309 a 1203 cm^{-1} (amid III). Obecność dubletu amidu I jest związana ze strukturą krystaliczną chityny. Utrata ostrości w tym obszarze wskazuje na utratę krystaliczności po procesie rozpuszczenia. Cztery silne pasma przypisane drganiom rozciągającym C–O–C i C–O znajdują się przy 1154 cm^{-1} , 1112 cm^{-1} , 1067 cm^{-1} i 1028 cm^{-1} . Pasma obecne przy 1375 cm^{-1} zinterpretowano jako drgania grupy metylowej. Pasma te są identyczne lub bardzo

6.2 Rozpuszczanie chitynowych szkieletów z gąbki *Aplysina aerophoba*

zbliżone do widma referencyjnego α -chityny [26, 28, 363–365]. Przypisanie pasm przedstawiono w tabeli 6.3.



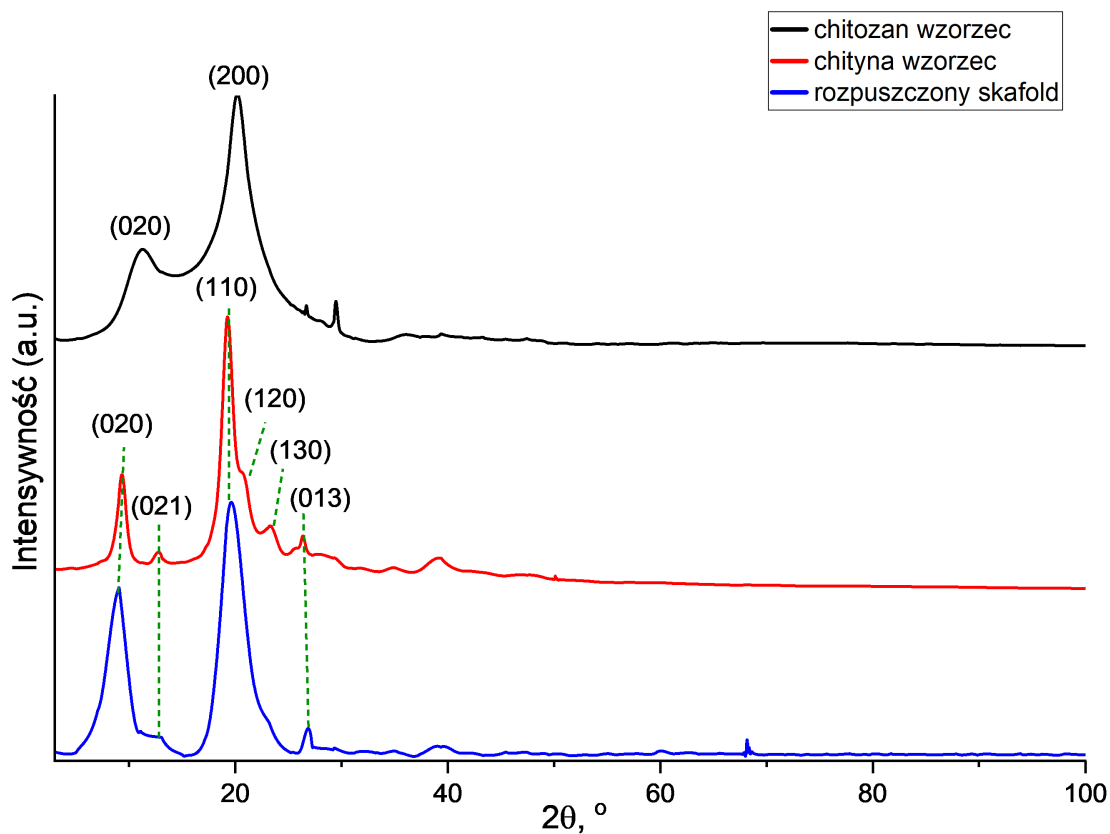
Rysunek 6.17: Widma FTIR wzorców chityny i chitozanu oraz chityny *A. aerophoba* poddanej działaniu LiOH w zakresie (a) 400 – 4000 cm^{-1} i (b) 400 – 1800 cm^{-1} , zaadaptowano z [278].

Tabela 6.3: Liczby falowe z widm FTIR wzorców chityny i chitozanu oraz rozpuszczonego szkieletu oraz ich przyporządkowanie, zaadaptowano z [278].

Chitozan wzorzec (cm^{-1})	Chityna wzorzec (cm^{-1})	Rozpuszczony szkielet (cm^{-1})	Przypisanie pasm
3359	3428	3430	Drgania rozciągające O-H
3295	3259	3272	Drgania rozciągające N-H
-	3103	3100	Drgania rozciągające N-H
-	2930	2933	Drgania rozciągające CH_x
2874	2878	2876	Drgania rozciągające CH_x
1648	1652	-	Pasmo amidowe I
-	1621	1627	Pasmo amidowe I
1591	1553	1557	Pasmo amidowe II
1418	1428	1429	Drgania zginające CH_2
1376	1375	1375	Drgania deformacyjne CH_3
1320	1308	1309	Pasmo amidowe III
1262	1260	1263	Pasmo amidowe III
1197	1204	1203	Pasmo amidowe III
1150	1154	1154	Drgania rozciągające C-O-C, C-O
-	1112	1112	Drgania rozciągające C-O-C, C-O
1062	1063	1067	Drgania rozciągające C-O-C, C-O
1026	1023	1028	Drgania rozciągające C-O-C, C-O
-	1008	-	Drgania rozciągające C-O w pierścieniu fazowym
-	952	951	Drgania kołyszące CH_3
895	896	899	Drgania rozciągające CH w pierścieniu

6 Wyniki i dyskusja

Dyfraktogramy XRD wzorców chityny i chitozanu oraz rozpuszczonego skafoldu chitynowego przedstawiono na rys. 6.18. Wzór dyfrakcyjny wzorca chitozanu wykazuje dwa główne piki przy $2\theta = 11,16^\circ$ i $20,26^\circ$, przypisywane płaszczyznom krystalograficznym (020) i (200) [26]. Wzór dyfrakcyjny wzorca chityny prezentuje charakterystyczne piki przy $2\theta = 9,31^\circ$, $12,69^\circ$, $19,27^\circ$, $20,55^\circ$, $23,33^\circ$ i $26,31^\circ$, odpowiadające płaszczyznom (020), (021), (110), (120), (130) i (013). Po procesie rozpuszczania piki przy $2\theta = 20,55^\circ$ i $23,33^\circ$ nie zostały zaobserwowane. Rozpuszczony skafold chitynowy wykazuje główne piki dyfrakcyjne α -chityny przy $2\theta = 9,03^\circ$ i $19,65^\circ$, odpowiadające płaszczyznom krystalograficznym chityny typu α (020) i (110). Widoczne są również dwa mniejsze piki przy $2\theta = 12,50^\circ$ i $26,81^\circ$, które można przypisać refleksom (021) i (013). Piki te są szerokie i zlokalizowane w charakterystycznych dla α -chityny pozycjach [150, 26].



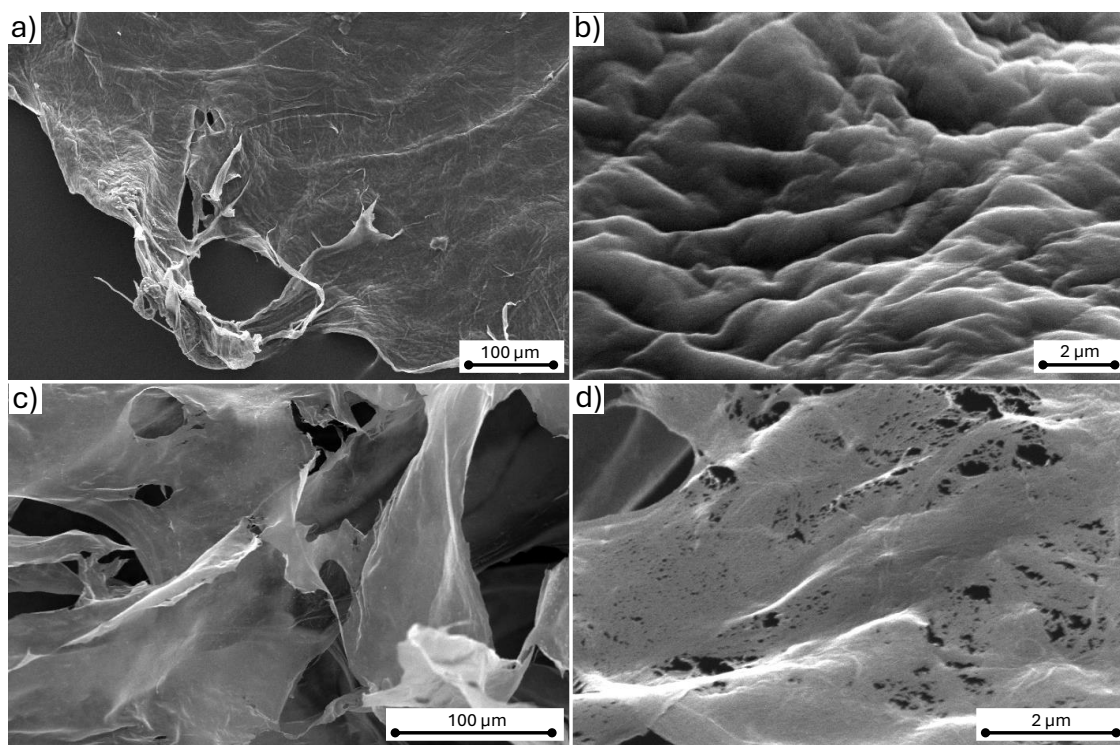
Rysunek 6.18: Znormalizowane dyfraktogramy XRD standardów chityny i chitozanu w porównaniu z rozpuszczonym skafoldem chitynowym z gąbki *A. aerophoba*, zaadaptowano z [278].

Poszerzenie sygnałów XRD może wynikać ze zwiększonej powierzchni odsłaniającej łańcuchy polisacharydów [366, 150]. Piki na dyfraktogramie rozpuszczonego skafoldu

6.2 Rozpuszczanie chitynowych skafoldów z gąbki *Aplysina aerophoba*

chitynowego są szersze w porównaniu z wzorcem. Może to wskazywać na spadek kryształowości chityny. Obecność niewielkiego pików w okolicach $2\theta = 70^\circ$ i intensywność pików związanego z odbiciem (020) na dyfraktogramie rozpuszczonego skafoldu mogą być spowodowane zanieczyszczeniami. Można oczekiwać, że w roztworze wewnątrzcząsteczkowe i międzycząsteczkowe wiązania wodorowe ulegają zerwaniu [361]. Ponieważ wzór dyfrakcyjny rozpuszczonego skafoldu chitynowego jest podobny do wzoru dyfrakcyjnego wzorca α -chityny i różni się od wzoru dyfrakcyjnego wzorca chitozanu, nie zachodzą żadne modyfikacje chemiczne, co potwierdza poprawność analizy FTIR.

Rysunek 6.19 przedstawia obrazy SEM włókien chityny z gąbki *A. aerophoba* wyizolowanych po działaniu NaOH (a, c) i po rozpuszczeniu w roztworze LiOH (b, d).



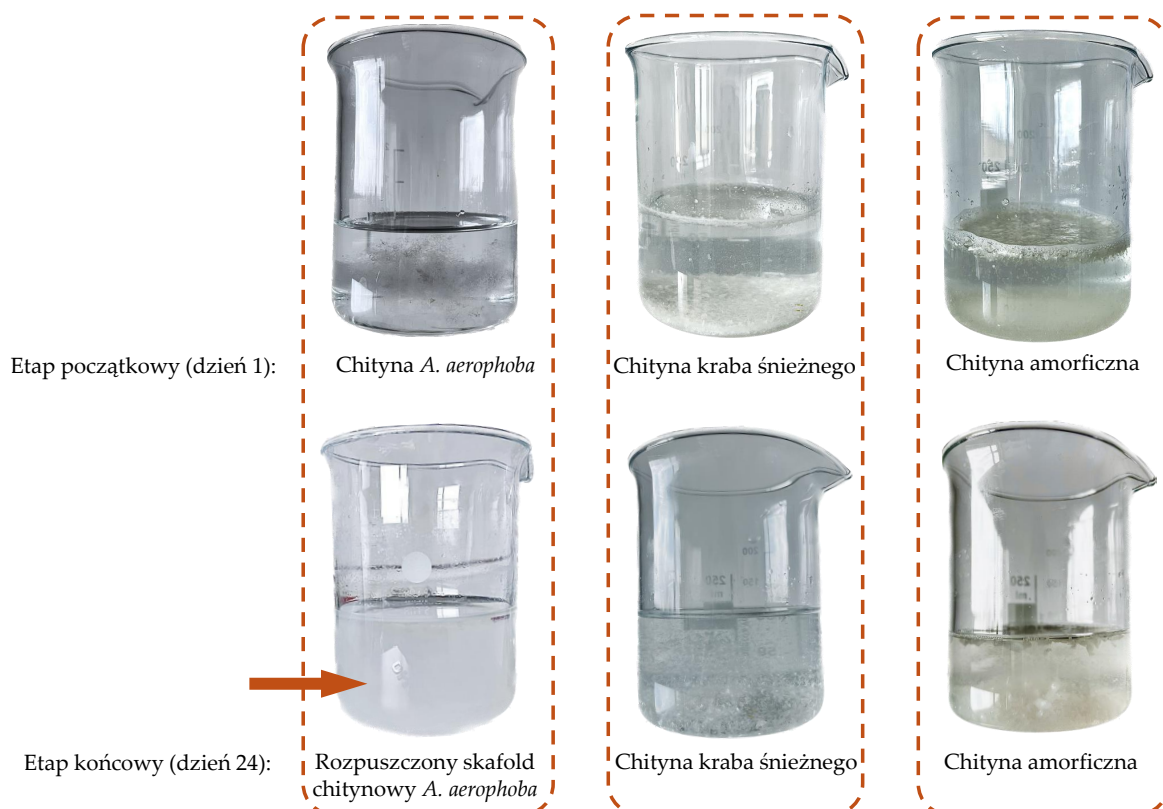
Rysunek 6.19: Obrazy SEM skafoldu chitynowego *A. aerophoba* po działaniu NaOH (a, b) i po rozpuszczeniu w LiOH (c, d). Zniszczenie integralności strukturalnej po obróbce roztworem LiOH jest wyraźnie widoczne, zaadaptowano z [278].

Różnica w integralności strukturalnej jest wyraźnie widoczna. Powierzchnia skafoldu chitynowego poddanego działaniu NaOH jest szorstka i zwarta (rys. 6.19a, b). Obraz SEM rozpuszczonego skafoldu chitynowego z gąbki po liofilizacji przedstawia strukturę składającą się z gładkich warstw (rys. 6.19c). Większe zbliżenie pozornie zdeintegrowanej gładkiej powierzchni ujawnia obecność nanowłókien chityny (rys. 6.19d). Połączenie wyników XRD

6 Wyniki i dyskusja

(rys. 6.18) z obrazami SEM (rys. 6.19) wskazuje na obecność nanowłókien i sugeruje nanokrystaliczną organizację uzyskanej próbki [150].

Aby przeprowadzić test kontrolny dotyczący szczególnej aktywności LiOH na wybranych źródłach chityny, próbki wzorców chityny z kraba śnieżnego (*Chionoecetes opilio*) oraz amorficznej chityny poddano działaniu ultradźwięków w roztworze wodorotlenku litu w takich samych warunkach, jak w eksperymentach z gąbką *A. aerophoba*. Po 24 dniach rozpuszczeniu uległa jedynie matryca chitynowa wyizolowana z gąbki *A. aerophoba*, podczas gdy pozostałe próbki chityny poddane badaniu pozostały bez zmian (rys. 6.20).



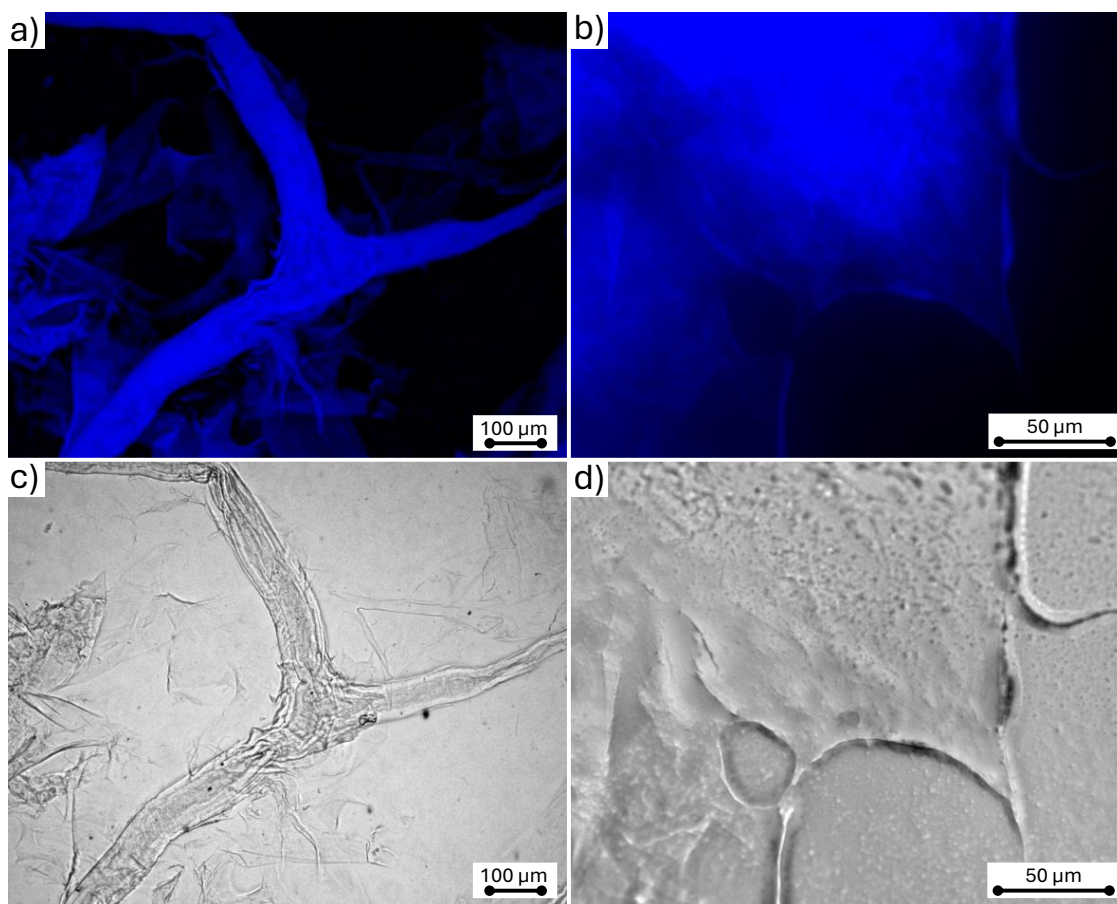
Rysunek 6.20: Porównanie różnych próbek chityny przed i po działaniu LiOH. Tylko w przypadku chityny z gąbki *A. aerophoba* uzyskano zawiesinę (strzałka), zaadaptowano z [278].

W przeciwieństwie do wzorca chityny pochodzącego ze stawonogów, tylko chityna wyizolowana z gąbki *A. aerophoba* zawiera brom w postaci bromotyrozyn [362, 217, 218]. Resztkowa ilość bromu wykryta w tej częściowo rozpuszczonej chitynie metodą EDX mieści się w zakresie od 0,17 do 0,25% wag. W związku z tym obserwowane zjawisko rozpuszczania matrycy chitynowej z gąbki opiera się na możliwej interakcji jonów Li^+ i Br^- , która prowadzi do powstania LiBr, który jest uznawany za dobrze znany odczynnik do rozpuszczania

6.2 Rozpuszczanie chitynowych skafoldów z gąbki *Aplysina aerophoba*

biopolimerów, w tym polisacharydów [367–370].

Dodatkowo, w celu potwierdzenia obecności chityny w skafoldach szkieletowych *A. aerophoba*, częściowo rozpuszczonych w 1% roztworze LiOH, zastosowano barwienie Calcofluor White. Technika ta była już stosowana do identyfikacji chityny w skafoldach różnych gatunków gąbek morskich, w tym *A. aerophoba* [228], *A. archeri*, *I. basta* [200], *I. labirintus* [158]. Mechanizm działania metody polega na wiązaniu CFW z grupami β -glikozydowymi chityny i tworzeniu związku o silnej fluorescencji w niebieskim zakresie widma. Zarówno częściowo rozpuszczone w roztworze LiOH włókna chitynowego skafoldu z gąbki (rys. 6.21c), jak i warstwa ostatecznie uzyskana po liofilizacji (rys. 6.21d) wykazują silną niebieską fluorescencję przy wyjątkowo krótkim czasie ekspozycji na światło (rys. 6.21a,b).

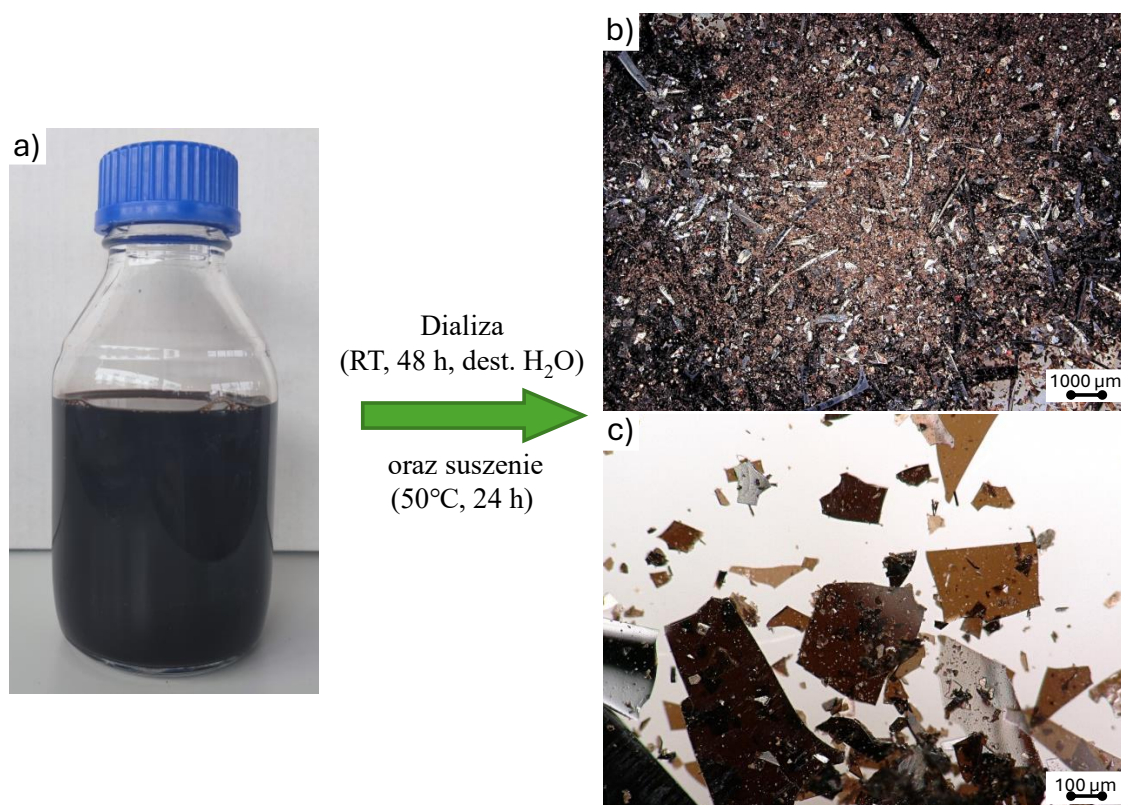


Rysunek 6.21: Próbki barwione CFW (a, c) częściowo rozpuszczonych włókien chitynowych; (b, d) warstwa otrzymana po liofilizacji. Obrazy a i b uzyskano za pomocą kanału DAPI, obrazy c i d – w warunkach jasnego pola. Czas naświetlania: (a) 1/6800 s; (b) 1/1100 s, zaadaptowano z [278].

Jednocześnie z izolacją skafoldów chitynowych, zastosowanie roztworu LiOH prowadzi do powstania ciemnobrązowego ekstraktu zawierającego bromotyrozyny (rys. 6.22a). Po

6 Wyniki i dyskusja

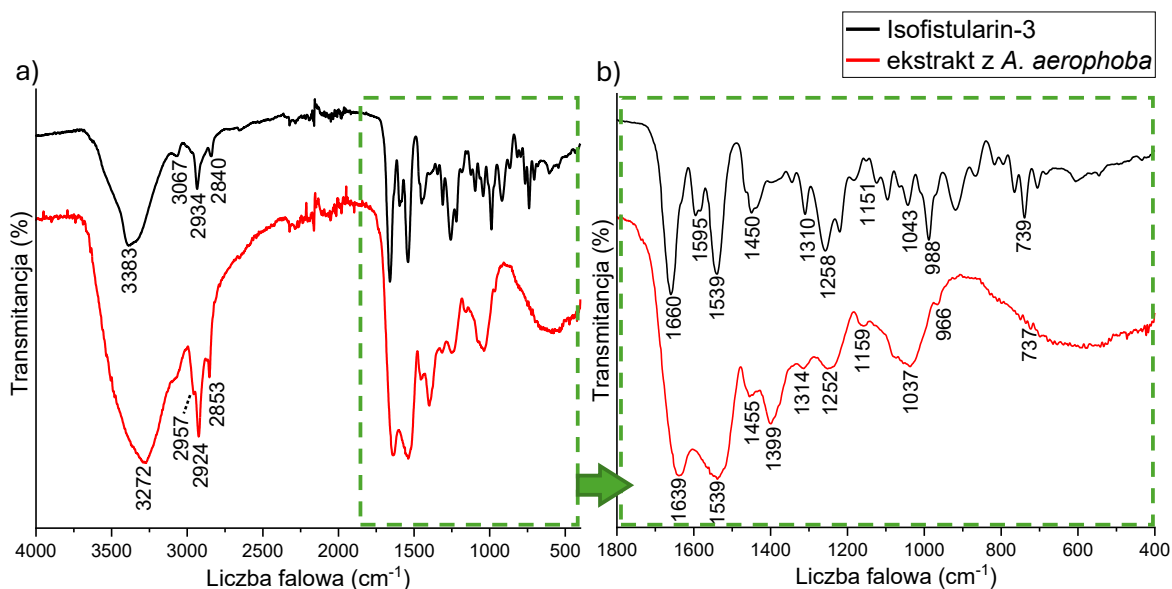
dializie i wysuszeniu tworzy on czarną lub brązową fazę krystaliczną (rys. 6.22b, c).



Rysunek 6.22: Ekstrakt zawierający bromotyrozyny (a) uzyskany w procesie rozpuszczania matrycy chitynowej. (b) Obraz mikroskopowy dializowanego i wysuszonego ekstraktu, (c) obraz w większym powiększeniu, zaadaptowano z [278].

Rysunek 6.23 przedstawia widma FTIR uzyskanego ekstraktu z *A. aerophoba* w porównaniu z widmem wzorca isofistularin-3, jednej z najlepiej poznanych bromotyrozyn wyizolowanych z tej gąbki [228, 371]. Pasma w zakresie $2840 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ są podobne na obu widmach i wskazują na obecność grup hydroksylowych (3272 cm^{-1}) i grup CH_x ($2957, 2924, 2853 \text{ cm}^{-1}$). Powyżej 3000 cm^{-1} występuje również pasmo pochodzące z rozciągania C–H. Pasma przy 1639 i 1539 cm^{-1} mogą być wynikiem obecności wiązania amidowego. Pasma przy 1455 cm^{-1} można przypisać rozciąganiu pierścienia aromatycznego. Pasma przy 1159 i 1037 cm^{-1} mogą być związane z drganiami rozciągającymi C–O. Alifatyczne związki bromu wykazują pasmo przy częstotliwości $600-700 \text{ cm}^{-1}$, ale jeśli obecnych jest kilka atomów bromu, interpretacja nie jest oczywista. W przypadku bromowanych związków aromatycznych obecności halogenu nie można wykryć bezpośrednio [372]. Wzorec isofistularin-3 wykazuje pasma charakterystyczne dla tego związku ($3383, 2934, 1660, 1595, 1539, 1450$ i 1258 cm^{-1}), co jest zgodne z danymi z literatury [373–375]. Pasma przy $3383, 2934, 1660$ i 1539

cm^{-1} można przypisać grupom hydroksylowym [375]. W obszarze odcisku palca widma zarówno wzorca isofistularin-3, jak i ekstraktu wykazują bardzo podobne sygnały. Są to pasma przy 1450, 1310, 1258, 1151, 1043 i 739 cm^{-1} w widmie standardowym isofistularin-3, które dobrze odpowiadają sygnałom w widmie ekstraktu *A. aerophoba* przy 1455, 1314, 1252, 1159, 1037 i 737 cm^{-1} . Pasma przy 1539 cm^{-1} znajduje się w tym samym miejscu na obu widmach.

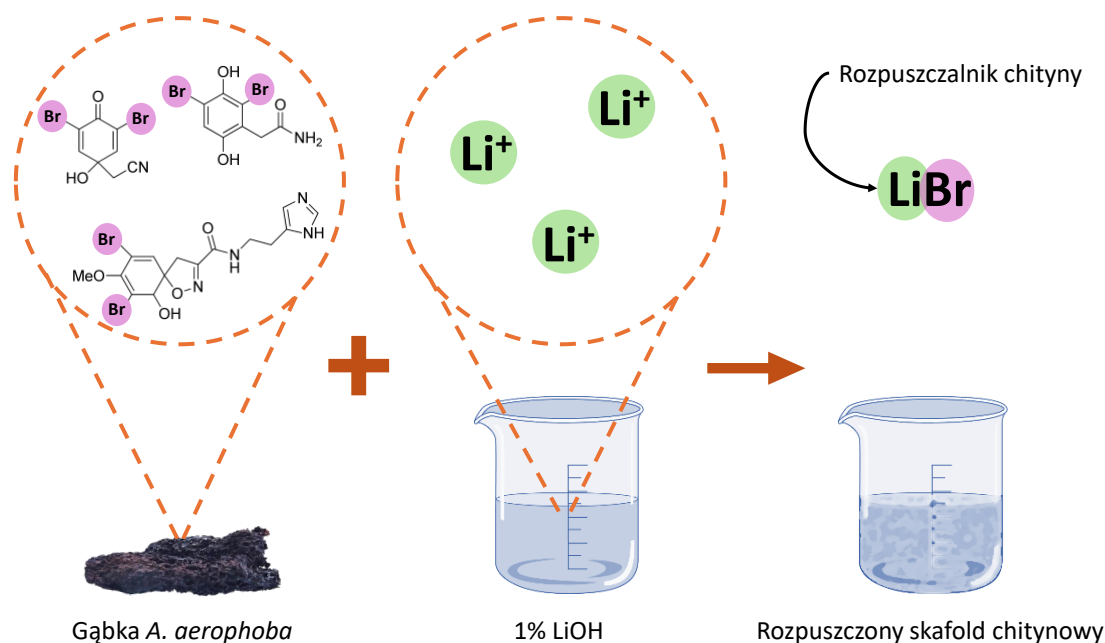


Rysunek 6.23: Porównawcze widma FTIR otrzymanego ekstraktu dializowanego i suszonego oraz wzorca isofistularin-3 w zakresie $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ i (e) w zakresie $400\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$, zaadaptowano z [278].

6.2.2 Wnioski

Podczas rozpuszczania skafoldów chitynowych pigmentowane mikrowłókna chityny *A. aerophoba*, zawierające bromotyrozyny, przestają być widoczne, przekształcając się w materię amorficzną. Wskazuje to, że wodorotlenek litu reaguje z bromem pochodzącym z bromotyrozyn z gąbki *A. aerophoba*, dając bromek litu, który ostatecznie rozpuszcza skafold. Schematyczny obraz procesu przedstawiono na rysunku 6.24. Stężenie izofistularyny, jako głównego potencjalnego źródła bromu w tym gatunku, może sięgać nawet 55 mg na 1 g wysuszonej gąbki [228]. Można zasugerować, że wiązania krzyżowe oparte na bromotyrozynach mogą być odpowiedzialne za wzajemne połączenia chitynowych nanowarstw, które tworzą odpowiadające im mikrorurki szkieletowe (rys. 6.16d, f). Żaden z dotychczas badanych alkaliów, z wyjątkiem wodorotlenku litu, nie doprowadził do oddzielenia takich struktur rurowych i ich późniejszej transformacji w struktury przypominające błonę. Dlatego

roztwór bromku litu może być obiecującym kandydatem do rozpuszczania tak specyficznej chityny, jak ta z gąbki *A. aerophoba*. Co więcej, inne naturalne polimery, które mają ograniczoną liczbę rozpuszczalników ze względu na występowanie wiązań wodorowych, takie jak jedwab, można z powodzeniem rozpuścić w bromku litu, uzyskując wodny roztwór jedwabiu. Wynika to z faktu, że LiBr jest solą chaotropową, która w wysokich stężeniach może rozrywać między- i wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe i rozpuszczać włókna jedwabiu [370]. We wcześniejszych badaniach użyto roztworu bromku litu do rozpuszczenia fibroiny jedwabiu i celulozy, tworząc porowate gąbki o trójwymiarowej strukturze nanowłóknistej [368]. Doniesiono, że rozpuszczanie celulozy w roztworze bromku litu powoduje spadek jej krystaliczności i że można ją rozpuścić w wodnym roztworze LiBr, tworząc nanowłókna celulozowe. Po podgrzaniu roztworu LiBr celuloza ulega całkowitemu rozpuszczeniu [376, 369]. Opisano również rozpuszczanie chityny w LiBr w różnych, wybranych warunkach [377, 378]. Chitozan można również rozpuścić w wodnym roztworze bromku litu. Proces ten nie powoduje istotnych różnic w krystaliczności [376]. Tradycyjnie, główną zaletą chityny z gąbek jest jej integralność strukturalna na poziomie 3D, a co za tym idzie, przydatność do zastosowania w inżynierii komórkowej i tkankowej [69]. Wprowadzenie gąbki *A. aerophoba* do 1% roztworu LiOH w temperaturze 65°C prowadzi do zniszczenia trójwymiarowych konstrukcji chitynowych. Otwiera jednak również drogę do uzyskania chitynowych materiałów o nanowłóknistej strukturze przypominającej folię (rys. 6.19d). Pomimo utraty pierwotnej, rurkowatej struktury 3D (rys. 6.16c, d), chityna z gąbki nadal posiada właściwości chemiczne α -chityny. Co ciekawe, zastosowanie LiOH otwiera również perspektywę optymalizacji metody izolacji bromotyrozyn, zwłaszcza w przypadku tak biologicznie aktywnego leku przeciwnowotworowego, jak isofistularin-3 [371]. Obecnie cena 1 g isofistularin-3 wynosi 150 000 dolarów [228]. Ze względu na hodowlę gąbek *A. aerophoba* w warunkach morskich [379], izolacja tego związku może prowadzić do interesujących zmian w farmakologii morskiej, a także w biogospodarce morskiej gąbek.



Rysunek 6.24: Schemat rozpuszczania skafoldu chitynowego z gąbki *A. aerophoba*, zaadaptowano z [278].

6.3 Właściwości mechaniczne chitynowych skafoldów z gąbek

Właściwości mechaniczne biomateriałów, w tym chityny, są niezwykle istotne, zwłaszcza jeśli są one wykorzystywane do regeneracji struktur o funkcji nośnej lub o zwiększonej sztywności, takich jak tkanki twarde, np. kości i zęby [380, 381].

Grupa acetylowa występująca w chitynie, w przeciwieństwie do jej deacetylowanej pochodnej – chitozanu, może odgrywać bardzo istotną rolę w określaniu lepszych właściwości mechanicznych obserwowanych w przypadku chityny, co odkryto dzięki teorii funkcjonału gęstości elektronowej i symulacji dynamiki molekularnej [382]. Autorzy [382] stwierdzili, że wynika to z większej liczby wiązań wodorowych wzdłuż kierunku międzypłaszczyznowego modelu chityny. Ponadto interakcje van der Waalsa w kryształach chityny ulegają wzmocnieniu ze względu na większą masę cząsteczkową grupy acetylowej, co jest również przyczyną różnic we właściwościach mechanicznych obserwowanych między chityną a chitozanem [382]. W eksperymencie badającym β -chitynę stwierdzono wpływ stopnia deacetylacji na właściwości mechaniczne, takie jak maksymalne naprężenie i moduł Younga, które zmniejszały się wraz ze zmniejszaniem stopnia deacetylacji, a maksymalne wydłużenie rosło wraz ze zmniejszaniem stopnia deacetylacji [383].

6 Wyniki i dyskusja

Stwierdzono, że kryształ α -chityny wykazuje lepsze właściwości mechaniczne w odpowiedzi na obciążenia rozciągające i ścinające. Po przyłożeniu niewielkiego jednoosiowego naprężenia wzdłuż łańcucha, kryształ α -chityny wykazuje moduł sprężystości przy 48 GPa, prawie dwukrotnie wyższy niż kryształ β -chityny przy 27 GPa. Ponadto praca pęknięcia, moduł ścinania i wytrzymałość kryształu α -chityny są wyższe niż w przypadku kryształu β -chityny [384].

Oprócz chityny różnorodne organizmy morskie, w tym gąbki, zawierają również biominerały i pigmenty w obrębie swojego szkieletu [26]. W przypadku gąbek z rzędu Verongiida opisano występowanie licznych bromotyrozyn [278]. Biologiczna rola tych związków polega na ochronie przed aktywnością chitynaz mikroorganizmów, które wykorzystują matrycę chitynową jako źródło węgla [150]. Zarówno działanie przeciwwirusowe [72], jak i przeciwbakteryjne bromotyrozyn jest dobrze poznane [228]. Odpowiednie mechanizmy wyżej wymienionych aktywności zostały dokładnie przedstawione i omówione [218].

Rola bromotyrozyny, unikalnej pochodnej aminokwasu w sieciowaniu chityny u organizmów morskich, takich jak gąbki z rzędu Verongiida, jest jednak słabo poznana. W związku z tym można zasugerować, że zawartość bromotyrozyny, a także chemiczne oddziaływanie między chityną i bromotyrozynami, może odgrywać istotną rolę w kształtowaniu właściwości mechanicznych chityny występującej u gąbek z rzędu Verongiida.

Właściwości mechaniczne warstw chitynowych można powiązać z wielkością redukcji objętości zachodzącej podczas przejścia z żelu do końcowej postaci błony [385]. Dlatego, aby zachować elastyczność, zmniejszyć zniekształcenia wymiarowe i zapewnić doskonałą integralność mechaniczną w stanie suchym, ważne jest kontrolowanie procesu koagulacji i kurczenia podczas przygotowywania materiałów chitynowych. Do produkcji elastycznych błon chitynowych o grubości 25–80 μm zastosowano procesy prasowania na zimno (np. rozpuszczanie chityny w roztworze dimetyloacetamidu i 5% LiCl w temperaturze 0°C). Aby usunąć pozostałości rozpuszczalnika, próbki ogrzewano w temperaturze 50°C przez 12 godzin i płukano w 95% etanolu. Moduł Younga tych elastycznych błon chitynowych wahał się od 1240 do 3650 MPa, przy wytrzymałości na rozciąganie od 38 do 60 MPa i przezroczystości do 90% [385]. Błony chitynowe o takich właściwościach mechanicznych są uznawane za przydatne w zastosowaniach opatrunkowych [385]. W celu porównania właściwości mechanicznych wybranych biomateriałów zestawiono je w tabeli 6.4.

Tabela 6.4: Porównanie właściwości mechanicznych różnych biomateriałów, zaadaptowano z [386].

	Biomateriał	Moduł sprężystości (MPa)	Wytrzymałość na rozciąganie (MPa)	Źródło
Chityna	Tchawki akustyczne pasikoników	5200	–	[387]
	Mokry pancerz kraba <i>Loxorhynchus grandis</i>	518 ± 72	31,5 ± 5,4	[388]
	Suchy pancerz kraba <i>Loxorhynchus grandis</i>	764 ± 83	12,9 ± 1,7	
	Komercyjne folie chitynowe	1240 - 3650	38 - 60	[385]
	Chityna z kraba <i>Portunus pelagicus</i>	–	44,22	[389]
Ludzkie tkanki	Ludzka skóra	98,97 ± 97	27,2 ± 9,3	[390]
	Gąbczasta tkanka kostna kości udowej człowieka	441	6,8	[391]

Opracowano wytrzymałe, przezroczyste błony na bazie chityny, wykazujące właściwości barierowe dla gazów. Metoda ich wytwarzania opiera się na rozpuszczeniu chityny w wodnym roztworze NaOH o stężeniu 11% wag. i mocznika o stężeniu 4% wag. w niskiej temperaturze. Przy grubości 800 nm wykazują one przepuszczalność światła na poziomie 87% i doskonałą wytrzymałość na rozciąganie do 111 MPa [392].

Wysoka wytrzymałość mechaniczna oraz moduł Younga (powyżej 150 GPa) materiałów na bazie chityny wynikają z antyrównoległej, rozciągniętej struktury krystalicznej nanowłókien chitynowych. Dzięki takim właściwościom mechanicznym nanowłókna chitynowe mogą poprawiać właściwości mechaniczne polilaktydu [393], poli(ϵ -kaprolaktonu) [394, 395], oraz żywic akrylowych [396, 202].

Chitynę z kraba *Portunus pelagicus* wykorzystano do wytworzenia błon z 5% (w/v) roztworem chlorku litu/*N,N*-dimetyloacetamidu (LiCl/DMAc) [389]. Stwierdzono, że błony z polimerów chitynowych charakteryzują się wyższą wytrzymałością na rozciąganie, do 44,22 MPa, niż komercyjne próbki kontrolne z tworzyw sztucznych, które wykazują wytrzymałość na rozciąganie równą 18,90 MPa. W analizie kompozytów kolagen/chityna wytworzonych z wykorzystaniem dwóch polimorfów: α -chityny i β -chityny, i wykazano, że polimorf β -chityny wykazuje znacznie lepsze właściwości mechaniczne dzięki przegrupowaniu regionów krystalicznych i tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych z kolagenem [397].

6 Wyniki i dyskusja

Symulacje dynamiki molekularnej dowodzą, że α -chityna charakteryzuje się wyższą sztywnością i wytrzymałością na rozciąganie w porównaniu z biokompozytem chitozanowym. Biokompozyt charakteryzuje się jednak zwiększoną ciągliwością, co czyni go wszechstronnym materiałem do różnych zastosowań wymagających zarówno sztywności, jak i elastyczności [398].

Badania egzoszkieletu morskiego bezkręgowca *Aglaophenia latirostris* wykazują, że hierarchiczna organizacja nanowłókien chityny przyczynia się do zwiększenia sztywności materiału w warunkach suchych, jak i twardości w warunkach wilgotnych. Pomimo pogorszenia wytrzymałości mechanicznej w obecności wody, elastyczność materiału została zachowana, co potwierdza jego zdolność adaptacji do warunków wodnych [399].

Błony wytworzone z komercyjnej chityny, pozyskiwanej głównie ze skorupiaków, zazwyczaj wykazują dobre właściwości mechaniczne. Jednakże nie wykazują one specyficznie połączonych mikrotubularnych, trójwymiarowych struktur włóknistych. W związku z tym niniejsze badania mają na celu zrozumienie właściwości mechanicznych trójwymiarowych matryc chitynowych, wyizolowanych z wybranych gąbek morskich, które posiadają α -chitynę [26]. Na podstawie symulacji dynamiki molekularnej stwierdzono, że woda może znacząco wpływać na elastyczność symulowanych kompozytów chitynowo-białkowych [400]. Dlatego też wykorzystano dwa rodzaje próbek: próbki do oceny modułu sprężystości podczas ściskania w stanie mokrym oraz suche próbki osadzone w żywicy do eksperymentów nanoindentacji. W obu eksperymentach oceniano dwa rodzaje próbek: pozbawione komórek matryce chitynowe zawierające bromotyrozyny oraz pozbawione komórek skafoldy chitynowe niezawierające bromotyrozyn. Ma to na celu jednoczesne określenie potencjalnego wpływu bromotyrozyn na właściwości mechaniczne skafoldów chitynowych z gąbek.

6.3.1 Wyniki

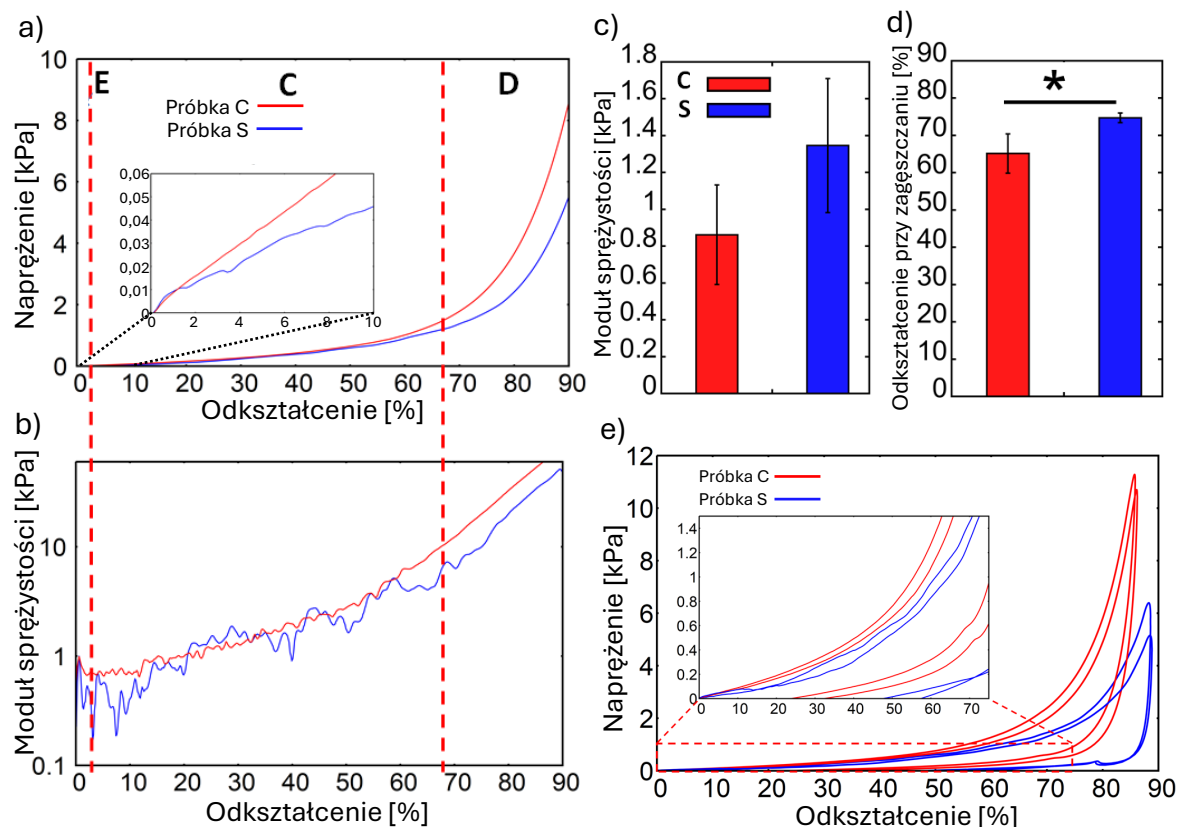
Rysunek 6.25a i b przedstawia krzywe naprężenie-odkształcenie i moduł sprężystości-odkształcenie dla wybranych próbek gąbek chitynowych skafoldów wyizolowanych z gąbki *Aplysina aerophoba*, hodowanej w warunkach hodowli morskiej, testowanej w warunkach wilgotnych. Wyznaczono moduły sprężystości charakteryzujące próbki (rys. 6.25c). Moduł sprężystości próbek zawierających bromotyrozyny (S) jest nieznacznie wyższy niż próbek

6.3 Właściwości mechaniczne chitynowych skafoldów z gąbek

pozbawionych bromotyrozyn (C). Różnica ta pozostaje jednak statystycznie nieistotna. Fazy zapadania się próbek zawierających i pozbawionych bromotyrozyn różnią się wyraźnie. Krzywa modułu sprężystości i odkształcenia próbki pozbawionej bromotyrozyn jest znacznie gładka niż w przypadku próbek zawierających bromotyrozyn. Widać, że napężenie wyraźnie wzrosło, gdy obie próbki skafoldów zostały ściśnięte do odkształcenia przekraczającego 60%, co może wskazywać na obecność fazy zagęszczania.

Gładkość krzywych stycznych modułu sprężystości i odkształcenia wyraźnie obrazuje zagęszczanie badanych skafoldów (rys. 6.25a, b). Z rysunku 6.25d wynika, że w przypadku próbek pozbawionych bromotyrozyn odkształcenie zagęszczające jest istotnie niższe niż w przypadku próbek zawierających bromotyrozyn. Na rysunku 6.25e przedstawiono krzywe histerezy napężenie-odkształcenie. Obie badane grupy próbek były trwale odkształcone, jednak nadal miały pewną resztkową zdolność do zmiany kształtu. Warto podkreślić, że w przypadku próbek zawierających bromotyrozyn odkształcenie jest nieodwracalne w większym stopniu niż w przypadku próbek pozbawionych bromotyrozyn (rys. 6.25e), co może sugerować, że znaczna liczba elementów nośnych próbek zawierających bromotyrozyn utraciła ciągłość.

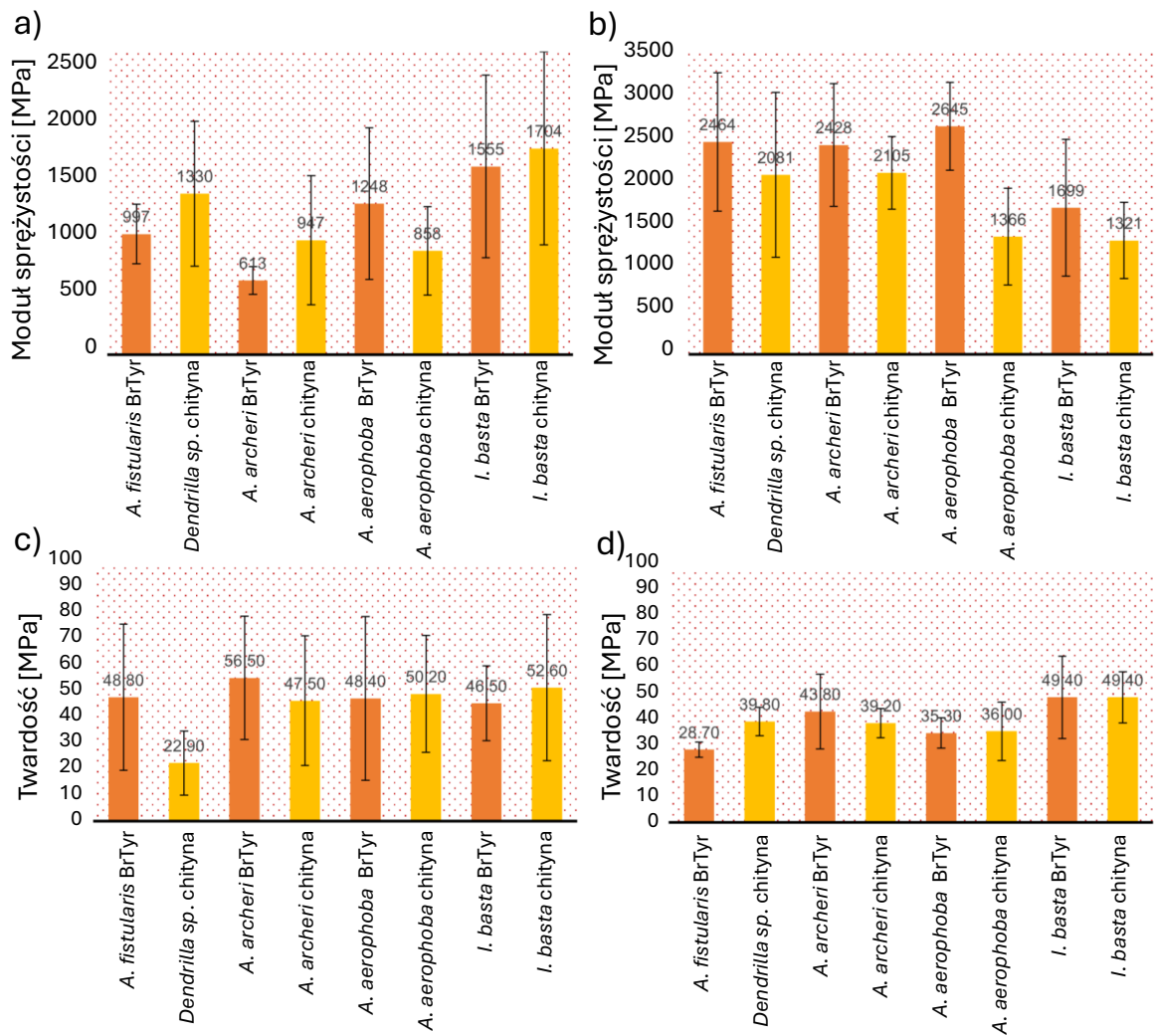
6 Wyniki i dyskusja



Rysunek 6.25: (a) Krzywe napężenie–odkształcenie i (b) moduł sprężystości–odkształcenie. Zaznaczono trzy charakterystyczne etapy ściskania: E – etap sprężystości, C – etap zapadnięcia i D – etap gęstnienia. Porównanie (c) modułu sprężystości ściskania (MPa) i (d) odkształcenia zagęszczającego skafoldów chitynowych zawierających bromotyrozynę i niezawierających bromotyrozyne. * $p < 0.05$; (e) krzywe histerezy obciążenie–odciążenie. Próbki S (niebieskie) odpowiadają próbkom zawierającym bromotyrozynę, a C (czerwone) – próbkom niezawierającym bromotyrozyne, wyizolowanych z gąbki *A. aerophoba*, zaadaptowano z [386].

Rysunek 6.26a, b przedstawia wyniki modułu sprężystości (nanoindentacji) dla pozbawionych komórek włókien chitynowych wyizolowanych z danej gąbki. Wartość modułu sprężystości różni się między próbkami około czterokrotnie, a wartość twardości najtwardszej próbki (*A. archeri*) jest o około 60% wyższa niż próbki o najniższej twardości (*Dendrilla* sp.) (rys. 6.26c, d). Na to może mieć wpływ rozrzut rozmiarów włókien i naturalny sposób ich formowania. Ponadto badając włókna z pojedynczej próbki, zaobserwowano znaczny rozrzut wyników między nimi. Odchylenia standardowe średniej arytmetycznej mieszczą się w zakresie od 20 do 50% wartości zmierzonej. Wynika to z dużej niejednorodności badanego materiału.

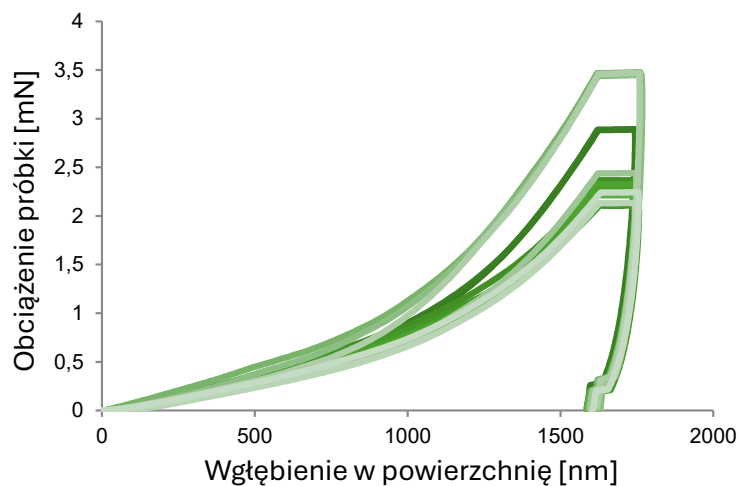
6.3 Właściwości mechaniczne chitynowych skafoldów z gąbek



Rysunek 6.26: Moduł sprężystości przekrojów o grubości 10 μm (a) i 1 μm (b) oraz twardość przekrojów o grubości 10 μm (c) i 1 μm (d) badanych gąbek (od lewej: *A. fistularis*, *Dendrilla sp.*, *A. archeri*, *A. aerophoba*, *Ianthella basta*). BrT oznacza próbki zawierające bromotyrozinę (pomarańczowy), określenie „chityna” odnosi się do próbek, z których usunięto bromotyrozyny (żółty), zaadaptowano z [386].

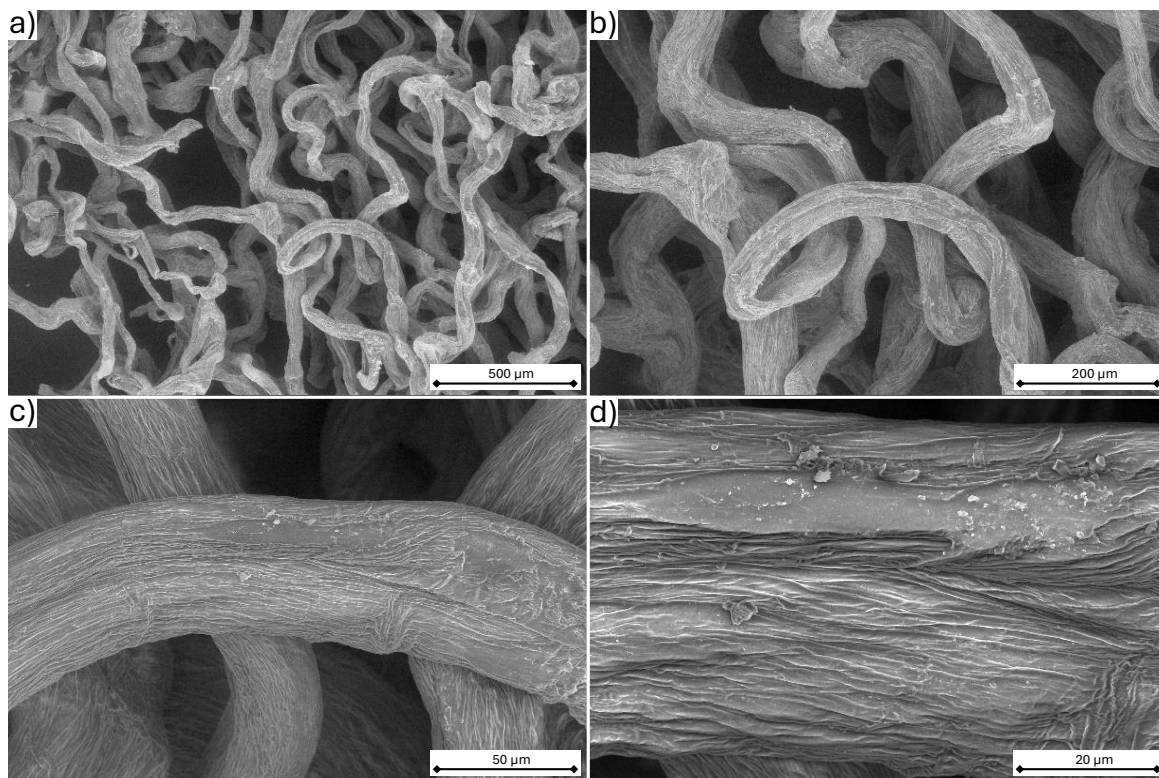
Rysunek 6.27 przedstawia podsumowanie krzywych histerezy nanoindentacji dla jednego rodzaju próbki, tj. kilku włókien *A. aerophoba*.

6 Wyniki i dyskusja



Rysunek 6.27: Krzywe histerezy testów indentacji dla pomiarów włókien chitynowych gąbki *A. aerophoba*, zaadaptowano z [386].

Rysunek 6.28 przedstawia obrazy SEM mechanicznie sprasowanych próbek chitynowych włókien z gąbki *A. aerophoba* w różnych powiększeniach.



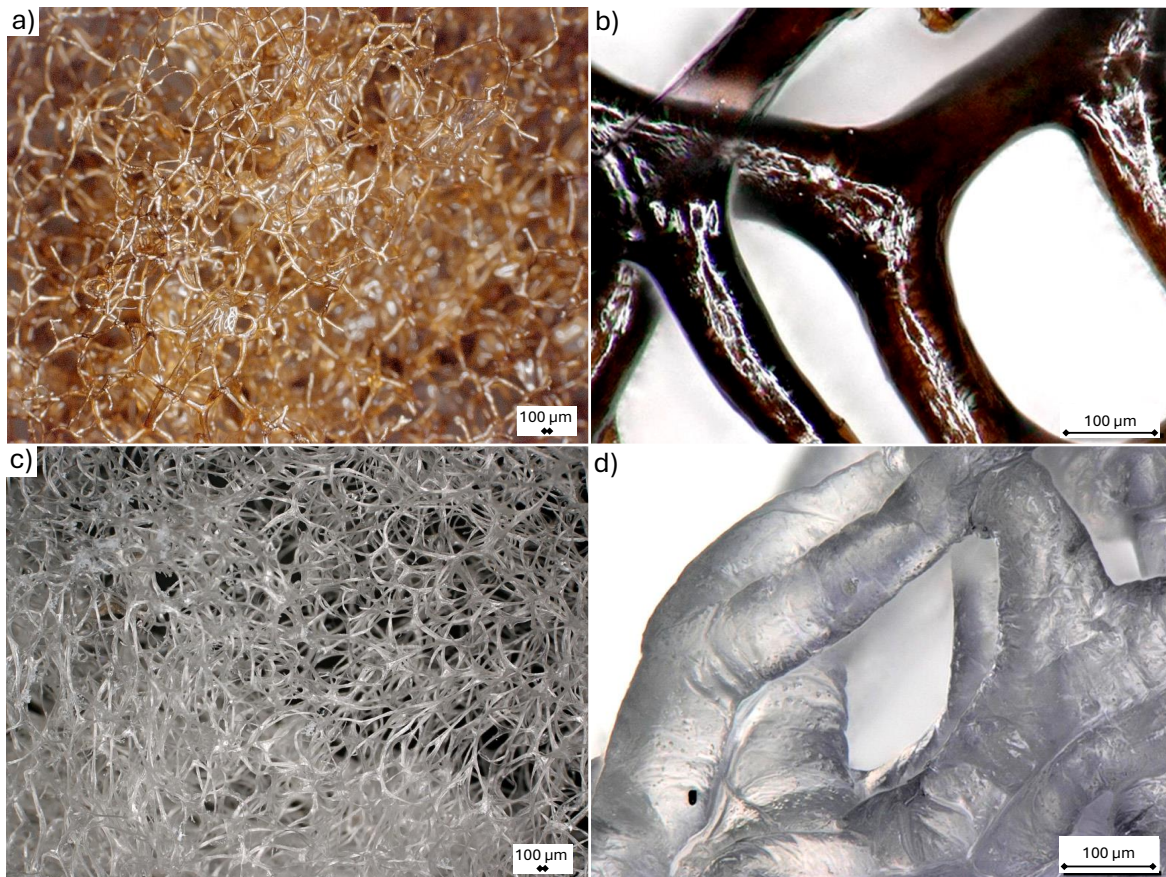
Rysunek 6.28: Obrazy SEM pozbawionego komórek skafoldu z włókien chitynowych *A. aerophoba* w różnych powiększeniach, zaadaptowano z [386].

Włókna wykazują losową orientację i tendencję do wyginania. Widoczne są ślady kurczenia spowodowanego suszeniem. Średnia średnica włókna wynosi około $59 \pm 25,1 \mu\text{m}$ i jest

6.3 Właściwości mechaniczne chitynowych skafoldów z gąbek

zróżnicowana w obrębie pojedynczego włókna z powodu odwodnienia i nierównomiernej redukcji objętości. Porowatość analizowanych próbek określono na około 60% (rozmiar porów: $225 \pm 96 \mu\text{m}$).

Rysunek 6.29 przedstawia próbki szkieletu zawierające bromotyrozynę (a, b) i niezawierające bromotyrozyny (c,d), wyizolowane z gąbki *A. aerophoba*.



Rysunek 6.29: Obrazy z mikroskopu cyfrowego skafoldu z włókien chitynowych *A. aerophoba*. Skafoldy chitynowe zawierające bromotyrozynę, charakteryzujące się trójwymiarową siecią porowatych mikrowłókien (a, b). Skafoldy chitynowe bez bromotyrozyny, charakteryzujące się taką samą trójwymiarową siecią porowatych mikrowłókien (c, d), zaadaptowano z [386].

Próbka zawierająca bromotyrozynę przedstawiona na rysunku 6.29a, b charakteryzuje się porowatą strukturą mikrowłókien 3D o charakterystycznej brązowej pigmentacji [278]. Bromotyrozyny zlokalizowane we włóknach szkieletowych gąbki *A. aerophoba* zostały już wcześniej zidentyfikowane [218, 228]. Zbadano również zawartość pierwiastków w obu rodzajach próbek tego gatunku gąbki, analizowanych za pomocą EDX [199]. W próbce zawierającej bromotyrozynę zidentyfikowano nie tylko atomy bromu, ale także siarki i chloru

[199]. Próbki wolne od bromotyrozyny przedstawione na rysunku 6.29c, d wykazują podobną strukturę; jednak w wyniku obróbki zasadą [278] mikrowłókna utraciły pigmentację i stały się półprzezroczyste. Jest to typowe dla izolowanych skafoldów opartych na włóknach chitynowych, opisywanych wcześniej dla innych gatunków z rzędu Verongiida [141].

6.3.2 Dyskusja

Właściwości mechaniczne skafoldów chitynowych (rys. 6.29) pochodzących z gąbek z rzędu Verongiida nie były dotychczas badane eksperymentalnie. Jednakże stwierdzono, że gąbka z rzędu Verongiida, *A. fistularis*, może wykazywać teoretyczny moduł sprężystości przy ściskaniu wynoszący 0,5 kPa [125], co jest porównywalne z wynikami przedstawionymi w niniejszym badaniu (rys. 6.25c i d).

Właściwości mechaniczne szkieletów gąbek [401] oraz materiałów gąbczastych pochodzenia innego niż gąbki [402] są rzadko badane porównawczo, a dostępnych jest ich zaledwie kilka [403–405]. Różnice te wynikają z rodzaju występującej matrycy organicznej, takiej jak białkowe szkielety gąbek kąpielowych [404], gąbki kolagenowe [406], gąbki drzewne [407], a także celulozowe gąbki z owoców luffy (tj. *Luffa aegyptiaca*) [405]. Bezpośrednie porównanie właściwości mechanicznych gąbek (Porifera) nie jest możliwe ze względu na istotne różnice. Jednakże, gąbki morskie *Rhopaloeides odorabile* [404], wykazały moduł sprężystości mniejszy niż jeden megapaskal ($838,7 \pm 53,5$ kPa). Z kolei gąbki celulozowe wyizolowane z owoców luffy wykazały moduł Younga w zakresie 2–12 MPa, co nadal jest wartością znacznie niższą od wyników przedstawionych w niniejszej pracy. To dodatkowo potwierdza unikalną naturę i doskonałe właściwości mechaniczne badanych matryc chitynowych z gąbek z rzędu Verongiida. Moduł sprężystości szkieletu gąbki *A. aerophoba*, nadal zawierającego bromotyrozyny, wynosi około 2,6 GPa (rys. 6.26a, b). Wartość ta stanowi połowę modułu tchawek akustycznych świerszcza *Mecopoda elongata* (5,2 GPa) [387] i pancerza skorpiona (*Scorpio palmatus*) (5,4 GPa) [405]. Wartość ta mieści się w zakresie dla warstw chitynowych [385, 408, 409], ale jest niższa, np. dla nanowłókien skorupiaków izolowanych z homara amerykańskiego (*Homarus americanus*) (moduł Younga: 7,3 GPa) [410]. Takie wahania modułu sprężystości mogą być specyficzne dla gatunku i są związane z różnymi układami hierarchicznymi oraz wzajemnym oddziaływaniem chemicznym między chityną a towarzyszącymi jej białkami i pigmentami [26].

6.3 Właściwości mechaniczne chitynowych skafoldów z gąbek

Na rys. 6.25c, d i 6.26 można zaobserwować wyraźną tendencję, gdzie moduł sprężystości zależy od tego, czy próbka skafoldu 3D zawiera bromotyrozyny, czy występuje w postaci czystej chityny. W przypadku próbek chityny obserwuje się zmniejszenie modułu sprężystości w związku z ekstrakcją wszystkich bromotyrozyn [217]. Zjawisko to jest niemal powszechnie obserwowane we wszystkich próbkach chityny ocenianych w niniejszym badaniu. Jednakże trend ten nie jest statystycznie istotny. Co więcej, twardość próbek chityny pozostaje stosunkowo niezmienną, co stanowi dowód na to, że ten polisacharyd jest odpowiedzialny za twardość materiału obserwowaną w badanych próbkach. Z drugiej strony, bromotyrozyny w szkieletowych włóknach chitynowych badanych gąbek zwiększają ich elastyczność; nie wpływają jednak znacząco na ich twardość. Można to wyjaśnić obecnością wiązań O-glikozydowych bromotyrozyn, wiązań wodorowych między chityną a bromotyrozynami lub mieszkanką obu tych czynników.

Badane próbki chityny pochodzące z gąbek z rzędu Verongiida kurczą się z powodu odwodnienia, jednak po zanurzeniu w środowisku wodnym ulegają pęcznieniu [141]. Badane matryce wykazują również właściwości „piany z pamięcią kształtu”, co jest atrakcyjną właściwością z punktu widzenia inżynierii tkankowej [411]. Właściwości pianki z pamięcią kształtu wynikają z rotacyjnej elastyczności wiązań wodorowych między łańcuchami chityny [412].

Trójwymiarowe chitynowe skafoldy pochodzące z gąbek z rzędu Verongiida wykazują typowe krzywe histerezy (rys. 6.25e i 6.27) dla materiałów kruchych [413], z nagłym krytycznym uszkodzeniem struktury. Jednakże po utracie bromotyrozyn z matrycy chitynowej, zaobserwowano nieznaczne zmniejszenie sprężystości. Kruchość materiału potwierdza również bardzo wąski stan sprężystości (rys. 6.25a, b). Kruchość jest nieznacznie bardziej widoczna w próbkach zawierających bromotyrozyny (S), co może wynikać ze wzmocnienia matrycy białkiem, czyli wiązania chityna-bromotyrozyna. Na przykład, wcześniej dibromotyrozyny zostały opisane jako czynniki sieciujące w strukturach kutikularnych skrzypłocza atlantyckiego (*Limulus polyphemus*) [414], a także w skleroproteinach występujących u trąbika zwyczajnego *Buccinum undatum* [415]. Odkryto, że białka również odgrywają rolę w elastycznych właściwościach kompozytów białkowo-chitynowych u kałamarnicy z gatunku *Loligo vulgaris*, a usunięcie całego białka powoduje zmniejszenie elastyczności [416]. Podobnie jest w przypadku świerszcza *Mecopoda elongate*, gdzie związki dityrozyny sieciują

6 Wyniki i dyskusja

białko rezylinę, co skutkuje znaczną poprawą elastyczności pojedynczych włókien tenidiów tworzących tchawicę słuchową, co autorzy przypisują strukturalnej optymalizacji między podatnością a sztywnością [387].

Niemniej jednak, odnawialne nanocząstki celulozy nanofibrylowanej (NFC) i nanofibrylowanej chityny skorupiaków (NFCh), porównywalne ze skafoldami chitynowymi z gąbek, zostały niedawno wytworzone metodą rozciągania na mokro i zbadane pod kątem właściwości mechanicznych w funkcji ułożenia makrowłókien. Autorzy badania stwierdzili, że celuloza (moduł sprężystości: 33,7 GPa) przewyższa chitynę (moduł sprężystości: 12,6 GPa) i argumentowali, że można to przypisać wyższemu modułowi sprężystości osiowej celulozy I w porównaniu z α -chityną [417]. Badanie to pokazuje, że stopień ułożenia mikrowłókien może silnie wpływać na właściwości mechaniczne chityny [418], co może również wpływać na właściwości mechaniczne chityny pochodzącej z gąbek obserwowane w niniejszym badaniu.

Można ponadto założyć, że na podstawie procentowej redukcji modułu sprężystości (rys. 6.26a, b), że zawartość bromu, a tym samym białka, może być najwyższa w przypadku *A. aerophoba* (redukcja modułu po depigmentacji: 48,35%), a następnie *I. basta* (22,24%) i *A. archeri* (13,30%), która wykazała najmniejszą redukcję po depigmentacji.

Właściwości mechaniczne zaobserwowane w badaniu w warunkach mokrych mogą nie nadawać się do przenoszenia obciążeń fizjologicznych, jednak ich odwodnione odpowiedniki są porównywalne ze skórą ludzką [390] i kością gąbczastą [391]. To może wyjaśniać, dlaczego chitynowe skafoldy pochodzące z gąbek z rzędu Verongiida okazały się wyjątkowo obiecujące w zastosowaniach w inżynierii tkankowej w odniesieniu do chondrocytów, kardiocytów, adipocytów i ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych [15, 16, 69, 125, 128, 226]. Niemniej jednak, zawierające bromotyrozyny matryce chitynowe, takie jak te z gąbki *A. aerophoba* (rys. 6.29a, b), mają również duży potencjał do wykorzystania jako katalizatory chemiczne i jako matryce, które oddziałują z jonami metali poprzez interakcje z bromem i mogą służyć w zastosowaniach takich jak potencjalne systemy filtracji wody [239]. Dlatego zrozumienie właściwości mechanicznych tych wielofazowych, biomineralizowanych [203] konstrukcji 3D jest niezwykle istotne.

6.4 Chitynowa matryca oraz bromotyrozyny z gąbki *Ianthella*

basta

Gąbki z rzędu Verongiida nie tylko posiadają chitynę jako szkielet zapewniający sztywność strukturalną, ale także produkują bromotyrozyny – bromowane pochodne tyrozyny – jako chemiczny środek obrony przed patogenami i innymi mikroorganizmami [419]. Bromotyrozyny zostały zidentyfikowane jako wielocelowe leki morskie ze względu na ich działanie przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe oraz inne właściwości terapeutyczne [419–425]. Oferują one również potencjalną aktywność przeciwko COVID-19 [72]. Jak przedstawiono w poprzednim rozdziale, bromotyrozyny mogą odpowiadać za stabilność chitynowych szkieletów u gąbek, działając jako czynniki sieciujące.

W szkielecie gąbki bromotyrozyny są wbudowywane w skafoldy chitynowe, zaburzając tworzenie się niezakłóconej krystalicznej chityny [215]. Warto zauważyć, że tak zwane sferulocyty, komórki produkujące bromotyrozyny, występują w chitynowych włóknach szkieletowych gąbek z rzędu Verongiida. Sferulocyty mogą ulegać degeneracji, uwalniając bromotyrozyny do macierzy międzykomórkowej, a następnie do otaczającej wody morskiej [218], gdzie mogą działać jako antybiotyki.

W związku z tym chitynowe szkielety gąbek z rzędu Verongiida, pierwotnie zawierające bromotyrozyny, mogą być wykorzystywane jako układy modelowe w procesie uwalniania leków i gojenia ran. Matryce chitynowe pochodzące z gąbki *Ianthella flabelliformis* impregnowane roztworem dekametoksyny hamują wzrost patogenu *Staphylococcus aureus*, co wykazano w teście dyfuzji w agarze [217].

Celem niniejszych badań była ocena uwalniania *in vitro* wybranych antyseptyków z płaskiej matrycy chitynowej *I. basta* o grubości do 3 mm, wykazując jej potencjał do zastosowania jako naturalnego nośnika dla wybranych antyseptyków, naśladującego sztuczne materiały stosowane w opatrunkach na rany. Antyseptyki wybrano z różnych grup według klasyfikacji Anatomiczno-Terapeutyczno-Chemicznej (ATC), w tym barwników, związków jodu, utleniaczy, czwartorzędowych związków amoniowych i biguanidów. Do stosowanych substancji należą: fiolet gencjanowy, nadmanganian potasu, rivanol, jodyna, glicerynowy ekstrakt z bromotyrozynami, zieleń brylantowa, olej rokitnikowy, dekametoksyna i poliheksanid (tab. 5.1 i 6.5).

Tabela 6.5: Charakterystyka antyseptyków stosowanych w badaniu, zaadaptowano z [279].

Środek antyseptyczny	Składnik aktywny	Nazwa chemiczna	Wzór chemiczny	Masa molowa [g/mol]	Źródło
Fiolet gencjanowy	1% (w/v) chlorek metylorozaniliny	Chlorek heksametylopararozaniliny	$C_{25}H_{30}N_3Cl$	407,98	[426]
Nadmanganian potasu	1% (w/v) nadmanganian potasu	Nadmanganian potasu	$KMnO_4$	158,03	[427]
Rivanol	0.1% (w/v) monohydrat mleczanu etakrydyny	Mleczan 6,9-diamino-2-etoksyakrydyny monohydrat	$C_{18}H_{21}N_3O_4$	343,38	[428]
Jodyna	3% (w/v) jod	jod	I_2	253,81	[429]
Ekstrakt glicerynowy zawierający bromotyrozyny	Ekstrakt glicerynowy z gąbki <i>A. aerophoba</i>	–	–	–	[218]
Zieleń brylantowa	1% (w/v) zieleń brylantowa	4-(4-(dietyloamino)fenylometylideno)-N,N-dietylocykloheksa-2,5-dien-1-iminium; wodorosiarczany	$C_{27}H_{33}N_2 \cdot HO_4S$	482,63	[430]
Olej rokitnikowy	Olej rokitnikowy 100%	–	–	–	[431]
Dekametoksyna	0.1% (w/v)	10-[dimetylo-(2-[(1R,2S,5R)-5-metylo-2-izopropylcykloheksyl]oksy-2-oksoetyl)azanio]-decyl-dimetylo-(2-[(1R,2S,5R)-5-metylo-2-izopropylcykloheksyl]oksy-2-oksoetyl)azanio dichlorek	$C_{38}H_{74}Cl_2N_2O_4$	693,92	[432]
Poliheksanid	0.1% (w/v) poliaminopropyl biguanid	poli(heksametylenobiguanid)	$(C_8H_{17}N_5)_n \cdot xHCl$ $n \leq 40$	od 500 do 6000	[433]

6.4.1 Ocena aktywności przeciwbakteryjnej

Zahamowanie wzrostu *S. aureus* zaobserwowano w próbkach impregnowanych fioletem gencjanowym, zielenią brylantową, wodnym i alkoholowym roztworem dekametoksyny oraz roztworem poliheksanidu. W przypadku poliheksanidu strefa zahamowania była nieco mniejsza. Dla próbek nadmanganianu potasu, rivanolu i jodiny, wzrost kultur bakteryjnych nie był obserwowany bezpośrednio na matrycy, ale nie zaobserwowano również stref zahamowania wzrostu na TSA. Próbki impregnowane olejem z rokitnika i glicerynowym ekstraktem bromotyrozyn nie różniły się od próbek kontrolnych, w których wzrost bakterii obserwowano bezpośrednio na matrycy.

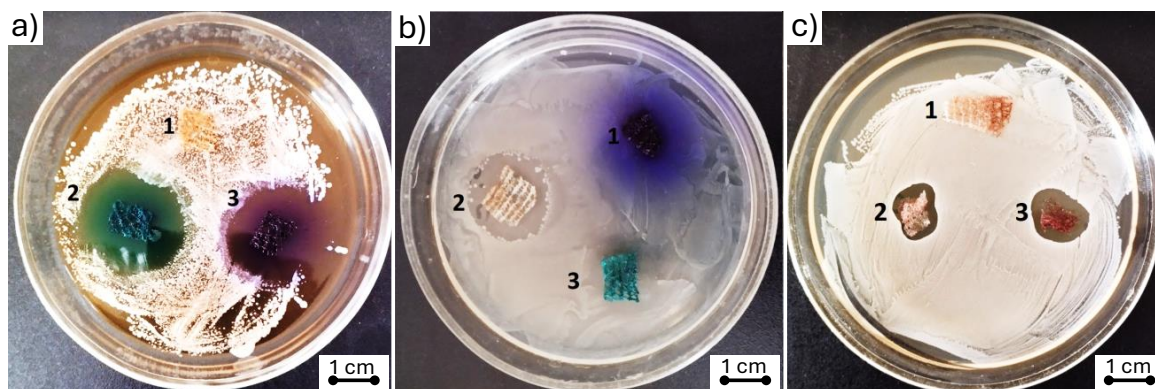
Matryce impregnowane barwnikami były mniej aktywne wobec *E. coli*: zaobserwowano niewielkie zahamowanie wzrostu dla zieleni brylantowej, a dla fioletu gencjanowego strefę zahamowania wzrostu mniejszą niż 1 mm od krawędzi matrycy. Roztwór poliheksanidu był nieco skuteczniejszy, dobre wyniki uzyskano zarówno z wodnym, jak i alkoholowym roztworem dekametoksyny.

Najbardziej obiecujące wyniki przeciwko *C. albicans* uzyskano z użyciem barwników: fioletu gencjanowego i zieleni brylantowej. Matryce impregnowane wodnym i alkoholowym roztworem czwartorzędowego związku amoniowego – dekametoksyny – okazały się mniej skuteczne, ale nadal wykazywały zahamowanie wzrostu, podczas gdy próbki z poliheksanidem nie wykazywały żadnego efektu. Wyniki przedstawiono w tabeli 6.6 i na rysunku 6.30.

Tabela 6.6: Wyniki testu aktywności mikrobiologicznej przy użyciu różnych środków antyseptycznych dla szczepów *C. albicans*, *E. coli* i *S. aureus*, zaadaptowano z [279].

	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Próba kontrolna	○	○	○
Fiolet gencjanowy	●●●	●	●●●
Nadmanganian potasu	○	○	○
Rivanol	○	○	○
Jodyna	○	○	○
Ekstrakt glicerynowy zawierający bromotyrozyny	○	○	○
Zieleń brylantowa	●●●	●	●●●
Olej rokitnikowy	○	○	○
Dekametoksyna roztwór wodny	●	●●●	●●●
Dekametoksyna roztwór etanolowy	●	●●●	●●●
Polihexanid	○	●	●●

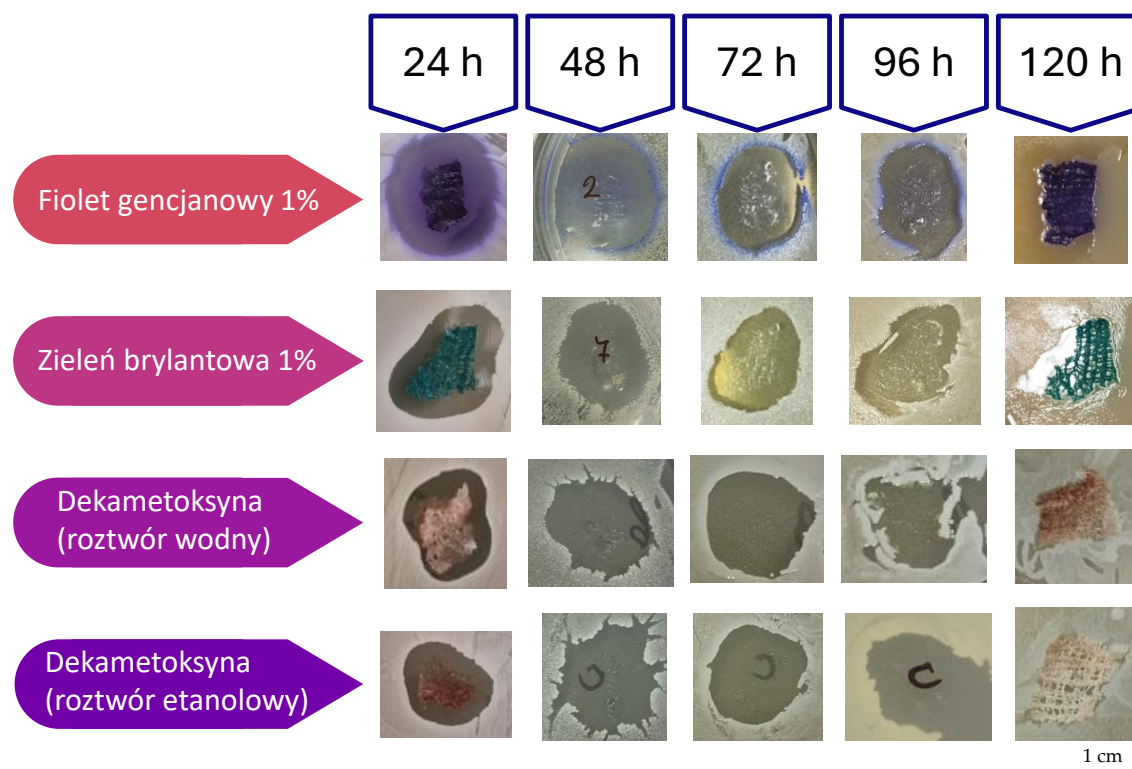
Legenda: Brak efektu ○, Słaby efekt ●, Umiarkowany efekt ●●, Silny efekt ●●●



Rysunek 6.30: Przykłady szalek Petriego ze strefami zahamowania wzrostu dla (a) szczepu klinicznego *C. albicans*, 1 – matryca chitynowa impregnowana roztworem poliheksanidu, 2 – matryca chitynowa impregnowana zielenią brylantową i 3 – matryca chitynowa impregnowana fioletem gencjanowym; (b) szczep kliniczny *E. coli*, 1 – matryca chitynowa impregnowana fioletem gencjanowym, 2 – matryca chitynowa impregnowana alkoholowym roztworem dekametoksyny i 3 – matryca chitynowa impregnowana zielenią brylantową; (c) szczep kliniczny *S. aureus*: 1 – kontrola, 2 – matryca chitynowa impregnowana wodnym roztworem dekametoksyny i 3 – matryca chitynowa impregnowana alkoholowym roztworem dekametoksyny, zaadaptowano z [279].

6.4 Chitynowa matryca oraz bromotyrozyny z gąbki *Ianthella basta*

W przypadku matrycy chitynowej z gąbki *I. basta* z roztworami fioletu gencjanowego, zieleni brylantowej i dekametoksyny oceniono zdolność uwalniania antyseptyku z matrycy. Po przeniesieniu matrycy nasączonej antyseptykiem do świeżej hodowli po każdych 24 godzinach ekspozycji, strefy zahamowania wzrostu *S. aureus* były niemal stałe (średnica od 25 do 30 mm) w ciągu pierwszych 72 godzin. Po czwartym przeniesieniu rozmiar strefy zahamowania wzrostu zaczął się widocznie zmniejszać, a po 120 godzinach zahamowanie wzrostu obserwowano tylko pod matrycą (rys. 6.31).



Rysunek 6.31: Wyniki testu zdolności uwalniania antyseptyków o najwyższej aktywności w ciągu 5 dni. Obrazy po 48, 72 i 96 godzinach uzyskano po przeniesieniu nasączonej matrycy do świeżej hodowli, zaadaptowano z [279].

6.4.2 Bromotyrozyny z gąbki *I. basta*

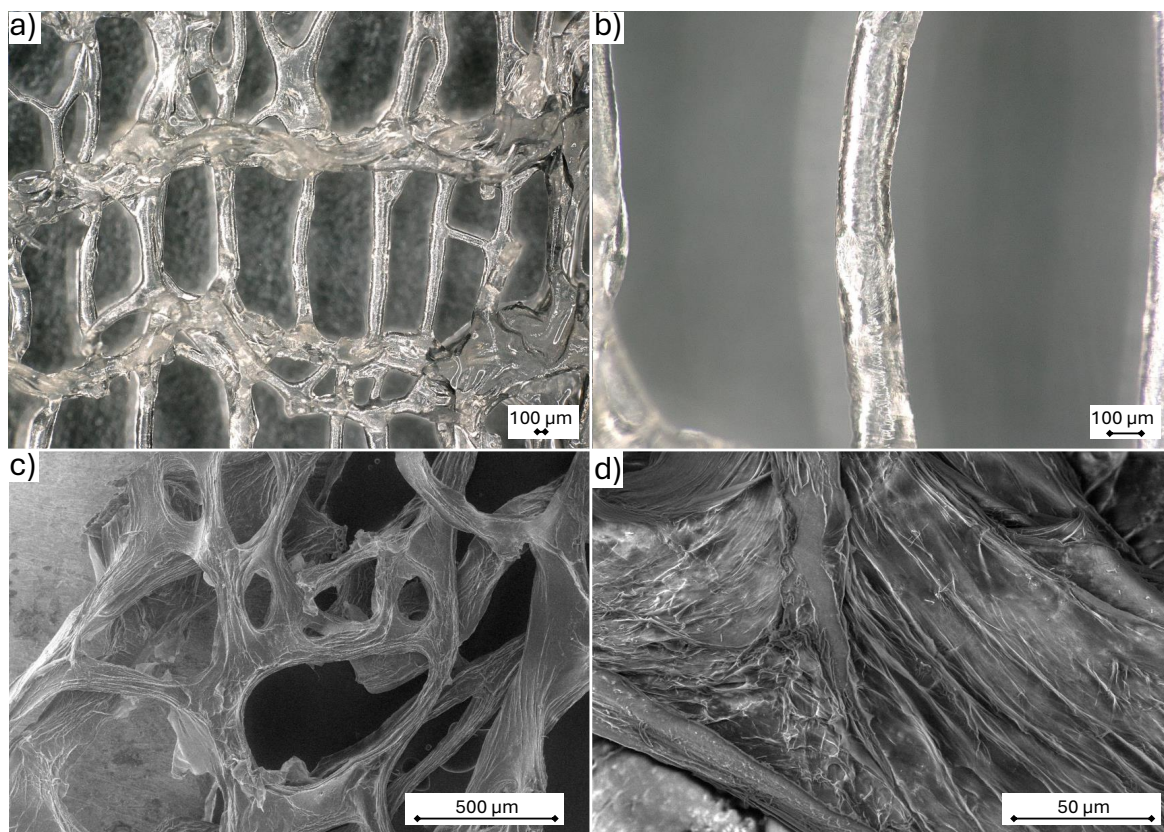
Pozyskiwanie ekstraktów wodnych z gąbek morskich jako odnawialnych źródeł różnorodnych związków bioaktywnych i materiałów biologicznych (np. chityny lub sponginy) należy do strategii zielonej chemii. Niestety, podejście to jest rzadko stosowane ze względu na stosowanie różnych rozpuszczalników organicznych. Otrzymywanie wodnych ekstraktów z gąbek zostało opisane jedynie w kilku artykułach [218, 434–437].

W tym badaniu szkielet gąbki *I. basta* został pozbawiony komórek przy użyciu wody

6 Wyniki i dyskusja

destylowanej, a następnie oczyszczony za pomocą naprzemiennego działania kwasem i zasadą w celu usunięcia węglanów wapnia, lipidów, białek i pigmentów, przy jednoczesnym zachowaniu natywnej, płaskiej, trójwymiarowej architektury szkieletu gąbki. Po usunięciu wszystkich towarzyszących bromotyrozyn uzyskano bezbarwną, oczyszczoną matrycę chitynową, składającą się z regularnie połączonych, rurowatych, półprzezroczystych włókien o średnicy do 200 μm , które tworzą charakterystyczne, komorowe jednostki strukturalne (rys. 6.32a, b) [150, 215, 279].

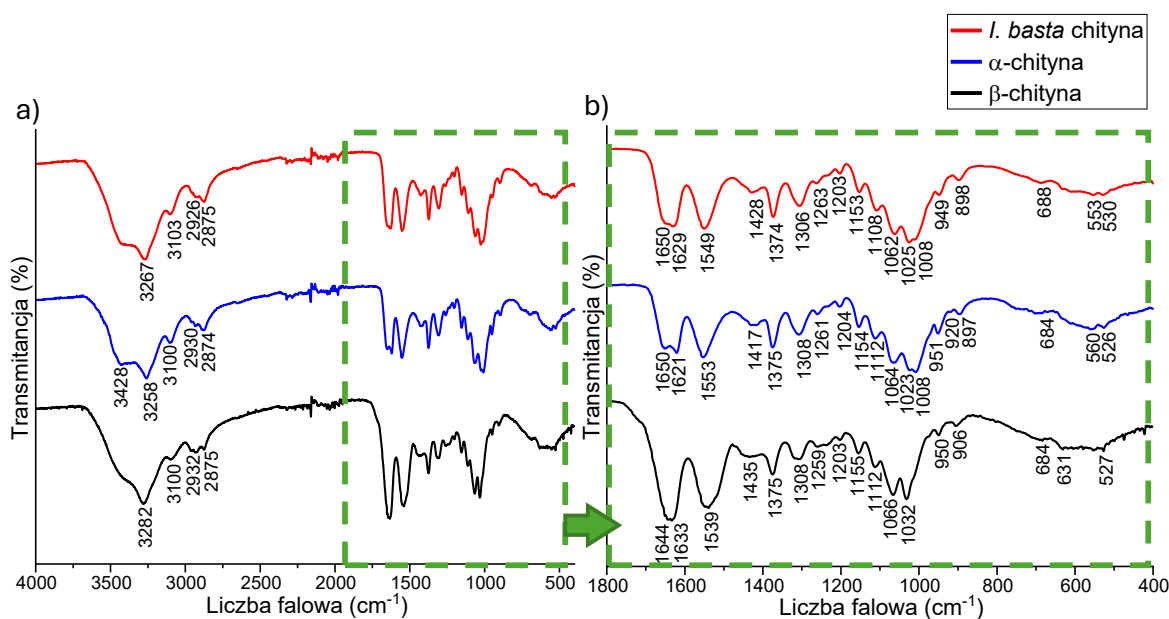
Mikroskopia skaningowa (SEM) (rys. 6.32c, d) umożliwia dokładniejsze zbadanie włókien chitynowych. Ujawniają one charakterystyczną pomarszczoną, silnie pofałdowaną powierzchnię, cechę powszechnie obserwowaną w przypadku chitynowych skafoldów otrzymanych z gąbek z rzędu Verongiida w poprzednich badaniach [28, 151, 279].



Rysunek 6.32: Zdjęcia z mikroskopii cyfrowej przedstawiające skafold chitynowy gąbki *I. basta* (a,b). Mikrofotografie SEM chitynowego skafoldu *I. basta* przy różnych powiększeniach (c,d).

Spektroskopia w podczerwieni jest dobrze znaną metodą charakteryzacji polisacharydów, w tym chityny [26]. Badanie ATR-FTIR (rys. 6.33) ujawniło charakterystyczne cechy widmowe chityny wyizolowanej ze szkieletu gąbki *I. basta*, w porównaniu ze standardami α -i

β -chityny. Wszystkie widma wykazywały pasma amidowe odpowiadające drganiom grupy CONH. Pasma amidowe I jest rozszczepione na dwie składowe. przy ok. 1630 i 1650 cm^{-1} , co wskazuje na efekty wiązania wodorowego [150]. Pasma amidu II pojawia się jako wąski sygnał przy ok. 1550 cm^{-1} w α -chitynie i chitynie z gąbki *I. basta*, ale jest szersze i przesunięte do 1539 cm^{-1} w β -chitynie. Wibracje amidu III obserwowano między 1308 a 1203 cm^{-1} , podczas gdy pasmo przy 1375 cm^{-1} odpowiada kołysaniu grupy metylowej [28]. Silne pasma rozciągające C–O–C i C–O wykryto przy 1154, 1112 i 1064 cm^{-1} we wszystkich trzech próbkach. Dodatkowo, β -chityna wykazuje pasmo przy 1032 cm^{-1} , podczas gdy α -chityna oraz chityna z *I. basta* wykazują rozszczepienie pasm odpowiednio przy 1023 i 1008 oraz 1025 i 1008 cm^{-1} . Pasma wiązania β -glikozydowego występuje przy 897 i 898 cm^{-1} w α -chitynie i *I. basta*, ale w β -chitynie jest przesunięte do 904 cm^{-1} . Wyniki FTIR potwierdzają, że chityna wyizolowana ze szkieletu gąbki *I. basta* jest bardzo podobna do chityny α -chityny, a nie β -chityny, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [150].



Rysunek 6.33: Widma FTIR uzyskanej matrycy chitynowej z gąbki *I. basta* w porównaniu ze wzorcami α -chityny i β -chityny (a) 400 – 4000 cm^{-1} i (b) 400 – 1800 cm^{-1} .

Matryca chitynowa ze szkieletu gąbki *I. basta* stanowi obiecujący, wysoce biozgodny biomateriał do zastosowań w inżynierii tkankowej opartej na komórkach macierzystych [16], z dodatkowym potencjałem jako zrównoważone, innowacyjne biomateriały do kontrolowanego uwalniania leków i opatrunków na rany. Jednak w niniejszej pracy po raz pierwszy szkielet gąbki *I. basta* namoczono w wodzie destylowanej w celu uzyskania wodnego

6 Wyniki i dyskusja

ekstraktu, który następnie poddano szczegółowej analizie pod kątem izolacji związków biologicznie czynnych, w tym bromotyrozyn. Ekstrakt wodny szkieletu *I. basta* zawiera następujące bromotyrozyny: bastadin-6 [438, 439], bastadin-19 [421], kwas 2-(3,5-dibromo-4-metoksyfenylo)octowy [440, 441] oraz kwas (Z)-3-(4-metoksy-3,5-dimetylofenylo)-2-(sulfo-oksy)akrylowy [440].

6.4.3 Dyskusja

Skuteczność przeciwdrobnoustrojowa matryc chitynowych impregnowanych różnymi antyseptykami w dużej mierze zależy od struktury chemicznej antyseptyków, minimalnego stężenia hamującego (MIC), zastosowanego stężenia oraz właściwości adsorpcyjnych i pęcznienia matrycy chitynowej. W badaniu wykorzystano antyseptyki o różnej strukturze chemicznej, rozpuszczalności, mechanizmach działania oraz jakościowej i ilościowej aktywności przeciwbakteryjnej. Matryce chitynowe pochodzące z gąbki *I. basta*, dzięki swojej unikalnej trójwymiarowej strukturze mikrotubularnej i właściwościom kapilarnym [141, 217, 386], oferują dużą powierzchnię adsorpcyjną, co znacząco wpływa na interakcje ze związkami antyseptycznymi.

Środki antyseptyczne, takie jak fiolet gencjanowy i zieleń brylantowa, będące barwnikami triarylometanowymi z trzema pierścieniami aromatycznymi połączonymi z centralnym atomem węgla, wykazują silną aktywność przeciwdrobnoustrojową, szczególnie wobec *S. aureus* i *C. albicans*. Ich skuteczność można przypisać ich strukturze molekularnej, która umożliwia skuteczną adsorpcję na powierzchni chityny. Silny charakter kationowy (wynikający z obecności wielu grup aminowych) fioletu gencjanowego i zieleni brylantowej pozwala im silnie oddziaływać z ujemnie naładowanymi miejscami na chitynie. Zieleń brylantowa zawiera również dodatkowe grupy alkilowe, które zwiększają jej hydrofobowość i mogą dodatkowo wzmacniać jej adsorpcję poprzez oddziaływania hydrofobowe z mniej polarnymi obszarami powierzchni chityny. Płaska struktura aromatyczna tych barwników prawdopodobnie ułatwia silne oddziaływania van der Waalsa π - π z matrycą chitynową, co skutkuje skutecznym wiązaniem i długotrwałą aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Uzyskane wyniki są podobne do tych opisanych dla innych barwników [141, 442], takich jak błękit metylenowy, dla którego chityna okazała się skutecznym sorbentem [443, 141].

Chociaż rivanol jest również barwnikiem z płaskim układem trójpierścieniowym i ato-

6.4 Chitynowa matryca oraz bromotyrozyny z gąbki *lanthella basta*

mem azotu, co czyni go słabą zasadą, jest on pochodną akrydyny [428, 444] i jest mniej kationowy niż barwniki triarylometanowe. Ta różnica, w połączeniu z obecnością reszty mleczanowej, zwiększa jego hydrofilowość, co prowadzi do mniej efektywnej adsorpcji. W konsekwencji barwnik może nie przylegać tak silnie do hydrofobowych obszarów chityny. Ponadto fakt, że w przypadku rivanolu wzrost bakterii nie był obserwowany bezpośrednio na matrycy – ani nie zaobserwowano stref zahamowania wzrostu na płytkach TSA – można wytłumaczyć niewystarczającym stężeniem środka antyseptycznego. Dostępny w handlu roztwór mleczanu etakrydyny ma stężenie 0,1% w/v, w przeciwieństwie do 1% w/v roztworów zieleni brylantowej i fioletu gencjanowego. Wartość minimalnego stężenia hamującego rivanolu wobec badanych mikroorganizmów jest znacznie wyższa [445, 444] niż barwników triarylometanowych [430].

Czwartorzędowy związek amoniowy, dekametoksyna [446, 447], wykazał dobrą aktywność, zarówno w roztworze wodnym, jak i alkoholowym. Długi, hydrofobowy ogon i kationowy charakter dekametoksyny [448, 432] prawdopodobnie sprzyjają silnej adsorpcji do ujemnie naładowanej matrycy chitynowej, wzmacniając tym samym jej właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Poliheksanid, związek biguanidowy, był nieco mniej skuteczny, co może wynikać z jego większego rozmiaru cząsteczki, co prowadziło do zawady przestrzennej i zmniejszonej adsorpcji [433, 449].

Z kolei środki antyseptyczne, takie jak nadmanganian potasu [427] i jodyna [429], które są mniejszymi i mniej złożonymi cząsteczkami, wykazały ograniczoną skuteczność. Może to wynikać z niższej adsorpcji na matrycy chitynowej, co prawdopodobnie wynika z ich mniejszej masy cząsteczkowej i braku licznych pierścieni aromatycznych, które w przeciwnym razie wzmacniałyby interakcje z materiałem chitynowym, lub z możliwej degradacji w warunkach badania. Jest to szczególnie godne uwagi w przypadku jodiny, tradycyjnie znanej ze swoich właściwości antyseptycznych [429]. Lotność jodu i możliwość szybkiej sublimacji mogą ograniczać jego długotrwałe uwalnianie z matrycy, co prowadzi do niższej obserwowanej aktywności. W rezultacie te antyseptyki były mniej skuteczne w tworzeniu długotrwałej strefy inhibicji.

Próbki impregnowane olejem z rokitnika [431] i ekstraktem glicerynowym zawierającym bromotyrozyny [218] nie wykazały znaczącej aktywności przeciwdrobnoustrojowej w porównaniu z próbką kontrolną. Wzrost bakterii obserwowano bezpośrednio na matrycy, co

6 Wyniki i dyskusja

wskazuje na brak skuteczności tych substancji w hamowaniu namnażania bakterii w badanych warunkach. W przypadku oleju z rokitnika może to być spowodowane znacznie niższą chłonnością oleju w porównaniu z wodą [450, 451, 96], a także niewystarczającym uwalnianiem z matrycy chitynowej lub słabą penetracją związków bioaktywnych (takich jak flawonoidy, karotenoidy i kwasy tłuszczowe) do komórek mikroorganizmów ze względu na ich hydrofobowy charakter.

Ekstrakt glicerynowy zawierający bromotyrozyny [218] prawdopodobnie zawierał bromowane struktury aromatyczne, typowe dla naturalnych produktów morskich, które mogą nasilać adsorpcję na powierzchniach drobnoustrojów. Jednak jego skuteczność może być ograniczona przez słabą adsorpcję lub niestabilność w matrycy chitynowej, co prowadzi do znikomej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Właściwości pęczniące matrycy chitynowej odgrywają również kluczową rolę w dyfuzji i przedłużonym uwalnianiu impregnowanych antyseptyków. Hydrofilowy charakter matryc chitynowych z gąbek z rzędu Verongiida pozwala im pęcznieć w roztworach wodnych, ze zdolnością pęcznienia $255 \pm 8\%$ [141], ułatwiając stopniowe uwalnianie antyseptyków i utrzymując przedłużoną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Ta właściwość jest szczególnie korzystna w przypadku antyseptyków, takich jak dekametoksyna, gdzie przedłużone uwalnianie może zapewnić przedłużone hamowanie wzrostu drobnoustrojów. Porównywalne właściwości pęcznienia chityny w roztworach wodnych i alkoholowych [452] opisano, co wyjaśnia spójne właściwości przeciwdrobnoustrojowe matryc impregnowanych zarówno etanolem, jak i wodnym roztworem dekametoksyny.

Matryca chitynowa z gąbki *I. basta* zapewnia ciągłe uwalnianie środków antyseptycznych przez co najmniej 72 godziny, wykazując znaczące działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko *S. aureus*. Trójwymiarowa matryca chitynowa z gąbki *I. basta* stanowi obiecujący materiał do dostarczania wybranych środków antyseptycznych, oferując skuteczną alternatywę dla syntetycznych materiałów opatrunkowych.

Co więcej, środki antyseptyczne mogą dyfundować zarówno z powierzchni matrycy chitynowej, jak i potencjalnie z wewnętrznych obszarów jej struktur mikrotubularnych i nanoporowatych [217]. Powstawanie stref zahamowania wzrostu wokół kolonii drobnoustrojów w ciągu 72 godzin inkubacji potwierdza skuteczność przeciwbakteryjną tego środka związaną z dyfuzją z impregnowanej matrycy chitynowej.

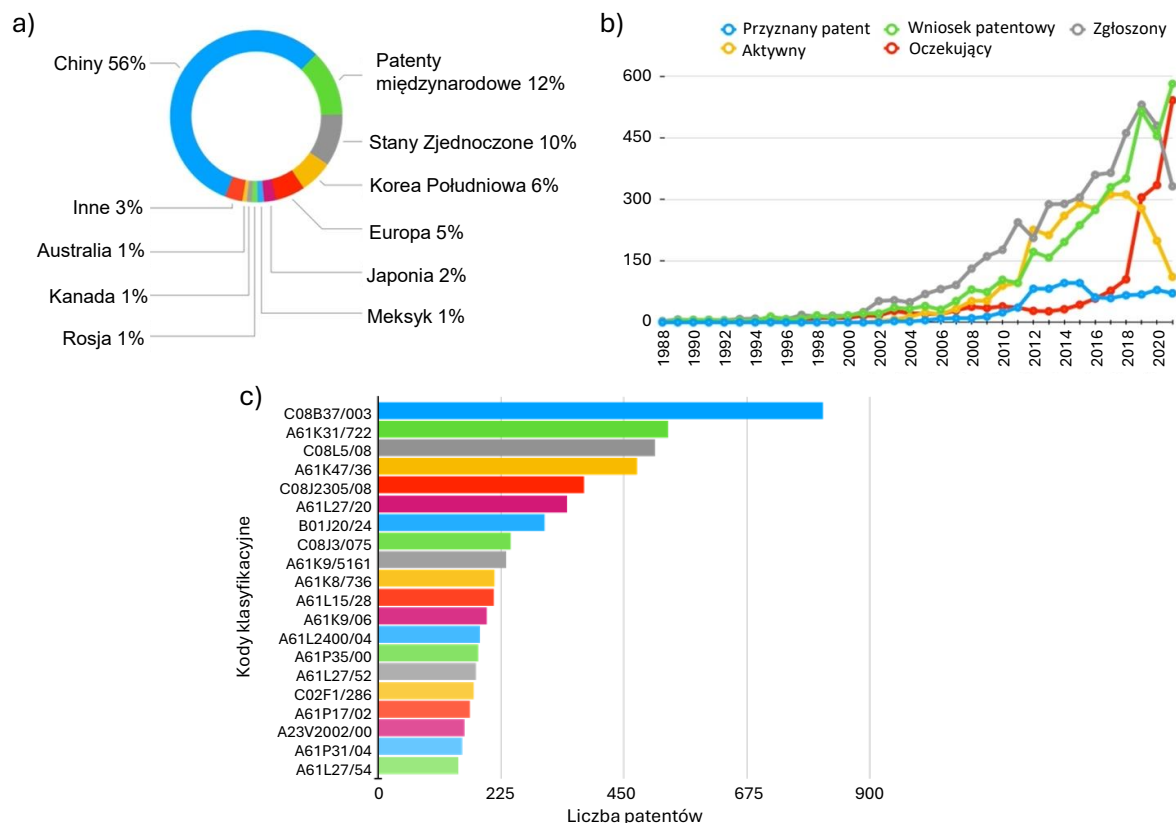
Antyseptyki o niskich wartościach minimalnego stężenia hamującego (MIC), które są hydrofobowe, mają płaską strukturę i silną adsorpcję do matrycy (w tym fiolet gencjanowy i zieleń brylantowa) wykazują silniejsze i długotrwałe działanie przeciwdrobnoustrojowe. Natomiast antyseptyki o wyższych wartościach minimalnego stężenia hamującego (MIC), słabej adsorpcji lub szybkim uwalnianiu (takie jak nadmanganian potasu i jodyna) wykazują zmniejszoną skuteczność. Dodanie antyseptyków, takich jak dekametoksyna, z jej silnymi właściwościami adsorpcyjnymi i przedłużonym uwalnianiem, dodatkowo dowodzi potencjału matryc chitynowych jako skutecznych systemów uwalniania. Zrozumienie tych zależności może pomóc w wyborze i optymalizacji środków antyseptycznych do stosowania w skafoldach na bazie chityny.

6.5 Patentologia chitozanu

Według analizy patentowej przeprowadzonej w II kwartale 2022 r., wyszukiwanym zapytaniom odpowiadało 3650 rodzin patentów. Podobnie jak w pierwszej części analizy patentowej dotyczącej chityny [4], największy udział wśród analizowanych krajów reprezentowały Chiny (56%), Stany Zjednoczone (10%), Korea (6%) i Japonia (2%). Natomiast udział patentów międzynarodowych (WO-WIPO) i europejskich wyniósł łącznie 17% (rys. 6.34a). Analiza historyczna statusu prawnego patentów wykazała, że liczba zgłoszeń patentowych dotyczących produktów na bazie chitozanu wyraźnie wzrosła od 2006 r. Liczba aktywnych patentów wykazywała podobną tendencję do 2017 r. Jednak po 2017 r. liczba aktywnych patentów zaczęła spadać. Co ciekawe, liczba przyznanych patentów zaczęła rosnać dopiero w 2003 r., lecz od 2016 r. ta liczba spada. Natomiast liczba patentów oczekujących na rozpatrzenie wzrosła od 2016 r. (rys. 6.34b). Dalsza analiza przeprowadzona w ramach kodów klasyfikacyjnych przypisanych patentom związanym z chitozanem (rys. 6.34c) wykazała, że najpopularniejszymi tematami zgłoszeń patentowych były produkcja/zastosowania chemicznie modyfikowanego chitozanu (C08B37/003), a następnie zastosowania biomedyczne chitozanu (A61K31/722) i formułacje kwasu hialuronowego/siarczanu chondroityny (C08J2305/08 lub C08L5/08). Pozostałe kierunki to: zastosowanie pochodnych polisacharydów do celów medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych lub toaletowych (A61K47/36), zastosowanie chitozanu jako polisacharydu w przeszczepianiu protez (A61L27/20), zastosowania chitozanu jako materiału

6 Wyniki i dyskusja

filtracyjnego lub chromatograficznego (B01J20/24), zastosowanie jako żelującego materiału makrocząsteczkowego (C08J3/075), zastosowania chitozanu w kosmetykach (A61K8/736), zastosowanie chitozanu w medycznych materiałach opatrunkowych (A61L15/28). Statystyki dotyczące częstotliwości stosowania kodów klasyfikacyjnych (rys. 6.35) pokazują obszar zainteresowania badań i rozwoju w zakresie materiałów powiązanych z chitozanem.



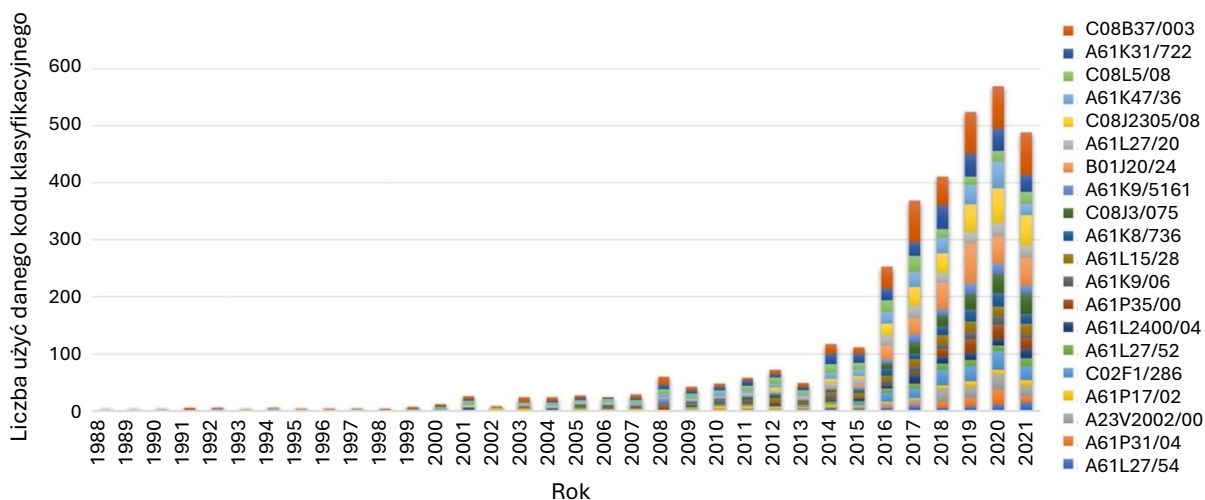
Rysunek 6.34: a) Kraje zgłoszeń patentów związanych z chitozanem, b) status prawny analizowanych patentów, c) najczęściej stosowane kody klasyfikacyjne w patentach związanych z chitozanem, zaadaptowano z [5].

6.5.1 Analiza opisów patentów związanych z chitozanem

W niniejszym rozdziale przedstawiono omówienie wybranych patentów, a szczegółowe zestawienie analizowanych patentów zamieszczono w Aneksie.

Biomedycyna

W ciągu ostatnich ponad 20 lat chitozan zajął jedną z czołowych pozycji w biomedycynie, nanomedycynie oraz inżynierii komórkowej i tkankowej [453]. Wśród patentów, które można zaklasyfikować w dziedzinie biomedycyny, bardzo często zgłaszano właściwości



Rysunek 6.35: Tendencje w stosowaniu kodów klasyfikacyjnych, zaadaptowano z [5].

żelujące materiałów chitozanowych, których lepkość lub gęstość można regulować w określonych warunkach fizykochemicznych w celu zapewnienia biokompatybilności. Na szczególną uwagę zasługują patenty dotyczące właściwości żelujących materiałów chitozanowych, które rozwiązują znane problemy podobnych materiałów stosowanych w dziedzinie biomedycyny. Na przykład, konwencjonalne biomedyczne termozele na bazie chitozanu są zazwyczaj stosowane jako wstrzykiwalne środki osteogenne dzięki zawartości glicerofosforanu, który zapewnia odpowiednią kombinację czasu żelowania i ogólnej lepkości. Jednakże, pomimo wyższych stężeń glicerofosforanu, które zazwyczaj poprawiają czas żelowania, lepkość hydrożelu proporcjonalnie spada, co powoduje problemy z jego zastosowaniem. Ponadto niska bioaktywność termozeli jest zazwyczaj zwiększana przez dodanie fosforanu wapnia (CaP), co również negatywnie wpływa na zastosowania termozeli, ponieważ cząstki CaP mają tendencję do aglomeracji i wytrącania się [454]. W związku z tym zaproponowano połączenie termozeli na bazie chitozanu z enzymem fosfatazą alkaliczną, co poprawiło zarówno czas żelowania, jak i formowanie cząstek CaP.

Podobnie, β -glicerofosforan (β -GP) jest powszechnie stosowany do otrzymywania chitynowych hydrożeli termoreaktywnych. Jednak zastosowanie β -glicerofosforanu ma liczne wady, takie jak ujemny ładunek β -GP, który zmusza β -GP do interakcji, zwłaszcza z substancjami farmaceutycznie czynnymi, co obniża ich aktywność. Wysokie stężenia β -GP skracają czas żelowania, jednak jednocześnie zmniejszają lepkość hydrożelu i powodują jego zmętnienie, co jest nieodpowiednie do zastosowań terapeutycznych, takich jak podawanie do oczu. W związku z tym zaproponowano metodę wytwarzania hydrożelu na bazie chito-

6 Wyniki i dyskusja

zanu, niezawierającego fosforanu [455].

Kolejny patent dotyczył gotowych do implantacji gąbek chitozanowych (hydrożeli) do regeneracji tkanki chrzęstnej i kostnej oraz zastosowań związanych z dostarczaniem leków, których użycie wymaga przeprowadzenia zabiegów chirurgicznych, obciążających pacjentów długim gojeniem się ran i zwiększonym ryzykiem infekcji. Patent ten opisywał wstrzykiwalne hydrożele chitozanowe, które tworzą gąbki chitozanowe w miejscu docelowym po usieciowaniu z cząsteczkami 5'-difosforanu guanozyny. W patencie wykazano szybkie tempo żelowania w porównaniu z konwencjonalnymi metodami opartymi na zastosowaniu podwyższonej temperatury i promieniowania UV [456]. Aby poprawić właściwości żelujące chitozanu, w innych pracach opisano kompozycje chitozanu składające się z różnych rodzajów chitozanu, różniących się stopniem acetylacji. Zaproponowana metoda dotyczyła zastosowania chitozanu o stopniu acetylacji 30–60% lub stopniu deacetylacji co najmniej 70%. Taki materiał następnie połączono z ujemnie naładowanym polisacharydem, tworząc hydrożel w temperaturze 37°C, w warunkach zbliżonych do fizjologicznego pH [457].

Otrzymywanie termoczułego hydrożelu chitozanu z użyciem co najmniej dwóch słabych zasad jako czynników żelujących (np. wodorowęglanu sodu) zostało objęte ochroną patentową. Opisanie termożele nadawały się do wstrzykiwania, charakteryzowały się krótkim czasem żelowaniem i dobrymi właściwościami mechanicznymi, a niskie stężenia soli zapewniały biogodność dzięki enkapsulacji komórek [458].

Poprawa wytrzymałości chemicznej i mechanicznej hydrożeli w celu wydłużenia ich trwałości w środowisku biologicznym była przedmiotem odrębnego zgłoszenia. Opisanie patent dotyczące połączenia nanowłókien celulozowych z chitozanem w celu utworzenia kompozytu hydrożelowego o ulepszonych właściwościach mechanicznych, przeznaczonego do inżynierii tkankowej lub wytwarzania biokompatybilnych implantów [459]. W innym patencie opisano połączenie tiolowanego chitozanu z utleniaczami i zewnętrznymi środkami sieciującymi, co pozwoliło na uzyskanie hydrożeli o znacznie skróconym czasie żelowania. Opatentowana metoda zapewniała pewne udoskonalenia w porównaniu z samosieciującym tiolowanym chitozanem, który zazwyczaj charakteryzował się podatnością na biodegradację, niepełnym żelowaniem lub długim czasem żelowania, co prowadziło do utraty materiału żelującego na skutek jego odpływu z miejsca aplikacji przed zakończeniem procesu żelowania [460].

Zastosowanie chitozanu jako materiału wspomagającego gojenie ran pozostaje popularnym tematem [461, 462]. Grupa patentów została poświęcona alternatywnym metodom gojenia ran. Na przykład, jeden z nich koncentrował się na naturalnych właściwościach grzybobójczych i bakteriościsłych chitozanu, które można było stosować bez medycznych materiałów opatrunkowych, w postaci kremu lub maści, które mogły z łatwością pokryć duże obszary zakażonej skóry [463]. Inny patent dotyczył opracowania terapeutycznych kompozycji chitozanu i kwasu węglowego w postaci sprayu do leczenia otwartych ran skórnych [464]. Forma sprayu z chitozanem rozwiązała problemy związane z powszechnie stosowanymi opatrunkami na rany w postaci waty, wełny, gazy lub bandażu, które słabo przylegają do rany i wymagają dużej powierzchni ciała do skutecznej aplikacji.

Niewielka grupa patentów dotyczyła zastosowania chitozanu jako matrycy lub medium w biomedycznych urządzeniach diagnostycznych. Na przykład, w jednym z patentów opisano biomedyczną metodę testową do ilościowego i jakościowego oznaczania poziomu sarkozyny w próbkach środowiskowych lub moczu. Opisywana metoda została przeprowadzona na matrycy chitozanowej zawierającej nanocząstki $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$, funkcjonalizowane oksydazą sarkozyny i peroksydazą chrzanową [465]. Inny patent dotyczył oznaczania białka tropomiozyny w matrycy chitozanowej za pomocą testu immunoenzymatycznego, takiego jak ELISA. Metoda ta opierała się na rozpuszczaniu matrycy chitozanowej w kwasie organicznym, takim jak kwas piroolidonokarboksyłowy, kwas octowy lub kwas mlekowy [466]. W innym patencie opisano zastosowanie matrycy chitozanowej jako medium ochronnego do przechowywania DNA w temperaturze pokojowej przez dłuższy czas, poprzez tworzenie trwałych wiązań z cząsteczkami DNA i ochronę przed ich rozpadem przez deoksyrybonukleazę [467].

Zgłoszenia dotyczące inżynierii tkankowej i skafoldów z materiałów chitozanowych można wymienić jako odrębną grupę patentów. Przykładowo, opisano materiał kompozytowy składający się z agarozy, fosforanu wapnia i chitozanu, stanowiący wysoce mikroporowate, chłonne i biokompatybilne skafoldy kostne, które dzięki sieci porów mogą sprzyjać waskularyzacji i przerostowi tkanki kostnej [468]. W tej samej kategorii zgłoszono kolejny patent na wytwarzanie *in vitro* trójwymiarowych modeli guzów do testowania i przesiewowego badania leków przeciwnowotworowych. Wynalazek ten dotyczył zastosowania skafoldów chitozanowo-żelatynowych do tworzenia trójwymiarowych modeli

guzów nowotworowych. Skafoldy przygotowano metodą liofilizacji w obecności środka sieciującego (genipiny) i rozpuszczalnika (lodowatego kwasu octowego) [469].

Materiałoznawstwo i inżynieria materiałowa

Patenty związane z chitozanem, zgłoszone w ramach nauki o materiałach i inżynierii materiałowej, można ogólnie podzielić na dwie podkategorie. Pierwsza podkategoria dotyczy inżynierii chitozanu w materiały o wyższej funkcjonalności z fizykochemicznego punktu widzenia, bez określania konkretnego zastosowania modyfikowanego materiału. Druga kategoria dotyczy inżynierii chitozanu w substancje biomedycynie czynne, materiały o właściwościach medycznych lub substancje farmaceutycznie czynne.

Inżynieria materiałów o wyższej funkcjonalności

W celu poprawy stabilności termicznej i chemicznej chitozanu (w środowisku wodnym lub rozcieńczonych roztworach kwaśnych) opracowano metodę kompleksowania chitozanu z jonami wapnia. Według autorów, ten rodzaj kompleksowania był lepszy pod względem określonych aspektów w porównaniu z powszechnymi metodami chemicznej modyfikacji materiałów chitynowych [470]. W innym patencie połączono etapy degradacji oksydacyjnej, hydrolitycznej i enzymatycznej w celu wytworzenia mikrokrystalicznego materiału chitozanowego, który charakteryzował się unikalną bioaktywnością, biodegradowalnością, adhezją, mieszalnością i porowatością i który mógł być wytwarzany w różnych postaciach, takich jak proszek, zawiesina lub pasta [471]. W innym zgłoszeniu opisano metodę, w której reakcje sieciowania przeprowadzane na polimerze chitozanowym jednocześnie tworzyły nanocząstki chitozanu. Metoda ta była lepsza od konwencjonalnych metod wykorzystujących mielenie, rozpuszczanie, obróbkę kwasem lub formowanie soli, które mają drastyczny wpływ na integralność chemiczną polimeru chitozanowego [472].

Na szczególną uwagę zasługują następujące przykłady materiałów inżynieryjnych na bazie chitozanu i metod ich wytwarzania:

- metoda wytwarzania selektywnie przepuszczalnego laminatu, który hamuje przenikanie czynnika biologicznie lub chemicznie szkodliwego. Laminat zawiera podłoże, błonę chitozanową i co najmniej jedną warstwę tkaniny [473];
- sposób wytwarzania matrycy chitozanowej zawierającej dwie porowate warstwy chi-

tozanu z włóknistym elementem wzmacniającym pomiędzy nimi, gdzie matryca wykazuje dobre właściwości mechaniczne i integralność [474];

- sposób kompresji tkaniny zawierającej co najmniej jedno włókno zawierające chitozan, gdzie włókno jest na bazie celulozy, a jego powierzchnia jest pokryta chitozaniem. Włókno pokrywa elastyczną przędzę. Produkt może być stosowany w medycynie i poza nią, np. w sporcie [475];

- sposób odgazowywania roztworów przędzalniczych o ultrawysokiej lepkości z czystego chitozanu. Metoda ta charakteryzuje się dobrym efektem odgazowania i wysoką wydajnością odgazowania i może być stosowana do roztworów przędzalniczych o szerokim zakresie lepkości [476];

- technologia przetwarzania związków o dużej masie cząsteczkowej, mianowicie celulozy i podobnych polimerów, rozpuszczalnych w kwasie fosforowym i nadających się do formowania włókien, błon, powłok i produktów z nich wykonanych. Celem wynalazku jest opracowanie metody wytwarzania produktów celulozowych i mieszanin celulozy z chitozaniem o ulepszonych właściwościach mechanicznych i fizycznych oraz ograniczenie ich zmienności [477];

- metoda wytwarzania sterylizowanej termicznie kompozycji zawierającej chitozan i glicerol, która po sterylizacji jest klarownym i lepkiem roztworem o pH zbliżonym do obojętnego. Metoda ta zapobiega tworzeniu się agregatów i umożliwia przygotowanie klarownych roztworów poprzez rozpuszczenie chitozanu w wodzie przed sterylizacją termiczną [478];

- metoda nakładania powłoki hydrofobowej na powierzchnię szkła przy użyciu odpowiednio przygotowanego biopolimeru chitozanu, a także otrzymany w ten sposób powlekaną produkt szklany. Wynalazek dotyczy reakcji chitozanu z powierzchnią szkła (w szczególności z niehydrofobowym chitozaniem) i przekształcenia typowo hydrofilowego chitozanu w hydrofobowy chitozan w celu utworzenia trwałej powłoki na powierzchni szkła [479];

- procedura uzyskiwania sprasowanej porowatej warstwy chitozanu o pożądanych właściwościach mechanicznych. Warstwa opisana w wynalazku charakteryzuje się wysoką gęstością, dużą wytrzymałością na rozciąganie i dużą odpornością na szycie chirurgiczne [480];

6 Wyniki i dyskusja

- formuła zawierająca chitozan i kwas glikolowy, charakteryzująca się doskonałą żywotnością jako roztwór „jednoskładnikowy”. Roztwór jednoskładnikowy może tworzyć powłokę chitozanową nierozpuszczalną w wodzie. Powłoka zachowuje swoje właściwości nawet po wyschnięciu w temperaturze pokojowej i po nałożeniu na materiał bazowy [481];
- przygotowanie materiału składającego się z wielu warstw wraz z warstwą włóknistą wykonaną z chitozanu pochodzącego z grzybów. Warstwa włókniny składa się z ultracienkich włókien chitozanu o wymiarach nanometrycznych [482];
- sposób wytwarzania wodnego roztworu chitozanu i jego zastosowanie w postaci aerozolu. Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania membrany z hydrożelu chitozanowego i materiału biopolimerowego składającego się z chitozanu i białka przy użyciu wodnego roztworu chitozanu [483];
- sposób oczyszczania ścieków poprzez wiązanie jonów metali za pomocą chitozanu. Sposób dotyczy wykorzystania procesu papierniczego do formowania arkusza. Doprowadzanie ścieków zawierających jony metali do kontaktu z arkuszem i umożliwienie jonom metali zawartym w ściekach związania się z włóknami chitozanu w arkuszu [484];
- metoda otrzymywania przezroczystego żelu zawierającego kopolimer ksyloglukanu i chitozanu w celu utworzenia żelu „chitam”. Żel chitamowy jest opisywany jako bezbarwny, krystalicznie czysty, termostabilny, biodegradowalny, nietoksyczny i biokompatybilny [485];
- przygotowanie wodnej, termoutwardzalnej, zobojetnionej kompozycji chitozanu, która w temperaturze powyżej 5°C tworzy przezroczysty hydrożel niezawierający fosforanów, zawierający deacetylowany chitozan w stężeniu 0,1–5,0%, o stopniu deacetylacji 40–70%, zobojetniony zasadą i czynnikiem kompleksującym wybranym spośród polisacharydów i polioli [486];
- przygotowanie skafoldu warstwowego na bazie chitozanu, w którym skafold zawiera co najmniej dwie zespolone warstwy. Co najmniej jedna warstwa zawiera porowaty skafold nośny wykonany z warstwy chitozanu i co najmniej jedna warstwa zawiera membranę wykonaną z nanowłókien chitozanu [487].

Inżynieria materiałowa do zastosowań biomedycznych

Cechy chitozanu, takie jak niska rozpuszczalność, wysoka sztywność, duży stopień separacji ładunków i silna tendencja do tworzenia wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych [488], mają kluczowe znaczenie dla jego zastosowań we współczesnej nauce o biomateriałach, zwłaszcza w perspektywie rozwoju odpowiednich tuszy do druku 3D [489, 490], a także różnorodnych materiałów hybrydowych i kompozytowych. Opracowanie skalowalnej technologii wytwarzania materiałów na bazie chitozanu pozostaje aktualnym wyzwaniem badawczym [491].

Kwas poliglikolowy (PGA) i kwas polimlekowy (PLA) to biodegradowalne polimery, często stosowane w urządzeniach do stabilizacji kości. PGA i PLA mają jednak kilka wad, takich jak słaba biozgodność z komórkami oraz ich powolny rozkład do kwasu mlekowego i glikolowego, co skutkuje opóźnioną reakcją zapalną w miejscu implantacji. W związku z tym, w jednym z patentów zaproponowano zastosowanie chitozanu jako kompozycji ortopedycznej, która przewyższała PGA i PLA dzięki sprzyjającym właściwościom proliferacji i adhezji komórek, a także wysokiej nośności i elastyczności [492]. Inny patent dotyczył problemów związanych z materiałami opatrunkowymi na rany, które fizycznie zawierają nanocząstki srebra, uwalniające je w sposób niekontrolowany do tkanki rany i powodujące zatrucie srebrem. Jako rozwiązanie zaproponowano zastosowanie chitozanu, który może chemicznie wiązać się ze srebrem poprzez cząsteczki glukozaminy [493]. W kolejnym zgłoszeniu patentowym dotyczącym nanocząstek i chitozanu opisano przygotowanie matrycy chitozanowej wypełnionej nanocząstkami srebra. Matryca generowała jony srebra pod wpływem tlenu lub rozpuszczalnych w wodzie środków utleniających. Ponieważ chitozan działał jak ochronna, ale przepuszczalna matryca, powolne i kontrolowane utlenianie nanocząstek *in situ* zapewniło skuteczne działanie przeciwdrobnoustrojowe [494].

W dziedzinie ukierunkowanego dostarczania substancji terapeutycznych można wskazać patenty stanowiące przykłady inżynierii materiałów chitynowych, takie jak zastosowanie polipleksów w terapii celowanej [495]. Konwencjonalnie polipleksy zawierają polikationy (takie jak polietylenoimina) w celu elektrostatycznego wbudowywania cząsteczek ładunków do polipleksów podczas dostarczania ukierunkowanego. Wiadomo jednak, że nadmiar polikationów jest toksyczny ze względu na ich interakcję z białkami surowicy krwi. W związku z tym patent dotyczył problemów związanych z zastosowaniem polika-

tionów i opracowywał polipleks zawierający polianiony (takie jak kwas hialuronowy) w celu usprawnienia ukierunkowanego dostarczania leków lub genów. W innym patencie, w celu zwiększenia skuteczności działania środków terapeutycznych, zaproponowano przygotowanie mikrosfer chitozanowo-żelatynowych jako adiuwantów leków. Głównym celem wprowadzenia żelatyny do chitozanu było zachowanie ładunku dodatniego na mikrosferach i zwiększenie ich zdolności do transportu leków polarnych do tkanek śluzowych [496].

Inne przykłady patentów z tej samej kategorii:

- przygotowanie kompozytu włóknistego składającego się z chitozanu i alginianu, który ma zastosowanie w artykułach wspomagających gojenie się ran, w którym chitozan jest związany z alginianem wzdłuż włókna. Zawartość chitozanu wynosi co najmniej 1% wag., a alginianu co najmniej 75% wag. [497];
- przygotowanie preparatu do wstrzykiwań, którego zastosowanie dotyczy regeneracji tkanki kostnej. Skład zawiera wodny roztwór chitozanu, cząstki szkła bioaktywnego i wodę lub wodny roztwór o pH od 5,5 do 8 [498];
- przygotowanie materiału grafenowego modyfikowanego chitozanem do elektrochemicznego wykrywania mutacji w sekwencjach DNA, gdzie kowalencyjna modyfikacja chitozanu unieruchamia jednoniciowy oligonukleotyd DNA poprzez wytworzenie ładunku dodatniego [499].

Biotechnologia

Biotechnologia chitozanu również stanowi przedmiot różnorodnych badań [258, 500]. Najbardziej reprezentatywne przykłady zgłoszeń patentowych dotyczących chitozanu w dziedzinie biotechnologii stanowią zastosowania dotyczące metabolizmu chitozanu lub jego wykorzystania razem z żywymi komórkami.

Powszechne metody produkcji chitozanu poprzez deacetylację chityny zazwyczaj prowadzą do powstania losowo deacetylowanych jednostek chitozanu. Metabolizm takiego chitozanu jest różny u ssaków, roślin i bakterii. Na przykład brak chitozanas u ssaków oznacza, że chitozan o stopniu deacetylacji poniżej 30% nie może być metabolizowany. Natomiast rośliny posiadają chitynazy, a komórki bakteryjne i grzybicze mogą posiadać zarówno chitynazy, jak i chitozanas. W zależności od celu zastosowania i stopnia acetylacji materiału

chitozanowego, jego skuteczność różni się znacząco, niezależnie od tego, czy był stosowany jako stymulator wzrostu roślin, czy środek antybakteryjny. Na przykład, obecność obu enzymów w bakteriach oznacza, że chitozan o dowolnym stopniu acetylacji może być metabolizowany. W konsekwencji, rozkład metaboliczny chitozanu przez bakterie definiuje jego skuteczność jako środka antybakteryjnego. W związku z tym, w jednym z patentów opisano otrzymywanie nielosowych polimerów chitozanowych z powtarzającymi się jednostkami D-glukozaminy, które miały uporządkowany układ i umożliwiały precyzyjne zastosowanie materiału w określonych warunkach [501].

Produkcję dużych ilości białek o wartości farmaceutycznej (np. przeciwciał) uzyskano za pomocą rekombinacyjnych metod ekspresji z wykorzystaniem owadów, drożdży, bakterii lub roślin transgenicznych. Stosowanie takich konwencjonalnych metod produkcji uważa się za nieskuteczne w przypadku produkcji dużych białek z powodu ich nieprawidłowego fałdowania. W związku z tym opisano wykorzystanie transgenicznego ssaka do ekspresji białka w gruczole sutkowym (w mleku) oraz oczyszczenie lub izolację białka poprzez wytrącanie kwasowym roztworem chitozanu [502]. Chitozan był również stosowany do oddzielania kwasów nukleinowych od mikroorganizmów, gdzie chitozan pełnił rolę czynnika chelatującego jony metali obecne w roztworze mikroorganizmów. Celem opisanego zastosowania było uniknięcie rozpadu kwasów nukleinowych przez jony metali podczas ich oddzielania [503].

W innym patencie opisano wynalazek dotyczący metabolizmu azotanów chitozanu przez bakterie reagujące na azotany w jelitach w celu wytworzenia farmaceutycznie aktywnego tlenu azotu, co rozwiązało problem podawania gazowego tlenu azotu do organizmu [504].

Chemia

Analiza zgłoszeń patentowych związanych z chitozaniem pokazuje, że najliczniejszą grupę patentów można zaliczyć do kierunku chemicznego. Chitozan jest słabo rozpuszczalny w wodzie, a jego przechowywanie w postaci płynnej jest możliwe jedynie w roztworach kwasów. Roztwory kwasowe mają jednak wady. Kwasy rozkładają chitozan z czasem, a stosowanie roztworów kwasów nie jest praktyczne w zastosowaniach rolniczych. Wiadomo, że degradacja chitozanu prowadzi do powstawania oligomerów, które mogą być

6 Wyniki i dyskusja

fitotoksyczne w zastosowaniach rolniczych. W związku z tym, różne patenty rozwiązywały problem rozpuszczalności w wodzie produktów na bazie chitozanu, przygotowując zawiesiny chlorowodorowej pochodnej chitozanu w mieszaninie ciecz-woda, gdzie cieczą był związek organiczny z co najmniej jedną grupą hydroksylową. Na przykład, doniesiono, że chlorowodorowe pochodne chitozanu nie tworzyły żeli bez obecności wody, gdy pochodna chitozanu stykała się wyłącznie z cieczą zawierającą grupy hydroksylowe, jednak po dodaniu wody tworzyły błony. Według wynalazców, opisana formuła zapewniła nową formę pakowania produktów w postaci płynnej i rozwiązała problem żelowania. Warto zauważyć, że pomimo tego, że produkty żelowe są uważane za bezużyteczne w zastosowaniach rolniczych, żele opisane w patencie skutecznie wspomagały tworzenie pożądaných struktur na pokrywanych powierzchniach [505].

Powszechnie stosowane wypełniacze skórne na bazie kolagenu i kwasu hialuronowego są problematyczne ze względu na powikłania alergiczne wywoływane przez takie wypełniacze i wymagają przeprowadzenia testów alergicznych u pacjentów przed ich zastosowaniem. Ponadto konieczność kilkukrotnego podania wypełniacza w formie zastrzyku ze względu na nieskuteczność wypełniacza na bazie kwasu hialuronowego, jest uważana za proces bolesny. Niska stabilność kolagenu i kwasu hialuronowego w opakowaniu, będąca konsekwencją wysokiej lepkości i agregacji materiału, ogranicza praktyczność wypełniacza. Dlatego zaproponowano zastosowanie koniugatu chitozanu i cytrynianu jako wypełniacza skórnoego jako alternatywy dla wypełniacza na bazie kolagenu i kwasu hialuronowego [506].

Polimery chitozanu usieciowane tioamidami, które okazały się skutecznymi kosmetykami do włosów i skóry dzięki zdolności grup tiolowych do tworzenia wiązań disiarczkowych z resztami cysteinowymi białek powierzchniowych, zostały opisane w zgłoszeniu patentowym [507]. Właściwości żelujące polimerów chitozanu modyfikowanych tioamidyną okazały się skutecznymi nośnikami farmaceutycznymi do podawania leków do oczu poprzez powolne uwalnianie substancji farmaceutycznie czynnych. Zwiększona lepkość polimeru na powierzchni oka była spowodowana procesem utleniania w powietrzu.

Częstym problemem związanym z zastosowaniem związków nieorganicznych w testach wilgotności jest szybkie blaknięcie ich koloru. W związku z tym użytkownik nie może dokładnie określić czasu zmiany koloru, co jest kluczowe dla poprawności testów wilgotności. W związku z tym, w jednym z patentów opisano metodę przygotowania urządzenia do po-

miaru wilgotności, w którym wprowadzono wrażliwy na wilgoć związek nieorganiczny (chlorek kobaltu) do usieciowanej membrany celulozowo-chitozanowej jako środek utrwalający kolor. Zmiany barwy, będące wskaźnikiem zmian wilgotności, były zależne od stosunku związku wskaźnikowego do domieszki chitozanu [508].

Metoda warstwa po warstwie, polegająca na adsorpcji związków jonowych wokół kropli emulsji, do wytwarzania kapsułek typu olej w wodzie (o/w) lub woda w oleju (w/o), jest uważana za proces czasochłonny. Powstałe kapsułki charakteryzują się niestabilnością mechaniczną ze względu na ich cienkie warstwy. Metody koacerwacji umożliwiają uzyskanie kontrolowanej grubości powłoki poprzez przeprowadzenie polimeryzacji międzyfazowej między polimerowymi surfaktantami. Kapsułki wytwarzane tymi metodami są jednak uważane za nieodpowiednie do zastosowań w przemyśle spożywczym. W związku z tym zaproponowano metodę wytwarzania kapsułek o/w i w/o o jakości spożywczej, w zakresie od nanometrów do milimetrów, poprzez kompleksowanie międzyfazowe chitozanu z surfaktantami lipidowymi na bazie kwasu fosfatydowego [509].

Problemy z ograniczoną rozpuszczalnością chitozanu w wodzie zostały rozwiązane w zgłoszeniu patentowym [510]. W celu rozpuszczenia chitozanu w wodzie w warunkach obojętnego pH, patent zastrzegał wytwarzanie polimeru chitozanu nasyconego wodorosiarczanem, który mógłby tworzyć roztwór w obecności anionowych polielektrolitów.

W innym zgłoszeniu opisano ciągłą metodę produkcji chitozanu poprzez deacetylację w obecności wodorotlenków metali. Patent dotyczył zagadnień związanych z okresowym procesem deacetylacji/oczyszczania chitozanu, w którym proces jest przeprowadzany etapowo i prowadzi do uzyskania heterogenicznego chitozanu [511, 512].

Farmacja

Patenty zgłoszone w kategorii farmacja obejmują głównie podkategorie formułacji chitozanu w celu poprawy leczenia określonych chorób. Patenty te dotyczą zastosowania chitozanu w celu poprawy skuteczności istniejących leków lub zaferowania preparatów na bazie chitozanu jako nowego sposobu leczenia.

Siarczan chondroityny jest lekiem polimerowym, który jest słabo rozpuszczalny w środowisku wodnym. Dlatego wymaga podawania w dużych dawkach i wielomiesięcznej terapii, aby uzyskać pożądane efekty terapeutyczne. Pomimo opracowania różnych doustnych

6 Wyniki i dyskusja

formulacji leku w postaci kapsułek, tabletek, żeli doustnych lub tabletek do żucia, efekt terapeutyczny ulega osłabieniu z powodu degradacji leku *in vivo*. W związku z tym, zaproponowano metodę sprzęgania nanocząstek chitozanu z lekiem w celu ukierunkowania ich na bariery nabłonkowe, co zapewniło skuteczne dostarczanie leku i jego kontrolowane uwalnianie [513].

Pacjenci leczeni inhibitorami lipazy zazwyczaj cierpią na zespół oleistego wycieku z odbytu, który jest spowodowany oddzielaniem się oleju od tłuszczu pokarmowego w jelitach. Aby zatrzymać lub ograniczyć wyciek oleju, zaproponowano połączenie chitozanu i inhibitorów lipazy żołądkowo-jelitowej (orlistatu) [514].

Droga nosowa zazwyczaj służy jako szybka droga podania niektórych leków do krwioobiegu. Tak szybkie wchłanianie może być przydatne w walce z problemami zdrowotnymi takimi, jak lęk, migrena, impotencja, drgawki czy nudności. W związku z tym opisano zastosowanie chitozanu jako materiału bioadhezyjnego, który może przenosić farmaceutycznie czynne związki do jamy nosowej w postaci proszku. Adhezyjny chitozan podtrzymywał obecność substancji czynnych w błonie śluzowej jamy nosowej i zwiększał skuteczność leków, których nie można by podać w płynnych substancjach pomocniczych do podawania donosowego ze względu na ich niską rozpuszczalność w wodzie [515].

Zastosowanie chitozanu w miejscowym preparacie przeciwgrzybiczym miało na celu nadanie mu dodatkowej funkcji, jaką była regeneracja uszkodzonej skóry. Konwencjonalne leczenie skóry w zakażeniach przeciwgrzybiczych wymaga najpierw wyeliminowania zakażenia, a następnie regeneracji uszkodzonej tkanki, co pozostawia skórę bez ochrony z powodu powolnego ukrwienia nieprawidłowo funkcjonującej tkanki skórnej. W związku z tym zasugerowano zastosowanie chitozanu, który jednocześnie zapewniał tworzenie mikrowarstwy, elektrostatyczne wychwytywanie drobnoustrojów i przyspieszanie krzepnięcia krwi, podczas gdy substancja farmaceutycznie czynna działała podczas podawania miejscowego [516–519].

Metoda żelowania jonowego do otrzymywania nanocząstek składających się z chitozanu, tripolifosforanu sodu (TPP) i pirofosforanu tiaminy (TDP), jako środka sygnałowego, została zgłoszona w więcej niż jednym zgłoszeniu patentowym. Nanocząstki chitozanu/TPP/TDP zostały wykorzystane do dostarczania peptydów wykazujących aktywność farmaceutyczną w ośrodkowym układzie nerwowym. W patentach zastosowano

biokompatybilne nanocząstki chitozanu. TDP był szczególnie wykorzystywany ze względu na swoją zdolność do interakcji z receptorami tiaminy w barierze krew-mózg. Natomiast TPP ze względu na swoją zdolność do żelowania poprzez wiązania jonowe w wyniku interakcji z chitozanem [520, 521].

Zgodnie z zgłoszeniem patentowym [522], nanocząstki zawierające chitozan i heparynę (zarówno w obecności pochodnej polioksymetylenowej, jak i przy jej braku), otrzymane metodą żelowania jonowego w obecności substancji powodującej sieciowanie chitozanu, umożliwiały efektywne łączenie cząsteczek heparyny, a także ich późniejsze uwalnianie w odpowiednim środowisku biologicznym. Wykazano, że takie nanocząstki w płynach żołądkowo-jelitowych były stabilne i wykazały doskonałą skuteczność oraz biodostępność *in vivo*, a jednocześnie charakteryzowały się powolnym i kontrolowanym profilem uwalniania. Wykazano, że system nadawał się do podawania doustnego, po którym osiągnięto stężenia heparyny w osoczu nawet 10-krotnie wyższe niż w przypadku konwencjonalnej heparyny w roztworze.

Kosmetyki

Kosmetyki na bazie chitozanu stanowią kolejny obszar badań [523, 524, 525]. Jednak produkty na bazie chitozanu w dziedzinie kosmetyki były przedmiotem ograniczonej liczby zgłoszeń patentowych. Stwierdzono, że zgłoszenia te dotyczyły głównie preparatów do skóry i włosów, podczas gdy ograniczona liczba patentów koncentrowała się na opracowaniu potencjalnej formułacji kosmetycznej z punktu widzenia fizykochemicznego. Na przykład, donoszono, że konwencjonalne peelings naskórkowe, zawierające retinoidy i kwasy powodowały podrażnienia prowadzące do wyraźnych stanów zapalnych, złuszczenie, blizny przerostowe lub przebarwienia (nierównomierne koagulacje białek). Objawy te w ciężkich przypadkach łączyły się czasami z opryszczką i grzybicą. W związku z tym, zgłoszenie patentowe miało na celu wyeliminowanie tych wad peelingsów, wykorzystując preparaty na bazie chitozanu [526]. Preparat dermatologiczny lub kosmetyczny składający się z kolagenu, chitozanu i glikozaminoglikanów lub ich pochodnych, przeznaczony do regeneracji blizn, został objęty ochroną patentową [527].

W innym patencie opisano kosmetyczną kompozycję koloidalną, która charakteryzowała się silnym działaniem nawilżającym i wykazywała właściwości zwiększające elastyczność

6 Wyniki i dyskusja

skóry [528]. Opisywana kompozycja składała się z mieszaniny kwasu hialuronowego i chitozanu o różnej masie cząsteczkowej.

Przedstawiono również hydrofobowo modyfikowany biopolimer oraz kompozycję odpowiednią do zastosowań kosmetycznych lub pielęgnacyjnych, składający się z chitozanu, celulozy lub alginianu. Roztwór hydrofobowy modyfikowany biopolimerem miał postać płynnego sprayu, żelu, balsamu, kremu lub pianki. Modyfikację szkieletu chitozanu uzyskano poprzez połączenie związku amfifilowego z grupami aminowymi w taki sposób, że hydrofobowa część związku amfifilowego została połączona z hydrofilowym szkieletem [529].

Efekt półtrwałego prostowania włosów uzyskano z wykorzystaniem roztworów zawierających chitozan, alantoinę i pochodne kwasu glioksalowego połączone z obróbką cieplną. Zgodnie z patentem, karboksylimina chitozanu i pochodne alantoiny były w stanie poprawić odkształcanie włókien keratynowych [530].

Zgłoszeniem patentowym objęto jednorazowy wyrób chłonny, zawierający materiał chitozanowy wraz z ujemnie naładowanym, chłonnym materiałem żelującym. Patent obejmował metodę kontroli zapachów związanych z wydzielinami i płynami ustrojowymi. Zazwyczaj płyny ustrojowe (wysięki) miały kontakt z absorbentem przeznaczonym do umieszczenia w pobliżu lub na ciele użytkownika [531].

Ochrona środowiska

Spośród analizowanych patentów, bardzo niewiele zgłoszeń zostało sklasyfikowanych w ramach dziedziny ochrona środowiska.

Do wad konwencjonalnych systemów filtracji wody należą: spadek kinetyki adsorpcji z powodu interferencji z powszechnie występującymi jonami lub brak możliwości ponownego wykorzystania materiału po recyklingu. Tradycyjnie stosowane materiały filtracyjne w postaci proszku charakteryzują się obniżoną wydajnością hydrauliczną i wymywaniem cząstek. Chociaż opracowano różne metody umożliwiające stosowanie proszkowych materiałów filtracyjnych (takie jak zastosowanie organicznych lub nieorganicznych spoiw do granulowania proszków, a następnie pakowania granulek w kolumny), systemy filtracji oparte na takich zastosowaniach charakteryzują się obniżoną wydajnością adsorpcji z powodu obecności spoiw. Ponadto ich wytwarzanie w wysokich temperaturach jest kosz-

towne. Aby zaradzić tym problemom, zaproponowano zastosowanie nanokompozytów z oksywodorotlenku żelaza i glinu na matrycach chitozanowych do oczyszczania wody z arsenu i fluorków [532].

W innym patencie zaproponowano metodę usuwania glonów tworzących wykwitły wodne z wykorzystaniem chitozanu zawierającego wolne grupy aminowe, który charakteryzuje się działaniem przeciw zielenicom [533].

Przetwórstwo żywności

Jednym z rozwijających się obszarów badań dotyczących chitozanu są jego potencjalne zastosowania jako materiał do pakowania żywności [534, 535]. Ponadto jadalne materiały chitozanowe nadal przyciągają uwagę badaczy [536]. Jednak zastosowania związane z żywnością to kolejna kategoria reprezentowana przez niewielką liczbę patentów. W jednym z patentów opisywano metodę zapobiegania zmetnieniu napojów w pojemnikach z użyciem witaminy C i chitozanu [537]. Kolejny patent dotyczył kompozycji gumy do żucia zawierającej nanocząstki chitozanu pozyskane ze źródeł niezwierzęcych. Kompozycja zawierała skuteczną ilość nanocząstek chitozanu, które działały jako substancja czynna hamująca wzrost mikroorganizmów w jamie ustnej [538]. W innym zgłoszeniu donoszono, że kwasowy chitozan można dodawać do ciasta na artykuły spożywcze, takie jak pieczywo czy makaron. Nawet po ugotowaniu tych produktów chitozan ogranicza wchłanianie tłuszczów żołądkowo-jelitowych po spożyciu. Stosowanie tych produktów pozwala zmniejszyć ilość wchłanianego tłuszczu, a tym samym obniżyć poziom lipidów w osoczu i masę ciała, bez konieczności zmiany nawyków żywieniowych [539]. Opisano także metodę obróbki żywności w celu zmniejszenia zawartości pestycydów, co poprawia jej jakość higieniczną i organoleptyczną [540].

Rolnictwo

Zastosowanie chitozanu w rolnictwie jest dobrze opisane w literaturze [541, 542, 543, 544]. Jednak spośród przeanalizowanych patentów jedynie niewielka liczba patentów została zaklasyfikowana do kategorii rolnictwo. Na przykład, opisano preparat chitozanu rozpuszczalnego w wodzie o pH 7–12, który miał być stosowany jako stymulator wzrostu roślin i środek przeciwko chorobom roślin. Według autorów, rozpuszczalność chitozanu w roztwo-

racach kwasowych stanowiła wadę w zastosowaniach rolniczych, ponieważ kwaśne warunki nie były odpowiednie dla roślin. W kwaśnym środowisku chitozan o ładunku dodatnim prowadzi do interakcji z cząsteczkami anionowymi, takimi jak kwasy nukleinowe, kwasy tłuszczowe lub sole nieorganiczne [545].

Chitozan jest substancją wywołującą sporulację grzybowych czynników kontroli biologicznej. Grzyby rosnące w podłożach zawierających chitozan wykazały ponad 40-krotnie wyższy poziom produkcji zarodników niż w przypadku podłóż bez chitozanu. W związku z tym, w jednym z wynalazków wykorzystano chitozan do zwiększenia sporulacji grzybów strzępkowych. Grzyby te mogłyby być wykorzystane jako czynnik zwalczania biologicznego. Zwiększając produkcję zarodników biologicznych środków przeciwgrzybiczych, można zwiększyć produkcję szczepionek przeciwgrzybiczych do późniejszego opracowania oraz możliwości ich zastosowania w różnych obszarach [546].

6.5.2 Podsumowanie

Analiza przeprowadzona wśród patentów związanych z chitozaniem wykazała, że większość z nich została sklasyfikowana w kategoriach: materiałoznawstwo, chemia, biotechnologia i farmacja, podczas gdy tylko ograniczoną liczbę patentów można zaklasyfikować do dziedzin takich jak żywność, kosmetyki, rolnictwo, biomedycyna i ochrona środowiska. Dominacja patentów dotyczących chitozanu nad patentami dotyczącymi chityny wynika niewątpliwie ze specyfiki jego właściwości fizykochemicznych, w tym możliwości przetwarzania chitozanu w różne formy fizyczne (tj. hydrożele, włókna, membrany, folie, mieszanki, skafoldy, systemy nanokompozytowe). Chitozan jako ekologiczna alternatywa dla tworzyw sztucznych w opakowaniach stanowi bardzo atrakcyjne rozwiązanie. Jednym z czynników ograniczających może być odniżona dostępność chityny jako surowca, a także nieopłacalność procesów technologicznych wynikająca z wzrostu kosztów energii. Komercjalizacja badań nad chitozaniem jest również siłą napędową powstawania kolejnych patentów. Analiza patentów wskazuje, że chitozan będzie stale badany pod kątem dalszych wynalazków w dziedzinie technologii, jednocześnie rozszerzając obszary jego zastosowania w ramach globalnej polityki zielonej i ekologicznej chemii.

Chociaż patenty azjatyckie zostały w dużej mierze wyłączone z przeglądu ze względu na problemy językowe (brak pełnego tekstu w języku angielskim), należy podkreślić, że w

statystykach patentowych przeważają patenty chińskie. W związku z tym przedstawiono jedynie ograniczoną liczbę chińskich patentów, aby uwzględnić ich dominację. Ogólne statystyki patentowe przeprowadzone w tym temacie pokazują, że gwałtowny wzrost liczby zgłoszeń patentowych od 2006 r. i stosunkowo gwałtowny spadek od 2017 r. można przypisać polityce Chińskiej Narodowej Administracji Własności Intelektualnej (CNIPA) z 2017 r., wprowadzonej w celu śledzenia „nietypowych działań związanych ze zgłoszeniami patentowymi” [547]. Wiadomo, że w 2021 r. duża liczba (43%) chińskich firm patentowych borykała się z problemem nieregularnego składania wniosków patentowych. Chociaż polityka CNIPA z 2017 r. wydaje się być ściśle związana z nagłym spadkiem liczby zgłoszeń patentowych, brak szczegółowych informacji w tej sprawie (takich jak lista wycofanych patentów lub ukaranych chińskich firm patentowych) uniemożliwił dalsze badanie wpływu polityki CNIPA na liczbę patentów związanych z chitozanem.

7 Podsumowanie i perspektywy

W ramach niniejszej pracy po raz pierwszy otrzymano trójwymiarowe kompozyty chitynowo-chitozanowe poprzez deacetylację skafoldów chitynowych pochodzących z gąbek *A. aerophoba* oraz *I. basta*. Uzyskane matryce zachowują rozmiar i morfologię naturalnego szkieletu gąbki. Opracowane struktury, zbudowane są z zewnętrznej warstwy chitozanowej i chitynowego rdzenia. Dzięki temu otrzymane dwuwarstwowe kompozyty łączą wysoką wytrzymałość mechaniczną oraz wszechstronność chemiczną. Pozwala to na zwiększenie potencjału aplikacyjnego tych biomateriałów. Wyniki badań wskazują na zastosowanie konstruktywów chitynowo-chitozanowych w takich dziedzinach jak biomedycyna lub przemysł. Umożliwiają skalowalny i adaptowalny proces produkcyjny, który toruje drogę dla przyszłych innowacji w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.

Ponadto po raz pierwszy wykazano możliwość rozpuszczenia chitynowego skafoldu z gąbki *A. aerophoba* w 1% roztworze wodorotlenku litu. Proces ten prowadzi do przekształcenia trójwymiarowej struktury w amorficzną materię. W warunkach przeprowadzonych w badaniu nie dochodzi do zmiany właściwości chemicznych α -chityny ani jej deacetylacji do chitozanu. Jednakże pewne kwestie nadal zostają otwarte. Należą do nich analiza kinetyki rozpuszczania w zależności od stężenia LiOH i temperatury reakcji oraz charakterystyka strukturalna chityny izolowanej w tych warunkach z wykorzystaniem metod TEM i HR-TEM, a także badania właściwości mechanicznych metodą nanoindentacji.

W pracy zbadano również właściwości mechaniczne czystych matryc chitynowych oraz szkieletów chitynowych naturalnie zawierających bromotyrozyny. Próbkę pochodziły z takich gatunków gąbek jak: *A. fistularis*, *Dendrilla* sp., *A. archeri*, *A. aerophoba* oraz *I. basta*. Wykazano, iż usunięcie bromotyrozyn prowadzi do obniżenia modułu sprężystości, lecz nie wpływa znacząco na twardość materiału. Otrzymane wyniki mają szczególne znaczenie dla projektowania materiałów do zastosowań biomedycznych (np. w przypadku regeneracji tkanek nośnych) oraz technologicznych (np. systemy filtracyjne, kataliza), gdzie wymagane

7 Podsumowanie i perspektywy

są ściśle określone parametry mechaniczne.

Dodatkowo przebadano właściwości matrycy chitynowej z gąbki *I. basta* jako nośnika dla środków antyseptycznych. Skuteczność przeciwdrobnoustrojowa matryc chitynowych zależy od złożonej interakcji pomiędzy strukturą chemiczną i stężeniem zastosowanych antyseptyków a naturalnymi właściwościami nośnika, w tym jego zdolności pęcznienia i adsorpcji. Pozyskana wiedza stanowi podstawę do optymalizacji matryc chitynowych w zastosowaniach biomedycznych. W szczególności w opatrunkach na rany i systemach kontrolowanego uwalniania leków.

Na koniec pracy przedstawiona jest szczegółowa analiza patentów dotyczących chitozanu zgłoszonych w latach 1988–2021. Dominujące obszary klasyfikacji patentów obejmują materiałoznawstwo, chemię, biotechnologię oraz farmację. Kategorie takie jak żywność, kosmetyki, rolnictwo, biomedycyna i ochrona środowiska stanowią mniejszą część zgłoszeń. Analiza wskaźników jakości i komercjalizacji patentów pozwala lepiej zrozumieć globalne trendy i rosnące znaczenie materiałów chitynowych w nowoczesnych technologiach.

8 Bibliografia

- [1] H. Ehrlich *Marine Biological Materials of Invertebrate Origin* **2019**.
- [2] B. Moussian “Chitin: Structure, Chemistry and Biology” *Targeting Chitin-containing Organisms* red. Q. Yang, T. Fukamizo Singapore: Springer, **2019**, 5–18.
- [3] M. Banaee, C. R. Multisanti, F. Impellitteri, G. Piccione, C. Faggio “Environmental Toxicology of Microplastic Particles on Fish: A Review” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **287**, **2025**, 110042.
- [4] A. Kertmen, H. Ehrlich “Patentology of Chitinous Biomaterials. Part I: Chitin” *Carbohydrate Polymers* **282**, **2022**, 119102.
- [5] A. Kertmen, I. Dziedzic, H. Ehrlich “Patentology of Chitinous Biomaterials. Part II: Chitosan” *Carbohydrate Polymers* **301**, **2023**, 120224.
- [6] A. K. Badawi, R. Hasan, B. Ismail “Sustainable Coagulative Removal of Microplastic from Aquatic Systems: Recent Progress and Outlook” *RSC Advances* **15**:31, **2025**, 25256–25273.
- [7] Y. Xu, X. Zhang, S. Xiao, B.-Y. Peng, J. Chen, L. Yang, X. Zhou, Y. Zhang “Distinct Exposure Impact of Non-Degradable and Biodegradable Microplastics on Freshwater Microalgae (*Chlorella Pyrenoidosa*): Implications for Polylactic Acid as a Sustainable Plastic Alternative” *Journal of Hazardous Materials* **480**, **2024**, 136265.
- [8] I. Shanmugam Mahadevan, M. K. Harsha Vardhan, R. S. Rejith Kumar, M. Rohinth, Z. H. Tawfeeq Ahmed, P. Prakash, J. A. Kumar “Biotechnological Interventions for Monitoring and Mitigating Microplastic Pollution and Development of Alternatives to Single-Use Plastics” *Environmental Quality Management* **34**:1, **2024**, e22186.
- [9] P. Costa, M. Lackner “Biodegradable Microplastics: Environmental Fate and Persistence in Comparison to Micro- and Nanoplastics from Traditional, Non-Degradable Polymers” *Macromol* **5**:2, **2025**, 29.
- [10] V. G. L. Souza, J. R. A. Pires, C. Rodrigues, I. M. Coelho, A. L. Fernando “Chitosan Composites in Packaging Industry—Current Trends and Future Challenges” *Polymers* **12**:2, **2020**, 417.
- [11] S. Ju, G. Shin, M. Lee, J. Mo Koo, H. Jeon, Y. Sik Ok, D. Soo Hwang, S. Yeon Hwang, D. X. Oh, J. Park “Biodegradable Chito-Beads Replacing Non-Biodegradable Microplastics for Cosmetics” *Green Chemistry* **23**:18, **2021**, 6953–6965.
- [12] N. Wrońska, N. Katir, M. Nowak-Lange, A. El Kadib, K. Lisowska “Biodegradable Chitosan-Based Films as an Alternative to Plastic Packaging” *Foods* **12**:18, **2023**, 3519.
- [13] D. Tsurkan, M. Wysokowski, I. Petrenko, A. Voronkina, Y. Khrunyk, A. Fursov, H. Ehrlich “Modern Scaffolding Strategies Based on Naturally Pre-Fabricated 3D Biomaterials of Poriferan Origin” *Applied Physics A* **126**:5, **2020**, 382.
- [14] Y. S. Kim, Y. S. Shin “Surface Functionalization of 3D-Printed Bio-Inspired Scaffolds for Biomedical Applications: A Review” *Biomimetics* **9**:11, **2024**, 703.

- [15] V. V. Mutsenko, V. V. Bazhenov, O. Rogulska, D. N. Tarusin, K. Schütz, S. Brüggemeier, E. Gossila, A. R. Akkineni, H. Meißner, A. Lode, S. Meschke, A. Ehrlich, S. Petović, R. Martinović, M. Djurović, A. L. Stelling, S. Nikulin, S. Rodin, A. Tonevitsky, M. Gelinsky, A. Y. Petrenko, B. Glasmacher, H. Ehrlich "3D Chitinous Scaffolds Derived from Cultivated Marine Demosponge *Aplysina Aerophoba* for Tissue Engineering Approaches Based on Human Mesenchymal Stromal Cells" *International Journal of Biological Macromolecules* 11th APCCS-2016-Chemistry, Environmental, Biotechnology and Biomedical Aspects of Chitin and Chitosan 104, **2017**, 1966–1974.
- [16] V. V. Mutsenko, O. Gryshkov, L. Lauterboeck, O. Rogulska, D. N. Tarusin, V. V. Bazhenov, K. Schütz, S. Brüggemeier, E. Gossila, A. R. Akkineni, H. Meißner, A. Lode, S. Meschke, J. Fromont, A. L. Stelling, K. R. Tabachnik, M. Gelinsky, S. Nikulin, S. Rodin, A. G. Tonevitsky, A. Y. Petrenko, B. Glasmacher, P. J. Schupp, H. Ehrlich "Novel Chitin Scaffolds Derived from Marine Sponge *Ianthella Basta* for Tissue Engineering Approaches Based on Human Mesenchymal Stromal Cells: Biocompatibility and Cryopreservation" *International Journal of Biological Macromolecules* 104, **2017**, 1955–1965.
- [17] C. Hatchett "Experiments and Observations on Shell and Bone" *Philosophical Transactions Royal Society London* 89, **1799**, 315–334.
- [18] H. Braconnot "Des Recherches Analytiques Sur La Nature Des Champignons." *Recueil de Mémoires Concernant La Chimie et Les Arts Qui En Dépendent et Spécialement La Pharmacie* Klostermann J., **1811**, 272–292.
- [19] H. Braconnot "Sur La Nature Des Champignons." *Recueil de Mémoires Concernant La Chimie et Les Arts Qui En Dépendent et Spécialement La Pharmacie* t. Soixante-dix-neuf Klostermann J., **1811**, 265–304.
- [20] A. Odier "Mémoire Sur La Composition Chimique Des Parties Cornées Des Insectes" *Mémoires de La Société d'Histoire Naturelle de Paris* t. Première Baudouin Frères Libraires-Éditeurs, Paris, **1823**.
- [21] G. A. F. Roberts *Chitin Chemistry* London: Macmillan Education UK, **1992**.
- [22] G. Ledderhose "Ueber Salzsaures Glycosamin" *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 9:2, **1876**, 1200–1201.
- [23] G. Crini "Historical Review on Chitin and Chitosan Biopolymers" *Environmental Chemistry Letters* 17:4, **2019**, 1623–1643.
- [24] S. Fränkel, A. Kelly "Beiträge zur Constitution des Chitins" *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften* 23:2, **1901**, 123–132.
- [25] S. Fränkel, A. Kelly "Sur La Constitution de La Chitine." *Bulletin de la Société Chimique de Paris* Troisième Série vol. XXX, **1903**, 372.
- [26] M. V. Tsurkan, A. Voronkina, Y. Khrunyk, M. Wysokowski, I. Petrenko, H. Ehrlich "Progress in Chitin Analytics" *Carbohydrate Polymers* 252, **2021**, 117204.
- [27] M. Psarianos, G. Rossi, M. Van Der Borght, O. K. Schlüter "Methods for Estimating the Chitin Content of Edible Insects: Advantages and Challenges" *Carbohydrate Polymers* 367, **2025**, 124009.
- [28] H. Ehrlich, M. Maldonado, K.-D. Spindler, C. Eckert, T. Hanke, R. Born, C. Goebel, P. Simon, S. Heinemann, H. Worch "First Evidence of Chitin as a Component of the Skeletal Fibers of Marine Sponges. Part I. Verongidae (Demospongia: Porifera)" *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution* 308:4, **2007**, 347–356.

- [29] H. Ehrlich, M. Krautter, T. Hanke, P. Simon, C. Knieb, S. Heinemann, H. Worch "First Evidence of the Presence of Chitin in Skeletons of Marine Sponges. Part II. Glass Sponges (Hexactinellida: Porifera)" *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution* 308:4, **2007**, 473–483.
- [30] C. Rouget "Des Substances Amylacées Dans Les Tissus Des Ani- Maux, Spécialement Les Articulés (Chitine)." *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences* 48, **1859**, 792–795.
- [31] F. Hoppe-Seyler "Ueber Chitin Und Cellulose" *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 27:3, **1894**, 3329–3331.
- [32] F. Hoppe-Seyler "Ueber Umwandlungen Des Chitins" *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 28:1, **1895**, 82–82.
- [33] P. Karrer, A. Hofmann "Polysaccharide XXXIX. Über Den Enzymatischen Abbau von Chitin Und Chitosan I." *Helvetica Chimica Acta* 12:1, **1929**, 616–637.
- [34] P. Karrer "Der enzymatische Abbau von nativer und umgefällter Zellulose, von Kunstseiden und von Chitin" *Kolloid-Zeitschrift* 52:3, **1930**, 304–319.
- [35] A. Harugade, A. P. Sherje, A. Pethe "Chitosan: A Review on Properties, Biological Activities and Recent Progress in Biomedical Applications" *Reactive and Functional Polymers* 191, **2023**, 105634.
- [36] A. Elizalde-Cárdenas, R. M. Ribas-Aparicio, A. Rodríguez-Martínez, G. Leyva-Gómez, C. Ríos-Castañeda, M. González-Torres "Advances in Chitosan and Chitosan Derivatives for Biomedical Applications in Tissue Engineering: An Updated Review" *International Journal of Biological Macromolecules* 262, **2024**, 129999.
- [37] M. T. El-Saadony, A. M. Saad, S. S. Alkafaas, M. Dladla, S. Ghosh, S. S. Elkafas, W. Hafez, S. M. Ezzat, S. A. Khedr, A. M. Hussien, M. A. Fahmy, I. E. Elesawi, H. M. Salem, D. M. Mohammed, T. A. Abd El-Mageed, A. E. Ahmed, W. F. A. Mosa, M. K. El-Tarabily, S. F. AbuQamar, K. A. El-Tarabily "Chitosan, Derivatives, and Its Nanoparticles: Preparation, Physicochemical Properties, Biological Activities, and Biomedical Applications – A Comprehensive Review" *International Journal of Biological Macromolecules* 313, **2025**, 142832.
- [38] J. Wang, Y. Yuan, Y. Liu, X. Li, S. Wu "Application of Chitosan in Fruit Preservation: A Review" *Food Chemistry: X* 23, **2024**, 101589.
- [39] R. Saberi Riseh, M. Vatankhah, M. Hassanisaadi, R. S. Varma "A Review of Chitosan Nanoparticles: Nature's Gift for Transforming Agriculture through Smart and Effective Delivery Mechanisms" *International Journal of Biological Macromolecules* 260, **2024**, 129522.
- [40] Y. Zhou, Y. Zhang, Y. Nie, D. Sun, D. Wu, L. Ban, H. Zhang, S. Yang, J. Chen, H. Du, X. Pan "Recent Advances and Perspectives in Functional Chitosan-Based Composites for Environmental Remediation, Energy, and Biomedical Applications" *Progress in Materials Science* 152, **2025**, 101460.
- [41] A. Haider, S. Khan, D. N. Iqbal, M. Shrahili, S. Haider, K. Mohammad, A. Mohammad, M. Rizwan, Q. Kanwal, G. Mustafa "Advances in Chitosan-Based Drug Delivery Systems: A Comprehensive Review for Therapeutic Applications" *European Polymer Journal* 210, **2024**, 112983.
- [42] R. Biswas, S. Mondal, M. A. Ansari, T. Sarkar, I. P. Condiuc, G. Trifas, L. I. Atanase "Chitosan and Its Derivatives as Nanocarriers for Drug Delivery" *Molecules* 30:6, **2025**, 1297.

- [43] M. A. Khorasani, S. M. Naghib "A Review of Chitosan-Based Multifunctional Nanocomposites for Drug/Gene/Protein Delivery and Gene Therapy in Cancer Treatments: Promises, Challenges and Outlooks" *International Journal of Biological Macromolecules* 306, **2025**, 141394.
- [44] J. Klarak, A. C. M. Brito, L. F. Moreira, F. N. Silva, D. R. Amancio, R. Andok, M. C. F. Oliveira, M. Bardosova, O. N. Oliveira "Using Network Analysis and Large-Language Models to Obtain a Landscape of the Literature on Dressing Materials for Wound Healing: The Predominance of Chitosan and Other Biomacromolecules: A Review" *International Journal of Biological Macromolecules* 306, **2025**, 141565.
- [45] J. Su, C. Liu, A. Sun, J. Yan, F. Sang, Y. Xin, Y. Zhao, S. Wang, Q. Dang "Hemostatic and Antimicrobial Properties of Chitosan-Based Wound Healing Dressings: A Review" *International Journal of Biological Macromolecules* 306, **2025**, 141570.
- [46] S. Jogaiah, A. G. Mujtaba, M. Mujtaba, Archana, S. De Britto, N. Geetha, S. A. Belorkar, H. S. Shetty "Chitosan-Metal and Metal Oxide Nanocomposites for Active and Intelligent Food Packaging; a Comprehensive Review of Emerging Trends and Associated Challenges" *Carbohydrate Polymers* 357, **2025**, 123459.
- [47] A. P. R. Charles, B. Rajasekaran, N. Awasti, P. Choudhary, A. C. Khanashyam, K. Majumder, Y. Wu, R. Pandiselvam, T. Z. Jin "Emerging Chitosan Systems Incorporated with Polyphenols: Their Applications in Intelligent Packaging, Active Packaging, and Nutraceutical Systems – A Comprehensive Review" *International Journal of Biological Macromolecules* 308, **2025**, 142714.
- [48] K. Piekarska, M. Sikora, M. Owczarek, J. Jóźwik-Pruska, M. Wiśniewska-Wrona "Chitin and Chitosan as Polymers of the Future—Obtaining, Modification, Life Cycle Assessment and Main Directions of Application" *Polymers* 15:4, **2023**, 793.
- [49] N. A. N. Dzolkifle, W. M. F. Wan Nawawi "A Review on Chitin Dissolution as Preparation for Electrospinning Application" *International Journal of Biological Macromolecules* 265, **2024**, 130858.
- [50] A. Anitha, S. Sowmya, P. T. S. Kumar, S. Deepthi, K. P. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan, R. Jayakumar "Chitin and Chitosan in Selected Biomedical Applications" *Progress in Polymer Science Special Issue on Biorelated Materials* 39:9, **2014**, 1644–1667.
- [51] I. Younes, M. Rinaudo "Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications" *Marine Drugs* 13:3, **2015**, 1133–1174.
- [52] J. Lv, X. Lv, M. Ma, D.-H. Oh, Z. Jiang, X. Fu "Chitin and Chitin-Based Biomaterials: A Review of Advances in Processing and Food Applications" *Carbohydrate Polymers* 299, **2023**, 120142.
- [53] S. Ngasotter, K. A. M. Xavier, M. M. Meitei, D. Waikhom, Madhulika, J. Pathak, S. K. Singh "Crustacean Shell Waste Derived Chitin and Chitin Nanomaterials for Application in Agriculture, Food, and Health – A Review" *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 6, **2023**, 100349.
- [54] L. Qian, K. Zhang, X. Guo, M. Yu "What Happens When Chitin Becomes Chitosan? A Single-Molecule Study" *RSC Advances* 13:4, **2023**, 2294–2300.
- [55] M. M. Jaworska, A. Gorak "Modification of Chitin Particles with Chloride Ionic Liquids" *Materials Letters* 164, **2016**, 341–343.
- [56] M. M. Jaworska, A. Górak, J. Zdunek "Modification of Chitin Particles with Ionic Liquids Containing Ethyl Substituent in a Cation" *Advances in Materials Science and Engineering* 2017:1, **2017**, 3961318.

- [57] M. M. Jaworska, I. Stępnia, M. Galiński, D. Kasprzak, D. Biniś, A. Górak "Modification of Chitin Structure with Tailored Ionic Liquids" *Carbohydrate Polymers* 202, **2018**, 397–403.
- [58] M. M. Jaworska, A. Górak "New Ionic Liquids for Modification of Chitin Particles" *Research on Chemical Intermediates* 44:8, **2018**, 4841–4854.
- [59] M. H. Rahman, M. I. H. Mondal "Stability, Challenges, and Prospects of Chitosan for the Delivery of Anticancer Drugs and Tissue Regenerative Growth Factors" *Heliyon* 10:21, **2024**, e39879.
- [60] E. Scarcelli, A. Catalano, D. Iacopetta, J. Ceramella, M. S. Sinicropi, F. Aiello "Chitin, Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobials and/or Mitigators of Water" *Macromol* 5:2, **2025**, 15.
- [61] W. Wang, C. Xue, X. Mao "Chitosan: Structural Modification, Biological Activity and Application" *International Journal of Biological Macromolecules* 164, **2020**, 4532–4546.
- [62] L. Mersmann, V. G. L. Souza, A. L. Fernando "Green Processes for Chitin and Chitosan Production from Insects: Current State, Challenges, and Opportunities" *Polymers* 17:9, **2025**, 1185.
- [63] B. Ayhan, N. Şanlıer "A Renewable Natural Bioactive Polysaccharide: An Overview to Chitosan" *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 4:5, **2015**, 541–548.
- [64] T. Machałowski *Naturally Formed Chitin-Based Scaffolds: Characterization, Functionalization, and Practical Utility* Poznan: Poznan University of Technology, **2022**.
- [65] R. Singh, K. Shitiz, A. Singh "Chitin and Chitosan: Biopolymers for Wound Management" *International Wound Journal* 14:6, **2017**, 1276–1289.
- [66] Z. Yu, Y. Ji, V. Bourg, M. Bilgen, J. C. Meredith "Chitin- and Cellulose-Based Sustainable Barrier Materials: A Review" *Emergent Materials* 3:6, **2020**, 919–936.
- [67] P. Baharlouei, A. Rahman "Chitin and Chitosan: Prospective Biomedical Applications in Drug Delivery, Cancer Treatment, and Wound Healing" *Marine Drugs* 20:7, **2022**, 460.
- [68] H. Nagahama, N. Nwe, R. Jayakumar, S. Koiwa, T. Furuike, H. Tamura "Novel Biodegradable Chitin Membranes for Tissue Engineering Applications" *Carbohydrate Polymers* 73:2, **2008**, 295–302.
- [69] V. Mutsenko, O. Gryshkov, O. Rogulska, A. Lode, A. Y. Petrenko, M. Gelinsky, B. Glasmacher, H. Ehrlich "Chitinous Scaffolds from Marine Sponges for Tissue Engineering" *Marine-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications* red. A. H. Choi, B. Ben-Nissan Springer Series in Biomaterials Science and Engineering Singapore: Springer, **2019**, 285–307.
- [70] J. Kiryk, M. Michalak, Z. Majchrzak, M. Laszczyńska, S. Kiryk, S. Szotek, H. Gerber, I. Nawrot-Hadzik, J. Matys, M. Dobrzyński "Functionalization Strategies of Chitosan-Based Scaffolds with Growth Factors for Bone Regeneration: A Systematic Review" *Marine Drugs* 23:10, **2025**, 396.
- [71] T.-L. Yang "Chitin-Based Materials in Tissue Engineering: Applications in Soft Tissue and Epithelial Organ" *International Journal of Molecular Sciences* 12:3, **2011**, 1936–1963.
- [72] S. Geahchan, H. Ehrlich, M. A. Rahman "The Anti-Viral Applications of Marine Resources for COVID-19 Treatment: An Overview" *Marine Drugs* 19:8, **2021**, 409.
- [73] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair, H. Tamura "Biomaterials Based on Chitin and Chitosan in Wound Dressing Applications" *Biotechnology Advances* 29:3, **2011**, 322–337.

8 Bibliografia

- [74] M. Wiśniewska-Wrona, M. E. Fray "Właściwości fizykochemiczne i funkcjonalne biokompozytów polimerowych" *Polimery* 64:1, **2019**, 23–33.
- [75] J. Shah, D. Patel, D. Rananavare, D. Hudson, M. Tran, R. Schloss, N. Langrana, F. Berthiaume, S. Kumar "Recent Advancements in Chitosan-Based Biomaterials for Wound Healing" *Journal of Functional Biomaterials* 16:2, **2025**, 45.
- [76] F.-L. Mi, Y.-M. Lin, Y.-B. Wu, S.-S. Shyu, Y.-H. Tsai "Chitin/PLGA Blend Microspheres as a Biodegradable Drug-Delivery System: Phase-Separation, Degradation and Release Behavior" *Biomaterials* 23:15, **2002**, 3257–3267.
- [77] A. Piegat, A. Niemczyk, A. R. Boccaccini, M. El Fray, L. Liverani "Hierarchical Multi-Layered Scaffolds Based on Electrofluidodynamic Processes for Tissue Engineering" *Biomedical Materials* 16:4, **2021**, 041001.
- [78] J. Zhang, W. Zhu, J. Liang, L. Li, L. Zheng, X. Shi, C. Wang, Y. Dong, C. Li, X. Zhu "In Situ Synthesis of Gold Nanoparticles from Chitin Nanogels and Their Drug Release Response to Stimulation" *Polymers* 16:3, **2024**, 390.
- [79] U. Piotrowska, J. Szatko, A. Nowakowska, E. Klimaszewska, M. Ogorzałek, M. Sobczak "Chitosan-Based Drug Delivery Systems for Targeted Chemotherapy in Colorectal Cancer: A Scoping Review" *Marine Drugs* 23:12, **2025**, 467.
- [80] A. Niemczyk, A. Goszczyńska, M. Gołda-Cępa, A. Kotarba, P. Sobolewski, M. El Fray "Biofunctional Catheter Coatings Based on Chitosan-Fatty Acids Derivatives" *Carbohydrate Polymers* 225, **2019**, 115263.
- [81] M. Wekwejt, M. Michalska-Sionkowska, M. Bartmański, M. Nadolska, K. Łukowicz, A. Pałubicka, A. M. Osyczka, A. Zieliński "Influence of Several Biodegradable Components Added to Pure and Nanosilver-Doped PMMA Bone Cements on Its Biological and Mechanical Properties" *Materials Science and Engineering: C* 117, **2020**, 111286.
- [82] M. Supernak-Marczewska, A. Zieliński "Effects of the Origin and Deacetylation Degree of Chitosan on Properties of Its Coatings on Titanium" *Coatings* 10:2, **2020**, 99.
- [83] Ł. Pawłowski, M. Bartmański, A. Mielewczyk-Gryń, A. Zieliński "Chitosan/Poly(4-Vinylpyridine) Coatings Formed on AgNPs-decorated Titanium" *Materials Letters* 319, **2022**, 132293.
- [84] Ł. Pawłowski, M. Rościszewska, B. Majkowska-Marzec, M. Jażdżewska, M. Bartmański, A. Zieliński, N. Tybuszewska, P. Samsel "Influence of Surface Modification of Titanium and Its Alloys for Medical Implants on Their Corrosion Behavior" *Materials* 15:21, **2022**, 7556.
- [85] Ł. Pawłowski, M. Asim Akhtar, A. Zieliński, A. R. Boccaccini "Biological Properties of Chitosan/Eudragit E 100 and Chitosan/Poly(4-Vinylpyridine) Coatings Electrostatically Deposited on AgNPs-decorated Titanium Substrate" *Materials Letters* 336, **2023**, 133885.
- [86] Ł. Pawłowski, M. A. Akhtar, A. Zieliński, A. R. Boccaccini "Electrophoretic Deposition and Characterization of Composite Chitosan/Eudragit E 100 or Poly(4-Vinylpyridine)/Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles Coatings on Pre-Treated Titanium for Implant Applications" *Surface and Coatings Technology* 479, **2024**, 130542.
- [87] Ł. Pawłowski, M. Bartmański, A. Mielewczyk-Gryń, A. Zieliński "Effects of Surface Pretreatment of Titanium Substrates on Properties of Electrostatically Deposited Biopolymer Chitosan/Eudragit E 100 Coatings" *Coatings* 11:9, **2021**, 1120.

- [88] Ł. Pawłowski, M. Bartmański, A. Mielewczyk-Gryń, B. M. Cieślik, G. Gajowiec, A. Zieliński "Electrophoretically Deposited Chitosan/Eudragit E 100/AgNPs Composite Coatings on Titanium Substrate as a Silver Release System" *Materials* 14:16, **2021**, 4533.
- [89] Ł. Pawłowski, J. Wawrzyniak, A. Banach-Kopeć, B. M. Cieślik, K. Jurak, J. Karczewski, R. Tylingo, K. Siuzdak, A. Zieliński "Antibacterial Properties of Laser-Encapsulated Titanium Oxide Nanotubes Decorated with Nanosilver and Covered with Chitosan/Eudragit Polymers" *Biomaterials Advances* 138, **2022**, 212950.
- [90] Ł. Pawłowski, S. Mania, A. Banach-Kopeć, M. Bartmański, A. Ronowska, K. Jurak, A. Mielewczyk-Gryń, N. Karska, S. Rodziewicz-Motowidło, A. Zieliński "Osteoblast and Bacterial Cell Response on RGD Peptide-Functionalized Chitosan Coatings Electrophoretically Deposited from Different Suspensions on Ti13Nb13Zr Alloy" *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 111:10, **2023**, 1800–1812.
- [91] Ł. Pawłowski, M. Bartmański, A. Ronowska, A. Banach-Kopeć, S. Mania, B. M. Cieślik, A. Mielewczyk-Gryń, J. Karczewski, A. Zieliński "Cytocompatibility, Antibacterial, and Corrosion Properties of Chitosan/Polymethacrylates and Chitosan/Poly(4-Vinylpyridine) Smart Coatings, Electrophoretically Deposited on Nanosilver-Decorated Titania Nanotubes" *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 112:1, **2024**, e35332.
- [92] C. Casadidio, D. V. Peregrina, M. R. Gigliobianco, S. Deng, R. Censi, P. Di Martino "Chitin and Chitosans: Characteristics, Eco-Friendly Processes, and Applications in Cosmetic Science" *Marine Drugs* 17:6, **2019**, 369.
- [93] M. M. Jaworska, U. Filipkowska, Z. Modrzejewska "Adsorption of the Dye Acid Blue 158 Premetalized with Chromium on Chitin/Chitosan" *Carbohydrate Polymers* 298, **2022**, 120122.
- [94] C. Songkroah, W. Nakbanpote, P. Thiravetyan "Recovery of Silver-Thiosulphate Complexes with Chitin" *Process Biochemistry* 39:11, **2004**, 1553–1559.
- [95] F. Blind, S. Fränze "Chitin as a Sorbent Superior to Other Biopolymers: Features and Applications in Environmental Research, Energy Conversion, and Understanding Evolution of Animals" *Polysaccharides* 2:4, **2021**, 773–794.
- [96] B. Duan, H. Gao, M. He, L. Zhang "Hydrophobic Modification on Surface of Chitin Sponges for Highly Effective Separation of Oil" *ACS Applied Materials & Interfaces* 6:22, **2014**, 19933–19942.
- [97] T. Machałowski, M. Wysokowski, I. Petrenko, A. Fursov, M. Rahimi-Nasrabadi, M. M. Amro, H. Meissner, Y. Joseph, B. Fazilov, H. Ehrlich, T. Jesionowski "Naturally Pre-Designed Biomaterials: Spider Molting Cuticle as a Functional Crude Oil Sorbent" *Journal of Environmental Management* 261, **2020**, 110218.
- [98] R. M. El-Shishtawy, A. M. Asiri, N. S. E. Ahmed "Removal of Toxic Dyestuffs from Aqueous Solution by Amphoteric Bioadsorbent" *Current Analytical Chemistry* 17:7, **2021**, 957–974.
- [99] U. Filipkowska, T. Józwiak "Chitosan Sorbents Used for Dye Removal" *Desalination and Water Treatment* 243, **2021**, 242–261.
- [100] U. Filipkowska, T. Józwiak "Dye Sorption from Mixtures on Chitosan Sorbents" *Molecules* 29:15, **2024**.
- [101] W.-L. Xu, H.-J. Chen, Y.-C. Wang, S. Liu, X.-Y. Wan, H.-L. Peng, K. Huang "Chitin-Derived Fibrous Carbon Microspheres as Support of Polyamine for Remarkable CO₂ Capture" *Green Chemical Engineering* 3:3, **2022**, 267–279.

- [102] U. Filipkowska, T. Józwiak "The Combination of Waste Products from Chitin and Sawdust to Remove Anionic and Cationic Dyes" *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 29, **2024**, 140–155.
- [103] U. Filipkowska, T. Józwiak "Reusability of Chitosan and Sawdust-Modified Chitosan for Adsorption/Desorption of Anionic and Cationic Dyes" *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 28, **2023**, 14–25.
- [104] T. Józwiak, U. Filipkowska "The Use of Air-Lift Adsorber with a Floating Filling from a Cross-Linked Chitosan Hydrogels for Reactive Black 5 Removal" *Scientific Reports* 11:1, **2021**, 13382.
- [105] T. Józwiak, A. Kowalkowska, U. Filipkowska, J. Struk-Sokołowska, L. Bolozan, L. Gache, M. Ilie "Recovery of Phosphorus as Soluble Phosphates from Aqueous Solutions Using Chitosan Hydrogel Sorbents" *Scientific Reports* 11:1, **2021**, 16766.
- [106] T. Józwiak, A. Mielcarek, U. Filipkowska "The Use of Chitin for the Removal of Nitrates and Orthophosphates from Greenhouse Wastewater" *Molecules* 29:6, **2024**.
- [107] J. Gubitosa, D. Cignolo, S. Lotito, P. Fini, A. Milella, A. Perrotta, P. Cosma, V. Rizzi "Physical and Chemical Parameters Driving the Direct Blue-78 Adsorption from Water Using Chitosan/ZnO Hybrid Sponges Engineered via Atomic Layer Deposition" *ACS Omega* 10:30, **2025**, 33897–33909.
- [108] A. Charoenpol, D. Crespy, A. Schulte, W. Suginta "Marine Chitin Upcycling with Immobilized Chitinolytic Enzymes: Current State and Prospects" *Green Chemistry* 25:2, **2023**, 467–489.
- [109] D. Zhao, N. Zhou, C. Wu, B. Wu, F. Chen, A. Zhang, K. Chen "The Application of Chitin Materials in Enzymatic Catalysis: A Review" *Carbohydrate Polymers* 352, **2025**, 123172.
- [110] W. Suginta, P. Khunkaewla, A. Schulte "Electrochemical Biosensor Applications of Polysaccharides Chitin and Chitosan" *Chemical Reviews* 113:7, **2013**, 5458–5479.
- [111] P. Sobolewski, M. Piwowarczyk, M. E. Fray "Polymer–Graphene Nanocomposite Materials for Electrochemical Biosensing" *Macromolecular Bioscience* 16:7, **2016**, 944–957.
- [112] P. Sobolewski, A. Goszczyńska, M. Aleksandrak, K. Urbaś, J. Derkowska, A. Bartoszewska, J. Podolski, E. Mijowska, M. E. Fray "A Biofunctionalizable Ink Platform Composed of Catechol-Modified Chitosan and Reduced Graphene Oxide/Platinum Nanocomposite" *Beilstein Journal of Nanotechnology* 8:1, **2017**, 1508–1514.
- [113] J. A. Lucas-Bautista, S. Mendoza-Acevedo, S. Bautista-Baños, Z. N. Correa-Pacheco, R. I. Ventura-Aguilar "Development of a Based-Chitin-Chitinase Nanostructured Biosensor for the Detection of Fungal Complex on Papaya Fruit during Storage" *Microchemical Journal* 197, **2024**, 109812.
- [114] J. Liao, Y. Zhou, B. Hou, J. Zhang, H. Huang "Nano-Chitin: Preparation Strategies and Food Biopolymer Film Reinforcement and Applications" *Carbohydrate Polymers* 305, **2023**, 120553.
- [115] R. Kumari, M. Kumar, V. Vivekanand, N. Pareek "Chitin Biorefinery: A Narrative and Prophecy of Crustacean Shell Waste Sustainable Transformation into Bioactives and Renewable Energy" *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 184, **2023**, 113595.
- [116] A. Aravind, K. Seliverstova, K. K. K. Kammerlander, T. Henle, E. Brunner "Processing α -Chitin into Stable Composite Materials for Heavy Metal Adsorption" *International Journal of Molecular Sciences* 26:7, **2025**, 3149.

- [117] M. M. Jaworska, D. Antos, A. Górak "Review on the Application of Chitin and Chitosan in Chromatography" *Reactive and Functional Polymers* 152, **2020**, 104606.
- [118] S. A. Al Kiey, M. Toderas, O. A. Al-Qabandi, M. Bassyouni, Q. Zhou, M. El Fray, M. S. Hasanin "Investigating the Hybrid Potential of PVA-chitosan-loaded TiO₂@NiO Films for Advanced Conductivity and Dielectric Performance" *Polymer Testing* 138, **2024**, 108546.
- [119] A. Strzałka, R. Lubczak, J. Lubczak "Chitosan Oligomer as a Raw Material for Obtaining Polyurethane Foams" *Polymers* 15:14, **2023**, 3084.
- [120] A. M. Strzałka, J. Lubczak "Polyols and Polyurethane Foams Based on Water-Soluble Chitosan" *Polymers* 15:6, **2023**, 1488.
- [121] A. M. Strzałka, B. Dębska, J. Lubczak "Polyols and Polyurethane Foams Based on Chitosans of Various Molecular Weights" *Journal of Applied Polymer Science* 141:20, **2024**, e55393.
- [122] M. Kaya, M. Mujtaba, H. Ehrlich, A. M. Salaberria, T. Baran, C. T. Amemiya, R. Galli, L. Akyuz, I. Sargin, J. Labidi "On Chemistry of γ -Chitin" *Carbohydrate Polymers* 176, **2017**, 177–186.
- [123] T. Machałowski, M. Wysokowski, S. Żółtowska-Aksamitowska, N. Bechmann, B. Binnewerg, M. Schubert, K. Guan, S. R. Bornstein, K. Czaczyk, O. Pokrovsky, M. Kraft, M. Bertau, C. Schimpf, D. Rafaja, M. Tsurkan, R. Galli, H. Meissner, I. Petrenko, A. Fursov, A. Voronkina, M. Figlerowicz, Y. Joseph, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Spider Chitin. The Biomimetic Potential and Applications of Caribena Versicolor Tubular Chitin" *Carbohydrate Polymers* 226, **2019**, 115301.
- [124] T. Machałowski, C. Amemiya, T. Jesionowski "Chitin of Araneae Origin: Structural Features and Biomimetic Applications: A Review" *Applied Physics A* 126:9, **2020**, 678.
- [125] T. Machałowski, A. Rusak, B. Wiatrak, K. Haczkiwicz-Leśniak, A. Popiel, J. Jaroszewicz, A. Żak, M. Podhorska-Okołów, T. Jesionowski "Naturally Formed Chitinous Skeleton Isolated from the Marine Demosponge *Aplysina Fistularis* as a 3D Scaffold for Tissue Engineering" *Materials* 14:11, **2021**, 2992.
- [126] T. Machałowski, J. Idaszek, A. Chlanda, M. Heljak, A. Piasecki, W. Świążzkowski, T. Jesionowski "Naturally Prefabricated 3D Chitinous Skeletal Scaffold of Marine Demosponge Origin, Biomineralized *Ex Vivo* as a Functional Biomaterial" *Carbohydrate Polymers* 275, **2022**, 118750.
- [127] H. Ehrlich "Biomimetic Potential of Chitin-Based Composite Biomaterials of Poriferan Origin" *Biomimetic Biomaterials* red. A. J. Ruys Woodhead Publishing Series in Biomaterials Woodhead Publishing, **2013**, 46–66.
- [128] H. Ehrlich "Chitin of Poriferan Origin as a Unique Biological Material" *Blue Biotechnology* John Wiley & Sons, Ltd, **2018**, 821–854.
- [129] H. Ehrlich *Marine Biological Materials of Invertebrate Origin* t. 13 Biologically-Inspired Systems Cham: Springer International Publishing, **2019**.
- [130] L. Brain, M. Bleackley, M. S. Doblin, M. Anderson "Fungal Chitin Synthases: Structure, Function, and Regulation" *Journal of Fungi* 11:11, **2025**, 796.
- [131] H. E. Shinnerl, I. J. Banks, R. N. Dilger "A Comparative Review of Chitin Occurrence and Quantification Methodologies with Applications to Insect Sourced Materials" *Carbohydrate Polymers* 371, **2026**, 124496.

- [132] K. Nakashima, S. Kimura, Y. Ogawa, S. Watanabe, S. Soma, T. Kaneko, L. Yamada, H. Sawada, C.-H. Tung, T.-M. Lu, J.-K. Yu, A. Villar-Briones, S. Kikuchi, N. Satoh "Chitin-Based Barrier Immunity and Its Loss Predated Mucus-Colonization by Indigenous Gut Microbiota" *Nature Communications* 9:1, **2018**, 3402.
- [133] H. Ehrlich "Chitin and Collagen as Universal and Alternative Templates in Biomineralization" *International Geology Review* 52:7–8, **2010**, 661–699.
- [134] B. A. Stankiewicz, D. E. G. Briggs, R. P. Evershed, M. B. Flannery, M. Wuttke "Preservation of Chitin in 25-Million-Year-Old Fossils" *Science* 276:5318, **1997**, 1541–1543.
- [135] P. G. Weaver, L. A. Doguzhaeva, D. R. Lawver, R. C. Tacker, C. N. Ciampaglio, J. M. Crate, W. Zheng "Characterization of Organics Consistent with β -Chitin Preserved in the Late Eocene Cuttlefish *Mississippia mississippiensis*" *PLOS ONE* 6:11, **2011**, e28195.
- [136] M. Wysokowski, M. Zatoń, V. V. Bazhenov, T. Behm, A. Ehrlich, A. L. Stelling, M. Hog, H. Ehrlich "Identification of Chitin in 200-Million-Year-Old Gastropod Egg Capsules" *Paleobiology* 40:4, **2014**, 529–540.
- [137] G. D. Cody, N. S. Gupta, D. E. Briggs, A. Kilcoyne, R. E. Summons, F. Kenig, R. E. Plotnick, A. C. Scott "Molecular Signature of Chitin-Protein Complex in Paleozoic Arthropods" *Geology* 39:3, **2011**, 255–258.
- [138] H. Ehrlich, J. K. Rigby, J. P. Botting, M. V. Tsurkan, C. Werner, P. Schwille, Z. Pe-trášek, A. Pisera, P. Simon, V. N. Sivkov, D. V. Vyalikh, S. L. Molodtsov, D. Kurek, M. Kammer, S. Hunoldt, R. Born, D. Stawski, A. Steinhof, V. V. Bazhenov, T. Geisler "Discovery of 505-Million-Year Old Chitin in the Basal Demosponge *Vauxia gracilenta*" *Scientific Reports* 3:1, **2013**, 3497.
- [139] S. Bonneville, F. Delpomdor, A. Pr eat, C. Chevalier, T. Araki, M. Kazemian, A. Steele, A. Schreiber, R. Wirth, L. G. Benning "Molecular Identification of Fungi Microfossils in a Neoproterozoic Shale Rock" *Science Advances* 6:4, **2020**, eaax7599.
- [140] E. Bailey, M. Tsurkan, K. Nowacki, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Evidence for Surviving Chitin in Cambrian Trilobites from the Carrara Formation, Western North America" *PALAIOS* 40:12, **2026**, 379–387.
- [141] C. Klinger, S. Źółtowska-Aksamitowska, M. Wysokowski, M. V. Tsurkan, R. Galli, I. Petrenko, T. Machałowski, A. Ereskovsky, R. Martinović, L. Muzychka, O. B. Smolii, N. Bechmann, V. Ivanenko, P. J. Schupp, T. Jesionowski, M. Giovine, Y. Joseph, S. R. Bornstein, A. Voronkina, H. Ehrlich "Express Method for Isolation of Ready-to-Use 3D Chitin Scaffolds from *Aplysina Archeri* (Aplysineidae: Verongiida) Demosponge" *Marine Drugs* 17:2, **2019**, 131.
- [142] J. Machado, M. L. Reis, J. Coimbra, C. S a "Studies on Chitin and Calcification in the Inner Layers of the Shell of *Anodonta Cygnea*" *Journal of Comparative Physiology B* 161:4, **1991**, 413–418.
- [143] M. Iijima, Y. Moriwaki "Orientation of Apatite and Organic Matrix in *Lingula Unguis* Shell" *Calcified Tissue International* 47:4, **1990**, 237–242.
- [144] K. Kurita "Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans" *Marine Biotechnology* 8:3, **2006**, 203–226.
- [145] M. Kaya, O. Seyyar, T. Baran, S. Erdoĝan, M. Kar "A Physicochemical Characterization of Fully Acetylated Chitin Structure Isolated from Two Spider Species: With New Surface Morphology" *International Journal of Biological Macromolecules* 65, **2014**, 553–558.

- [146] M. Wysokowski, T. Machałowski, I. Petrenko, C. Schimpf, D. Rafaja, R. Galli, J. Ziętek, S. Pantović, A. Voronkina, V. Kovalchuk, V. N. Ivanenko, B. W. Hoeksema, C. Diaz, Y. Khrunyk, A. L. Stelling, M. Giovine, T. Jesionowski, H. Ehrlich “3D Chitin Scaffolds of Marine Demosponge Origin for Biomimetic Mollusk Hemolymph-Associated Biomineralization Ex-Vivo” *Marine Drugs* 18:2, **2020**, 123.
- [147] H. Ehrlich, I. Miksik, M. V. Tsurkan, P. Simon, F. Porzucek, J. D. Rybka, M. Manowska, R. Galli, C. Viehweger, E. Brendler, A. Voronkina, M. Pajewska-Szmyt, A. Tabachnik, K. R. Tabachnick, C. Vogt, M. Wysokowski, T. Jesionowski, T. Buchwald, M. Szybowicz, K. Skieresz-Szewczyk, H. Jackowiak, A. Ereskovsky, A. C. S. de Alcântara, A. M. dos Santos, C. H. S. da Costa, S. E. Arevalo, M. S. Skaf, M. J. Buehler “Discovery of Mammalian Collagens I and III within Ancient Poriferan Biopolymer Spongin” *Nature Communications* 16:1, **2025**, 2515.
- [148] S. Nichols, G. Wörheide “Sponges: New Views of Old Animals1” *Integrative and Comparative Biology* 45:2, **2005**, 333–334.
- [149] E. C. Turner “Possible Poriferan Body Fossils in Early Neoproterozoic Microbial Reefs” *Nature* 596:7870, **2021**, 87–91.
- [150] E. Brunner, H. Ehrlich, P. Schupp, R. Hedrich, S. Hunoldt, M. Kammer, S. Machill, S. Paasch, V. V. Bazhenov, D. V. Kurek, T. Arnold, S. Brockmann, M. Ruhnnow, R. Born “Chitin-Based Scaffolds Are an Integral Part of the Skeleton of the Marine Demosponge *Ianthella Basta*” *Journal of Structural Biology* 168:3, **2009**, 539–547.
- [151] H. Ehrlich, M. Ilan, M. Maldonado, G. Muricy, G. Bavestrello, Z. Kljajic, J. L. Carballo, S. Schiaparelli, A. Ereskovsky, P. Schupp, R. Born, H. Worch, V. V. Bazhenov, D. Kurek, V. Varlamov, D. Vyalikh, K. Kummer, V. V. Sivkov, S. L. Molodtsov, H. Meissner, G. Richter, E. Steck, W. Richter, S. Hunoldt, M. Kammer, S. Paasch, V. Krasokhin, G. Patzke, E. Brunner “Three-Dimensional Chitin-Based Scaffolds from Verongida Sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and Identification of Chitin” *International Journal of Biological Macromolecules* 47:2, **2010**, 132–140.
- [152] J. A. Cruz-Barraza, J. L. Carballo, A. Rocha-Olivares, H. Ehrlich, M. Hog “Integrative Taxonomy and Molecular Phylogeny of Genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific” *PLOS ONE* 7:8, **2012**, e42049.
- [153] M. Wysokowski, V. V. Bazhenov, M. V. Tsurkan, R. Galli, A. L. Stelling, H. Stöcker, S. Kaiser, E. Niederschlag, G. Gärtner, T. Behm, M. Ilan, A. Y. Petrenko, T. Jesionowski, H. Ehrlich “Isolation and Identification of Chitin in Three-Dimensional Skeleton of *Aplysina Fistularis* Marine Sponge” *International Journal of Biological Macromolecules* 62, **2013**, 94–100.
- [154] H. Ehrlich, V. V. Bazhenov, C. Debitus, N. de Voogd, R. Galli, M. V. Tsurkan, M. Wysokowski, H. Meissner, E. Bulut, M. Kaya, T. Jesionowski “Isolation and Identification of Chitin from Heavy Mineralized Skeleton of *Suberea Clavata* (Verongida: Demospongiae: Porifera) Marine Demosponge” *International Journal of Biological Macromolecules* 11th APCCS-2016-Chemistry, Environmental, Biotechnology and Biomedical Aspects of Chitin and Chitosan 104, **2017**, 1706–1712.
- [155] S. Żółtowska- Aksamitowska, M. V. Tsurkan, S.-C. Lim, H. Meissner, K. Tabachnick, L. A. Shaala, D. T. A. Youssef, V. N. Ivanenko, I. Petrenko, M. Wysokowski, N. Bechmann, Y. Joseph, T. Jesionowski, H. Ehrlich “The Demosponge *Pseudoceratina Purpurea* as a New Source of Fibrous Chitin” *International Journal of Biological Macromolecules* 112, **2018**, 1021–1028.

- [156] L. A. Shaala, H. Z. Asfour, D. T. A. Youssef, S. Żółtowska-Aksamitowska, M. Wysocki, M. Tsurkan, R. Galli, H. Meissner, I. Petrenko, K. Tabachnick, V. N. Ivanenko, N. Bechmann, L. V. Muzychka, O. B. Smolii, R. Martinović, Y. Joseph, T. Jesionowski, H. Ehrlich "New Source of 3D Chitin Scaffolds: The Red Sea Demosponge *Pseudoceratina Arabica* (Pseudoceratinidae, Verongiida)" *Marine Drugs* 17:2, **2019**, 92.
- [157] J. Fromont, S. Żółtowska-Aksamitowska, R. Galli, H. Meissner, D. Erpenbeck, J. Vacelet, C. Diaz, M. V. Tsurkan, I. Petrenko, D. T. A. Youssef, H. Ehrlich "New Family and Genus of a Dendrilla-like Sponge with Characters of Verongiida. Part II. Discovery of Chitin in the Skeleton of *Ernstilla Lacunosa*" *Zoologischer Anzeiger* 280, **2019**, 21–29.
- [158] M. Schubert, B. Binnewerg, A. Voronkina, L. Muzychka, M. Wysocki, I. Petrenko, V. Kovalchuk, M. Tsurkan, R. Martinovic, N. Bechmann, V. N. Ivanenko, A. Fursov, O. B. Smolii, J. Fromont, Y. Joseph, S. R. Bornstein, M. Giovine, D. Erpenbeck, K. Guan, H. Ehrlich "Naturally Prefabricated Marine Biomaterials: Isolation and Applications of Flat Chitinous 3D Scaffolds from *Ianthella Labyrinthus* (Demospongiae: Verongiida)" *International Journal of Molecular Sciences* 20:20, **2019**, 5105.
- [159] H. Ehrlich, O. V. Kaluzhnaya, E. Brunner, M. V. Tsurkan, A. Ereskovsky, M. Ilan, K. R. Tabachnick, V. V. Bazhenov, S. Paasch, M. Kammer, R. Born, A. Stelling, R. Galli, S. Belikov, O. V. Petrova, V. V. Sivkov, D. Vyalikh, S. Hunoldt, G. Wörheide "Identification and First Insights into the Structure and Biosynthesis of Chitin from the Freshwater Sponge *Spongilla Lacustris*" *Journal of Structural Biology* 183:3, **2013**, 474–483.
- [160] H. Ehrlich, O. V. Kaluzhnaya, M. V. Tsurkan, A. Ereskovsky, K. R. Tabachnick, M. Ilan, A. Stelling, R. Galli, O. V. Petrova, S. V. Nekipelov, V. N. Sivkov, D. Vyalikh, R. Born, T. Behm, A. Ehrlich, L. I. Chernogor, S. Belikov, D. Janussen, V. V. Bazhenov, G. Wörheide "First Report on Chitinous Holdfast in Sponges (Porifera)" *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280:1762, **2013**, 20130339.
- [161] T. Talevski, A. Talevska Leshoska, E. Pejowski, B. Pejin, T. Machałowski, M. Wysocki, M. V. Tsurkan, O. Petrova, V. Sivkov, R. Martinovic, S. Pantovic, Y. Khrunyk, V. Trylis, A. Fursov, M. Djurovic, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Identification and First Insights into the Structure of Chitin from the Endemic Freshwater Demosponge *Ochridaspongia Rotunda* (Arndt, 1937)" *International Journal of Biological Macromolecules* 162, **2020**, 1187–1194.
- [162] S. Żółtowska-Aksamitowska, L. A. Shaala, D. T. A. Youssef, S. S. Elhady, M. V. Tsurkan, I. Petrenko, M. Wysocki, K. Tabachnick, H. Meissner, V. N. Ivanenko, N. Bechmann, Y. Joseph, T. Jesionowski, H. Ehrlich "First Report on Chitin in a Non-Verongiid Marine Demosponge: The *Mycale Euplectellioides* Case" *Marine Drugs* 16:2, **2018**, 68.
- [163] H. Ehrlich, L. A. Shaala, D. T. A. Youssef, S. Ż. Aksamitowska, M. Tsurkan, R. Galli, H. Meissner, M. Wysocki, I. Petrenko, K. R. Tabachnick, V. N. Ivanenko, N. Bechmann, Y. Joseph, T. Jesionowski "Discovery of Chitin in Skeletons of Non-Verongiid Red Sea Demosponges" *PLOS ONE* 13:5, **2018**, e0195803.
- [164] H. Ehrlich, H. Worch "Sponges as Natural Composites: From Biomimetic Potential to Development of New Biomaterials" *Porifera Research: Biodiversity, Innovation & Sustainability* 28 Rio de Janeiro: Museu Nacional, **2007**, 217–223.
- [165] H. Ehrlich, D. Janussen, P. Simon, V. V. Bazhenov, N. P. Shapkin, C. Erler, M. Mertig, R. Born, S. Heinemann, T. Hanke, H. Worch, J. N. Vournakis "Nanostructural Organization of Naturally Occurring Composites—Part II: Silica-Chitin-Based Biocomposites" *Journal of Nanomaterials* 2008:1, **2008**, 670235.

- [166] H. Ehrlich, M. Maldonado, A. R. Parker, Y. N. Kulchin, J. Schilling, B. Köhler, U. Skrzypczak, P. Simon, H. M. Reiswig, M. V. Tsurkan, E. Brunner, S. S. Voznesenskiy, A. V. Bezverbny, S. S. Golik, I. G. Nagorny, D. V. Vyalikh, A. A. Makarova, S. L. Molodtsov, K. Kummer, M. Mertig, C. Erler, D. V. Kurek, V. V. Bazhenov, F. Natalio, A. E. Kovalev, S. N. Gorb, A. L. Stelling, J. Heitmann, R. Born, D. C. Meyer, K. R. Tabachnick "Supercontinuum Generation in Naturally Occurring Glass Sponges Spicules" *Advanced Optical Materials* 4:10, **2016**, 1608–1613.
- [167] B. T. Iber, N. A. Kasan, D. Torsabo, J. W. Omuwa "A Review of Various Sources of Chitin and Chitosan in Nature" *Journal of Renewable Materials* 10:4, **2021**, 1097–1123.
- [168] A. P. Rahayu, A. F. Islami, E. Saputra, L. Sulmartiwi, A. U. Rahmah, K. A. Kurnia "The Impact of the Different Types of Acid Solution on the Extraction and Adsorption Performance of Chitin from Shrimp Shell Waste" *International Journal of Biological Macromolecules* 194, **2022**, 843–850.
- [169] M. K. Rasweefali, S. Sabu, K. S. Muhammed Azad, M. K. Raseel Rahman, K. V. Sunooj, A. Sasidharan, K. K. Anoop "Influence of Deproteinization and Demineralization Process Sequences on the Physicochemical and Structural Characteristics of Chitin Isolated from Deep-sea Mud Shrimp (*Solenocera Hextii*)" *Advances in Biomarker Sciences and Technology* 4, **2022**, 12–27.
- [170] Y. L. Ni'mah, H. Harmami, I. Ulfin, S. Suprpto, C. W. Saleh "Water-Soluble Chitosan Preparation from Marine Sources" *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* 15:2, **2019**, 159–163.
- [171] M. K. Rasweefali, A. Nayana, M. K. R. Rahman, H. Habeebrehman, S. Sabu "Influence of Chemical Concentrations on the Physicochemical, Structural, Functional and Color Characteristics of Chitin Isolated from Arabian Red Shrimp (*Aristeus Alcocki*)" *Sustainable Chemistry for the Environment* 10, **2025**, 100233.
- [172] J. Pohling, V. V. Ramakrishnan, A. Hossain, S. Trenholm, D. Dave "Optimization of Enzymatic Deproteinization of Northern Shrimp (*Pandalus borealis*) Shell Chitin Using Commercial Proteases" *Marine Drugs* 22:10, **2024**, 445.
- [173] S. Kaur, G. S. Dhillon "Recent Trends in Biological Extraction of Chitin from Marine Shell Wastes: A Review" *Critical Reviews in Biotechnology* 35:1, **2013**, 44–61.
- [174] R. Li, P.-H. Hsueh, S. A. Ulfadillah, S.-T. Wang, M.-L. Tsai "Exploring the Sustainable Utilization of Deep Eutectic Solvents for Chitin Isolation from Diverse Sources" *Polymers* 16:22, **2024**, 3187.
- [175] J. L. Shamshina "Chitin in Ionic Liquids: Historical Insights into the Polymer's Dissolution and Isolation. A Review" *Green Chemistry* 21:15, **2019**, 3974–3993.
- [176] J. L. Shamshina, P. Berton "Use of Ionic Liquids in Chitin Biorefinery: A Systematic Review" *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8, **2020**.
- [177] E. E. Kuprina, K. G. Timofeeva, S. V. Vodolazhskaya "Electrochemical Preparation of Chitin Materials" *Russian Journal of Applied Chemistry* 75:5, **2002**, 822–828.
- [178] J. Ruangwicha, B. Cheirsilp, W. Suyotha "Green Biorefinery of Shrimp Shell Waste for α -Chitin and High-Value Co-Products through Successive Fermentation by Co-Lactic Acid Bacteria and Proteolytic Fungus" *Bioresource Technology* 393, **2024**, 130106.
- [179] G. Huet, C. Hadad, E. Husson, S. Laclef, V. Lambertyn, M. Araya Farias, A. Jamali, M. Courty, R. Alayoubi, I. Gosselin, C. Sarazin, A. N. Van Nhien "Straightforward Extraction and Selective Bioconversion of High Purity Chitin from *Bombyx Eri* Larva: Toward an Integrated Insect Biorefinery" *Carbohydrate Polymers* 228, **2020**, 115382.

- [180] P. A. Aneesh, R. Anandan, L. R. G. Kumar, K. K. Ajeeshkumar, K. A. Kumar, S. Mathew "A Step to Shell Biorefinery—Extraction of Astaxanthin-Rich Oil, Protein, Chitin, and Chitosan from Shrimp Processing Waste" *Biomass Conversion and Biorefinery* 13:1, **2023**, 205–214.
- [181] V. Sieber, M. Hofer, W. M. Brück, D. Garbe, T. Brück, C. A. Lynch "ChiBio: An Integrated Bio-refinery for Processing Chitin-Rich Bio-waste to Specialty Chemicals" *Grand Challenges in Marine Biotechnology* red. P. H. Rampelotto, A. Trincone Cham: Springer International Publishing, **2018**, 555–578.
- [182] K. Mohan, A. R. Ganesan, P. N. Ezhilarasi, K. K. Kondamareddy, D. K. Rajan, P. Sathishkumar, J. Rajarajeswaran, L. Conterno "Green and Eco-Friendly Approaches for the Extraction of Chitin and Chitosan: A Review" *Carbohydrate Polymers* 287, **2022**, 119349.
- [183] N. Islam, M. Hoque, S. F. Taharat "Recent Advances in Extraction of Chitin and Chitosan" *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39:1, **2022**, 28.
- [184] M. Kozma, B. Acharya, R. Bissessur "Chitin, Chitosan, and Nanochitin: Extraction, Synthesis, and Applications" *Polymers* 14:19, **2022**, 3989.
- [185] R. Sulthan, A. Reghunadhan, S. Sambhudevan "A New Era of Chitin Synthesis and Dissolution Using Deep Eutectic Solvents- Comparison with Ionic Liquids" *Journal of Molecular Liquids* 380, **2023**, 121794.
- [186] R. Ben Aoun, N. Trabelsi, M. Abdallah, I. Mourtzinou, R. Mhamdi "Towards a Greener Future: Exploring the Challenges of Extraction of Chitin and Chitosan as Bioactive Polysaccharides" *Materials Today Communications* 39, **2024**, 108761.
- [187] Z. Mei, P. Kuzhir, G. Godeau "Update on Chitin and Chitosan from Insects: Sources, Production, Characterization, and Biomedical Applications" *Biomimetics* 9:5, **2024**, 297.
- [188] W. Dong, J. Tang, J. Crotova, D.-W. Sun, B. K. Tiwari "Green Technologies for Bio-Refinery in Marine Crustacean Shell Valorisation from Chitin Perspective" *Trends in Food Science & Technology* 150, **2024**, 104580.
- [189] A. Zannat, I. Eason, B. Wylie, R. D. Rogers, P. Berton, J. L. Shamshina "Comparative Analysis of Chitin Isolation Techniques from Mushrooms: Toward Sustainable Production of High-Purity Biopolymer" *Green Chemistry* 27:12, **2025**, 3217–3233.
- [190] T. M. N. Ta, T. M. N. Nguyen "Microbial Fermentation for Chitin Recovery from Shrimp By-Products – A Review" *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 1465:1, **2025**, 012014.
- [191] Q. Tao, X. Wang, R. Du, C. M. Leong, M. Y. Lui "Sustainable Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Insect Frass" *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 13:33, **2025**, 13331–13339.
- [192] I. Thamer, M. Mazurek-Budzyńska, V. Kumaravel "Sustainable Biopolymer Design: Extraction of Chitin and Chitosan Using Natural Deep Eutectic Solvents with Improved Antibacterial Features" *Materials & Design* 259, **2025**, 114775.
- [193] H. Izadi, H. Asadi, M. Bemani "Chitin: A Comparison between Its Main Sources" *Frontiers in Materials* 12, **2025**.
- [194] C. Seangarun, S. Seesanong, B. Boonchom, N. Laohavisuti, P. Rungrojchaipon, W. Boonmee, S. Punthipayanon, M. Thongkam "Extraction of Chitin, Chitosan, and Calcium Acetate from Mussel Shells for Sustainable Waste Management" *International Journal of Molecular Sciences* 26:15, **2025**, 7107.

- [195] C. F. Almeida, I. Amorim, C. G. Silva, J. C. B. Lopes, Y. A. Manrique, M. M. Dias "Recovery of Chitin from Agaricus Bisporus Mushrooms: Influence of Extraction Parameters and Supercritical CO₂ Treatment on Fresh Mushrooms and Production Residues" *Molecules* 30:7, **2025**, 1479.
- [196] A. Rahman "Unlocking Nature's Building Blocks: Emerging Advances in Chitin and Collagen Research" *Polysaccharides* 7:1, **2025**.
- [197] S. Żółtowska, C. Klinger, I. Petrenko, M. Wysokowski, Y. Joseph, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Methods of Isolating Chitin from Sponges (Porifera)" *Chitin and Chitosan* John Wiley & Sons, Ltd, **2019**, 35–59.
- [198] H. El Knidri, R. Belaabed, A. Addaou, A. Laajeb, A. Lahsini "Extraction, Chemical Modification and Characterization of Chitin and Chitosan" *International Journal of Biological Macromolecules* 120, **2018**, 1181–1189.
- [199] K. Nowacki, I. Stępnia, T. Machałowski, M. Wysokowski, I. Petrenko, C. Schimpf, D. Rafaja, E. Langer, A. Richter, J. Ziętek, S. Pantović, A. Voronkina, V. Kovalchuk, V. Ivanenko, Y. Khrunyk, R. Galli, Y. Joseph, M. Gelinsky, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Electrochemical Method for Isolation of Chitinous 3D Scaffolds from Cultivated *Aplysina Aerophoba* Marine Demosponge and Its Biomimetic Application" *Applied Physics A* 126:5, **2020**, 368.
- [200] K. Nowacki, M. Galiński, A. Fursov, A. Voronkina, H. Meissner, I. Petrenko, A. L. Stelling, H. Ehrlich "Electrolysis as a Universal Approach for Isolation of Diverse Chitin Scaffolds from Selected Marine Demosponges" *Marine Drugs* 20:11, **2022**, 665.
- [201] E. Jędrzejczak, P. Frąckowiak, T. Sibillano, E. Brendler, C. Giannini, T. Jesionowski, M. Wysokowski "Isolation and Structure Analysis of Chitin Obtained from Different Developmental Stages of the Mulberry Silkworm (*Bombyx Mori*)" *Molecules* 29:9, **2024**, 1914.
- [202] M. Wysokowski, I. Petrenko, A. L. Stelling, D. Stawski, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Poriferan Chitin as a Versatile Template for Extreme Biomimetics" *Polymers* 7:2, **2015**, 235–265.
- [203] H. Ehrlich, P. Simon, W. Carrillo-Cabrera, V. V. Bazhenov, J. P. Botting, M. Ilan, A. V. Ereskovsky, G. Muricy, H. Worch, A. Mensch, R. Born, A. Springer, K. Kummer, D. V. Vyalikh, S. L. Molodtsov, D. Kurek, M. Kammer, S. Paasch, E. Brunner "Insights into Chemistry of Biological Materials: Newly Discovered Silica-Aragonite-Chitin Biocomposites in Demosponges" *Chemistry of Materials* 22:4, **2010**, 1462–1471.
- [204] B. Duan, Y. Huang, A. Lu, L. Zhang "Recent Advances in Chitin Based Materials Constructed via Physical Methods" *Progress in Polymer Science* 82, **2018**, 1–33.
- [205] P. Sikorski, R. Hori, M. Wada "Revisit of α -Chitin Crystal Structure Using High Resolution X-ray Diffraction Data" *Biomacromolecules* 10:5, **2009**, 1100–1105.
- [206] R. Minke, J. Blackwell "The Structure of α -Chitin" *Journal of Molecular Biology* 120:2, **1978**, 167–181.
- [207] M. Kaya, V. Baublys, I. Šatkauskienė, B. Akyuz, E. Bulut, V. Tubelytė "First Chitin Extraction from *Plumatella Repens* (Bryozoa) with Comparison to Chitins of Insect and Fungal Origin" *International Journal of Biological Macromolecules* 79, **2015**, 126–132.
- [208] P. LeDuff, G. L. Rorrer "Formation of Extracellular β -Chitin Nanofibers during Batch Cultivation of Marine Diatom *Cyclotella* Sp. at Silicon Limitation" *Journal of Applied Phycology* 31:6, **2019**, 3479–3490.

- [209] E. Brunner, P. Richthammer, H. Ehrlich, S. Paasch, P. Simon, S. Ueberlein, K.-H. van Pée "Chitin-Based Organic Networks: An Integral Part of Cell Wall Biosilica in the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*" *Angewandte Chemie International Edition* 48:51, **2009**, 9724–9727.
- [210] L. G. Morin, R. A. Smucker, W. Herth "Effects of Two Chitin Synthesis Inhibitors on *Thalassiosira Fluviatilis* and *Cyclotella Cryptica*" *FEMS Microbiology Letters* 37:3, **1986**, 263–268.
- [211] E. Brunner, P. Richthammer, H. Ehrlich, S. Paasch, P. Simon, S. Ueberlein, K.-H. van Pée "Chitin-Based Organic Networks: An Integral Part of Cell Wall Biosilica in the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*" *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 48:51, **2009**, 9724–9727.
- [212] W. Lotmar, L. E. R. Picken "A New Crystallographic Modification of Chitin and Its Distribution" *Experientia* 6:2, **1950**, 58–59.
- [213] Y. Nishiyama, Y. Noishiki, M. Wada "X-Ray Structure of Anhydrous β -Chitin at 1 Å Resolution" *Macromolecules* 44:4, **2011**, 950–957.
- [214] K. M. Rudall "The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles" *Advances in Insect Physiology* red. J. W. L. Beament, J. E. Treherne, V. B. Wigglesworth t. 1 Academic Press, **1963**, 257–313.
- [215] A. Kertmen, I. Petrenko, C. Schimpf, D. Rafaja, O. Petrova, V. Sivkov, S. Nekipelov, A. Fursov, A. L. Stelling, K. Heimler, A. Rogoll, C. Vogt, H. Ehrlich "Calcite Nanotuned Chitinous Skeletons of Giant *Ianthella Basta* Marine Demosponge" *International Journal of Molecular Sciences* 22:22, **2021**, 12588.
- [216] I. Petrenko, Y. Khrunyk, A. Voronkina, V. Kovalchuk, A. Fursov, D. Tsurkan, V. Ivanenko "Poriferan Chitin: 3D Scaffolds from Nano- to Macroscale. A Review" *Letters in Applied NanoBioScience* 9:2, **2020**, 1004–1014.
- [217] V. Kovalchuk, A. Voronkina, B. Binnewerg, M. Schubert, L. Muzychka, M. Wysokowski, M. V. Tsurkan, N. Bechmann, I. Petrenko, A. Fursov, R. Martinovic, V. N. Ivanenko, J. Fromont, O. B. Smolii, Y. Joseph, M. Giovine, D. Erpenbeck, M. Gelin-sky, A. Springer, K. Guan, S. R. Bornstein, H. Ehrlich "Naturally Drug-Loaded Chitin: Isolation and Applications" *Marine Drugs* 17:10, **2019**, 574.
- [218] L. Muzychka, A. Voronkina, V. Kovalchuk, O. B. Smolii, M. Wysokowski, I. Petrenko, D. T. A. Youssef, I. Ehrlich, H. Ehrlich "Marine Biomimetics: Bromotyrosines Loaded Chitinous Skeleton as Source of Antibacterial Agents" *Applied Physics A* 127:1, **2021**, 15.
- [219] I. Petrenko, V. V. Bazhenov, R. Galli, M. Wysokowski, J. Fromont, P. J. Schupp, A. L. Stelling, E. Niederschlag, H. Stöker, V. Z. Kutsova, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Chitin of Poriferan Origin and the Bioelectrometallurgy of Copper/Copper Oxide" *International Journal of Biological Macromolecules* 11th APCCS-2016-Chemistry, Environmental, Biotechnology and Biomedical Aspects of Chitin and Chitosan 104, **2017**, 1626–1632.
- [220] A. Fursov *3D Chitin Scaffolds of Poriferan Origin as Multi-Target Biological Material* Freiberg: Uniwersytet Techniczny Bergakademie, **2023**.
- [221] R. Jayakumar, K. P. Chennazhi, S. Srinivasan, S. V. Nair, T. Furuike, H. Tamura "Chitin Scaffolds in Tissue Engineering" *International Journal of Molecular Sciences* 12:3, **2011**, 1876–1887.
- [222] N. M. Raj "Chitin Biopolymer in Tissue Engineering" *Natural Biopolymers in Drug Delivery and Tissue Engineering* Woodhead Publishing, **2023**, 501–512.

- [223] M. N. Uddin, M. S. I. Jamal, M. Y. Ali, M. A. Darda, S. I. Mahedi "Tissue Engineering and the Potential Use of Chitin" *Emergent Materials* 6:3, **2023**, 827–839.
- [224] T. Basak, J. L. Shamshina "Design of Chitin Cell Culture Matrices for 3D Tissue Engineering: The Importance of Chitin Types, Solvents, Cross-Linkers, and Fabrication Techniques" *Pharmaceutics* 16:6, **2024**, 777.
- [225] H. Hameed, M. A. Khan, A. C. Paiva-Santos, N. Ereej, S. Faheem "Chitin: A Versatile Biopolymer-Based Functional Therapy for Cartilage Regeneration" *International Journal of Biological Macromolecules* 265, **2024**, 131120.
- [226] H. Ehrlich, E. Steck, M. Ilan, M. Maldonado, G. Muricy, G. Bavestrello, Z. Kljajic, J. L. Carballo, S. Schiaparelli, A. Ereskovsky, P. Schupp, R. Born, H. Worch, V. V. Bazhenov, D. Kurek, V. Varlamov, D. Vyalikh, K. Kummer, V. V. Sivkov, S. L. Molodtsov, H. Meissner, G. Richter, S. Hunoldt, M. Kammer, S. Paasch, V. Krasokhin, G. Patzke, E. Brunner, W. Richter "Three-Dimensional Chitin-Based Scaffolds from Verongida Sponges (Demospongiae: Porifera). Part II: Biomimetic Potential and Applications" *International Journal of Biological Macromolecules* 47:2, **2010**, 141–145.
- [227] O. Y. Rogulska, V. V. Mutsenko, E. B. Revenko, Y. A. Petrenko, H. Ehrlich, A. Y. Petrenko "Culture and Differentiation of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells within Carriers Based on Sea Sponge Chitin Skeletons" *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 23:3, **2013**, 267–270.
- [228] B. Binnewerg, M. Schubert, A. Voronkina, L. Muzychka, M. Wysokowski, I. Petrenko, M. Djurović, V. Kovalchuk, M. Tsurkan, R. Martinovic, N. Bechmann, A. Fursov, V. N. Ivanenko, K. R. Tabachnick, O. B. Smolii, Y. Joseph, M. Giovine, S. R. Bornstein, A. L. Stelling, A. Tunger, M. Schmitz, O. S. Taniya, I. S. Kovalev, G. V. Zyryanov, K. Guan, H. Ehrlich "Marine Biomaterials: Biomimetic and Pharmacological Potential of Cultivated *Aplysina Aerophoba* Marine Demosponge" *Materials Science and Engineering C* 109, **2020**, 110566.
- [229] A. Zawadzka-Knefel, A. Rusak, M. Mrozowska, T. Machałowski, A. Żak, K. Haczkiwicz-Leśniak, M. Kulus, P. Kuropka, M. Podhorska-Okołów, K. Skośkiewicz-Malinowska "Chitin Scaffolds Derived from the Marine Demosponge *Aplysina Fistularis* Stimulate the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells" *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 11, **2023**.
- [230] H. Ehrlich, M. Wysokowski, T. Jesionowski "The Philosophy of Extreme Biomimetics" *Sustainable Materials and Technologies* 32, **2022**, e00447.
- [231] H. Ehrlich, E. Bailey, M. Wysokowski, T. Jesionowski "Forced Biomineralization: A Review" *Biomimetics* 6:3, **2021**, 46.
- [232] H. Ehrlich, red. *Extreme Biomimetics* Cham: Springer International Publishing, **2017**.
- [233] M. Wysokowski, T. Behm, R. Born, V. V. Bazhenov, H. Meißner, G. Richter, K. Szwarc-Rzepka, A. Makarova, D. Vyalikh, P. Schupp, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Preparation of Chitin–Silica Composites by in Vitro Silicification of Two-Dimensional *Ianthella Basta* Demosponge Chitinous Scaffolds under Modified Stöber Conditions" *Materials Science and Engineering: C* 33:7, **2013**, 3935–3941.
- [234] M. Wysokowski, M. Motylenko, V. V. Bazhenov, D. Stawski, I. Petrenko, A. Ehrlich, T. Behm, Z. Kljajic, A. L. Stelling, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Poriferan Chitin as a Template for Hydrothermal Zirconia Deposition" *Frontiers of Materials Science* 7:3, **2013**, 248–260.

- [235] H. Ehrlich, P. Simon, M. Motylenko, M. Wysokowski, V. V. Bazhenov, R. Galli, A. L. Stelling, D. Stawski, M. Ilan, H. Stöcker, B. Abendroth, R. Born, T. Jesionowski, K. J. Kurzydłowski, D. C. Meyer "Extreme Biomimetics: Formation of Zirconium Dioxide Nanophase Using Chitinous Scaffolds under Hydrothermal Conditions" *Journal of Materials Chemistry B* 1:38, **2013**, 5092–5099.
- [236] M. Wysokowski, M. Motylenko, J. Walter, G. Lota, J. Wojciechowski, H. Stöcker, R. Galli, A. L. Stelling, C. Himcinschi, E. Niederschlag, E. Langer, V. V. Bazhenov, T. Szatkowski, J. Zdarta, I. Pertenko, Z. Kljajić, T. Leisegang, S. L. Molodtsov, D. C. Meyer, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Synthesis of Nanostructured Chitin–Hematite Composites under Extreme Biomimetic Conditions" *RSC Advances* 4:106, **2014**, 61743–61752.
- [237] M. Wysokowski, M. Motylenko, J. Beyer, A. Makarova, H. Stöcker, J. Walter, R. Galli, S. Kaiser, D. Vyalikh, V. V. Bazhenov, I. Petrenko, A. L. Stelling, S. L. Molodtsov, D. Stawski, K. J. Kurzydłowski, E. Langer, M. V. Tsurkan, T. Jesionowski, J. Heitmann, D. C. Meyer, H. Ehrlich "Extreme Biomimetic Approach for Developing Novel Chitin–GeO₂ Nanocomposites with Photoluminescent Properties" *Nano Research* 8:7, **2015**, 2288–2301.
- [238] M. Wysokowski, M. Motylenko, D. Rafaja, I. Koltsov, H. Stöcker, T. J. Szalaty, V. V. Bazhenov, A. L. Stelling, J. Beyer, J. Heitmann, T. Jesionowski, S. Petovic, M. Durović, H. Ehrlich "Extreme Biomimetic Approach for Synthesis of Nanocrystalline Chitin–(Ti,Zr)O₂ Multiphase Composites" *Materials Chemistry and Physics* 188, **2017**, 115–124.
- [239] T. Machałowski, M. Czajka, I. Petrenko, H. Meissner, C. Schimpf, D. Rafaja, J. Ziętek, B. Dzięgiel, Ł. Adaszek, A. Voronkina, V. Kovalchuk, J. Jaroszewicz, A. Fursov, M. Rahimi-Nasrabadi, D. Stawski, N. Bechmann, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Functionalization of 3D Chitinous Skeletal Scaffolds of Sponge Origin Using Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Properties" *Marine Drugs* 18:6, **2020**, E304.
- [240] Nuclear Energy Agency, and the International Atomic Energy Agency *Uranium 2024: Resources, Production and Demand* Nuclear Energy Agency (NEA) **2024**.
- [241] J. Xin, C. Hong, J. Wei, J. Qie, H. Wang, B. Lei, X. Li, Z. Cai, Q. Kang, Z. Zeng, Y. Liu "A Comprehensive Review of Radioactive Pollution Treatment of Uranium Mill Tailings" *Environmental Science and Pollution Research* 30:46, **2023**, 102104–102128.
- [242] S. Akash, B. Sivaprakash, V. C. V. Raja, N. Rajamohan, G. Muthusamy "Remediation Techniques for Uranium Removal from Polluted Environment – Review on Methods, Mechanism and Toxicology" *Environmental Pollution* 302, **2022**, 119068.
- [243] M. Tsezos "The Role of Chitin in Uranium Adsorption by *R. Arrhizus*" *Biotechnology and Bioengineering* 25:8, **1983**, 2025–2040.
- [244] C. Bryant *Shrimp, 30,000 Volts Help UA Start-up Land \$1.5 Million for Uranium Extraction* University of Alabama News **2014**.
- [245] P. Nagabhusanam, R. Bose, A. Sivanand "Study of Uranium Sorption from Aqueous Solution Using D2EHPA Impregnated Chitin as a Biodegradable Natural Support" *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 334:11, **2025**, 8441–8456.
- [246] B. Sunilkumar, G. Chakrapani "Studies on Sorption of Uranium on Chitin: A Solid-State Extractant Application for Removal of Uranium from Ground Water" *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 302:3, **2014**, 1489–1493.
- [247] D. Schleuter, A. Günther, S. Paasch, H. Ehrlich, Z. Kljajić, T. Hanke, G. Bernhard, E. Brunner "Chitin-Based Renewable Materials from Marine Sponges for Uranium Adsorption" *Carbohydrate Polymers* 92:1, **2013**, 712–718.

- [248] P. R. Sivashankari, M. Prabakaran "5 - Deacetylation Modification Techniques of Chitin and Chitosan" *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* red. J. A. Jennings, J. D. Bumgardner Woodhead Publishing, **2017**, 117–133.
- [249] A. Hosney, S. Ullah, K. Barčauskaitė "A Review of the Chemical Extraction of Chitosan from Shrimp Wastes and Prediction of Factors Affecting Chitosan Yield by Using an Artificial Neural Network" *Marine Drugs* 20:11, **2022**, 675.
- [250] V. Y. Novikov, S. R. Derkach, I. N. Konovalova, N. V. Dolgopyatova, Y. A. Kuchina "Mechanism of Heterogeneous Alkaline Deacetylation of Chitin: A Review" *Polymers* 15:7, **2023**, 1729.
- [251] N. Mesa Ospina, S. P. Ospina Alvarez, D. M. Escobar Sierra, D. F. Rojas Vahos, P. A. Zapata Ocampo, C. P. Ossa Orozco "Isolation of Chitosan from Ganoderma Lucidum Mushroom for Biomedical Applications" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 26:3, **2015**, 135.
- [252] S. Krake, C. Conzelmann, S. Heuer, M. Dyballa, S. Zibek, T. Hahn "Production of Chitosan from Aspergillus Niger and Quantitative Evaluation of the Process Using Adapted Analytical Tools" *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 29:5, **2024**, 942–954.
- [253] S. G. Kou, L. M. Peters, M. R. Mucalo "Chitosan: A Review of Sources and Preparation Methods" *International Journal of Biological Macromolecules* 169, **2021**, 85–94.
- [254] S. Mania, A. Banach-Kopeć, K. Staszczyk, J. Kulesza, E. Augustin, R. Tylingo "An Influence of Molecular Weight, Deacetylation Degree of Chitosan Xerogels on Their Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. Comparison of Chitosan Materials Obtained Using Lactic Acid and CO₂ Saturation" *Carbohydrate Research* 534, **2023**, 108973.
- [255] I. Younes, O. Ghorbel-Bellaaj, M. Chaabouni, M. Rinaudo, F. Souard, C. Vanhaverbeke, K. Jellouli, M. Nasri "Use of a Fractional Factorial Design to Study the Effects of Experimental Factors on the Chitin Deacetylation" *International Journal of Biological Macromolecules* 70, **2014**, 385–390.
- [256] J. D. Giraldo, Y. García, M. Vera, K. A. Garrido-Miranda, D. Andrade-Acuña, K. P. Marrugo, B. L. Rivas, M. Schoebitz "Alternative Processes to Produce Chitin, Chitosan, and Their Oligomers" *Carbohydrate Polymers* 332, **2024**, 121924.
- [257] M. M. Jaworska, D. Biniaś, K. Dąbkowska-Susfał, A. Górak "Enzymatic Deacetylation of Chitin Treated with Ionic Liquids" *Chemical and Process Engineering: New Frontiers* 45:1, **2024**.
- [258] M. B. Kaczmarek, K. Struszczyk-Swita, X. Li, M. Szczesna-Antczak, M. Daroch "Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides" *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7, **2019**.
- [259] J. Mapuranga, J. Chang, H. Li, Y. Zhang, R. Li, L. Song, N. Zhang, W. Yang "The Molecular Structure, Biological Roles, and Inhibition of Plant Pathogenic Fungal Chitin Deacetylases" *Frontiers in Plant Science* 14, **2024**.
- [260] B. M. Stencel, M. Zień, M. M. Jaworska "The Energy of Activation of Intracellular and Extracellular Chitin Deacetylase" *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 30, **2025**, 283–289.
- [261] I. Aspras, M. M. Jaworska, A. Górak "Kinetics of Chitin Deacetylase Activation by the Ionic Liquid [Bmim][Br]" *Journal of Biotechnology* 251, **2017**, 94–98.
- [262] M. M. Jaworska, M. Kawka, I. Aspras, M. Kamińska, K. Karzyński "The Influence of Selected Ionic Liquids on Activity of Chitin Deacetylase" *Chemical and Process Engineering; 2016; vol. 37; No 1 March; 77-82*, **2016**.

8 Bibliografia

- [263] M. M. Jaworska "Kinetics of Enzymatic Deacetylation of Chitosan" *Cellulose* 19:2, **2012**, 363–369.
- [264] B. M. Stencel, M. M. Jaworska "pH Stability and Kinetics of Ph Deactivation of Chitin Deacetylase Produced by *Absidia Orchidis*" *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 29, **2024**, 263–269.
- [265] B. M. Stencel, M. M. Jaworska "Kinetic Evidence of Catalytic Residues in the Activity Centre of Chitin deacetylase from *Absidia Coerulea Vel Orchidis*" *Chemical and Process Engineering: New Frontiers; 2024; vol. 45; No 3; e71*, **2024**.
- [266] H. González-Lara, B. Parra-Pacheco, E. Rico-García, H. Aguirre-Becerra, A. A. Feregrino-Pérez, J. F. García-Trejo "Black Soldier Fly Culture as a Source of Chitin and Chitosan for Its Potential Use in Concrete: An Overview" *Polymers* 17:6, **2025**, 717.
- [267] G. A. F. Roberts, M. M. Jaworska "The Influence of Chitin Structure on Its Enzymatic Deacetylation" *Chemical and Process Engineering; 2016; vol. 37; No 2 June; 261-267*, **2016**.
- [268] F. A. Vicente, M. Huš, B. Likozar, U. Novak "Chitin Deacetylation Using Deep Eutectic Solvents: Ab Initio-Supported Process Optimization" *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 9:10, **2021**, 3874–3886.
- [269] Z. Huang, X. Lv, G. Sun, X. Mao, W. Lu, Y. Liu, J. Li, G. Du, L. Liu "Chitin Deacetylase: From Molecular Structure to Practical Applications" *Systems Microbiology and Biomanufacturing* 2:2, **2022**, 271–284.
- [270] X. Sun, Y. Wang, J. Yu, Q. Wei, X. Ren "Study on the Deacetylation and Mechanism of Chitin in Natural Deep Eutectic Solvent" *International Journal of Biological Macromolecules* 255, **2024**, 127698.
- [271] V. M. Dinh, S. G. Khokarale, P. O. May, T. Sparrman, K. Irgum, J.-P. Mikkola "Ionic Liquid Strategy for Chitosan Production from Chitin and Molecular Insights" *RSC Sustainability* 2:4, **2024**, 1154–1164.
- [272] S. Hegde, S. Selvaraj "Chitosan: An in-Depth Analysis of Its Extraction, Applications, Constraints, and Future Prospects" *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* 14:2, **2024**, e10563–e10563.
- [273] H. A. Ahmed, Y. A. El-Maradny, M. A. Shalaby, H. El-Menshawy, A. E. Abd EL-Wahab "Isolation and Characterization of Chitosan from Shrimp Shell Waste and the Sustainable Preparation of Salicylic Acid-Loaded Chitosan Nanoparticles for Antibiofilm Applications" *Scientific Reports* 15:1, **2025**, 19263.
- [274] M. Psarianos, N. Marzban, S. Ojha, R. Schneider, O. K. Schlüter "Functional and Bioactive Properties of Chitosan Produced from *Acheta Domesticus* with Fermentation, Enzymatic and Microwave-Assisted Extraction" *Sustainable Food Technology* 3:1, **2025**, 277–285.
- [275] N. Raghavan, E. K. Pathan "A Comprehensive Account of Fungal Chitin Deacetylases: Aspects and Prospects" *International Journal of Biological Macromolecules* 309, **2025**, 142705.
- [276] S. Shetranjiwalla, A. Ononiwu "Identifying Barriers to Scaled-up Production and Commercialization of Chitin and Chitosan Using Green Technologies: A Review and Quantitative Green Chemistry Assessment" *International Journal of Biological Macromolecules* 305, **2025**, 141062.
- [277] G. I. Edo, E. Yousif, M. H. Al-Mashhadani "Chitosan in Modern Industries: A Sustainable Alternative to Plastics?" *Polymer Bulletin* 83:2, **2025**, 58.

- [278] I. Dzedzic, A. Voronkina, M. Pajewska-Szmyt, M. Kotula, A. Kubiak, H. Meissner, T. Duminiš, H. Ehrlich "The Loss of Structural Integrity of 3D Chitin Scaffolds from *Aplysina Aerophoba* Marine Demosponge after Treatment with LiOH" *Marine Drugs* 21:6, **2023**, 334.
- [279] I. Dzedzic, K. Dydek, A. Voronkina, V. Kovalchuk, T. Jesionowski, H. Ehrlich "The Chitinous Skeleton of *Ianthella Basta* Marine Demosponge as a Renewable Scaffold-Based Carrier of Antiseptics" *Polysaccharides* 5:4, **2024**, 540–551.
- [280] I. Dzedzic, K. Dydek, J. Trzciński, A. Boczkowska, A. Voronkina, T. Jesionowski, H. Ehrlich "Creation of 3D Chitin/Chitosan Composite Scaffold from Naturally Pre-Structured Verongioid Sponge Skeleton" *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 8, **2024**, 100587.
- [281] F. L. Campbell "The Detection and Estimation of Insect Chitin; and the Irrelation of "Chitinization" to Hardness and Pigmentation of the Cuticula of the American Cockroach, *Periplaneta Americana* L" *Annals of the Entomological Society of America* 22:3, **1929**, 401–426.
- [282] W. C. Oliver, G. M. Pharr "An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic Modulus Using Load and Displacement Sensing Indentation Experiments" *Journal of Materials Research* 7:6, **1992**, 1564–1583.
- [283] T. Wu, S. Zivanovic "Determination of the Degree of Acetylation (DA) of Chitin and Chitosan by an Improved First Derivative UV Method" *Carbohydrate Polymers* 2:73, **2008**, 248–253.
- [284] S. H. Lv "7 - High-performance Superplasticizer Based on Chitosan" *Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials* red. F. Pacheco-Torgal, V. Ivanov, N. Karak, H. Jonkers Woodhead Publishing, **2016**, 131–150.
- [285] Z. Nuc, A. Dobrzycka-Krahel "From Chitin to Chitosan – a Potential Natural Antimicrobial Agent" *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 26, **2021**, 23–40.
- [286] L. Xing, Y.-T. Fan, T.-J. Zhou, J.-H. Gong, L.-H. Cui, K.-H. Cho, Y.-J. Choi, H.-L. Jiang, C.-S. Cho "Chemical Modification of Chitosan for Efficient Vaccine Delivery" *Molecules* 23:2, **2018**, 229.
- [287] I. A. Sogias, A. C. Williams, V. V. Khutoryanskiy "Why Is Chitosan Mucoadhesive?" *Biomacromolecules* 9:7, **2008**, 1837–1842.
- [288] C. L. Gîjriu, R. Isopescu, D. Dinculescu, M. Memecică, M.-R. Apetroaei, M. Anton, V. Schröder, I. Rău "Crabs Marine Waste—A Valuable Source of Chitosan: Tuning Chitosan Properties by Chitin Extraction Optimization" *Polymers* 14:21, **2022**, 4492.
- [289] L. Ma, W. Su, Y. Ran, X. Ma, Z. Yi, G. Chen, X. Chen, Z. Deng, Q. Tong, X. Wang, X. Li "Synthesis and Characterization of Injectable Self-Healing Hydrogels Based on Oxidized Alginate-Hybrid-Hydroxyapatite Nanoparticles and Carboxymethyl Chitosan" *International Journal of Biological Macromolecules* 165, **2020**, 1164–1174.
- [290] S. Jana, S. J. Florczyk, M. Leung, M. Zhang "High-Strength Pristine Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering" *Journal of Materials Chemistry* 22:13, **2012**, 6291–6299.
- [291] B. Beleño Acosta, R. C. Advincula, C. D. Grande-Tovar "Chitosan-Based Scaffolds for the Treatment of Myocardial Infarction: A Systematic Review" *Molecules (Basel, Switzerland)* 28:4, **2023**, 1920.

- [292] A. D. Gholap, S. Rojekar, H. S. Kapare, N. Vishwakarma, S. Raikwar, A. Garkal, T. A. Mehta, H. Jadhav, M. K. Prajapati, U. Annapure "Chitosan Scaffolds: Expanding Horizons in Biomedical Applications" *Carbohydrate Polymers* 323, **2024**, 121394.
- [293] C. Bergonzi, A. Di Natale, F. Zimetti, C. Marchi, A. Bianchera, F. Bernini, M. Silvestri, R. Bettini, L. Elviri "Study of 3D-printed Chitosan Scaffold Features after Different Post-Printing Gelation Processes" *Scientific Reports* 9:1, **2019**, 362.
- [294] G. M. Królczyk, M. Wzorek, A. Król, O. Kochan, J. Su, J. Kacprzyk, red. *Sustainable Production: Novel Trends in Energy, Environment and Material Systems* t. 198 Studies in Systems, Decision and Control Cham: Springer International Publishing, **2020**.
- [295] B. Tyliszczak, A. Drabczyk, S. Kudłacik-Kramarczyk, A. Sobczak-Kupiec "Sustainable Production of Chitosan" *Sustainable Production: Novel Trends in Energy, Environment and Material Systems* red. G. M. Królczyk, M. Wzorek, A. Król, O. Kochan, J. Su, J. Kacprzyk Cham: Springer International Publishing, **2020**, 45–60.
- [296] N. E. Mushi, S. Utsel, L. A. Berglund "Nanostructured Biocomposite Films of High Toughness Based on Native Chitin Nanofibers and Chitosan" *Frontiers in Chemistry* 2, **2014**.
- [297] S. Anandhavelu, V. Dhasekaran, V. Sethuraman, H. J. Park "Chitin and Chitosan Based Hybrid Nanocomposites for Super Capacitor Applications" *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 17:2, **2017**, 1321–1328.
- [298] I. Sivanesan, M. Muthu, J. Gopal, N. Hasan, S. Kashif Ali, J. Shin, J.-W. Oh "Nanochitosan: Commemorating the Metamorphosis of an ExoSkeletal Waste to a Versatile Nutraceutical" *Nanomaterials* 11:3, **2021**, 821.
- [299] G. Chidlow, J. P. M. Wood, L. A. Halliday, R. J. Casson, S. S. B. Gamage, A. J. O'Connor, D. Selva, M. T. Sun "Investigation into the Use of a Chitosan Scaffold for Tarsal Plate Substitution in Eyelid Reconstruction" *Regenerative Biomaterials* 12, **2025**, rba114.
- [300] R. A. A. Muzzarelli "Colorimetric Determination of Chitosan" *Analytical Biochemistry* 260:2, **1998**, 255–257.
- [301] C. Wischke, H.-H. Borchert "Increased Sensitivity of Chitosan Determination by a Dye Binding Method" *Carbohydrate Research* 341:18, **2006**, 2978–2979.
- [302] S. Hoffmann, J. P. F. Werner, I. Moreno-Villoslada, F. M. Goycoolea "New Insights into the Nature of the Cibacron Brilliant Red 3B-A – Chitosan Interaction" *Pure and Applied Chemistry* 88:9, **2016**, 891–904.
- [303] M. Kato, N. Mineshima, T. Kato, Y. Kawada, H. Hanada, T. Inomata, "Chitosan-Iodine Adduct", pat. US 4275194A, **1981**.
- [304] H. Yajima, M. Morita, M. Hashimoto, H. Sashiwa, T. Kikuchi, T. Ishii "Complex Formation of Chitosan with Iodine and Its Structure and Spectroscopic Properties—Molecular Assembly and Thermal Hysteresis Behavior" *International Journal of Thermophysics* 22, **2001**, 1265–1283.
- [305] G. Muedas-Taipe, I. M. Maza Mejía, F. A. Santillan, C. J. Velásquez, Y. J. O. Asencios "Removal of Azo Dyes in Aqueous Solutions Using Magnetized and Chemically Modified Chitosan Beads" *Materials Chemistry and Physics* 256, **2020**, 123595.
- [306] C. H. Giles, A. S. A. Hassan "Adsorption at Organic Surfaces V—A Study of the Adsorption of Dyes and Other Organic Solutes by Cellulose and Chitin" *Journal of the Society of Dyers and Colourists* 74:12, **1958**, 846–857.

- [307] J. Zhao, J. Wu "Preparation and Characterization of the Fluorescent Chitosan Nanoparticle Probe" *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 34:11, **2006**, 1555–1559.
- [308] S. H. Moussa, A. A. Tayel, A. I. Al-Turki "Evaluation of Fungal Chitosan as a Biocontrol and Antibacterial Agent Using Fluorescence-Labeling" *International Journal of Biological Macromolecules* 54, **2013**, 204–208.
- [309] H. Li, Z. Jiang, B. Han, S. Niu, W. Dong, W. Liu "Pharmacokinetics and Biodegradation of Chitosan in Rats" *Journal of Ocean University of China* 14:5, **2015**, 897–904.
- [310] H. M. Lee, M. H. Kim, Y. I. Yoon, W. H. Park "Fluorescent Property of Chitosan Oligomer and Its Application as a Metal Ion Sensor" *Marine Drugs* 15:4, **2017**, 105.
- [311] A. K. Azad, N. Sermsintham, S. Chandkrachang, W. F. Stevens "Chitosan Membrane as a Wound-Healing Dressing: Characterization and Clinical Application" *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 69B:2, **2004**, 216–222.
- [312] Y. Ma, L. Xin, H. Tan, M. Fan, J. Li, Y. Jia, Z. Ling, Y. Chen, X. Hu "Chitosan Membrane Dressings Toughened by Glycerol to Load Antibacterial Drugs for Wound Healing" *Materials Science and Engineering: C* 81, **2017**, 522–531.
- [313] S. Haifei, W. Xingang, W. Shoucheng, M. Zhengwei, Y. Chuangang, H. Chunmao "The Effect of Collagen–Chitosan Porous Scaffold Thickness on Dermal Regeneration in a One-Stage Grafting Procedure" *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 29, **2014**, 114–125.
- [314] B. Li, J. Wang, Q. Gui, H. Yang "Drug-Loaded Chitosan Film Prepared via Facile Solution Casting and Air-Drying of Plain Water-Based Chitosan Solution for Ocular Drug Delivery" *Bioactive Materials* 5:3, **2020**, 577–583.
- [315] J. B. M. Rocha Neto, G. G. Lima, A. Fiamingo, L. G. L. Germiniani, T. B. Taketa, R. A. Bataglioli, G. A. T. da Silveira, J. V. L. da Silva, S. P. Campana-Filho, O. N. Oliveira, M. M. Beppu "Controlling Antimicrobial Activity and Drug Loading Capacity of Chitosan-Based Layer-by-Layer Films" *International Journal of Biological Macromolecules* 172, **2021**, 154–161.
- [316] J. Ma, H. Wang, B. He, J. Chen "A Preliminary in Vitro Study on the Fabrication and Tissue Engineering Applications of a Novel Chitosan Bilayer Material as a Scaffold of Human Neonatal Dermal Fibroblasts" *Biomaterials* 22:4, **2001**, 331–336.
- [317] B. Ozcelik, K. D. Brown, A. Blencowe, M. Daniell, G. W. Stevens, G. G. Qiao "Ul-thin Chitosan–Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Films for Corneal Tissue Engineering" *Acta Biomaterialia* 9:5, **2013**, 6594–6605.
- [318] B. E. Uygun, T. Bou-Akl, M. Albanna, H. W. T. Matthew "Membrane Thickness Is an Important Variable in Membrane Scaffolds: Influence of Chitosan Membrane Structure on the Behavior of Cells" *Acta biomaterialia* 6:6, **2010**, 2126–2131.
- [319] S. Parajuli, M. J. Hasan, E. E. Ureña-Benavides "Effect of the Interactions between Oppositely Charged Cellulose Nanocrystals (CNCs) and Chitin Nanocrystals (ChNCs) on the Enhanced Stability of Soybean Oil-in-Water Emulsions" *Materials* 15:19, **2022**, 6673.
- [320] A. A. Alshahrani, M. Alsuhybani, M. S. Algamdi, D. Alquppani, I. Mashhour, M. S. Alshammari, I. H. Alsohaimi, T. S. Alraddadi "Evaluating the Performance of Chitosan and Chitosan-Palm Membrane for Water Treatment: Preparation, Characterization and Purification Study" *Journal of Taibah University for Science* 15:1, **2021**, 77–86.

- [321] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, T. M. Aminabhavi "Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery" *Journal of Controlled Release* 100:1, **2004**, 5–28.
- [322] I. Anastopoulos, A. Bhatnagar, D. N. Bikiaris, G. Z. Kyzas "Chitin Adsorbents for Toxic Metals: A Review" *International Journal of Molecular Sciences* 18:1, **2017**, 114.
- [323] L. Gritsch, C. Lovell, W. H. Goldmann, A. R. Boccaccini "Fabrication and Characterization of Copper(II)-Chitosan Complexes as Antibiotic-Free Antibacterial Biomaterial" *Carbohydrate Polymers* 179, **2018**, 370–378.
- [324] P. M. C. Matias, J. F. M. Sousa, E. F. Bernardino, J. P. Varela, L. Durães, P. E. Abreu, J. M. C. Marques, D. Murtinho, A. J. M. Valente "Reduced Chitosan as a Strategy for Removing Copper Ions from Water" *Molecules* 28:10, **2023**, 4110.
- [325] M. Rhazi, J. Desbrières, A. Tolaimate, M. Rinaudo, P. Vottero, A. Alagui, M. El Meray "Influence of the Nature of the Metal Ions on the Complexation with Chitosan.: Application to the Treatment of Liquid Waste" *European Polymer Journal* 38:8, **2002**, 1523–1530.
- [326] M. S. Usman, N. A. Ibrahim, K. Shameli, N. Zainuddin, W. M. Z. W. Yunus "Copper Nanoparticles Mediated by Chitosan: Synthesis and Characterization via Chemical Methods" *Molecules* 17:12, **2012**, 14928–14936.
- [327] G. Z. Kyzas, D. N. Bikiaris "Recent Modifications of Chitosan for Adsorption Applications: A Critical and Systematic Review" *Marine Drugs* 13:1, **2015**, 312–337.
- [328] M. Rinaudo "Chitin and Chitosan: Properties and Applications" *Progress in Polymer Science* 31:7, **2006**, 603–632.
- [329] G. Crini "Recent Developments in Polysaccharide-Based Materials Used as Adsorbents in Wastewater Treatment" *Progress in Polymer Science* 30:1, **2005**, 38–70.
- [330] A. Domard "pH and c.d. Measurements on a Fully Deacetylated Chitosan: Application to CuII—Polymer Interactions" *International Journal of Biological Macromolecules* 9:2, **1987**, 98–104.
- [331] R. D. {van der Weijden}, J. Mahabir, A. Abbadi, M. A. Reuter "Copper Recovery from Copper(II) Sulfate Solutions by Reduction with Carbohydrates" *Hydrometallurgy* 64:2, **2002**, 131–146.
- [332] I. Petrenko, A. P. Summers, P. Simon, S. Żółtowska-Aksamitowska, M. Motylenko, C. Schimpf, D. Rafaja, F. Roth, K. Kummer, E. Brendler, O. S. Pokrovsky, R. Galli, M. Wysokowski, H. Meissner, E. Niederschlag, Y. Joseph, S. Molodtsov, A. Ereskovsky, V. Sivkov, S. Nekipelov, O. Petrova, O. Volkova, M. Bertau, M. Kraft, A. Rogalev, M. Kopani, T. Jesioniowski, H. Ehrlich "Extreme Biomimetics: Preservation of Molecular Detail in Centimeter-Scale Samples of Biological Meshes Laid down by Sponges" *Science Advances* 5:10, **2019**, eaax2805.
- [333] D. Tsurkan, P. Simon, C. Schimpf, M. Motylenko, D. Rafaja, F. Roth, D. S. Inosov, A. A. Makarova, I. Stepniak, I. Petrenko, A. Springer, E. Langer, A. A. Kulbakov, M. Avdeev, A. R. Stefankiewicz, K. Heimler, O. Kononchuk, S. Hippmann, D. Kaiser, C. Viehweger, A. Rogoll, A. Voronkina, V. Kovalchuk, V. V. Bazhenov, R. Galli, M. Rahimi-Nasrabadi, S. L. Molodtsov, P. Rahimi, S. Falahi, Y. Joseph, C. Vogt, D. V. Vyalikh, M. Bertau, H. Ehrlich "Extreme Biomimetics: Designing of the First Nanostructured 3D Spongin–Atacamite Composite and Its Application" *Advanced Materials* 33:30, **2021**, 2101682.
- [334] A. K. Sasmal, S. Dutta, T. Pal "A Ternary Cu₂O–Cu–CuO Nanocomposite: A Catalyst with Intriguing Activity" *Dalton Transactions* 45:7, **2016**, 3139–3150.

- [335] S. Tokura, N. Nishi, A. Tsutsumi, O. Somorin "Studies on Chitin VIII. Some Properties of Water Soluble Chitin Derivatives" *Polymer Journal* 15:6, **czer. 1983**, 485–489.
- [336] J. C. Roy, F. Salaün, S. Giraud, A. Ferri, J. C. Roy, F. Salaün, S. Giraud, A. Ferri "Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms" *Solubility of Polysaccharides* IntechOpen, **2017**.
- [337] H. El Knidri, A. Laajeb, A. Lahsini "Chitin and Chitosan: Chemistry, Solubility, Fiber Formation, and Their Potential Applications" *Handbook of Chitin and Chitosan* Elsevier, **2020**, 35–57.
- [338] M. Feng, X. Lu, D. Hou, S. Zhang "Solubility, Chain Characterization, and Derivatives of Chitin" *Handbook of Chitin and Chitosan* Elsevier, **2020**, 101–129.
- [339] R. Vinothkumar, J. Paterson, R. Vinothkumar, J. Paterson "Preparation of Water-Soluble Colloidal Chitin (WSCC) from Prawn Waste and Its Characterization" *Chitin and Chitosan - Isolation, Properties, and Applications* IntechOpen, **2022**.
- [340] K. Murugaiyan, V. P. Murali, H. Tamura, T. Furuike, J. Rangasamy "Overview of Chitin Dissolution, Hydrogel Formation and Its Biomedical Applications" *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 36:9, **2025**, 1289–1320.
- [341] P. Gong, J. Wang, B. Liu, G. Ru, J. Feng "Dissolution of Chitin in Aqueous KOH" *Cellulose* 23:3, **2016**, 1705–1711.
- [342] M. M. Jaworska, T. Kozlecki, A. Gorak "Review of the Application of Ionic Liquids as Solvents for Chitin" *Journal of Polymer Engineering* 32:2, **2012**, 67–69.
- [343] P. R. Austin, "Purification of Chitin", pat. 3879377, **1975**.
- [344] P. R. Austin, "Solvents for and Purification of Chitin", pat. US 3892731A, **1975**.
- [345] D. Gagnaire, J. Saint-Germain, M. Vincendon "NMR Studies of Chitin and Chitin Derivatives" *Die Makromolekulare Chemie* 183:3, **1982**, 593–601.
- [346] P. R. Austin "Chitin Solvents and Solubility Parameters" *Chitin, Chitosan, and Related Enzymes* red. J. P. Zikakis Academic Press, **1984**, 227–237.
- [347] M. Vincendon "Regenerated Chitin from Phosphoric Acid Solutions" *Carbohydrate Polymers* 32:3, **1997**, 233–237.
- [348] R. C. Capozza, "Spinning And Shaping Poly-(n-Acetyl-d-Glucosamine)", pat. US 3988411 A, **1975**.
- [349] M. Rolandi, R. Rolandi "Self-Assembled Chitin Nanofibers and Applications" *Advances in Colloid and Interface Science* Special Issue: Helmuth Möhwald Honorary Issue 207, **2014**, 216–222.
- [350] S. Tokura, S.-I. Nishimura, N. Sakairi, N. Nishi "Biological Activities of Biodegradable Polysaccharide" *Macromolecular Symposia* 101:1, **1996**, 389–396.
- [351] H. Tamura, H. Nagahama, S. Tokura "Preparation of Chitin Hydrogel Under Mild Conditions" *Cellulose* 13:4, **2006**, 357–364.
- [352] M. Vincendon "1H NMR Study of the Chitin Dissolution Mechanism" *Die Makromolekulare Chemie* 186:9, **1985**, 1787–1795.
- [353] X. Hu, Y. Du, Y. Tang, Q. Wang, T. Feng, J. Yang, J. F. Kennedy "Solubility and Property of Chitin in NaOH/Urea Aqueous Solution" *Carbohydrate Polymers* 70:4, **2007**, 451–458.
- [354] G. L. Clark, A. F. Smith "X-Ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and Derivatives." *The Journal of Physical Chemistry* 40:7, **1936**, 863–879.

- [355] X. Chen, S. Ling Chew, F. M. Kerton, N. Yan "Direct Conversion of Chitin into a N-containing Furan Derivative" *Green Chemistry* 16:4, **2014**, 2204–2212.
- [356] T. Sannan, K. Kurita, Y. Iwakura "Studies on Chitin, 1. Solubility Change by Alkaline Treatment and Film Casting" *Die Makromolekulare Chemie* 176:4, **1975**, 1191–1195.
- [357] T. Sannan, K. Kurita, Y. Iwakura "Studies on Chitin, 2. Effect of Deacetylation on Solubility" *Die Makromolekulare Chemie* 177:12, **1976**, 3589–3600.
- [358] A. Einbu, S. N. Naess, A. Elgsaeter, K. M. Vårum "Solution Properties of Chitin in Alkali" *Biomacromolecules* 5:5, **2004**, 2048–2054.
- [359] F. Feng, Y. Liu, K. Hu "Influence of Alkali-Freezing Treatment on the Solid State Structure of Chitin" *Carbohydrate Research* 339:13, **2004**, 2321–2324.
- [360] C. Chang, S. Chen, L. Zhang "Novel Hydrogels Prepared via Direct Dissolution of Chitin at Low Temperature: Structure and Biocompatibility" *Journal of Materials Chemistry* 21:11, **2011**, 3865–3871.
- [361] M. Sharma, C. Mukesh, D. Mondal, K. Prasad "Dissolution of α -Chitin in Deep Eutectic Solvents" *RSC Advances* 3:39, **2013**, 18149–18155.
- [362] S. Ueberlein, S. Machill, H. Niemann, P. Proksch, E. Brunner "The Skeletal Amino Acid Composition of the Marine Demosponge *Aplysina Cavernicola*" *Marine Drugs* 12:8, **2014**, 4417–4438.
- [363] Y. Lu, Q. Sun, X. She, Y. Xia, Y. Liu, J. Li, D. Yang "Fabrication and Characterisation of α -Chitin Nanofibers and Highly Transparent Chitin Films by Pulsed Ultrasonication" *Carbohydrate Polymers* 98:2, **2013**, 1497–1504.
- [364] M. Fernandes Queiroz, K. R. T. Melo, D. A. Sabry, G. L. Sasaki, H. A. O. Rocha "Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?" *Marine Drugs* 13:1, **2015**, 141–158.
- [365] I. Dziedzic, A. Kertmen "Methods of Chitosan Identification: History and Trends" *Letters in Applied NanoBioScience* 12:4, **2023**, 94.
- [366] Y. Fan, T. Saito, A. Isogai "Preparation of Chitin Nanofibers from Squid Pen β -Chitin by Simple Mechanical Treatment under Acid Conditions" *Biomacromolecules* 9:7, **2008**, 1919–1923.
- [367] X. Zhang, N. Xiao, H. Wang, C. Liu, X. Pan "Preparation and Characterization of Regenerated Cellulose Film from a Solution in Lithium Bromide Molten Salt Hydrate" *Polymers* 10:6, **2018**, 614.
- [368] Y. Feng, X. Li, Q. Zhang, D. Ye, M. Li, R. You, W. Xu "Fabrication of Porous Silk Fibroin/Cellulose Nanofibril Sponges with Hierarchical Structure Using a Lithium Bromide Solvent System" *Cellulose* 26:2, **2019**, 1013–1023.
- [369] G. Cheng, X. Wang, M. Wu, S. Wu, L. Cheng, X. Zhang, F. Dai "Insignificant Difference in Biocompatibility of Regenerated Silk Fibroin Prepared with Ternary Reagent Compared with Regenerated Silk Fibroin Prepared with Lithium Bromide" *Polymers* 14:18, **2022**, 3903.
- [370] C. Li, J. Wu, H. Shi, Z. Xia, J. K. Sahoo, J. Yeo, D. L. Kaplan "Fiber-Based Biopolymer Processing as a Route toward Sustainability" *Advanced Materials* 34:1, **2022**, 2105196.
- [371] N. Bechmann, H. Ehrlich, G. Eisenhofer, A. Ehrlich, S. Meschke, C. G. Ziegler, S. R. Bornstein "Anti-Tumorigenic and Anti-Metastatic Activity of the Sponge-Derived Marine Drugs Aeroplysinin-1 and Isofistularin-3 against Pheochromocytoma In Vitro" *Marine Drugs* 16:5, **2018**, 172.

- [372] J. Coates "Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach" *Encyclopedia of Analytical Chemistry* John Wiley & Sons, Ltd, **2006**.
- [373] Y. Gopichand, F. J. Schmitz "Marine Natural Products: Fistularin-1, -2 and -3 from the Sponge *Aplysina Fistularis* Forma *Fulva*" *Tetrahedron Letters* 20:41, **1979**, 3921–3924.
- [374] G. Cimino, S. De Rosa, S. De Stefano, R. Self, G. Sodano "The Bromo-Compounds of the True sponge *Verongia Aerophoba*" *Tetrahedron Letters* 24:29, **1983**, 3029–3032.
- [375] Z. Aydog, N. Ersoy, S. Imre "Chemical Investigation of the Sponge *Verongia Aerophoba*" *Turkish Journal of Chemistry* 23, **1999**, 339–344.
- [376] U.-J. Kim, D. Kim, J. You, J. W. Choi, S. Kimura, M. Wada "Preparation of Cellulose-Chitosan Foams Using an Aqueous Lithium Bromide Solution and Their Adsorption Ability for Congo Red" *Cellulose* 25:4, **2018**, 2615–2628.
- [377] G. Gözaydın, S. Song, N. Yan "Chitin Hydrolysis in Acidified Molten Salt Hydrates" *Green Chemistry* 22:15, **2020**, 5096–5104.
- [378] G. Gözaydın, Q. Sun, M. Oh, S. Lee, M. Choi, Y. Liu, N. Yan "Chitin Hydrolysis Using Zeolites in Lithium Bromide Molten Salt Hydrate" *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 11:6, **2023**, 2511–2519.
- [379] H. Ehrlich, V. Bazhenov, S. Meschke, M. Bürger, A. Ehrlich, S. Petovic, M. Durovic "Marine Invertebrates of Boka Kotorska Bay Unique Sources for Bioinspired Materials Science" *The Boka Kotorska Bay Environment* red. A. Joksimović, M. Djurović, A. V. Semenov, I. S. Zonn, A. G. Kostianoy *The Handbook of Environmental Chemistry* Cham: Springer International Publishing, **2016**, 313–334.
- [380] T. Duminis, S. Shahid, R. G. Hill "Apatite Glass-Ceramics: A Review" *Frontiers in Materials* 3, **2017**.
- [381] T. Duminis "Natural Polymers with Bioactive Glass Additives for Bone Regeneration: Chemistry and Trends" *The Natural Products Journal* 14:1, **2024**, 51–67.
- [382] J. Cui, Z. Yu, D. Lau "Effect of Acetyl Group on Mechanical Properties of Chitin/Chitosan Nanocrystal: A Molecular Dynamics Study" *International Journal of Molecular Sciences* 17:1, **2016**, 61.
- [383] D. Montroni, S. Fermani, K. Morellato, G. Torri, A. Naggi, L. Cristofolini, G. Falini " β -Chitin Samples with Similar Microfibril Arrangement Change Mechanical Properties Varying the Degree of Acetylation" *Carbohydrate Polymers* 207, **2019**, 26–33.
- [384] A. Wei, J. Fu, F. Guo "Mechanical Properties of Chitin Polymorphs: A Computational Study" *Journal of Materials Science* 56:20, **2021**, 12048–12058.
- [385] N. L. B. M. Yusof, L. Y. Lim, E. Khor "Flexible Chitin Films: Structural Studies" *Carbohydrate Research* 339:16, **2004**, 2701–2711.
- [386] T. Duminis, M. Heljak, W. Świążzkowski, A. Ereskovsky, I. Dziedzic, M. Nowicki, M. Pajewska-Szmyt, A. Voronkina, S. R. Bornstein, H. Ehrlich "On the Mechanical Properties of Microfibre-Based 3D Chitinous Scaffolds from Selected *Verongiida* Sponges" *Marine Drugs* 21:9, **2023**, 463.
- [387] E. Siamantouras, C. Woodrow, E. Celiker, D. A. Cullen, C. E. Hills, P. E. Squires, F. Montealegre-Z "Quantification of Bush-Cricket Acoustic Trachea Mechanics Using Atomic Force Microscopy Nanoindentation" *Acta Biomaterialia* 153, **2022**, 399–410.
- [388] P.-Y. Chen, A. Y.-M. Lin, J. McKittrick, M. A. Meyers "Structure and Mechanical Properties of Crab Exoskeletons" *Acta Biomaterialia* 4:3, **2008**, 587–596.

- [389] K. K. Gadghey, A. Bahekar "Studies on Extraction Methods of Chitin from Crab Shell and Investigation of Its Mechanical Properties" *International journal of mechanical engineering and technology (IJMET)* 8:2, **2017**, 220–231.
- [390] A. J. Gallagher, A. Ní Annaidh, K. Bruyère, E. Al "Dynamic Tensile Properties of Human Skin" *IRCOBI Conference 2012, 12 - 14 September, Dublin (Ireland)*, **2012** HDL: 10197/4772.
- [391] A. Rohlmann, H. Zilch, G. Bergmann, R. Kolbel "Material Properties of Femoral Cancellous Bone in Axial Loading" *Archives of orthopaedic and traumatic surgery* 97:2, **1980**, 95–102.
- [392] B. Duan, C. Chang, L. Zhang "Structure and Properties of Films Fabricated from Chitin Solution by Coagulating with Heating" *Journal of Applied Polymer Science* 131:4, **2014**.
- [393] J. Y. Kim, C. S. Ha, N. J. Jo "Synthesis and Properties of Biodegradable Chitin-Graft-Poly(L-lactide) Copolymers" *Polymer International* 51:10, **2002**, 1123–1128.
- [394] B. Chen, K. Sun, T. Ren "Mechanical and Viscoelastic Properties of Chitin Fiber Reinforced Poly(ϵ -Caprolactone)" *European Polymer Journal* 41:3, **2005**, 453–457.
- [395] R. Jayakumar, H. Tamura "Synthesis, Characterization and Thermal Properties of Chitin-g-Poly(ϵ -Caprolactone) Copolymers by Using Chitin Gel" *International Journal of Biological Macromolecules* 10th International Conference on Chitin and Chitosan 43:1, **2008**, 32–36.
- [396] S. Ifuku, M. Nogi, K. Abe, M. Yoshioka, M. Morimoto, H. Saimoto, H. Yano "Preparation of Chitin Nanofibers with a Uniform Width as α -Chitin from Crab Shells" *Biomacromolecules* 10:6, **2009**, 1584–1588.
- [397] H. Moon, S. Choy, Y. Park, Y. M. Jung, J. M. Koo, D. S. Hwang "Different Molecular Interaction between Collagen and α - or β -Chitin in Mechanically Improved Electrospun Composite" *Marine Drugs* 17:6, **2019**, 318.
- [398] M. Salavati "Mechanical Properties of α -Chitin and Chitosan Biocomposite: A Molecular Dynamic Study" *Journal of Composites Science* 7:11, **2023**, 464.
- [399] S. Kim, S. Shin, D. X. Oh "Anisotropic Alignment and Mechanical Properties of Chitin Nanofibers in Marine Hydroid Perisarc" *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 30:2, **2025**, 345–353.
- [400] Z. Yu, D. Lau "Molecular Dynamics Study on Stiffness and Ductility in Chitin-Protein Composite" *Journal of Materials Science* 50:21, **2015**, 7149–7157.
- [401] R. N. Granito, M. R. Custódio, A. C. M. Rennó "Natural Marine Sponges for Bone Tissue Engineering: The State of Art and Future Perspectives" *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 105:6, **2017**, 1717–1727.
- [402] T. G. Chatzimitakos, C. D. Stalikas "Sponges and Sponge-Like Materials in Sample Preparation: A Journey from Past to Present and into the Future" *Molecules* 25:16, **2020**, 3673.
- [403] A. Woesz, J. C. Weaver, M. Kazanci, Y. Dauphin, J. Aizenberg, D. E. Morse, P. Fratzl "Micromechanical Properties of Biological Silica in Skeletons of Deep-Sea Sponges" *Journal of Materials Research* 21:8, **2006**, 2068–2078.
- [404] D. Loudon, S. Inderbitzin, Z. Peng, R. de Nys "Development of a New Protocol for Testing Bath Sponge Quality" *Aquaculture* 271:1, **2007**, 275–285.
- [405] J. Shen, Y. Min Xie, X. Huang, S. Zhou, D. Ruan "Mechanical Properties of Luffa Sponge" *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 15, **2012**, 141–152.

- [406] S. A. Ghodbane, M. G. Dunn “Physical and Mechanical Properties of Cross-Linked Type I Collagen Scaffolds Derived from Bovine, Porcine, and Ovine Tendons” *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 104:11, **2016**, 2685–2692.
- [407] Z. Wang, S. Lin, X. Li, H. Zou, B. Zhuo, P. Ti, Q. Yuan “Optimization and Absorption Performance of Wood Sponge” *Journal of Materials Science* 56:14, **2021**, 8479–8496.
- [408] S. Ifuku, H. Saimoto “Chitin Nanofibers: Preparations, Modifications, and Applications” *Nanoscale* 4:11, **2012**, 3308–3318.
- [409] M. I. Ofem, M. Muhammed, M. Eng, M. Umar “Mechanical Properties of Dungeness Crab Based Chitin” *International Journal of Scientific & Engineering Research* 6:8, **2015**.
- [410] N. E. Mushi, N. Butchosa, M. Salajkova, Q. Zhou, L. A. Berglund “Nanostructured Membranes Based on Native Chitin Nanofibers Prepared by Mild Process” *Carbohydrate Polymers* 112, **2014**, 255–263.
- [411] J. Wang, M. E. Brasch, R. M. Baker, L.-F. Tseng, A. N. Peña, J. H. Henderson “Shape Memory Activation Can Affect Cell Seeding of Shape Memory Polymer Scaffolds Designed for Tissue Engineering and Regenerative Medicine” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 28:10, **2017**, 151.
- [412] S. Lv, M. Cai, F. Leng, X. Jiang “Biodegradable Carboxymethyl Chitin-Based Hemostatic Sponges with High Strength and Shape Memory for Non-Compressible Hemorrhage” *Carbohydrate Polymers* 288, **2022**, 119369.
- [413] C. T. F. Ross, T. I. J. Case, A. Chilver *Strength of Materials and Structures* Elsevier, **1999** 721 Google Books: P0yyTfWJIEgC.
- [414] B. S. Welinder “Halogenated Tyrosines from the Cuticle of *Limulus Polyphemus* (L.)” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 279:3, **1972**, 491–497.
- [415] S. Hunt, S. W. Breuer “Chlorinated and Brominated Tyrosine Residues in Molluscan Scleroprotein” *Biochemical Society Transactions* 1:1, **1973**, 215–216.
- [416] D. Montroni, F. Sparla, S. Fermani, G. Falini “Influence of Proteins on Mechanical Properties of a Natural Chitin-Protein Composite” *Acta Biomaterialia Biomaterialization: From Cells to Biomaterials* 120, **2021**, 81–90.
- [417] J. G. Torres-Rendon, F. H. Schacher, S. Ifuku, A. Walther “Mechanical Performance of Macrofibers of Cellulose and Chitin Nanofibrils Aligned by Wet-Stretching: A Critical Comparison” *Biomacromolecules* 15:7, **2014**, 2709–2717.
- [418] N. E. Mushi “A Review on Native Well-Preserved Chitin Nanofibrils for Materials of High Mechanical Performance” *International Journal of Biological Macromolecules* 178, **2021**, 591–606.
- [419] J. A. García-Vilas, B. Martínez-Poveda, A. R. Quesada, M. Á. Medina “Aeroplysinin-1, a Sponge-Derived Multi-Targeted Bioactive Marine Drug” *Marine Drugs* 14:1, **2016**, 1.
- [420] M. A. Franklin, S. G. Penn, C. B. Lebrilla, T. H. Lam, I. N. Pessah, T. F. Molinski “Bastadin 20 and Bastadin O-Sulfate Esters from *Ianthella Basta*: Novel Modulators of the Ry1R FKBP12 Receptor Complex” *Journal of Natural Products* 59:12, **1996**, 1121–1127.
- [421] L. Calcul, W. D. Inman, A. A. Morris, K. Tenney, J. Ratnam, J. H. McKerrow, F. A. Valeriote, P. Crews “Additional Insights on the Bastadins: Isolation of Analogues from the Sponge *Ianthella Cf. Reticulata* and Exploration of the Oxime Configurations” *Journal of Natural Products* 73:3, **2010**, 365–372.

- [422] C. J. Gartshore, M. N. Salib, A. A. Renshaw, T. F. Molinski "Isolation of Bastadin-6-O-Sulfate and Expedient Purifications of Bastadins-4, -5 and -6 from Extracts of *Ianthella Basta*" *Fitoterapia* Emilio Ghisalberti Memorial Issue 126, **2018**, 16–21.
- [423] A. Drechsel, J. Helm, H. Ehrlich, S. Pantovic, S. R. Bornstein, N. Bechmann "Anti-Tumor Activity vs. Normal Cell Toxicity: Therapeutic Potential of the Bromotyrosines Aerothionin and Homoaerothionin In Vitro" *Marine Drugs* 18:5, **2020**, 236.
- [424] I. Mohanty, S. Tapadar, S. G. Moore, J. S. Biggs, C. J. Freeman, D. A. Gaul, N. Garg, V. Agarwal "Presence of Bromotyrosine Alkaloids in Marine Sponges Is Independent of Metabolomic and Microbiome Architectures" *mSystems* 6:2, **2021**, e01387–20.
- [425] P. Ferreira Montenegro, G. N. Pham, F. M. Abdoul-Latif, E. Taffin-de-Givenchy, M. Mehiri "Marine Bromotyrosine Derivatives in Spotlight: Bringing Discoveries and Biological Significance" *Marine Drugs* 22:3, **2024**, 132.
- [426] M. Abbas, Z. Harrache, M. Trari "Removal of Gentian Violet in Aqueous Solution by Activated Carbon Equilibrium, Kinetics, and Thermodynamic Study" *Adsorption Science & Technology* 37:7–8, **2019**, 566–589.
- [427] A. R. Abed, I. M. Hussein "In Vitro Study of Antibacterial and Antifungal Activity of Some Common Antiseptics and Disinfectants Agents" *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences* 7:1B, **2016**, 148–159.
- [428] A. Unnisa, N. Manasa, P. L. Ravali "Development of Validated Spectrophotometric Methods for Estimation of Ethacridine Lactate in Pharmaceutical Formulations" *Journal of Chemistry* 8:4, **2011**, 274361.
- [429] Y.-C. Mao, W.-J. Tsai, M.-L. Wu, J. Ger, J.-F. Deng, C.-C. Yang "Acute Hemolysis Following Iodine Tincture Ingestion" *Human & Experimental Toxicology* 30:10, **2011**, 1716–1719.
- [430] J. K. Narat "Brilliant Green: A Clinical Study of Its Value as a Local Antiseptic" *Annals of Surgery* 94:6, **1931**, 1007–1012.
- [431] M. Koskovac, S. Cupara, M. Kipic, A. Barjaktarevic, O. Milovanovic, K. Kojicic, M. Markovic "Sea Buckthorn Oil—A Valuable Source for Cosmeceuticals" *Cosmetics* 4:4, **2017**, 40.
- [432] N. A. Bagnyuk, O. A. Nazarchuk, Y. M. Babina, R. M. Chornopyschuk, A. V. Kulyk "Antimicrobial Activity of Antiseptics in the Prevention of Postoperative Infectious Complications", **2021**.
- [433] L. C. Carrijo-Carvalho, V. P. Sant'ana, A. S. Foronda, D. de Freitas, F. R. de Souza Carvalho "Therapeutic Agents and Biocides for Ocular Infections by Free-Living Amoebae of *Acanthamoeba* Genus" *Survey of Ophthalmology* 62:2, **2017**, 203–218.
- [434] T. Christ, M. Wüst, J. Matthes, M. Jänchen, S. Jürgens, S. Herzig, E. Wettwer, D. Dobrev, K. Matschke, D. Mebs, U. Ravens "An Aqueous Extract of the Marine Sponge *Ectyoplasia Ferox* Stimulates L-type Ca²⁺-Current by Direct Interaction with the Cav1.2 Subunit" *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 370:6, **2004**, 474–483.
- [435] G. D. Bari, E. Gentile, T. Latronico, G. Corriero, A. Fasano, C. N. Marzano, G. M. Liuzzi "Inhibitory Effect of Aqueous Extracts from Marine Sponges on the Activity and Expression of Gelatinases A (MMP-2) and B (MMP-9) in Rat Astrocyte Cultures" *PLOS ONE* 10:6, **2015**, e0129322.
- [436] M. R. Hamed, M. H. Givianrad, A. M. Moradi "Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Marine Sponge" *Oriental Journal of Chemistry* 31:4, **2015**, 1961–1967.

- [437] J. Piron, S. Betzi, J. Pastour, A. Restouin, R. Castellano, Y. Collette, N. Tysklind, J. Smith-Ravin, F. Priam "Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Marine Sponge Extracts *Agelas Clathrodes*, *Desmampsamma Anchorata* and *Verongula Rigida* from a Caribbean Island" *PeerJ* 10, **2022**, e13955.
- [438] R. Kazlauskas, R. O. Lidgard, P. T. Murphy, R. J. Wells "Brominated Tyrosine-Derived Metabolites from the Sponge *Ianthella Basta*" *Tetrahedron Letters* 21:23, **1980**, 2277–2280.
- [439] H. Greve, S. Kehraus, A. Krick, G. Kelter, A. Maier, H.-H. Fiebig, A. D. Wright, G. M. König "Cytotoxic Bastadin 24 from the Australian Sponge *Ianthella Quadrangulata*" *Journal of Natural Products* 71:3, **2008**, 309–312.
- [440] H. Greve, S. Meis, M. U. Kassack, S. Kehraus, A. Krick, A. D. Wright, G. M. König "New Ianthेरans from the Marine Sponge *Ianthella Quadrangulata*: Novel Agonists of the P2Y(11) Receptor" *Journal of Medicinal Chemistry* 50:23, **2007**, 5600–5607.
- [441] L.-W. Tian, Y. Feng, Y. Shimizu, T. A. Pfeifer, C. Wellington, J. N. A. Hooper, R. J. Quinn "ApoE Secretion Modulating Bromotyrosine Derivative from the Australian Marine Sponge *Callyspongia* Sp." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24:15, **2014**, 3537–3540.
- [442] T. Józwiak, U. Filipkowska, T. Bakula, B. Bralewska-Piotrowicz, K. Karczmarczyk, M. Gierszewska, E. Olewnik-Kruszkowska, N. Szyryńska, B. Lewczuk "The Use of Chitin from the Molts of Mealworm (*Tenebrio Molitor*) for the Removal of Anionic and Cationic Dyes from Aqueous Solutions" *Materials* 16:2, **2023**, 545.
- [443] G. L. Dotto, J. M. N. Santos, I. L. Rodrigues, R. Rosa, F. A. Pavan, E. C. Lima "Adsorption of Methylene Blue by Ultrasonic Surface Modified Chitin" *Journal of Colloid and Interface Science* 446, **2015**, 133–140.
- [444] T. Jabri, N. A. Khan, Z. Makhlof, N. Akbar, J. Gul, M. R. Shah, R. Siddiqui "Antibacterial Properties of Ethacridine Lactate and Sulfmethoxazole Loaded Functionalized Graphene Oxide Nanocomposites" *Antibiotics* 12:4, **2023**, 755.
- [445] K. Dydak, A. Junka, A. Dydak, M. Brożyna, J. Paleczny, K. Fijalkowski, G. Kubielas, O. Aniołek, M. Bartoszewicz "In Vitro Efficacy of Bacterial Cellulose Dressings Chemisorbed with Antiseptics against Biofilm Formed by Pathogens Isolated from Chronic Wounds" *International Journal of Molecular Sciences* 22:8, **2021**, 3996.
- [446] G. K. Paliy, O. A. Nazarchuk, O. I. Kulakov, V. G. Paliy, S. A. Nazarchuk, D. V. Paliy, Y. V. Kordon, O. O. Gonchar "Substantiation of Antimicrobial Dressings Use in Surgery." *Medicni perspektivi* 19:2, **2014**, 152–158.
- [447] O. A. Nazarchuk, I. L. Chereszniuk, H. H. Nazarchuk "The Research of Antimicrobial Efficacy of Antiseptics Decamethoxin, Miramistin and Their Effect on Nuclear DNA Fragmentation and Epithelial Cell Cycle", **2019**.
- [448] J. Fuss, V. Paliy, A. Voloboyeva "Evaluating the Effectiveness of Antiseptic Solution Decasan in Treatment of Necrotic Soft Tissue Diseases" *Polski Przegląd Chirurgiczny* 88:5, **2016**, 233–237.
- [449] Z. Ł. Babalska, M. Korbecka-Paczkowska, T. M. Karpiński "Wound Antiseptics and European Guidelines for Antiseptic Application in Wound Treatment" *Pharmaceuticals* 14:12, **2021**, 1253.
- [450] L. Setti, S. Mazzieri, P. G. Pifferi "Enhanced Degradation of Heavy Oil in an Aqueous System by a *Pseudomonas* Sp. in the Presence of Natural and Synthetic Sorbents" *Bioresource Technology* 67:2, **1999**, 191–199.

8 Bibliografia

- [451] F. C. F. Barros, L. C. Vasconcellos, T. Carvalho, R. Nascimento "Removal of Petroleum Spill in Water by Chitin and Chitosan" *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, **2014**.
- [452] Y. Saito, T. Okano, F. Gaill, H. Chanzy, J.-L. Putaux "Structural Data on the Intra-Crystalline Swelling of β -Chitin" *International Journal of Biological Macromolecules* 28:1, **2000**, 81–88.
- [453] W. Wang, Q. Meng, Q. Li, J. Liu, M. Zhou, Z. Jin, K. Zhao "Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine" *International Journal of Molecular Sciences* 21:2, **2020**, 487.
- [454] S. C. G. Leeuwenburgh, T. Douglas, J. A. Jansen, A. Skwarczynska, Z. Modrzejewska, "Chitosan-Based Hydrogels Containing Enzyme Alkaline Phosphatase", pat. WO 2013/015688 A1, **2012**.
- [455] J. Berger, R. Gurny, M. Reist Oechslin, "Pseudo-Thermosetting Neutralized Chitosan Composition Forming A Hydrogel And A Process For Producing The Same", pat. WO 2005/097871 A1, **2004**.
- [456] M. Mekhail, G. Almazan, M. Tabrizian, "Rapid Formation Of Chitosan Sponges Using Guanosine 5' -Diphosphate: Injectable Scaffolds For Tissue Regeneration And Drug Delivery", pat. WO 2014/036649 A1, **2013**.
- [457] N. Ben-shalom, Z. Nevo, A. Patchornik, D. Robinson, "Novel Injectable Chitosan Mixtures Forming Hydrogels", pat. EP 2121026 B1, **2007**.
- [458] E. Assaad, S. Lerouge, C. Ceccaldi, R. Lapointe, A. Monette, "Chitosan-Based Hydrogel And Applications Thereof.", pat. CA 2887749 A1, **2015**.
- [459] M. A. Osorio, L. David, A. Montembault, E. Viguier, T. Cachon, "Hydrogel Composites Comprising Chitosan And Cellulose Nanofibers", pat. US 2021/0047479 A1, **2019**.
- [460] M. N. Gonzalez, E. J. Tijsma, N. Schaffhausen, "Thiolated Chitosan Gel", pat. EP 2313104 B2, **2009**.
- [461] M. A. Matica, F. L. Aachmann, A. Tøndervik, H. Sletta, V. Ostafe "Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action" *International Journal of Molecular Sciences* 20:23, **2019**, 5889.
- [462] P. Feng, Y. Luo, C. Ke, H. Qiu, W. Wang, Y. Zhu, R. Hou, L. Xu, S. Wu "Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications" *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, **2021**.
- [463] E. Laugier, F. Gouchet, J.-p. Perraud, "Hydrogel Of Chitosan Carboxyalkylamide, Preparation Thereof And Cosmetic And Dermatological Use Thereof", pat. US 8236781 B2, **2008**.
- [464] P. Narasiyappa, K. Cherukuri Kiran, K. Joshi Vivek Vijaya, P. Shivakumar, S. Reddy, "Spray Compositions Of Chitosan For Wound Healing", pat. WO 2020/084416 A1, **2019**.
- [465] Y. Henrotin, C. Sanchez, F. Kesteloot, "Cell Cultivation In Chitosan Alginate Hydrogel Beads", pat. US 2012/0315307 A1, **2011**.
- [466] T. Kobayashi, "Method Of Determining Tropomyosin In Chitosan", pat. EP 1816474 B1, **2005**.
- [467] M. Woo-chul, O. Myung-ryurl, Y. Su-bin, E. Tae-han, L. Mi-ae, J. Bu-il, "Method For Storing Dna By Using Chitosan, And Products Using The Methods", pat. EP 1802753 B1, **2005**.

- [468] A. Przekora-kuśmierz, P. Kazimierczak, G. Ginalska, "Cryogel Bone Scaffold Based On Chitosan And Calcium Phosphate Bioceramics As Well As Method Of Producing It", pat. PL 426788 A1, **2018**.
- [469] K. Indian institute of Technology, "A Method For Tumoroid Generation Using 3-d Chitosan-gelatin Scaffolds For Anti-cancer Drug Screening", pat. **2012**.
- [470] H. Struszczyk, A. Niekraszewicz, M. Kucharska, A. Urbanowski, K. Brzoza, D. Ciechanska, M. Wisniewska-wrona, "Chitosan-Calcium Complex And Methods Of Producing The Complex", pat. WO 2003/057735 A1, **2003**.
- [471] H. Struszczyk, A. Niekraszewicz, M. Kucharska, A. Urbanowski, M. Wisniewska-wrona, E. Wesolowska, D. Ciechanska, "Methods Of Producing Modified Microcrystalline Chitosan And Uses Therefor", pat. WO 2003/057736 A1, **2003**.
- [472] Y. Kargapolov, V. Fomenko, "New Method Of Synthesis Of Chitosan Derivatives And Uses Thereof", pat. WO 2021/160667 A1, **2021**.
- [473] E. G. J. Howard, R. B. Lloyd, R. J. Mckinney, B. B. Sauer, M. G. Weinberg, "Chitosan Films And Laminates Made Therefrom", pat. EP 1951516 B1, **2006**.
- [474] A. Serrero, M. Desorme, "Method For Preparing A Chitosan-based Matrix Comprising A Fiber Reinforcement Member", pat. EP 3059255 A1, **2015**.
- [475] N. Ettner, A. Pahmeier, U. Kruehner, E. Bertaux Hegemann, M. Florence, "Compression Textile Comprising Chitosan Coated Fibres", pat. WO 2011/117310 A1, **2011**.
- [476] J. Zhou, G. Hu, "Composite Defoaming Method For High-viscosity Pure-chitosan Spinning Solution", pat. EP 3042706 B1, **2014**.
- [477] D. Grinshpan Dmitry, A. Savitskaya Tatyana, G. Tsygankova Nadezhda, E. Makarevich Svetlana, F. Serebbyakov Gennady, I. Vovk Vasily, V. Kostyukevich Vasily, "Method For Producing Formed Products From Solutions Of Cellulose And Mixtures Thereof With Chitosan", pat. EA 029929 B1, **2016**.
- [478] Y. Bossy Leila, A. Di Napoli, "Heat-Sterilized Formulation Comprising Chitosan And Process Of Preparation Thereof", pat. US 10493155 B2, **2015**.
- [479] J. Bristow, M. Demarco Richard, "Chitosan-Coated Hydrophobic Glass And Method Of Making", pat. EP 2271593 B1, **2009**.
- [480] S. Ladet, S. Francois, J. Claret, M. Buffin, "Method For Preparing A Chitosan-based Porous Layer", pat. EP 2880087 B1, **2013**.
- [481] N. Kobayashi, S. Tsuchida, T. Sannan, "Aqueous Solution Composition For Water-insoluble Chitosan Coatings", pat. EP 2105459 B1, **2007**.
- [482] T. N. Judanova, I. M. Afanasov, D. V. Perminov, "Multilayer Material With Chitosan Layer Of Nanofibres And Superfine Fibres", pat. RU 2522216 C1, **2013**.
- [483] G. Gorczyca, R. Tylingo, P. Szweda, S. Milewski, M. Sadowska, M. Zalewska, "The Method Of Obtaining The Aqueous Solution Of Chitosan, Chitosan Composition, Chitosan Aerosol, The Method Of Producing The Chitosan Hydrogel Membrane And The Method Of Producing Chitosan-protein Biopolymer Material", pat. WO 2014/014370 A2, **2013**.
- [484] A. Domard, E. Espuche, S. Despond, N. Cartier, "Use Of A Material Based On Organic And/or Inorganic Fibres And Chitosan For Fixing Metal Ions", pat. EP 1409133 B1, **2002**.
- [485] E. A. Tholath, K. S. Ghandroth, "A Transparent Xyloglucan/Chitosan Gel And A Process For The Preparation Thereof", pat. WO 2010/070655 A1, **2009**.

8 Bibliografia

- [486] Y. Schuetz, V. Caratti-besson, O. Jordan, R. Gurny, "Thermosetting Neutralized Chitosan Composition Forming A Hydrogel, Lyophilizate, And Processes For Producing The Same", pat. EP 1978925 B1, **2005**.
- [487] P. Filee, A. Freichels, C. Jerome, A. Aqil, C. Alain, V. Tchemtchoua Tateu, "Chitosan Biomimetic Scaffolds And Methods For Preparing The Same", pat. WO 2011/151225 A1, **2011**.
- [488] G. Cavallaro, S. Micciulla, L. Chiappisi, G. Lazzara "Chitosan-Based Smart Hybrid Materials: A Physico-Chemical Perspective" *Journal of Materials Chemistry B* 9:3, **2021**, 594–611.
- [489] Q. Wu, D. Therriault, M.-C. Heuzey "Processing and Properties of Chitosan Inks for 3D Printing of Hydrogel Microstructures" *ACS Biomaterials Science & Engineering* 4:7, **2018**, 2643–2652.
- [490] M. Taghizadeh, A. Taghizadeh, M. K. Yazdi, P. Zarrintaj, F. J. Stadler, J. D. Ramsey, S. Habibzadeh, S. H. Rad, G. Naderi, M. R. Saeb, M. Mozafari, U. S. Schubert "Chitosan-Based Inks for 3D Printing and Bioprinting" *Green Chemistry* 24:1, **2022**, 62–101.
- [491] Q. Zhang, Y. Chen, P. Wei, Y. Zhong, C. Chen, J. Cai "Extremely Strong and Tough Chitosan Films Mediated by Unique Hydrated Chitosan Crystal Structures" *Materials Today* 51, **2021**, 27–38.
- [492] M. Andersson, "Chitosan Compositions", pat. WO 2006/067626 A2, **2005**.
- [493] A. Al-rubeaan Khalid, "Wound Dressing Comprising Of Silver Chitosan", pat. WO 2012/143788 A1, **2012**.
- [494] X. Song, T. Do Bao, B. Johnson Robert, "Antimicrobial Component System Containing Metallic Nanoparticles And Chitosan And/or Its Derivatives", pat. WO 2008/075222 A1, **2007**.
- [495] D. Buschmann Michael, M. Lavertu, M. Nelea, V. Darras, G. Alameh Mohamad, A. Chevrier, N. Tran-khanh, A. Naeini Tavakoli, D. Veilleux, "Coated Chitosan-based Polyplex For Delivery Of Nucleic Acids", pat. WO 2016/127251 A1, **2016**.
- [496] P. J. Watts, L. Illum, "Chitosan-Gelatin A Microparticles", pat. WO 1998/030207 A1, **1998**.
- [497] M. Miraftab, M. Smart, "Composite Fibre Of Alginate And Chitosan", pat. WO 2007/093805 A1, **2007**.
- [498] A. Montembault, L. David, T. Delair, S. Tadier, L. Gremillard, A. Faivre, F. Despetis, "Product And Process For The Preparation Of An Injectable Composition Based On Chitosan And Bioglasses, Intended For The Regeneration Of Bone Tissue", pat. EP 3458117 B1, **2017**.
- [499] S. S. Mohapatra, K. A. Cissell, S. Alwarappan, "Chitosan-Graphene Biosensors And Methods For Their Use", pat. US 9091640 B1, **2013**.
- [500] A. S. E. Ismail "Chitosan Coating Biotechnology for Sustainable Environment" *Biotechnology for Sustainable Environment* red. S. J. Joshi, A. Deshmukh, H. Sarma Singapore: Springer, **2021**, 63–93.
- [501] B. Moerschbacher, J. Wattjes, A. Niehues, "Process For The Preparation Of A Non-random Chitosan Polymer", pat. WO 2019/242847 A1, **2018**.
- [502] N. Masiello, A. Chtourou, "Methods Of Purifying Antibodies From The Milk Of Transgenic Non-human Mammals Comprising The Use Of Chitosan", pat. WO 2020/053661 A1, **2019**.

- [503] A. J. Reyes, P. Parada Valdecantos, R. Badilla Ohlbaum, E. Roman Espinoza, "A Method Of Nucleic Acids Extraction From Microorganisms In The Presence Of Metallic Ions That Employs Particulated Chitosan", pat. WO 2011/055266 A2, **2010**.
- [504] M. H. J. M. Rietjens, "Chitosan Nitrate For Use As A Nitric Oxide Donor (No Donor)", pat. WO 2020/197385 A1, **2020**.
- [505] P. Cerchier, "Composition Based On Chitosan Rapidly Soluble In Water And Method For Obtaining It", pat. EP 3892675 A1, **2021**.
- [506] K. Kiehm, B. Hauptmeier, P. Boderke, "Chitosan Beads And Filler Comprising Such Beads", pat. WO 2011/124380 A1, **2011**.
- [507] M. Prinz, "Chitosan-Thio-Amidine Conjugates And Their Cosmetic As Well As Pharmaceutical Use", pat. WO 2003/020771 A1, **2002**.
- [508] A. Badwan, A.-q. Mohammed Murshed, "Chitosan As A Colour-fixing Agent", pat. WO 2008/011928 A1, **2007**.
- [509] D. Z. Gunes, M. Pouzot, R. Mezzenga, D. Labbe, "Liquid-Filled Chitosan-anionic Liposoluble Surfactant Capsule Dispersions", pat. WO 2011/101415 A1, **2011**.
- [510] F. G. A. Roberts, "Chitosan Condensation Products, Their Preparation And Their Uses", pat. WO 2001/055220 A1, **2001**.
- [511] H. Struszczyk, A. Niekraszewicz, K. Wrzesniewska-tosik, S. Koch, O. Kivekaes, "Method For Continuous Manufacture Of Microcrystalline Chitosan", pat. WO 1991/000298 A1, **1990**.
- [512] H. Struszczyk, O. Kivekaes, "Method For Manufacture Of Chitosan And Other Products From Shells Of Organisms, Especially Marine Organisms", pat. WO 1991/005808 A1, **1990**.
- [513] J. Escaich Ferrer, R. Ruhi Roura, J. Alonso Fernandez Ma, I. Vila Pena Ana, "Nanoparticulate Composition Of Chitosan And Chondroitin Sulfate", pat. WO 2008/119824 A1, **2008**.
- [514] J. Bailly, A. Fleury, P. Hadvary, H. Lengsfeld, H. Steffen, "Pharmaceutical Compositions Containing Lipase Inhibitors And Chitosan", pat. WO 2000/009123 A1, **1999**.
- [515] P. J. Watts, Y.-h. Cheng, A. Smith, J. Castile, "Pharmaceutical Powder Compositions Comprising A Benzodiazepine Drug And Chitosan", pat. WO 2009/027705 A1, **2008**.
- [516] S. Vanangamudi Sular, M. Srinivasan, N. Chulliel Neelakandan, "A Medicinal Antibacterial And Steroids Cream Comprising Chitosan And A Process To Make It", pat. WO 2010/109424 A1, **2010**.
- [517] S. Vanangamudi Sular, M. Srinivasan, N. Chulliel Neelakandan, K. Ghosh, "A Medicinal Cream Made Using Clotrimazole And Chitosan And A Process To Make The Same", pat. WO 2010/119365 A2, **2010**.
- [518] S. Vanangamudi Sular, M. Srinivasan, N. Chulliel Neelakandan, K. Ghosh, "A Medicinal Cream Made Using Fluticasone Propionate, And Chitosan, And A Process To Make The Same", pat. WO 2010/119366 A2, **2010**.
- [519] S. Vanangamudi Sular, M. Srinivasan, N. Chulliel Neelakandan, K. Senthilkumar, "A Medicinal Cream Made Using Miconazole Nitrate, Fluticasone Propionate, And Chitosan, And A Process To Make The Same", pat. WO 2010/119387 A2, **2010**.
- [520] G. Von Plessing Rossel Carlos, V. Castillo Quiroga Eileen, "Nanoparticles Based On Chitosan For The Transport Of Peptides With Activity In The Central Nervous System", pat. WO 2016/101081 A1, **2015**.

- [521] G. Smith, G. Davey, Y. Xie, R. O'connor, E. Juere, "Nanoparticle Composition Comprising Chitosan And Clathrin", pat. WO 2021/032894 A1, **2020**.
- [522] I. Vila Pena Ana, S. Suarez Luque, J. Alonso Fernandez Ma, "Chitosan And Heparin Nanoparticles", pat. WO 2007/042572 A1, **2006**.
- [523] S. Hirano, K. Hirochi, K.-i. Hayashi, T. Mikami, H. Tachibana "Cosmetic and Pharmaceutical Uses of Chitin and Chitosan" *Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers* red. C. G. Gebelein, T. C. Cheng, V. C. Yang Boston, MA: Springer US, **1991**, 95–104.
- [524] I. Aranaz, N. Acosta, C. Civera, B. Elorza, J. Mingo, C. Castro, M. D. I. L. Gandía, A. Heras Caballero "Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives" *Polymers* 10:2, **2018**, 213.
- [525] Q. Ta, J. Ting, S. Harwood, N. Browning, A. Simm, K. Ross, I. Olier, R. Al-Kassas "Chitosan Nanoparticles for Enhancing Drugs and Cosmetic Components Penetration through the Skin" *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 160, **2021**, 105765.
- [526] M. Giorgetti Paolo Luca, "Compositions Comprising A) Chitosan, B) Glycolic Acid, C) Carnitine And/or N-acetyl Cysteine For The Dermal-epidermal Peeling Treatment", pat. WO 2016/120796 A1, **2016**.
- [527] S. Gohla, D. Stangl, "Cosmetic Or Dermatological Preparation Comprising Collagen, Chitosan, Glycosylaminoglycan And Cell Growth Promoting Peptide And/or Cellular Complex", pat. US 2012/0064182 A1, **2010**.
- [528] G. Petrigni, "A Cosmetic Composition In Colloidal Form Comprising Hyaluronic Acids And Chitosan", pat. EP 1407759 A1, **2002**.
- [529] M. Dowling, "Hydrophobically-Modified Chitosan For Use In Cosmetics And Personal Care Applications", pat. WO 2017/177027 A1, **2017**.
- [530] A. D'ottavi, "Process For Semi-permanent Straightening Of Curly, Frizzy Or Wavy Hair Using Solutions Containing Chitosan, Allantoin And Glyoxylic Acid Derivatives Combined With Heat.", pat. EP 2723310 B1, **2012**.
- [531] A. Gagliardini, G. Carlucci, A. Di Cintio, A. Pesce, "Chitosan Material With An Anionic Absorbent Gelling Material", pat. WO 2001/080912 A1, **2001**.
- [532] T. Pradeep, A. Anil Kumar, B. R. Bibhuti, R. Kumar, S. Mukherjee, "Chitosan Reinforced Mixed Oxyhydroxide Nanocomposite For Fluoride And Arsenic Removal From Water And A Device Thereof", pat. WO 2018/122871 A1, **2017**.
- [533] J.-w. Nah, "Anti-Algal Bloom Composition Containing Water-soluble Free Amine Chitosan As Active Ingredient, And Method For Removing Algal-bloom Using Same", pat. US 2016/0021880 A1, **2015**.
- [534] P. Cazón, M. Vázquez "Applications of Chitosan as Food Packaging Materials" *Sustainable Agriculture Reviews 36: Chitin and Chitosan: Applications in Food, Agriculture, Pharmacy, Medicine and Wastewater Treatment* red. G. Crini, E. Lichtfouse Cham: Springer International Publishing, **2019**, 81–123.
- [535] M. Flórez, E. Guerra-Rodríguez, P. Cazón, M. Vázquez "Chitosan for Food Packaging: Recent Advances in Active and Intelligent Films" *Food Hydrocolloids* 124, **2022**, 107328.
- [536] L. P. Gomes, H. K. S. Souza, J. M. Campiña, C. T. Andrade, A. F. Silva, M. P. Gonçalves, V. M. F. Paschoalin "Edible Chitosan Films and Their Nanosized Counterparts Exhibit Antimicrobial Activity and Enhanced Mechanical and Barrier Properties" *Molecules* 24:1, **2019**, 127.

- [537] Y. Shimada, A. Yoshida, T. Osada, H. Tamura, T. Furuike, D. Komoto, "Chitosan-Containing Beverage", pat. EP 3881681 A1, **2019**.
- [538] M. Vishnu, K. Charuu, P. Rajesh, T. Dhanashree, "Chewing Gum Having Chitosan Nanoparticles", pat. IN 689MU2015 A, **2015**.
- [539] U. Cornelli, "Bakery And Pasta Products Comprising Acidified Chitosan", pat. WO 2006/082504 A1, **2006**.
- [540] P. Pifferi, G. Spagna, I. Manenti, "Method For Removing Pesticides And/or Phyto-drugs From Liquids Using Cellulose, Chitosan And Pectolignincellulosic Material Derivatives", pat. WO 1998/017386 A1, **1997**.
- [541] L. Orzali, B. Corsi, C. Forni, L. Riccioni, L. Orzali, B. Corsi, C. Forni, L. Riccioni "Chitosan in Agriculture: A New Challenge for Managing Plant Disease" *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides* IntechOpen, **2017**.
- [542] R. Sharif, M. Mujtaba, M. Ur Rahman, A. Shalmani, H. Ahmad, T. Anwar, D. Tianchan, X. Wang "The Multifunctional Role of Chitosan in Horticultural Crops; A Review" *Molecules* 23:4, **2018**, 872.
- [543] S. Bandara, H. Du, L. Carson, D. Bradford, R. Kommalapati "Agricultural and Biomedical Applications of Chitosan-Based Nanomaterials" *Nanomaterials* 10:10, **2020**, 1903.
- [544] K. Li, R. Xing, S. Liu, P. Li "Chitin and Chitosan Fragments Responsible for Plant Elicitor and Growth Stimulator" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68:44, **2020**, 12203–12211.
- [545] J. López-cervantes, "Composition Comprising Chitosan, Glucosamine And Amino Acids For Agricultural Use", pat. EP 2723172 B1, **2012**.
- [546] J. Palma Guerrero, V. Lopez Llorca Luis, H.-b. Jansson, J. Salinas Calvete, B. Guerri Agullo, "Use Of Chitosan For Increasing Sporulation Of Fungi", pat. EP 2113559 A1, **2008**.
- [547] Y. Li, C. Bian *China's Foreign Investment Legal Regime: Progress and Limitations* London: Routledge, **2022**.

9 Aktywność naukowa

ARTYKUŁY:

1. I. Dziedzic, A. Kertmen, "Methods of Chitosan Identification: History and Trends", *Letters in Applied NanoBioScience*, 2023, 12, 4. (IF: 0, MES: 0, liczba cytowań: 25)
2. A. Kertmen, I. Dziedzic, H. Ehrlich, "Patentology of Chitinous Biomaterials. Part II: Chitosan", *Carbohydrate Polymers*, 2023, 301, 120224. (IF: 11.2, MES: 140, liczba cytowań: 22)
3. I. Dziedzic, A. Voronkina, M. Pajewska-Szmyt, M. Kotula, A. Kubiak, H. Meissner, T. Duminis, H. Ehrlich, "The Loss of Structural Integrity of 3D Chitin Scaffolds from *Aplysina aerophoba* Marine Demosponge after Treatment with LiOH", *Marine Drugs*, 2023, 21, 334. (IF: 6.5, MES: 100, liczba cytowań: 7)
4. T. Duminis, M. Heljak, W. Świąszkowski, A. Ereskovsky, I. Dziedzic, M. Nowicki, M. Pajewska-Szmyt, A. Voronkina, S.R. Bornstein, H. Ehrlich, "On the Mechanical Properties of Microfibre-Based 3D Chitinous Scaffolds from Selected Verongiida Sponges", *Marine Drugs*, 2023, 21, 463. (IF: 5.4, MES: 100, liczba cytowań: 14)
5. I. Dziedzic, K. Dydek, A. Voronkina, V. Kovalchuk, T. Jesionowski, H. Ehrlich, "Chitinous skeleton of *Ianthella basta* marine demosponge as renewable scaffold-based carrier of antiseptics", *Polysaccharides*, 2024, 5(4), 540-551. (IF: 5.5, MES: 0, liczba cytowań: 2)
6. I. Dziedzic, K. Dydek, J. Trzcinski, A. Boczkowska, A. Voronkina, T. Jesionowski, H. Ehrlich, "Creation of 3D chitin/chitosan composite scaffold from naturally pre-structured verongioid sponge skeleton", *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2024, 8, 100587. (IF: 6.5, MES: 20, liczba cytowań: 4)

7. H. Ehrlich, J. Litowczenko, A. Szczurek, A. Voronkina, D. Pakuła, M. Frydrych, R. Przekop, I. Smirnov, S. Petrov, I. Sieliverstov, M. Kotula, A. Kubiak, B. Leśniewski, I. Dziedzic, L. Muzychka, H. Stöker, Z. Souiba, A. Springer, K. Heimler, C. Vogt, A. Flont, M. Przymyszała, D. Tsurkan, „3D skeletal scaffolds of marine keratosan demosponges origin as renewable sources for bioinspiration in modern structural biomimetics and tissue engineering”, *Biomimetics*, 2026, zaakceptowano
8. H. Ehrlich, I. Dziedzic, A. Voronkina, rozdział pt: „Chitin from marine sponges for biomedical application” w książce „Marine Biomaterials and Biomimetics for Regenerative Medicine”, ed. T. Silva i R. Reis, Royal Society of Chemistry, w druku

KONFERENCJE:

- XXVII Konferencja Polskiego Towarzystwa Chitynowego “New aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives”
21-23.09.2022 Poznań, Polska
Prezentacja posterowa zatytułowana: "Isolation of Poriferan chitin scaffolds using methanol with assistance of ultrasound treatment"
- XXVIII Konferencja Polskiego Towarzystwa Chitynowego “New aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives”
25-27.09.2023 Gdańsk, Polska
Prezentacja ustna zatytułowana: "Patentology of chitinous biomaterials"
- 14. Międzynarodowa Konferencja Europejskiego Towarzystwa Chitynowego
11-14.09.2023 Siglufjörður, Islandia
Prezentacja posterowa zatytułowana: "Solubilization of unique 3D chitin scaffolds from *Aplysina aerophoba* marine demosponge using LiOH"
- 1. Międzynarodowa Konferencja Online na temat Biomimetyki organizowana przez czasopismo *Biomimetics*
15-17.05.2024 Online
Prezentacja posterowa zatytułowana: “Biomimetic application of *Ianthella basta* demosponge capillary structured chitin scaffolds”

- 12. Światowa Konferencja o Gąbkach
9-13.09.2025 Vila do Conde, Portugalia
Prezentacja posterowa zatytułowana: „Creation of 3D chitin-chitosan scaffolds obtained from *Aplysina aerophoba* demosponge”

NAGRODY I WYRÓŻNIENIA:

- Wyróżnienie w konkursie na najlepszy poster "Isolation of Poriferan chitin scaffolds using methanol with assistance of ultrasound treatment" na XXVII Konferencji Polskiego Towarzystwa Chitynowego "New aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives" 21-23.09.2022 Poznań, Polska
- Wyróżnienie w konkursie na najlepsze wystąpienie ustne "Patentology of chitinous biomaterials" na XXVIII Konferencji Polskiego Towarzystwa Chitynowego "New aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives" 25-27.09.2023 Gdańsk, Polska
- Stypendium Naukowe Rektora UAM dla doktorantów w roku 2024

PRYZNANE GRANTY:

- Minigrant doktorancki „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” na rok 2023/2024 „Development of methods for effective metallization of isolated 3D mesoporous Verongiid sponges skeletons”, kierownik

DZIAŁALNOŚĆ POPULARNO-NAUKOWA:

- Perspektywy Women in Tech Summit, 14-15.06.2023, Warszawa, Polska

10 Aneks

W niniejszym aneksie przedstawiono szczegółowe zestawienie patentów dotyczących chitozanu zgłoszonych w latach 1988–2021, które uzupełnia analizę zawartą w rozdziale 6.5. Wszystkie oryginalne źródła patentów zawarte są w publikacji [5].

Tabela 10.1: Wykaz patentów sklasyfikowanych w kategorii biomedycyna.

Dziedzina	Przeznaczenie	Źródło materiału chitynowego	Początkowa lub końcowa forma materiału chitynowego	Rok	Numer patentu
biomedycyna	przygotowanie chitozanu z enzymem fosfatazą alkaliczną jako termożeli do wstrzykiwań do zastosowań osteogenicznych	nieokreślone	roztwór, termożel	2013	NL 2012050534 W
biomedycyna, materiałoznawstwo	przygotowanie termoczułego hydrożelu z chitozanem bez użycia tradycyjnie stosowanego β -glicerofosforanu	komercyjne	hydrożel w postaci końcowej	2005	EP 2004002988 W
biomedycyna, farmacja	tworzenie gąbek chitozanowych poprzez sieciowanie hydrożeli chitozanowych do wstrzykiwań z 5'-difosforanem guanozyny do regeneracji tkanki kostnej, jako nośnik leków przeciwnowotworowych lub wektor do dostarczania RNA	komercyjne	roztwór; hydrożel i gąbka w postaci końcowej	2014	CA 2013050677 W
biomedycyna	hydrożel polisacharydowy o ładunku dodatnim, wrażliwy na temperaturę, zależny od pH	przygotowywane przemysłowo z suchych płatków chityny	hydrożel polisacharydowy w postaci końcowej	2017	CA 2672495 A
biomedycyna, chemia	hydrożel chitozanowy o dobrych właściwościach mechanicznych, zawierający dwie słabe zasady umożliwiające szybkie żelowanie	nieokreślone	kwaśny roztwór chitozanu w postaci początkowej	2016	CA 2887749 A
biomedycyna	przygotowanie zawiesiny z chitozanu, celulozy i kwasu w celu utworzenia hydrożelu do regeneracji tkanek oraz do bioresorbowalnych i biokompatybilnych implantów	nieokreślone	proszek chitozanowy w postaci początkowej; wodna lub wodno-alkoholowa zawiesina chitozanu w postaci końcowej	2019	CA 3092424 A
biomedycyna, chemia	ochronna warstwa żelowa składająca się z tiolowanego chitozanu i środka utleniającego do gojenia tkanki błony śluzowej	komercyjne	tiolowany chitozan w postaci początkowej	2015	AU 2009/240511 A
biomedycyna, chemia	przygotowanie hydrożelu karboksyalkilamidu chitozanu do dermatologicznego i kosmetycznego leczenia oparzeń skóry	komercyjne	proszek chitozanowy w postaci początkowej	2014	CA 2693644 A
biomedycyna	przygotowanie farmaceutycznie aktywnego preparatu chitozanu i kwasu węglowego w postaci sprayu	nieokreślone	ciecz/dyspersja w postaci końcowej	2021	EP 19876202 A
biomedycyna	hodowla chondrocytów do regeneracji chrząstki	nieokreślone	roztwór chitozanu w postaci początkowej	2014	EP 11703452 A
biomedycyna	oznaczenie tropomiozyny w chitozanie	krab	roztwór chitozanu w postaci początkowej	2009	EP 05809400 A

biomedycyna	metoda długotrwałego przechowywania dużych fragmentów genomowego DNA w temperaturze pokojowej i zapobiegania jego degradacji	komercyjne	kompleks DNA i chitozanu przechowywany w stanie ciekłym w postaci końcowej	2010	EP 05789711 A
biomedycyna	zastosowanie makroporowatego skafoldu kostnego do inżynierii tkankowej, regeneracji kości	nieokreślone	skafold na bazie chitozanu w postaci końcowej	2020	PL 42678818 A
technologia biomedyczna	badania przesiewowe i testy leków przeciwnowotworowych	nieokreślone	skafoldy chitozanowo-żelatynowe w postaci końcowej	2014	IN 2841DE2012 A
biomedycyna	kompozycja przeciwbakteryjna do leczenia nieświeżego oddechu, bólu gardła, suchości w ustach	nieokreślone	kompozycja zawierająca chitozan, chlorheksydynę i jon metalu w postaci końcowej	2020	EP 15734586 A
biomedycyna	leczenie bakteryjnych infekcji skóry i gojenie ran	nieokreślone	nieokreślone	2013	US 201013263840 A
biomedycyna	biokompatybilny, chłonny i biodegradowalny opatrunek na rany	nieokreślone	błona karboksymetylowego chitozanu w postaci końcowej	2017	MX 2016007284 A
biomedycyna	regulacja przepływu krwi dzięki warstwie chłonnej składającej się z tkaniny, nierozpuszczalnego w wodzie chitozanu i chłonej wodę skrobi	chityna z pancerza kraba	włókna chitozanu pokryte dwiema warstwami modyfikowanej skrobi w postaci końcowej	2016	CA 2959946 A
biomedycyna	materiały do przeszczepów kostnych o wysokiej osteokonduktywności i działaniu hemostatycznym oraz niskim ryzyku infekcji	nieokreślone	chitozan z fosforanem wapnia w postaci końcowej	2015	US 201313801044 A
biomedycyna	chitozan sprzężony z cytokinami do leczenia schorzeń	komercyjne	chitozan kowalencyjnie związany z IL-12 w postaci końcowej	2020	EP 15800453 A
biomedycyna	chitozan sprzężony z antagonistą integryny do celowanego dostarczania leków	komercyjne	kowalencyjnie związany chitozan i mała cząsteczka	2018	EP 13701252 A
biomedycyna	kompozycje o właściwościach mukoadhezyjnych i termozelujących, przydatne w leczeniu zmian śluzówkowych	nieokreślone	kompozycja chitozanu, kwasu hialuronowego i soli glicerofosforanowej w postaci końcowej	2015	EP 12791441 A
biomedycyna	oznaczanie sarkozyny w próbce biologicznej	nieokreślone	proszek chitozanowy w postaci początkowej	2019	EP 18211201 A

biomedycyna	leczenie chorób poprzez kodowanie białka o działaniu terapeutycznym	komercyjne	nanocząstka na bazie chitozanu w postaci końcowej	2012	NZ 57196507 A
biomedycyna	hydrożel o właściwościach przeciwzapalnych, przydatny w gojeniu ran	nieokreślone	hydrożel chitozanu lub jego soli w postaci końcowej	2019	RU 2018104349 A
biomedycyna	szybkie krzepnięcie krwi w celu regeneracji tkanek	nieokreślone	mieszanka krwi, roztworu chitozanu i chlorku sodu w postaci końcowej	2018	EP 10831000 A
biomedycyna	leczenie grzybiczych infekcji skóry i odmładzanie skóry	nieokreślone	kompozycja kremu zawierająca chitozan w postaci końcowej	2011	MX 2011010781 A
biomedycyna	substancja żelująca do gojenia ran	komercyjne	sproszkowana substancja żelująca zawierająca sulfonamid i chitozan w postaci końcowej	2016	EP 14874363 A
biomedycyna	formulacja do dostarczania genów zawierająca ciekłe kryształy, wykazująca wysoką stabilność i skuteczność dostarczania genów	nieokreślone	kompozycja chitozanu i materiału tworzącego ciekły kryształ	2018	EP 14756578 A
biomedycyna	włóknisty środek hemostatyczny i materiał do gojenia ran	nieokreślone	włókna chitozanu w postaci końcowej	2019	RU 2019107409 A
biomedycyna	przygotowanie artykułów hemostatycznych	komercyjne	chitozan alkaliczny o niskiej zawartości endotoksyn w postaci końcowej	2018	EP 13719131 A
biomedycyna	środek stymulujący wzrost lub odbudowę włosów	komercyjne	kompozycja zawierająca chitozan i środki sulfonamidowe w postaci końcowej	2019	EP 15754782 A
biomedycyna	powłoka protezy zastawki serca	komercyjne	roztwór chitozanu w wodzie nasyconej dwutlenkiem węgla w postaci końcowej	2014	RU 2012156376 A
biomedycyna	hydrożel z mikrocząstek stosowany jako implant w regeneracji aksonów	komercyjny chitozan z chityny kałamarnic	mikrocząsteczki hydrożelu chitozanu w postaci końcowej	2016	EP 13744758 A
biomedycyna	preparaty immunogenne do podawania przez błony śluzowe	komercyjne	kompozycja zawierająca chitozan jako adiuwant	2005	MX PA04011249 A

biomedycyna	leczenie stanów zapalnych lub nadwrażliwości	nieokreślone	kompozycja oligomeru chitozanu w postaci końcowej	2008	PT 02787257 T
biomedycyna	zapobieganie wrastaniu tkanek miękkich	nieokreślone	przeciwmigracyjna endoproteza stentu pokryta chitozaniem w postaci końcowej	2020	RU 2019135547 A
biomedycyna	izotoniczny, biokompatybilny preparat, który w temperaturze ciała szybko przekształca się w żel	nieokreślone	chitozan klasy medycznej w postaci początkowej	2014	US 201313908299 A
biomedycyna	miejscowe podawanie substancji czynnych do otwartych złamań, ran lub miejsc zakażenia	komercyjne	pasta chitozanowa w postaci końcowej	2019	EP 19170643 A
biomedycyna	poходna chitozanu o niskiej toksyczności i wysokim powinowactwie do błon komórkowych, do stosowania w podawaniu leków	nieokreślone	kwaternizowana, acylowana pochodna chitozanu w postaci końcowej	2019	RU 2018106534 A
biomedycyna	mikrokapsułki winpocetyny do podawania leków	nieokreślone	mikrokapsułki chitozanu i alginianu w postaci końcowej	2020	RU 2019135778 A
biomedycyna	leczenie chorób zapalnych paznokci	nieokreślone	hydroksypropylochitozan w postaci początkowej	2019	US 201414536941 A
biomedycyna	wiązanie fosforanów i leczenie hiperfosfatemii	nieokreślone	cząsteczki	2011	US 9943308 A
biomedycyna	preparat do leczenia nadwrażliwości zębów poprzez stosowanie powierzchniowe	chityna	kompozycja zawierająca chitozan i małe cząsteczki krzemionki w postaci końcowej	2018	MX 2018006087 A
biomedycyna	zapobieganie tworzeniu się zrostów między tkankami podczas regeneracji	komercyjne	nanowłókna chitozanu zawierające nanocząstki chitozanu	2014	EP 14161830 A
biomedycyna	produkcja i zastosowanie jako produkt medyczny	nieokreślone	warstwa chitozanu w postaci końcowej	2015	US 200913322870 A
biomedycyna	ochrona przed alergią na metale	komercyjne	chitozan modyfikowany glutationem połączony wiązaniem peptydowym	2015	PL 40725714 A

biomedycyna	chirurgia zatok i nosa z użyciem pasty przylegającej do miejsca zabiegu	nieokreślone	pastę zawierającą chitozan lub jego pochodne w postaci końcowej	2015	US 201314061993 A
biomedycyna	ukierunkowane dostarczanie kilku leków przeciwnowotworowych działających synergicznie	nieokreślone	nanocząstki typu rdzeń-powłoka z chitozanu i lipidów	2015	IN 2469MU2013 A
biomedycyna	opatrunek wykonany z hydrofilowej struktury gąbki polimerowej	nieokreślone	gąbka chitozanowa w postaci końcowej	2009	NZ 54807904 A
biomedycyna	hydrożel do stosowania miejscowego, otrzymany przy użyciu promieniowania gamma, o ulepszonych właściwościach leczniczych	nieokreślone	hydrożel z chitozanu i poloksameru 407 w postaci końcowej	2019	MX 2017017192 A
biomedycyna	leczenie nietrzymania moczu lub impotencji u pacjenta po prostatektomii	komercyjne	stała błona w postaci końcowej	2018	EP 17176184 A
biomedycyna	leczenie chorób zapalnych przewodu pokarmowego	komercyjne	kompleks zawierający N-acetylowany chitozan i cząsteczkę RNAi w postaci końcowej	2018	EP 16862114 A
biomedycyna	leczenie tkanki za pomocą opatrunku z materiału stałego w postaci żelu lub błony	komercyjne	błona chitozanowa w postaci końcowej	2016	EP 09778249 A
biomedycyna	leczenie infekcji wywołanych przez koronawirusy	nieokreślone	polimery	2017	EP 13729822 A
biomedycyna	leczenie zapalenia sutka	komercyjne	kompozycja zawierająca chitozan i heparynę lub siarczan dekstranu	2000	NZ 33351198 A
biomedycyna	leczenie chorób układu oddechowego	chitozan otrzymany z grzybów	chitozan pochodzący z grzybów w postaci początkowej	2020	EP 20170456 A
biomedycyna	preparaty wiskoelastyczne zawierające glikowany chitozan w fizjologicznie kompatybilnym nośniku	chityna ze pancerzy skorupiaków	roztwór glikozylowanego chitozanu w postaci końcowej	2002	AU 2002/019823 A
biomedycyna	redukcja masy ciała przy użyciu kompozycji bez niepożądanych skutków ubocznych	nieokreślone	kompozycja zawierająca chitozan rozpuszczalny w wodzie, ekstrakt z hibiskusa, L-karnitynę w postaci końcowej	2006	US 72532403 A

biomedycyna	gojenie ran i zapobieganie zrostom tkankowym	komercyjne	chitozan usieciowany z dekstranem modyfikowanym aldehydem	2012	NZ 58381908 A
biomedycyna, biotechnologia	podawanie leków, w szczególności poprzez transfekcję polinukleotydów do komórek	komercyjne	nanocząstki chitozanu i hialuronianu	2009	IL 19531608 A
biomedycyna, chemia	pochodna chitozanu przydatna jako wiskoelastyczny suplement, w postaci do wstrzykiwań lub zmieszana z płynem stanowym jako kompozycja farmaceutyczna	chitozan pochodzący z grzybów	karboksyalkilowy chitozan w postaci końcowej	2020	EP 18799773 A
biomedycyna, chemia	zapobieganie powikłaniom lub leczenie mukowiscydozy	nieokreślone	rozpuszczalny chitozan lub pochodna w postaci końcowej	2018	EP 17182792 A
biomedycyna, chemia	zmniejszenie liczby bakterii w jamie ustnej	nieokreślone	chitozan-arginina w postaci początkowej	2020	EP 10814537 A
biomedycyna, materiałoznawstwo	proteza do regeneracji nerwów	nieokreślone	włókna chitozanu w postaci końcowej	2020	EP 17210150 A
biomedycyna, farmacja	leczenie alergii pokarmowych	komercyjne	cząsteczki heparyny / chitozanu w postaci końcowej	2017	US 201414336411 A
biomedycyna, farmacja	hamowanie aktywności krwotocznej siarczanowanych glikozoaminoglikanów	komercyjne	kationizowany chitozan w postaci końcowej	2016	EP 14836115 A
biomedycyna, farmacja	kompozycja chitozanu do wstrzykiwań, która po wstrzyknięciu tworzy krystaliczne cząsteczki, przydatna jako związek dermatologiczny lub kosmetyczny, wyrób medyczny, implant bioresorbowalny	komercyjny chitozan z chityny kałamarnic	proszek chitozanowy w postaci początkowej	2019	EP 12791802 A
biomedycyna, farmacja	leczenie lub zapobieganie rakowi szyjki macicy lub piersi	chitozan z grzybów <i>Actinomucor taiwanensis</i>	nieokreślone	2007	EP 03251230 A
biomedycyna, farmacja	leczenie nadwagi przy użyciu kompleksu dwutlenku krzemu z chitozanem o wysokiej zdolności wiązania tłuszczów	nieokreślone	produkt współstrącania chitozanu i dwutlenku krzemu w postaci końcowej	2013	EP 07014046 A
biomedycyna, farmacja	szczepionka przeciwko wirusom i nowotworom	komercyjne	nanocząstki kwasu poligamma-glutaminowego z chitozanem w postaci końcowej	2012	EP 10792358 A

biomedycyna, farmacja	kompozycja lepkosprężysta przydatna jako adiuwant immunologiczny lub szczepionka przeciwnowotworowa	nieokreślone	wodny roztwór glikowanego chitozanu w postaci końcowej	2020	EP 13738505 A
biomedycyna, materiało- znawstwo	samoorganizujące się nanowłókna przydatne jako nutraceutyki lub leki na choroby neurodegeneracyjne	komercyjne	nanowłókna chitozanu w postaci końcowej	2018	EP 16802314 A
biomedycyna	otrzymywanie środka hemostatycznego składającego się z chitozanu usieciowanego z poli(kwasem asparaginowym) i fizycznie obciążonego lizosomem w celu zwiększenia biodegradowalności chitozanu	nieokreślone	postać liofilizowana	2021	IB 2021054169 W
biomedycyna	przygotowanie termożelującego polimeru chitozanowego w obecności składników krwi, soli i środków terapeutycznych w celu utworzenia chrząstki stawowej	nieokreślone	zestawiony polimer, termożel	2011	CA 2010001857 W
biomedycyna	wykorzystanie polipleksów chitozanu i kwasu nukleinowego do miejscowej ekspresji cytokiny IL-2 (poprzez dostarczanie kwasu nukleinowego kodującego IL-2) w leczeniu nowotworów	nieokreślone	preparat farmaceutyczny, nanocząstki	2020	IB 2020000178 W
biomedycyna, chemia	wykorzystanie chitozanu o masie cząsteczkowej 7-185 kDa i stopniu deacetylacji 72-92% jako niewirusowego środka dostarczającego DNA	komercyjne	nanocząstki kompleksu chitozanu i DNA o wielkości 200-400 nm	2007	CA 2006001813 W
biomedycyna, chemia	przygotowanie pochodnych O-karboksyalkilowych chitozanu jako kompozycji okulistycznych zawierających substancję czynną ketotifen	nieokreślone	przezroczysty żel w postaci końcowej	2002	EP 0206280 W
biomedycyna, chemia, farmacja	przygotowanie preparatów chitozanu usieciowanego peptydami jako środków przeciwbakteryjnych i materiałów do gojenia ran	komercyjne	liofilizowana pianka, hydrożel	2020	EP 2020062433 W
biomedycyna, materiało- znawstwo	przygotowanie chitozanu wolnego od endotoksyn (lipopolisacharydów), który nadaje się do stosowania jako materiał hemostatyczny	nieokreślone	warstwa żelująca w materiałach opatrunkowych	2014	GB 2014051648 W
biomedycyna, materiało- znawstwo	przygotowanie materiału powlekającego na bazie chitozanu w połączeniu z nanocząstkami metali w celu zapobiegania tworzeniu się biofilmu mikrobiologicznego na wyrobach medycznych przeznaczonych do implantacji	nieokreślone	proszek	2021	EP 2020068733 W
biomedycyna, materiało- znawstwo	wykorzystanie kompozytów polimerowych chitozanu, tlenku polietylenu i heparyny, zawierających substancje czynne (np. argininę), jako biokompatybilnych powłok stentów wewnątrznaczyniowych, które wykazują właściwości uwalniania leków	komercyjne – pochodzące z pancerzy krabów	polimerowa powłoka kompozytowa	2004	CA 2004000906 W
biomedycyna, farmacja	przygotowanie nanocząstek chitozanu do doustnego podawania antygenów	komercyjne	nanocząstki w postaci końcowej	2003	EP 0303875 W

biomedycyna, farmacja	wykorzystanie chitozanu usieciowanego samorzutnie lub polisacharydem polianionowym do celów farmaceutycznych lub biomedycznych, w szczególności w leczeniu chorób zapalnych, w których dochodzi do nadekspresji galektyn	nieokreślone	preparat farmaceutyczny	2021	IB 2021052735 W
biomedycyna	wstrzykiwalne, cytokompatybilne, samoczynnie żelujące roztwory chitozanu do enkapsulacji i dostarczania żywych komórek lub biologicznie aktywnych środków do regeneracji tkanek lub gojenia ran	nieokreślone	roztwór izotonicznego obojętnego chitozanu w postaci końcowej	2005	EP 03763548 A
biomedycyna	preparat do wstrzyknięć dostawowych w postaci termoczułego hydrożelu zawierającego chitozan i kwasy nukleinowe	nieokreślone	roztwór	2019	CN 201680088586 A
biomedycyna	przygotowanie środka hemostatycznego zawierającego chitozan, fibroinę jedwabiu i osocze bogatopłytkowe o właściwościach antybakteryjnych	nieokreślone	nieokreślone	2020	CN 201911050578 A
biomedycyna	przygotowanie materiału do wstrzykiwania służącego do regeneracji chrząstki, zawierającego chitozan i kwas hialuronowy	nieokreślone	hydrożel	2020	CN 202010202921 A
biomedycyna	ułatwianie fagocytozy <i>Listeria iuanuii</i> , a tym samym poprawa odpowiedzi immunologicznej poprzez zwiększenie ujemnych ładunków powierzchniowych komórek <i>L. iuanuii</i> poprzez pokrycie ich powierzchni oligosacharydami chitozanu	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201811231019 A
biomedycyna	zastosowanie oligosacharydów chitozanu w zapobieganiu uszkodzeniom wątroby wywołanym przez acetaminofen	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201910354734 A
biomedycyna, materiało- znawstwo	przygotowanie nanowłókien zawierających chitozan, nanorurki węglowe, polisacharydy pochodzące z <i>Lycium barbarum</i> oraz czynnik wzrostu neuronów, przeznaczonych do regeneracji tkanki nerwowej	nieokreślone	nanowłókno	2020	CN 202010415408 A
biomedycyna, materiało- znawstwo	wykorzystanie nanocząstek chitozanu jako nośników do dostarczania białka IL17RC, które poprawia adsorpcję przez błonę śluzową nosa	nieokreślone	nanocząstki	2017	CN 201710718023 A

Tabela 10.2: Wykaz patentów sklasyfikowanych w kategorii materiałoznawstwo i inżynieria materiałowa.

Dziedzina	Przeznaczenie	Źródło materiału chitynowego	Początkowa lub końcowa forma materiału chitynowego	Rok	Numer patentu
materiałoznawstwo	przygotowanie żelu chitozanowego poprzez kompleksowanie z jonami wapnia (II)	nieokreślone	żel	2003	WO 2003/057735 A1
materiałoznawstwo	przygotowanie mikrokrystalicznego chitozanu przy użyciu połączenia etapów degradacji oksydacyjnej, hydrolitycznej i enzymatycznej; przygotowanie kompleksu wapnia i chitozanu w celu poprawy retencji wody, stabilności termicznej i aktywności biologicznej	nieokreślone	polimer mikrokrystaliczny	2003	WO 2003/057736 A1
materiałoznawstwo, chemia	przygotowanie nanocząstek chitozanu poprzez reakcje sieciowania bez uprzedniego rozpuszczania polimeru	nieokreślone	postać liofilizowana	2021	WO 2021/160667 A1
materiałoznawstwo	artykuły odzieży ochronnej nieprzepuszczającej substancji chemicznych, ale przepuszczającej parę wodną	komercyjne	a z warstwą tkaniny i podłożem	2012	EP 06837039 A
materiałoznawstwo	matryca chitozanowa do zastępowania, wzmocnienia lub regeneracji tkanek miękkich	nieokreślone	warstwa porowata	2020	EP 15305236 A
materiałoznawstwo	tekstylna kompresyjna do zastosowań medycznych i sportowych	komercyjne	włókno zmieszane z celulozą	2018	EP 11709733 A
materiałoznawstwo	odgazowanie roztworów przedzalnicyznych o wysokiej lepkości	nieokreślone	ultraczyty roztwór przedzalnicyzny chitozanu	2017	EP 14841045 A
materiałoznawstwo	włókna i błony o dobrych właściwościach fizycznych i mechanicznych	nieokreślone	mieszanina chitozanu z celulozą	2018	EA 201700046 A
materiałoznawstwo	formuła sterylizowana termicznie, która po sterylizacji termicznej w obojętnym pH jest lepka i klarowna, do zastosowań okulistycznych	chitozan pochodzący z grzybów	roztwór sterylizowany termicznie	2020	EP 15798206 A
materiałoznawstwo	powłoka hydrofobowa do powierzchni szklanych	nieokreślone	hydrofobowy chitozan	2017	EP 09722474 A
materiałoznawstwo	implanty wzmocniające strefy lub linie zszycia	komercyjne	porowata warstwa chitozanu	2015	EP 13745399 A
materiałoznawstwo	hydrofobowa powłoka chitozanowa, którą można suszyć w temperaturze pokojowej	nieokreślone	powłoka	2018	EP 07860333 A
materiałoznawstwo	materiał odporny na obciążenia mechaniczne, do stosowania w opatrunkach na rany, filtrach nosowych, maskach medycznych, sorpcji radionuklidów, filtracji cieczy	nieokreślone	nanowłókna	2014	RU 2013121353 A

materiałoznawstwo	matryca produktów biomedycznych o działaniu przeciwbakteryjnym	nieokreślone	membrana hydrożelowa, biopolimer	2015	EP 13820587 A
materiałoznawstwo	adsorpcja jonów metali w oczyszczaniu ścieków	nieokreślone	sól chitozanu w postaci początkowej	2005	EP 02790195 A
materiałoznawstwo	przezroczysty, termostabilny żel stosowany w kosmetykach lub farmaceutykach	nieokreślone	żel utworzony w wyniku kopolimeryzacji ksyloglukanu	2011	EP 09787583 A
materiałoznawstwo, chemia	wodny, zneutralizowany, termoutwardzalny materiał tworzący przezroczysty hydrożel stosowany do podawania leków, preparat do wstrzykiwań	komercyjne	zneutralizowany hydrożel wodny	2009	EP 05824526 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	biomimetyczne skafoldy i modulacja ich właściwości, takich jak sztywność, porowatość, elastyczność, stosowane w inżynierii tkankowej lub zastosowaniach biomedycznych	grzyby	skafold	2013	EP 11721057 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie materiałów do implantów ortopedycznych wykonanych z chitozanu	nieokreślone	cząsteczki, powłoka, materiały formowane	2007	WO 2006/067626 A8
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie materiału opatrunkowego z chitozanu, który chemicznie zawiera nanocząstki srebra	komercyjne	nanowłókna	2012	WO 2012/143788 A1
materiałoznawstwo	przygotowanie powłoki antybakteryjnej na bazie chitozanu zawierającej nanocząstki srebra lub miedzi	komercyjne	powłoki	2008	WO 2008/075222 A1
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie nanorozmiarowych kompleksów polielektrolitowych (poliplexów) z chitozanu zawierających polianion (kwas hialuronowy) w celu poprawy dostarczania kwasu nukleinowego do docelowego organu	nieokreślone	liofilizowany roztwór	2016	WO 2016/127251 A1
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie mikrosfer przy użyciu kationowej mieszaniny żelatyny i chitozanu w celu dostarczania substancji farmaceutycznie czynnych do tkanek błony śluzowej	komercyjne	mikrosfery	1998	WO 1998/030207 A1
materiałoznawstwo	biokompatybilny, chłonny, miękki i łatwy w produkcji opatrunek na rany	komercyjne	kompozyt z alginianem	2008	EP 07705221 A
materiałoznawstwo	regeneracja tkanki kostnej	nieokreślone	wodny roztwór	2020	EP 17731215 A
materiałoznawstwo	wykrywanie mutacji DNA przy użyciu elektrody z węgla szklanego	nieokreślone	nanowarstwa	2015	US 201314028920 A
materiałoznawstwo	chłonny opatrunek o strukturze gąbczastej	nieokreślone	gąbka	2012	US 21856808 A

materiałoznawstwo	klej do łączenia strukturalnego	komercyjne	kompozycja zawierająca chitozan, kwasy, związki polianionowe, poliole i wodny nośnik	2017	EP 11741672 A
materiałoznawstwo	adsorpcja metali ciężkich przez chitozan modyfikowany aminami	komercyjne	nanowłókno	2015	EP 13163660 A
materiałoznawstwo	materiał absorpcyjny o działaniu przeciwbakteryjnym, stosowany jako opatrunek na rany	nieokreślone	chłonny materiał włókninowy, włókno	2016	EP 10809322 A
materiałoznawstwo	poходna czwartorzędowej soli amonowej chitozanu jako stabilny materiał przeciwbakteryjny do produkcji sprzętu medycznego	komercyjne	powłoka chitozanowa modyfikowana czwartorzędową solą amonową	2018	US 201213983847 A
materiałoznawstwo	nić chitozanowa o wysokiej elastyczności i wytrzymałości mechanicznej, którą można wiązać i tkąć bez zerwania	nieokreślone	przędza	2014	EP 11712966 A
materiałoznawstwo	wydłużony element polisacharydowy do zastosowań medycznych	komercyjne	przędza	2014	EP 10708346 A
materiałoznawstwo	ulepszone środki hemostatyczne do gojenia ran	nieokreślone	granulki, cząsteczki	2015	US 201414255297 A
materiałoznawstwo	opakowania do żywności zapewniające dłuższy okres przydatności produktów spożywczych	nieokreślone	nanokompozytowa a z hydroksypropylometyloce-lulozy	2015	IN 736CH2014 A
materiałoznawstwo	materiał hemostatyczny o zmniejszonej pirogenności	pancerz kraba	włókno, proszek, błona, arkusz, gąbka lub tekstylia	2015	US 201314097151 A
materiałoznawstwo	implanty zawierające porowatą warstwę przydatne w regeneracji tkanek	nieokreślone	liofilizowany roztwór	2015	US 201113637440 A
materiałoznawstwo	implanty wzmacniające strefy lub linie zszycia	komercyjne	porowata warstwa	2019	EP 13745399 A
materiałoznawstwo	poprawa właściwości chemicznych i fizycznych właściwości produktów włóknistych; środek klejący do tekstyliów	nieokreślone	mieszanina chitozanu i skrobi	2008	EP 07115213 A
materiałoznawstwo	przemysłowa produkcja czystego włókna chitozanu	nieokreślone	płatki w postaci początkowej; włókno w postaci końcowej	2015	US 201113696079 A
materiałoznawstwo	filtracja wody	komercyjne	membrana z chitozanu i tlenu grafenu	2020	US 201816050425 A

materiałoznawstwo	modyfikacja materiału nietkanego wykonanego z włókna chitozanowego stosowanego jako opatrunek na rany	nieokreślone	włókno, tkanina	2015	US 201313912174 A
materiałoznawstwo	włókniny chitozanowe wykonane z ultracienkich włókien	nieokreślone	włókno, tkanina	2010	US 54088706 A
materiałoznawstwo	hodowla osteoblastów	nieokreślone	żel termoodwracalny	2019	PL 42382217 A
materiałoznawstwo	porowate struktury z polimerów	nieokreślone	kompozyt	2016	RU 2015149043 A
materiałoznawstwo	produkcja włókna chitozanowego przy użyciu procesu elektroprzędzenia	nieokreślone	włókno	2018	EP 11780612 A
materiałoznawstwo	produkcja gęstego chitozanu do podawania leków, inżynierii tkankowej, gojenia ran	chityna	proszek w postaci początkowej, membrana w postaci końcowej	2014	US 201113334388 A
materiałoznawstwo	chitozan o obniżonej pirogenności do zastosowań biomedycznych	komercyjne	fragmenty	2016	US 201614991331 A
materiałoznawstwo	rozpuszczalne addukty polimerowe przydatne jako wiskosuplementy, środki uelastyczniające, klej	nieokreślone	addukt kwasu borowego i chitozanu	2019	EP 17832994 A
materiałoznawstwo	stabilizowane nanocząstki i hydrofilowa substancja dyspergująca	komercyjne	nanocząstki	2016	US 201113090732 A
materiałoznawstwo	strukturalnie wzmocnione płytki sufitowe wykonane z zawiesiny wodnej	nieokreślone	zawiesina wodna	2018	EP 11810928 A
materiałoznawstwo	podłoża tekstylne o właściwościach powierzchniowych wrażliwych na bodźce zewnętrzne, przydatne w zastosowaniach medycznych i kosmetycznych	nieokreślone	hydrożel	2011	ES 201030533 A
materiałoznawstwo	leczenie złamań kości długich	organizmy morskie	proszek w postaci początkowej	2020	US 201715633036 A
materiałoznawstwo	nanogenerator tryboelektryczny wytwarzający prąd i napięcie	komercyjne	proszek	2019	US 201815978236 A
materiałoznawstwo	wytwarzanie wolnej od chemikaliów wodoodpornej powłoki powierzchniowej	nieokreślone	roztwór hydroksyalkilowanego chitozanu	2015	EP 06834947 A
materiałoznawstwo	odgazowywanie roztworów przedzalnicznych o wysokiej lepkości	nieokreślone	materiał o wysokiej lepkości	2018	EP 14841017 A

materiałoznawstwo, biomedycyna	przyspieszenie i uproszczenie produkcji Antyseptycznego Stymulatora Dorogowa (ASD) poprzez dodanie chitozanu, do stosowania w kosmetykach i weterynarii	nieokreślone	nanokapsułki	2015	RU 2014109982 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	zwiększona zdolność do enkapsulacji lub łączenia leków hydrofobowych	komercyjne	nanocząstki chitozanu i cyklodekstryny	2008	IL 18769607 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	fragmenty polimerowe elektroprzędzonych włókien do leczenia choroby zwyrodnieniowej stawów, regeneracji tkanek miękkich	nieokreślone	włókno elektroprzędzone	2019	US 201615146417 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	produkcja protez do implantacji chirurgicznej, kosmetycznej lub estetycznej	nieokreślone	błona	2009	CA 2720099 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	stabilna, nieprzezroczysta pasta do gojenia ran	komercyjne	pasta	2019	EP 14793731 A
materiałoznawstwo, biotechnologia	filtr gazowy i wodny do oczyszczania zanieczyszczeń organicznych	komercyjne	proszek w postaci początkowej	2018	US 201414501059 A
materiałoznawstwo, chemia	przygotowanie klejącej żywicy bez formaldehydu, dobrze wiążącej materiały włókniste	komercyjne	nieokreślone	2014	EP 11736558 A
materiałoznawstwo, chemia	przygotowanie powłok antybakteryjnych nie wpływających na właściwości mechaniczne, wygląd i wrażenia dotykowe materiału	nieokreślone	cząsteczki polimerowe	2012	US 4551705 A
materiałoznawstwo, chemia	metoda produkcji materiału na folię spożywczą, odporną na wilgoć, hydrofobową i wykazującą działanie przeciwdrobnoustrojowe	nieokreślone	błona	2019	RU 2017121731 A
materiałoznawstwo, chemia	używanie materiałów chitozanowych do wspomagania gojenia w zabiegach stomatologicznych	nieokreślone	gąbka	2011	US 26135105 A
materiałoznawstwo, chemia	usuwanie nadmiaru farby natryskowej	nieokreślone	roztwór	2007	EP 02750163 A
materiałoznawstwo, przetwórstwo spożywcze	jadalne, bioaktywne opakowania zachowujące świeżość owoców	komercyjne	proszek w postaci początkowej, folia w postaci końcowej	2017	CA 3048067 A

materiałoznawstwo, farmacja	hemostaza, gojenie ran, zapobieganie zrostom tkanek po operacji	komercyjne	włókna	2010	EP 08715072 A
materiałoznawstwo	przygotowanie plastrów hemostatycznych składających się z porowatych warstw utlenionej glukozy i chitozanu	nieokreślone	kompozyt	2021	CA 2879765 C
materiałoznawstwo	wykorzystanie materiału nośnego na bazie chitozanu do urządzenia chirurgicznego w celu zminimalizowania uszkodzeń pęczka nerwowo-naczyniowego podczas prostatektomii	komercyjne	powłoka, błona	2020	WO 2020/234740 A1
materiałoznawstwo	wykorzystanie rodzin Crididae, Tenebrionidae i Gammaridae jako przyjaznego dla środowiska źródła chitozanu	owady, słodkowodne skorupiaki	nieokreślone	2018	WO 2018/122700 A1
materiałoznawstwo	przygotowanie wzmocnionych chitozaniem żywic klejących na bazie mocznika i formaldehydu	komercyjne	płatki; lepka mieszanka kompozytowa	2018	WO 2018/053625 A1
materiałoznawstwo	metody produkcji chitozanu o niskiej i wysokiej masie cząsteczkowej poprzez mielenie/rozdrabnianie/dojrzwianie/deacetylację surowego materiału chitynowego	komercyjne i naturalne krewetki, homary, kraby, owady	lepki lub amorficzny materiał	2020	WO 2020/024053 A1
materiałoznawstwo	wykorzystanie cieczy jonowych do rozpuszczenia chitozanu w celu uzyskania trwałej biokompatybilności	krewetki	zawiesina nanocząstek	2020	WO 2020/110047 A1
materiałoznawstwo	wykorzystanie chitozanu jako materiału opakowaniowego o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych	komercyjne	warstwa lub powierzchnia polimerowa	2020	WO 2020/113342 A1
materiałoznawstwo	wykorzystanie octanu chitozanu lub cytrynianu chitozanu do konserwacji i wydłużenia okresu przydatności do spożycia pakowanych produktów na bazie wody	nieokreślone	powłoka	2020	WO 2020/234643 A1
materiałoznawstwo, biomedycyna	implanty chirurgiczne o wysokiej wytrzymałości mechanicznej i niskiej przepuszczalności	kraby, homary, kalmary, grzyby, krewetki; komercyjne	matryce	2016	WO 2016/046354 A1
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie kompozytów karboksymetylochitozanu i polifosforanu jako medium do druku 3D w celu przygotowania biologicznych substytutów kości	nieokreślone	składnik kompozycji hydrożelu	2016	WO 2016/012583 A1
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie bioadhezyjnych pochodnych chitozanu lub usieciowanych mikrosfer chitozanu o określonym potencjale zeta od -0,5 do +50 mV w celu przedłużonego uwalniania leku w tkankach błony śluzowej	komercyjne	nieokreślone	1996	WO 1996/005810 A1

materiałoznawstwo, biomedycyna	materiał do gojenia ran o stopniu deacetylacji 70-88% i masie cząsteczkowej 400-600 kDa	krewetki	błona	2001	WO 2001/041820 A1
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie czwartorzędowych N-podstawionych polielektrolitów chitozanu, skompleksowanych z polimerami polianionowymi, do transportu substancji biologicznie czynnych	nieokreślone	nanocząstki/mikrocząstki	2006	WO 2006/064331 A1
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie polielektrolitów chitozanu skompleksowanych z karboksymetylowanymi lub siarczanowanymi polisacharydami anionowymi do transportu substancji biologicznie czynnych	nieokreślone	nanocząstki/mikrocząstki	2007	WO 2007/031812 A1
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie antybakteryjnych gąbek hemostatycznych z beta chitozanu/mleczanu/glicerolu, które po nałożeniu na skórę tworzą warstwę wspomagającą gojenie się ran	kałamarnice	ciecz, błona	2011	WO 2011/004399 A2
materiałoznawstwo, biomedycyna	materiały reagujące na temperaturę i pH	komercyjne	hydrożel	2009	WO 2009/150651 A1
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie kompleksu chitozan/kwas rybonukleinowy/polianion wykazującego ujemny potencjał zeta i dobrą biokompatybilność	komercyjne	cząsteczki koloidalne	2008	WO 2008/093195 A2
materiałoznawstwo, biomedycyna, farmacja	preparat z nanocząstkami metali lub antybiotykami do leczenia zmian skórnych lub infekcji	nieokreślone	matryca żelowa	2019	WO 2019/232656 A1
materiałoznawstwo, biotechnologia	przygotowanie chitozanu o określonej masie molowej, stopniu acetylacji i grubości warstwy powierzchniowej oraz przygotowanie go do pokrycia szkiełka nakrywkowego w celu unieruchomienia żywych komórek	kałamarnice, krewetki	błona, powłoka	2019	WO 2019/229198 A1
materiałoznawstwo, chemia	izolacja chitozanu z grzybów przy użyciu NaOH pod wpływem promieniowania mikrofalowego	grzyby	osad	2021	WO 2021/116426 A1
materiałoznawstwo, chemia	metoda usuwania białka z surowego aglomeratu chitozanu poprzez wytrącanie mikrokystalicznego chitozanu przez dodanie dwuskładnikowego układu roztworów zasadowych	nieokreślone	osad	2003	WO 2003/066682 A1
materiałoznawstwo, chemia	przygotowanie sulfonamidu lub sulfonowanego kompleksu chitozanu i srebra jako wypełniacza fazy stacjonarnej kolumny chromatograficznej do rozdzielania tłuszczów nasyconych i nienasyconych pochodzenia morskiego	nieokreślone	żywica	2014	WO 2014/072862 A1
materiałoznawstwo, kosmetyki	przygotowanie kompozycji wypełniacza skórniego do leczenia zmarszczek lub fałdów na twarzy, składającej się z mikrosfer chitozanu usieciowanych kwasem hialuronowym	nieokreślone	mikrosfery	2017	WO 2017/136935 A1

materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie koniugatów polietylenoglikolu i chitozanu o dodatnim ładunku powierzchniowym do dostarczania ujemnie naładowanych substancji farmaceutycznie czynnych	komercyjne	mikrosfery lub mikrokapsułki	1999	WO 1999/001498 A1
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie formułacji chitozanu i steroidu (ketaminy) wykazujących działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii -ujemnych i -dodatnich, a także grzybów	nieokreślone	nanocząstki	2016	WO 2016/103280 A1
materiałoznawstwo, inżynieria	metoda wytwarzania urządzenia do badania przepływu składającego się z nitrocelulozowo chitozanowej membrany sprzężonej z barwnikiem	nieokreślone	membrana	2008	WO 2008/086846 A1
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie włókien na bazie chitozanu o średnicy 10 µm metodą przedzenia odśrodkowego do produkcji hemostatycznych materiałów opatrunkowych o wielkości porów 1–20 µm.	komercyjne	mikrowłókna	2018	CN 201780010548 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie funkcjonalizowanych antygenem nanocząstek chitozanu metodą suszenia rozpyłowego jako adiuwantu szczepionki śluzówkowej, gdzie chitozan o 90% DA ma masę cząsteczkową 10–70 kDa, a nanocząstki wykazują średnią wielkość 100–500 nm	komercyjne	nanocząstki	2017	CN 201580030088 A
materiałoznawstwo, chemia	przygotowanie hybrydowych nanocząstek tlenku grafenu i kationowego czwartorzędowego chitozanu do stosowania jako środek przeciwdrobnoustrojowy i dezynfekujący o niskiej toksyczności	nieokreślone	nanocząstki	2016	CN 201480016262 A
materiałoznawstwo	przygotowanie chitozanu metodą żelowania jonowego w kwasie fitowym, w której kapsułki chitozanowe zapewniają mechanizmy przedłużonego uwalniania substancji czynnej wchodzącej w skład preparatu farmaceutycznego, spożywczego lub kosmetycznego	nieokreślone	nanocząstki	2010	CN 200880103896 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie przezroczystego materiału żelatynowo-chitozanowego do tamowania krwawienia, szczególnie w przypadku operacji chirurgicznych, bez zakłócania zabiegu i bez pozostawiania blizn	nieokreślone	hydrożel	2018	CN 201680021044 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie opatrunku na ranę lub gąbki hemostatycznej składającej się z karboksymetylochitozanu i metylocelulozy, hydroksyetylocelulozy, alginianu wapnia, poliakrylanu	komercyjne	opatrunek, gąbka	2018	CN 201680024757 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie termoczułych hydrożeli modyfikowanych kwasami nukleinowymi, które można wstrzykiwać do organizmu lub pokrywać nimi powierzchnie tkanek	nieokreślone	roztwór, hydrożel	2018	CN 201680080527 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie kompozycji polisacharydu utlenionego chitozaniem żelatynowym jako warstwy ochronnej na tkance uszkodzonej lub operowanej chirurgicznie	komercyjne	hydrożel	2011	CN 200980118461 A

materiałoznawstwo	przygotowanie materiału filtracyjnego składającego się z chitozanu, kopolimeru (glikolu polietylenowego, alkoholu poliwinylowego lub kwasu poliakrylowego) i fotokatalitycznego tlenku metalu (tlenku wanadu, dwutlenku tytanu, dwutlenku manganu lub tlenku cynku), przy czym ten ostatni nadaje materiałowi filtracyjnemu zdolność regeneracyjną	nieokreślone	materiał polimerowy	2013	CN 201310087535 A
materiałoznawstwo	przygotowanie materiału powłokowego na bazie chitozanu do urządzeń medycznych poprzez przyłożenie pola elektrycznego do roztworu elektrolitu	nieokreślone	drut, pręt, płatki, rurki lub cząstki; powłoka	2013	CN 201310047308 A
materiałoznawstwo	przygotowanie biozgodnego i biodegradowalnego materiału chitozanowego poprzez sieciowanie chitozanu z żelatyną lub kolagenem	komercyjne	liofilizowana gąbka, pianka, implant, rusztowanie tkankowe, powłoka powierzchniowa urządzenia implantacyjnego, matryca, włókno, proszek, arkusz, folia, membrana, nanowłókno, nanocząstka i hydrożel	2015	CN 201480015466 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	preparat uszczelniający naczynia krwionośne składający się z chitozanu i modyfikowanego estrem glikolu polietylenowego w postaci hydrożelu	nieokreślone	hydrożel	2017	CN 201580033218 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie materiału hemostatycznego z chitozanu i celulozy w postaci wyrobu tkanego lub dzianiny	komercyjne	mikrofibryl	2018	CN 201680037541 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie materiału o przedłużonym uwalnianiu leku składającego się z chitozanu kopolimeryzowanego z hypromelozą i polielektrolitem	nieokreślone	żel, bandaż, tabletki, pasta, pigułka	2018	CN 201680036999 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie hydrożelu chitozanowego jako materiału o przedłużonym uwalnianiu	nieokreślone	proszek	2018	CN 201680050794 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie bioaktywnego chitozanu modyfikowanego katecholem jako materiału opatrunkowego do zastosowań medycznych, który może przylegać do tkanek śluzówkowych	komercyjne	sucha substancja stała	2020	CN 201880090516 A
materiałoznawstwo, chemia	przygotowanie nanokapsułek chitozanowych o średnicy 5–80 nm pokrytych powłoką pluroniczną, które mogą zawierać leki hydrofilowe i hydrofobowe	nieokreślone	nanokapsułki	2021	CN 201980085253 A
materiałoznawstwo	przygotowanie mikrokapsułek chitozanowych zawierających hydrofobowe nanocząstki magnetyczne do celowanego dostarczenia substancji	nieokreślone	mikrokapsułki	2015	CN 201510003522 A

materiałoznawstwo	przygotowanie skafoldu z PEGyłowanego chitozanu metodą elektroprzędzenia	nieokreślone	nieokreślone	2018	CN 201811198072 A
materiałoznawstwo	kompleksowanie ferrytyny z chitozaniem przy użyciu transglutaminazy w celu zwiększenia biodostępności ferrytyny	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201811293438 A
materiałoznawstwo	przygotowanie porowatych mikrosfer składających się z usieciowanego glutaraldehydem chitozanu i białka sojowego	nieokreślone	nieokreślone	2017	CN 201710663948 A
materiałoznawstwo	przygotowanie kompozytu składającego się z chitozanu i pektyny w celu zachowania aktywności antocyjanów pochodzących z borówek brusznicy	nieokreślone	kompozyt	2019	CN 201910663534 A
materiałoznawstwo	przygotowanie powłoki antibakteryjnej składającej się z chitozanu, tlenku cynku, skrobi i alginianu sodu, charakteryzującej się niską przepuszczalnością wody	nieokreślone	folia, powłoka	2019	CN 201811018217 A
materiałoznawstwo	przygotowanie medium do druku 3D składającego się z cieczy jonowych i chitozanu	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201910695583 A
materiałoznawstwo	przygotowanie kationowej powłoki chitozanowo-guanidynowo-poliuretanowej o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych	nieokreślone	powłoka	2020	CN 201811159533 A
materiałoznawstwo	przygotowanie nanocząstek z powłoką z alginianu sodu/chitozanu i rdzeniem z aldehydu cynamonowego przy użyciu polielektrolitów, bez dodatku emulgatorów	nieokreślone	nanocząstki	2018	CN 201810386762 A
materiałoznawstwo	przygotowanie biodegradowalnego i mechanicznie ulepszanego kompozytowego hydrożelu składającego się z karboksymetylochitozanu, poli(butylenu bursztynianu) i alkoholu poliwinylowego	nieokreślone	hydrożel	2018	CN 201810592535 A
materiałoznawstwo	przygotowanie biodegradowalnego i mechanicznie ulepszanego kompozytowego hydrożelu składającego się z karboksymetylochitozanu, poli(tereftalanu butylenu) i alkoholu poliwinylowego	nieokreślone	hydrożel	2018	CN 201810592534 A
materiałoznawstwo	przygotowanie chlorowanego chitozanu w celu poprawy działania przeciwdrobnoustrojowego	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201710641263 A
materiałoznawstwo	przygotowanie mechanicznie lepszego fotoaktywnego materiału żelowego składającego się z chitozanu, rodzaju krzemianu glinowo-magnezowego, tlenku tytanu i siarczanu cynku	nieokreślone	żel	2019	CN 201910148442 A

materiałoznawstwo	przygotowanie biokompatybilnego i hydrofilowego medium filtracyjnego na bazie chitozanu, zapewniającego lepszą wydajność filtracji poprzez zapobieganie niepożądanemu wzrostowi bakterii w membranie, regulowaną porowatość i dodatkową wytrzymałość mechaniczną	nieokreślone	porowata membrana	2019	CN 201910368233 A
materiałoznawstwo	przygotowanie hydrożelu z pamięcią kształtu, składającego się z chitozanu i alginianu	nieokreślone	proszek, hydrożel	2019	CN 201910202695 A
materiałoznawstwo	przygotowanie struktury hydrożelu 3D poprzez włączenie nanorurek węglowych i podłoża szklanego do chitozanu poprzez usieciowanie aldehydem glutarowym	nieokreślone	hydrożel	2019	CN 201910521730 A
materiałoznawstwo	przygotowanie elektrostatycznie aktywnego kompozytu żelowego poprzez połączenie białka sojowego i chitozanu	nieokreślone	żel	2019	CN 201910434574 A
materiałoznawstwo	przygotowanie pochłaniacza magnetycznego składającego się z nanocząstek tlenku żelaza, dopaminy i karboksymetylochitozanu w celu adsorpcji kationowego barwnika	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201910543125 A
materiałoznawstwo	przygotowanie samoregenerującego się, antybakteryjnego i degradablego hydrożelu składającego się z czwartorzędowej soli amonowej chitozanu i alkoholu poliwinylowego	nieokreślone	hydrożel	2020	CN 201911235722 A
materiałoznawstwo	przygotowanie mikrokapsulek składających się z chitozanu, acylowanego chitozanu i alginianu do kapsułkowania substancji bioaktywnych	nieokreślone	mikrokapsułki	2012	CN 201010566996 A
materiałoznawstwo	przygotowanie mikrosfer antybakteryjnych składających się z czwartorzędowej soli amonowej chitozanu oraz trimetyloaminy i epichlorohydryny	nieokreślone	mikrosfery	2014	CN 201410419747 A
materiałoznawstwo	przygotowanie emulgujących koloidów chitozanowych o właściwościach światłoczułych, które mogą być stosowane w ochronie przeciwsłonecznej	nieokreślone	koloid	2016	CN 201610279513 A
materiałoznawstwo	przygotowanie hydrożelu z wykorzystaniem pochodnych chitozanu	nieokreślone	żel	2016	CN 201610625357 A
materiałoznawstwo	przygotowanie nośników leków o przedłużonym uwalnianiu składających się z chitozanu i cyklodekstryny	nieokreślone	materiał kompozytowy	2018	CN 201810347088 A
materiałoznawstwo, rolnictwo	przygotowanie mikrosfer żelowych składających się z chitozanu, manganu i protiokonazolu, które zapewniają mechanizmy powolnego uwalniania, do stosowania w pestycydach	nieokreślone	żelowe mikrosfery	2020	CN 202010681329 A

materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie kompozytu wrażliwego na pH z chitozanu, jonów wapnia, celulozy i tlenku grafenu do kontrolowanego uwalniania leku	nieokreślone	kompozyt	2017	CN 201710256180 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie mikrosfer chitozanowych pokrytych nanocząstkami złota i doksorubicyną do kontrolowanego fototermicznego uwalniania leku	nieokreślone	nieokreślone	2020	CN 201911157771 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie środka do regeneracji nerwów składającego się z mikrosfer chitozanowych i celulozy	nieokreślone	nieokreślone	2021	CN 202011615887 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie doustnego systemu dostarczania leku, składającego się z czynnika Eudragit S100, insuliny, peptydu przenikającego do komórek i chitozanu, który zwiększa biodostępność insuliny i umożliwia jej dojelitowe dostarczenie	nieokreślone	nieokreślone	2015	CN 201510410734 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie kompozytowego materiału gąbczastego na bazie chitozanu i tlenku grafenu, przeznaczonego do adsorpcji składników krwi	nieokreślone	gąbka	2018	CN 201810220089 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	zastosowanie nanocząstek chitozanu-hydroksyapatytu do przygotowywania sztucznych kości metodą formowania wtryskowego	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201811261850 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie środka konserwującego miążgę zęba składającego się z chitozanu i mikro- lub nano-bioaktywnych kulek szklanych	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201910925451 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie materiału opatrunkowego na rany o działaniu przeciwbakteryjnym i hemostatycznym, składającego się z czwartorzędowego chitozanu	nieokreślone	gąbka	2020	CN 202010699305 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie hemostatycznego, przeciwzapalnego materiału opatrunkowego na rany, składającego się z kompozytu celulozy i chitozanu	nieokreślone	nieokreślone	2014	CN 201310526128 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie materiału opatrunkowego o działaniu antybakteryjnym, składającego się z chitozanu-poloksameru jako tkaniny i nanocząstek srebra jako substancji czynnej	nieokreślone	opatrunek	2018	CN 201810595187 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie medium do druku 3D składającego się z chitozanu, glikolu polietylenowego i żelatyny	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201811633735 A
materiało- znawstwo, biomedycyna	przygotowanie porowatych mikrosfer z tiolowanego chitozanu i węgla wapnia, które charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą i wysoką efektywnością wiązania leku	nieokreślone	mikrosfery	2019	CN 201710881333 A

materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie środka hemostatycznego składającego się z alginianu i chitozanu	nieokreślone	mikrosfery	2019	CN 201910441782 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie aerożelu o ulepszonych właściwościach mechanicznych i działaniu antybakteryjnym, składającego się z chitozanu, celulozy diamidoksymowej, fibroiny i nanocząstek srebra	nieokreślone	aerożel	2019	CN 201910531865 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie błony do hemodializy metodą wirowania, składającego się z chitozanu modyfikowanego sulfonowanym kwasem cytrynowym i polisulfonu	nieokreślone	błona	2020	CN 201911165257 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie mikrokapsulek zawierających białko sojowe, czwartorzędową sól amonową chitozanu i polifenole pochodzące z herbaty, do stosowania w powolnym uwalnianiu pueraryny	nieokreślone	mikrokapsułki	2020	CN 202010950930 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie nanocząstek chitozanu i laktoglobuliny w celu poprawy doustnego podawania i biodostępności galusanu epigallokatechiny	nieokreślone	nanaocząstki	2015	CN 201510047564 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	zastosowanie chitozanu o wyższej masie cząsteczkowej w celu poprawy efektu hemostatycznego	nieokreślone	nieokreślone	2015	CN 201510104148 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie materiału stomatologicznego składającego się z chitozanu, hydroksyapatytu i skóry właściwej świni	nieokreślone	nieokreślone	2016	CN 201610130835 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie mikrosfer składających się z karboksymetylochitozanu i żelatyny, przeznaczony do stosowania w kontrolowanym, powolnym uwalnianiu linkomycyny i ułatwiający jej biodegradację	nieokreślone	mikrosfery	2016	CN 201610158149 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	przygotowanie nanocząstek składających się z karboksymetylochitozanu i cyklodekstryny w celu poprawy biodostępności antocyjanów	nieokreślone	nanocząstki	2017	CN 201710486749 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	sposób przygotowania błon żelowych składających się z chitozanu i aptamerów	nieokreślone	żel, błona	2017	CN 201710700370 A
materiałoznawstwo, biomedycyna	metoda funkcjonalizacji mikrosfer chitozanowo-alginianowych czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów lub czynnikiem martwicy tkanek	nieokreślone	mikrosfery	2018	CN 201610715801 A
materiałoznawstwo, chemia	elektroaktywny kompozyt na bazie chitozanu kopolimeryzowany z pirolem lub aniliną	nieokreślone	polimer, kompozyt	2014	CN 201410037627 A

materiałoznawstwo, chemia	przygotowanie kompozytu chitozanowo-poliakrylamidowego w postaci przewodzącego hydrożelu	nieokreślone	hydrożel	2020	CN 201911059652 A
materiałoznawstwo, chemia	przygotowanie usieciowanego materiału chitozanowego	nieokreślone	hydrożel	2020	CN 202010454913 A
materiałoznawstwo, chemia	metoda jednonaczyniowej syntezy przewodzącego, kompozytowego hydrożelu składającego się z chitozanu rozpuszczonego w tlenku grafenu, polianiliny i poliakrylamidu	nieokreślone	hydrożel	2020	CN 201911059662 A
materiałoznawstwo, chemia	przygotowanie biodegradowalnej i antybakteryjnej folii poliuretanowej z chitozanu i oleju roślinnego	nieokreślone	folia	2019	CN 201811141047 A
materiałoznawstwo, chemia	metoda przygotowania wysoce wydajnej żywicy czyszczącej poprzez deacetylację chityny do chitozanu	nieokreślone	żywica	2017	CN 201710201231 A
materiałoznawstwo, ochrona środowiska	przygotowanie pochłaniacza metali ciężkich składającego się z koloidów chitozanu i tlenku tytanu	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201811171208 A
materiałoznawstwo, technologia żywności	przygotowanie nanoemulsji na bazie chitozanu z goździkowym olejkim eterycznym w celu przedłużenia okresu przydatności olejku	nieokreślone	nanoemulsja	2021	CN 202011369301 A
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie farmaceutycznie aktywnych granulek oligomerów chitozanu jako nośnika pochodnych kurkuminy	nieokreślone	granulki	2018	CN 201810524150 A
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie mikrosfer kompozytowych z nanorurek lenzynitu i chitozanu do dojelitowego przedłużonego uwalniania kwasu chlorogenowego	nieokreślone	mikrosfery	2019	CN 201910870576 A
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie kompleksu chitozanowo-fosforanowego do stosowania jako suplement wapnia	nieokreślone	nieokreślone	2018	CN 201810576143 A
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie farmaceutycznie czynnej formułacji aerozolu składającej się z czwartorzędowej soli amonowej chitozanu i olejków eterycznych	nieokreślone	aerozol	2015	CN 201410567704 A
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie formułacji hydrożelu do wstrzykiwań zawierającego cyklodekstrynę i chitozan umożliwiającą powolne i kontrolowane uwalnianie leku	nieokreślone	nieokreślone	2017	CN 201710407575 A

materiałoznawstwo, farmacja, biomedycyna	zastosowanie oligosacharydów chitozanowych w celu zmniejszenia ryzyka zawału mózgu i śmierci neuronów w przypadkach niedokrwienia	nieokreślone	nieokreślone	2017	CN 201710384863 A
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie farmaceutycznie aktywnych nanocząstek chitozanu w kompleksach z ryfamycyną/izoniazidem i tymopentyną	nieokreślone	nanocząstki	2017	CN 201710388148 A
materiałoznawstwo, farmacja	przygotowanie farmaceutycznie aktywnego, antibakteryjnego hydrożelu poprzez usieciowanie środka przeciwnowotworowego z chitozanem	nieokreślone	hydrożel	2017	CN 201710599062 A

Tabela 10.3: Wykaz patentów sklasyfikowanych w kategorii biotechnologia.

Dziedzina	Przeznaczenie	Źródło materiału chitynowego	Początkowa lub końcowa forma materiału chitynowego	Rok	Numer patentu
biotechnologia, farmacja	przygotowanie chitozanu poddanego nieprzypadkowej deacetylacji poprzez poddanie jednostki poli-D-glukozaminy działaniu enzymu deacetylazy chityny	nie dotyczy	materiał polimerowy z powtarzającymi się jednostkami D-glukozaminy	2019	WO 2019/242847 A1
biotechnologia, materiałoznawstwo	wykorzystanie kwaśnego roztworu chitozanu do ekstrakcji i oczyszczania białek mleka poprzez wytrącanie	grzyby	kwaśny roztwór	2020	WO 2020/053661 A1
biotechnologia	wykorzystanie chitozanu jako środka do ekstrakcji jonów metali z roztworów stosowanych podczas separacji kwasów nukleinowych z mikroorganizmów	nieokreślone	cząsteczki	2011	WO 2011/055266 A2
biotechnologia	wykorzystanie azotanu chitozanu, który może być metabolizowany przez bakterie w okrężnicy, tkance śluzowej lub skórze w celu wytworzenia tlenu azotu do celów farmaceutycznych lub kosmetycznych	nieokreślone	preparat farmaceutyczny	2020	WO 2020/197385 A1
biotechnologia	przygotowanie odwodnionych nanocząstek chitozanu i siRNA o ulepszonych właściwościach przechowywania, stosowane w metodach przesiewowych lub inżynierii tkankowej	nieokreślone	nanocząstka chitozanu/RNA w postaci końcowej	2010	EP 08758308 A
biotechnologia	plastyczna hodowla komórek do stosowania w inżynierii tkankowej	nieokreślone	hydrożel chitozanowy	2012	EP 04812547 A

biotechnologia	wykorzystanie deacetylazy i aminokwasów do kodowania białka	nieokreślone	nieokreślone	2014	EP 08784498 A
biotechnologia, przetwórstwo spożywcze	hamowanie namnażania się mikroorganizmów lub patogenów powodujących psucie się produktów spożywczych	komercyjne	hydrolizowany chitozan	2007	EP 03742479 A
biotechnologia, farmacja	zapobieganie lub leczenie oporności wielolekowej	nieokreślone	nieokreślone	2017	CA 2743585 A
biotechnologia	przyspieszenie reakcji enzymatycznej	komercyjne	produkt jadalny, pochodna bursztynianu chitozanu	2019	RU 2018142931 A
biotechnologia	antybiotyki przeciwko bakteriom wielolekoopornym	komercyjne	micele	2020	US 201916247061 A
biotechnologia	produkcja antygenów ze ścian komórek bakteryjnych, stosowanych w leczeniu przewlekłych chorób zapalnych	nieokreślone	nieokreślone	2021	RU 2020121925 A
biotechnologia	biokataliza z wykorzystaniem deoksyrybozylotransferazy nukleozydowej unieruchomionej na magnetycznych cząsteczkach chitozanu do syntezy nukleozydów	komercyjne	cząsteczki	2013	ES 201200390 A
biotechnologia	hodowane skafoldy komórkowe do stosowania jako implanty	nieokreślone	termoczuły hydrożel	2012	PL 39300710 A
biotechnologia	odpowiedź komórkowa	nieokreślone	nanosfery	2002	NZ 50587699 A
biotechnologia	chitozan i utleniona celuloza do gojenia ran	komercyjne	proszek w postaci początkowej	2012	CA 2499498 A
biotechnologia	określanie potencjału antibakteryjnego chitozanu	nieokreślone	roztwór	2013	RU 2012105889 A
biotechnologia	zagęszczanie próbki DNA przy łatwym przygotowaniu próbki	nieokreślone	mikrocząsteczki	2018	EP 16797400 A
biotechnologia	kontrola infekcji grzybiczych u roślin	komercyjne	chitooligo- lub chitopoli-sacharydy	2019	US 201314437530 A
biotechnologia	wytwarzanie heterogenicznego żelu papainowego	komercyjne	jadalna matryca, bursztynian chitozanu	2020	RU 2019106572 A
biotechnologia	materiał hydrożelowy o właściwościach przeciwzapalnych i antibakteryjnych, do leczenia ran	nieokreślone	proszek w postaci początkowej	2019	RU 2019104336 A
biotechnologia	otrzymywanie materiału żelowego o aktywności kolagenazy	komercyjne	jadalny materiał	2020	RU 2018142755 A

biotechnologia	sposób wytwarzania kompleksu chitozan-melanina	muchy	biopolymer	2020	RU 2019144495 A
biotechnologia, biomedycyna	odbudowa szkliwa poprzez odbudowę warstwy ochronnej na zdemineralizowanej zębinie	nieokreślone	hydrożel	2018	US 201615202882 A
biotechnologia, chemia	czwartorzędowe pochodne chitozanu, które mogą tworzyć hydrożelową matrycę o właściwościach przeciwbakteryjnych, służącą do powlekania i ochrony wyrobów medycznych	komercyjne	proszek w postaci początkowej, hydrożel w postaci końcowej	2012	EP 09847352 A
biotechnologia, farmacja	wytwarzanie szczepionki wzmacniającej odpowiedź immunologiczną	nieokreślone	pochodna zasady Schiffa	2018	EA 201590829 A
biotechnologia	przygotowanie hydrolizatów chitozanu przy użyciu chitozanazy wyizolowanej z <i>Thermoactinomyces sp.</i> i 10-70% acetylowanego polimeru chitozanu	komercyjne	hydrolizaty polimeru chitozanu	1994	WO 1994/005778 A1
biotechnologia	wykorzystanie chitozanu jako czynnika adhezyjnego komórek do wzrostu in vitro kultur neuronów 2D	komercyjne	roztwór, powłoka	2020	WO 2020/128703 A1
biotechnologia	przygotowanie czujnika bakterii patogennych składającego się z nanocząstek złota, nanorurek węglowych i chitozanu, w którym makrofagi myszy obciążone nanocząstkami magnetycznymi służą jako element detekcyjny	nieokreślone	nieokreślone	2016	CN 201510945115 A
biotechnologia	zastosowanie chitozanu z dodatkiem <i>Bacillus subtilis</i> jako środka dezynfekującego	nieokreślone	płyn do rozpylania	2019	CN 201910254330 A

Tabela 10.4: Wykaz patentów sklasyfikowanych w kategorii chemia.

Dziedzina	Przeznaczenie	Źródło materiału chitynowego	Początkowa lub końcowa forma materiału chitynowego	Rok	Numer patentu
chemia, rolnictwo	przygotowanie zawiesiny chlorowodoru chitozanu w mieszaninie cieczy polarnej i wody jako stabilnej formy chitozanu w stanie ciekłym	komercyjne	zawiesina, proszek, błona	2021	EP 3892675 A1
chemia, kosmetyki	przygotowanie wypełniacza skórniego sprzężonego z jonami cytrynianowymi	nieokreślone	granulki	2011	WO 2011/124380 A1

chemia, kosmetyki, farmacja	metoda przygotowania koniugatów polimerowych chitozanu i tioamidyny o ulepszonych właściwościach żelujących i reologicznych	nieokreślone	materiał polimerowy	2003	WO 2003/020771 A1
chemia, inżynieria	metoda przygotowania czujnika wilgotności składającego się z chlorku kobaltu (II), chitozanu i urządzenia przepływu bocznego	nieokreślone	warstwa lub powłoka	2008	WO 2008/011928 A1
chemia, materiało- znawstwo, technologia żywności	przygotowanie kapsułek składających się z membran chitozanowo-lipidowych do enkapsulacji małych związków aromatycznych	nieokreślone	membrany; kapsułki typu olej w wodzie lub woda w oleju	2011	WO 2011/101415 A1
chemia	przygotowanie stabilnego polielektrolitowego roztworu chitozanu	pancerz krewetki	roztwór	2001	WO 2001/055220 A1
chemia, materiało- znawstwo	przygotowanie mikrokrystalicznego chitozanu o jednorodnych właściwościach przy użyciu ciągłego procesu produkcyjnego opartego na wytrącaniu chitozanu z systemu pojedynczej partii	nieokreślony	dyspersja mikrokrystaliczna	1991	WO 1991/000298 A1
chemia, materiało- znawstwo	przygotowanie chitozanu o wyjątkowo jednorodnych właściwościach	krewetka	forma suszona	1991	WO 1991/005808 A1
chemia	produkcja chitozanu z naturalnie występujących materiałów zawierających chitynę	chityna	białe płatki chitozanu w postaci końcowej	2017	EP 09721317 A
chemia	przyspieszenie i uproszczenie produkcji Antyseptycznego Stymulatora Dorogowa (ASD) w kapsułkach chitozanowych	nieokreślone	nanokapsułki	2018	RU 2016124774 A
chemia	przyspieszenie i uproszczenie produkcji antocyjanów z czerwonej kapusty przy użyciu kapsułek chitozanowych	nieokreślone	nanokapsułki	2020	RU 2020108207 A
chemia	stabilny, termoczuły hydrożel, który może być stosowany jako środek bioadhezyjny do użytku medycznego	nieokreślone	nieokreślone	2015	AU 2011/381641 A
chemia	środek przeciwpasożytniczy lub przeciwgrzybiczy	komercyjne	hydrofilowe nanocząstki	2018	EP 14790240 A
chemia	artykuły chemiczne dla motoryzacji i gospodarstwa domowego	nieokreślone	nanokompozyty metalu	2015	PL 38515308 A
chemia	zapobieganie tworzeniu się kompleksów polielektrolitowych pomiędzy glikolem chitozanowym a kwasem hialuronowym poprzez regulację pH	komercyjne	kompleks chitozanu z kwasem hialuronowym	2016	EP 05751911 A
chemia	substancja wiążąca odpowiednia jako nośnik dla produktów leczniczych	komercyjne	mieszanka chitozanu z polisacharydem	2016	EP 07728579 A

chemia	biokompatybilne i biodegradowalne kompozyty taniny i chitozanu do stosowania w dostarczaniu leków, zastosowaniach przeciwbakteryjnych, gojeniu ran, inżynierii tkankowej, jako adiuwant	komercyjne	kompozyt chitozanu i taniny	2017	US 201314139081 A
chemia	biodegradowalny materiał izolacyjny, adsorbent, nośnik leków, katalizator	nieokreślone	aerożel	2018	PL 41787316 A
chemia	kompleks chitozan-białk do stosowania w gojeniu ran oraz jako nośnik leków, kosmetyków i artykułów spożywczych	nieokreślone	biopolimer	2016	PL 40007812 A
chemia	składnik węglowodanowy do stosowania w dostarczaniu leków, miękkich soczewkach kontaktowych, implantach, immobilizacji enzymów	komercyjne	nieokreślone	2015	US 201113052463 A
chemia	polimery węglowodanowe do rozpuszczania leków hydrofobowych	komercyjne	środek polimerowy	2019	EP 03748286 A
chemia	modyfikacja chemiczna chitozanu zwiększająca jego reaktywność aminową	nieokreślone	nieokreślone	2011	EP 02779062 A
chemia	ochronna matryca dla preparatów medycznych, kosmetycznych, spożywczych lub rolniczych	nieokreślone	aerozol	2016	PL 40369713 A
chemia	zawiesina chitozanu i srebra do zastosowań przeciwbakteryjnych	nieokreślone	nanocząstki	2017	PL 41012614 A
chemia	poходna chitozanu o wysokiej zdolności rozdzielczej enancjomerów stosowana jako faza stacjonarna w HPLC	komercyjne	żywica modyfikowana chemicznie	2008	EP 06732509 A
chemia	cienkie włókno chitozanowe stosowane w opatrunkach na rany, hodowli tkanek, materiałach nietkanych	nieokreślone	nieokreślone	2013	RU 2011131959 A
chemia	nanonośnik chitozanowy skoniugowany z substancją fotoczułą do terapii fotodynamicznej (PDT) i internalizacji fotochemicznej (PCI)	nieokreślone	nieokreślone	2014	AU 2013/279748 A
chemia	produkcja oligosacharydów chitozanu przy użyciu degradacji mikrofalowej	nieokreślone	oligosacharydy chitozanu o niskiej masie cząsteczkowej	2010	US 56029603 A
chemia	przygotowanie chitozanu z chityny	krewetki	nieokreślone	2009	EP 02745687 A
chemia	preparaty powłokowe zdolne do samoregeneracji właściwości pod wpływem promieniowania UV	komercyjne	chitozan podstawiony tlenkiem cyklicznym	2014	US 72299410 A
chemia	kompleks z siRNA do dostarczania leków	komercyjne	sprzężony chitozan	2014	US 201013496170 A
chemia	soczewki kontaktowe z opatrunkiem rogówkowym	komercyjne	glutaminian chitozanu w postaci początkowej; reacetylowany chitozan w postaci końcowej	1993	NZ 24045191 A

chemia	usieciowane kulki chitozanu o zwiększonej specyficzności wiązania podczas rozdziału w procesach chromatograficznych	nieokreślone	kulki hydrożelowe	1998	AU 1998/065520 A
chemia	wykrywanie rozpuszczonego tlenu za pomocą czujnika elektrochemicznego	nieokreślone	matryca; kompozyt nanocząstek złota	2015	IN 3150DE2013 A
chemia	materiały emboliczne dostarczane do miejsca docelowego w postaci płynnej lub żelowej	komercyjne	karboksymetylochitozan	2015	US 201213720135 A
chemia	emulgator w niejonowej lub kationowej emulsji wodnej zawierającej bitumiczny lub niebitumiczny klej	komercyjne z pancerzy krewetek	funkcjonalizowany oligomer	2021	EP 20183480 A
chemia	maty włókniste stosowane jako filtry	komercyjne	nanowłókno	2015	US 59811208 A
chemia	nieulegające wytrąceniu, jednorodne hydrożele, przydatne w wiskosuplementacji, dostarczaniu leków lub jako macierz zewnątrzkomórkowa	nieokreślone	hydrożel	2020	EP 20172421 A
chemia	ulepszone i selektywne właściwości antibakteryjne do stosowania w środkach bakteriostatycznych	nieokreślone	związek chitozanu i argininy	2020	EP 07749237 A
chemia	poprawa właściwości protez naczyniowych, biogodności i aktywności przeciwdrobnoustrojowej	nieokreślone	nanocząstki	2015	CZ 2013964 A
chemia	generowanie protonów in situ w obecności mieszaniny wodnej o ulepszonych właściwościach rozpuszczających	pancerz kraba, pancerz krewetki	chitozan stały w postaci końcowej	2012	US 85209810 A
chemia	zwiększenie stabilności układów koloidalnych stosowanych w zastosowaniach medycznych	chityna	hydrożel	2014	EP 11716396 A
chemia	materiały biologiczne lub wypełniacze do wstrzykiwań, stosowane w regeneracji tkanek	nieokreślone	roztwór wodny	2019	EP 16721203 A
chemia	formowalny hydrożel N-acylchitozanowy do wstrzykiwań, do implantów ciała	nieokreślone	roztwór w postaci początkowej, pochodna N-acylchitozanu w postaci końcowej	2015	CA 2622342 A
chemia	przygotowanie biodegradowalnego chitozanu zachowującego integralność o zmniejszonej rozpuszczalności	nieokreślone	blona	2018	RU 2017127781 A
chemia	produkcja bezpiecznej wody pitnej poprzez oczyszczanie	nieokreślone	kompleks chitozanu z solą cyrkonu	2018	NO 20161973 A
chemia	chitozan niskocząsteczkowy uzyskiwany w uproszczonym i krótkim procesie	nieokreślone	oligomery o niskiej masie cząsteczkowej	2019	RU 2018131225 A

chemia	wytwarzanie czystego, rozpuszczalnego w wodzie chitozanu	nieokreślone	chitozan o wysokiej czystości	2008	US 48937904 A
chemia	metalowe nośniki katalizatorów, żywice jonowymienne do ekstrakcji jonów	nieokreślone	usieciowane granulki	2016	RU 2015125829 A
chemia	adsorpcja jonów metali przez chitozan o dużej porowatości, który wykazuje zwiększone powinowactwo wiązania	nieokreślone	kompleks chitozanu z eterem dibenzokoronowym	2013	EP 11171632 A
chemia	metoda wytwarzania membrany chitozanej z nanocząstkami nieorganicznymi	nieokreślone	kompleks membrany z nanocząstkami	2006	US 46010803 A
chemia	kompleks chitozanu i kwasu tłuszczowego połączony amidem do doustnego podawania insuliny	komercyjne	cząsteczki	2017	US 201615378017 A
chemia	mikroporowaty sorbent odporny na kwasy i degradację promieniowaniem beta i gamma	komercyjne	chitozan usieciowany aldehydem glutarowym	2019	CA 2830434 A
chemia	mikroporowate sorbenty zawierające nanocząstki pierwiastka o wysokiej liczbie atomowej	komercyjne	kompozyt chitozanowo-glutaraldehydowy	2019	CA 3095151 A
chemia	wielofunkcyjny poli(tlenek alkilenu), usieciowany z chitozaniem i monofunkcyjnym poli(tlenkiem alkilenu), tworzący hydrożel do dostarczania leków, chirurgiczny środek uszczelniający, system dostarczania środków do obrazowania medycznego, opatrunek na rany, leczenia blizn	komercyjne	materiał polimerowy	2001	AU 2001/012490 A
chemia	nanokompozyt o ujemnym ładunku powierzchniowym, przydatny w hodowli komórek, dostarczaniu leków, jako środek kontrastowy	nieokreślone	nanokompozyt	2018	PL 42061417 A
chemia	uzyskiwanie chitozanu o wysokim stopniu deacetylacji i wysokiej masie cząsteczkowej przy użyciu prostego procesu o niskich kosztach energetycznych	gladius kałamarnicy	nieokreślone	2020	EP 18799830 A
chemia	przygotowanie roztworu chitozanu i soli metali wielowartościowych do analizy miareczkowej kompleksometrycznej	komercyjne	żel	1995	CZ 258694 A
chemia	materiał porowaty do stosowania jako filtr lub środek antybakteryjny	komercyjne	pochodne hydrofobowe lub hydrofilowe	2020	EP 20164396 A
chemia	przygotowanie chitozanu o wysokim stopniu deacetylacji	gladius kałamarnicy	nieokreślone	2016	EP 15153107 A
chemia	modyfikacja chitozanu przydatna w zastosowaniach farmaceutycznych, redukcji tkanki tłuszczowej, opatrunkach hemostatycznych	komercyjne	nieokreślone	2016	US 201314374948 A
chemia	produkcja modyfikacji pochodnych polisacharydów z łańcuchami fluoropolieteryowymi do stosowania jako powłoka ochronna	komercyjne	nieokreślone	2017	US 201314652093 A
chemia	produkcja nanominiaturyzowanego chitozanu do zwiększenia biokompatybilności	nieokreślone	żel koloidalny	2012	US 31855008 A

chemia	produkcja kleju, który można wytworzyć in situ lub przygotować wcześniej	nieokreślone	substancja adhezyjna	2014	US 201213463280 A
chemia	produkcja chitozanu o wysokim stopniu deacetylacji	biomasa pochodzenia grzybowego	chitozan o wysokiej czystości	2009	US 50957004 A
chemia	produkcja polimerowego, biokompatybilnego produktu przy użyciu prostego i ekologicznego procesu	komercyjne	mikrorurki chitozanu w postaci końcowej	2015	RU 2014115325 A
chemia	produkcja chitozanu o obniżonej zawartości endotoksyn, do zastosowań biomedycznych	skorupiaki	nieokreślone	2017	US 201414572749 A
chemia	produkcja nanocząstek srebra stosowanych jako środek przeciwbakteryjny	nieokreślone	nieokreślone	2019	RU 2019116305 A
chemia	produkcja rozpuszczalnego chitozanu o wysokiej masie cząsteczkowej	nieokreślone	nieokreślone	2018	US 201715413942 A
chemia	matryca biopolimerowa o wysokiej biodostępności, zdolności kompleksowania i hydrofilowości w postaci farmaceutycznie akceptowalnej	chityna	pochodna bursztynianu chitozanu	2019	RU 2018141734 A
chemia	selektywny adsorbent do usuwania związków z cieczy	komercyjne	usieciowany chitozan	2015	US 71442310 A
chemia	jednoetapowy proces produkcji kriożelowego chitozanu, który jest stabilny w szerokim zakresie pH	nieokreślone	materiał porowaty	2019	RU 2019116338 A
chemia	stabilizowane nanocząstki odporne na agregację, do stosowania w dostarczaniu leków	nieokreślone	nanocząstki	2020	RU 2019129326 A
chemia	stabilne, biologicznie aktywne nanocząstki chitozanu	nieokreślone	nanocząstki	2020	RU 2019129512 A
chemia	termoczuła pochodna stosowana do funkcjonalizacji chitozanu, przydatna w preparatach biomedycznych, farmaceutycznych lub kosmetycznych	nieokreślone	nieokreślone	2011	EP 08804024 A
chemia	pochodne tiolaktonu chitozanu do stosowania jako materiał do dostarczania leków lub powłoka wyrobów medycznych	nieokreślone	nieokreślone	2014	ES 201300228 A
chemia	poprawa zdolności adsorpcji metali ciężkich przy użyciu nanocząstek magnetycznych	nieokreślone	włókno	2011	TW 97127205 A
chemia	ochrona przed korozją metali i hamowanie tworzenia się hydratów gazowych	komercyjne	sulfonowany chitozan	2020	RU 2020116187 A
chemia	eliminacja zabarwienia ścieków	komercyjne	płatki	2011	ES 200901314 A
chemia, biomedycyna	aktywowana kompozycja polimerowa zawierająca osocze bogatopłytkowe (PRP), roztwór chitozanu, sól i aktywator do regeneracji tkanek	nieokreślone	kwaśny roztwór	2011	CA 2814784 A

chemia, biomedycyna	chitozan funkcjonalizowany hydrofilowym poliolem i arginina o zwiększonej skuteczności transfekcji, do dostarczania kwasów nukleinowych	nieokreślone	nanocząstki	2018	AU 2014/328439 A
chemia, biomedycyna	usieciowany kopolimer do dostarczania leków lub regeneracji tkanek	komercyjne	hydrożel	2017	HK 16109760 A
chemia, biomedycyna	nośnik wykazujący wysoki wskaźnik osadzania się na końcówkach włosów	komercyjne	sól fenyloalaniny i chitozanu	2019	US 201615572359 A
chemia, biomedycyna	inaktywacja endotoksyn, ochrona powierzchni nanocząstek	komercyjne	materiał zwitterjonowy	2018	US 201615345870 A
chemia, biomedycyna	żel wykonany z wysoko acetylowanego chitozanu, przydatny jako szczepionka, środek gojący rany, środek do dostarczania leków, podłoże do hodowli komórek, kosmetyk, lubrykant, klej, dodatek do żywności	chityna	wiskoelastyczny hydrożel chitozanowy w postaci końcowej	2010	MX 2010004836 A
chemia, biomedycyna	prosta, szybka metoda wytwarzania powłoki do implantów twardych tkanek, w której można kontrolować grubość, morfologię i przyczepność	nieokreślone	kompozyt	2019	RS P20150785 A
chemia, biomedycyna	leczenie owrzodzeń błony śluzowej lub przewodu pokarmowego, gojenie ran	nieokreślone	nieokreślone	2019	EP 11766639 A
chemia, bio- technologia	przyspieszenie inwolucji lub zapobieganie zakażeniom wewnątrzsukowym	komercyjne	hydrożel	2018	AU 2017/233727 A
chemia, bio- technologia	kontrolowanie populacji mikroorganizmów u zwierząt i ludzi	nieokreślone	kompleks chitozanu i argininy	2014	AU 2013/211460 A
chemia, bio- technologia	hamowanie wzrostu bakterii u zwierząt	nieokreślone	kompleks chitozanu i argininy	2015	EP 09756103 A
chemia, bio- technologia	żel do implantacji w celu regeneracji chrząstki szklistej	grzyby	proszek w postaci początkowej, hydrożel w postaci końcowej	2016	CA 2969285 A
chemia, bio- technologia	leczenie zakażeń gronkowcem złocistym opornym na metycylinę	nieokreślone	nieokreślone	2015	US 54158409 A
chemia, kosmetyki	poprawa kondycji włosów	komercyjne	nieokreślone	2017	EP 08803034 A
chemia, kosmetyki	tymczasowe kształtowanie włókien keratynowych	komercyjne	nieokreślone	2017	EP 10776320 A
chemia, materiało- znawstwo	dostosowanie właściwości tektury i artykułów papierniczych za pomocą powłoki chitozanowej	grzyby	warstwa	2018	US 201615207021 A

chemia, materiało- znawstwo	substancje biokompatybilne stosowane jako nośniki genów o wysokiej skuteczności i niskiej toksyczności w transfekcji genów	komercyjne	nanocząstki	2016	EP 14184168 A
chemia, materiało- znawstwo	eliminacja heparyny z płynów fizjologicznych przy użyciu kationowej genipiny usieciowanej chitozanem	komercyjne	nieokreślone	2019	EP 09773814 A
chemia, materiało- znawstwo	zastosowanie halogenowanego chitozanu do filtracji wody pitnej, regeneracja wody w okresach stagnacji	krewetki	nieokreślone	2015	US 201113053939 A
chemia, materiało- znawstwo	tekstylna medyczna zawierająca antybakteryjne włókna wiskozowe	chityna z pancerzy krewetek lub krabów	materiał tekstylny	2014	US 201213566550 A
chemia, materiało- znawstwo	przygotowanie wydrążonych sfer wykonanych z amfifilowych pochodnych chitozanu, do zastosowań medycznych	komercyjne	nieokreślone	2012	US 37988009 A
chemia, materiało- znawstwo	produkcja usieciowanych polimerów stosowanych w detergentach, dodatkach, dostarczaniu leków, materiałach chłonnych	nieokreślone	żel	2010	US 9194005 A
chemia, materiało- znawstwo	materiał przylegający do skóry, chłonny, dopasowujący się do kształtu ciała i elastyczny, stosowany jako opatrunek, nośnik leków lub w urządzeniach protetycznych	komercyjne	żel	2002	AU 2001/059601 A
chemia, farmacja	zastosowanie chitozanu modyfikowanego katecholem w celu zapobiegania krwawieniu podczas iniekcji	komercyjne	nieokreślone	2019	EP 16773515 A
chemia, farmacja	przedłużone ciągle uwalnianie leku, przydatne w chemioterapii nowotworów dzięki zwiększonej specyficzności wobec tkanki nowotworowej	nieokreślone	agregaty w roztworach wodnych	2006	EP 02758920 A
chemia, farmacja	przedłużenie czasu uwalniania leku, zwiększenie selektywności wobec tkanki nowotworowej, zwiększenie zawartości leku, przydatne w chemioterapii przeciwnowotworowej	nieokreślone	nieokreślone	2017	EP 06702900 A
chemia, farmacja	ogólnoustrojowe i miejscowe dostarczanie środków w jamie ustnej	nieokreślone	nanocząstki	2015	AU 2014/218717 A
chemia, farmacja	leczenie chorób związanych z wolnymi rodnikami	nieokreślone	nieokreślone	2006	US 30176605 A
chemia, materiało- znawstwo, biomedycyna	biokompatybilny hydrożel, błona, spray lub gaza przydatne w inżynierii tkankowej	nieokreślone	nieokreślone	2018	US 201715587064 A

chemia	izolacja chitozanu z grzybów (<i>Rhizopus oryzae</i> i <i>Aspergillus niger</i>)	grzyby	roztwór wodny; cząsteczki o wielkości 10-100 μm	2015	WO 2015/085429 A1
chemia	przygotowanie chitozanu sprzężonego z związkami siarkoorganicznymi (kwasy nukleinowe, polipeptydy) lub resztami glikolu polietylenowego	komercyjne	substancja stała/proszek w postaci końcowej	2016	WO 2016/101068 A1
chemia	przygotowanie chitozanu o niskiej masie cząsteczkowej poprzez wysalanie	komercyjne	proszek	2005	WO 2005/066213 A1
chemia, biomedycyna	przygotowanie powłok do gojenia ran wykonanych z chitozanu, który jest usieciowany wiązaniem zasady Schiffa z kwasem hialuronowym zmodyfikowanym L-amino-3,3-dietoksy-propanem	komercyjne	substancja stała lub roztwór; hydrożel i powłoka	2014	WO 2014/161085 A1
chemia, technologia żywności, farmacja	wykorzystanie chitozanu jako adsorbentu w produktach spożywczych w celu zmniejszenia ilości niezdrowych składników chemicznych w żywności dostających się do przewodu pokarmowego; wykorzystanie chitozanu jako nośnika leków i do przedłużonego uwalniania leków	nieokreślone	nieokreślone	2004	WO 2004/068971 A1
chemia	przygotowanie pochodnych N-karboksymetylo-chitozanu do zastosowań kosmetycznych i farmaceutycznych	krewetki	nieokreślone	2005	WO 2005/070971 A1
chemia	przygotowanie kompleksów kationowego chitozanu (stopień deacetylacji 35-49% i średnia masa molowa 55-150 kDa) oraz anionowych polisacharydów jako stabilnych w wodzie zawiesin cząstek	komercyjne	cząsteczki, zawiesina	2012	WO 2012/013895 A1
chemia	metoda deacetylacji chityny do chitozanu w łagodnych roztworach zasadowych poprzez przygotowanie zawiesiny chityny w roztworach alkoholowych	pancerze krewetek	nieokreślone	1990	WO 1990/004608 A1
chemia	metoda przygotowania N,N,N-trimetylowego chitozanu o niskim stopniu O-alkilowania	nieokreślone	nieokreślone	2020	WO 2020/039463 A1
chemia	metoda przygotowania PEGylowanego chitozanu znakowanego peptydem	komercyjne	materiał polimerowy	2017	WO 2017/079830 A1
chemia	przygotowanie soli chitozanu, które są dyspersyjne lub rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak DMSO, DMA, DMF, glikol etylenowy, kwas mrówkowy, metanol, kwas trifluorooctowy	komercyjne – pancerze krewetek	folia, włókno, proszek, żel	2008	WO 2008/141452 A1
chemia, rolnictwo	przygotowanie powłoki ochronnej dla świeżych produktów, składającej się z chitozanu, glikolu polietylenowego i mieszaniny środków powierzchniowo czynnych	nieokreślone	wodny roztwór	2011	WO 2011/073115 A1

chemia, biomedycyna, kosmetyka, farmacja	przygotowanie N-metylopirolidonu chitozanu jako środka gojącego rany, wspomagającego regenerację tkanki łącznej; jako preparaty kosmetyczne i farmaceutyczne.	skorupiaki	żel, proszek, błona, powłoka	1992	WO 1992/009635 A1
chemia, biomedycyna, farmacja	przygotowanie dwuskładnikowego roztworu polimerowego chitozanu zawierającego polimer chitozanu i roztwór soli w celu utworzenia kompatybilnej z komórkami, niewytrącającej formuły do stosowania w regeneracji tkanek i dostarczaniu środków terapeutycznych	nieokreślone	roztwór	2011	WO 2011/060553 A1
chemia, kosmetyki	metoda N-acetylacji (ponownej acetylacji po deacetylacji) chitozanu do stosowania w detergentach w postaci „dawek jednostkowych”	komercyjne	nieokreślone	2009	WO 2009/095816 A1
chemia, materiało- znawstwo	przygotowanie chitozanu z grzybów przy użyciu zasadowego roztworu i temperatury, do stosowania jako środek odwadniający i flokulujący w oczyszczaniu ścieków	grzyby	nieokreślone	2021	WO 2021/136882 A1
chemia, farmacja	przygotowanie N-karboksyalkilokarbonylochitozanu lub N-karboksyalkilochitozanu w połączeniu z peptydem lub aminokwasem jako substancją czynną przeciwko nowotworom złośliwym	nieokreślone	nieokreślone	1998	WO 1998/011903 A1
chemia, farmacja	przygotowanie kompleksów chitozanu i kwasu nukleinowego o właściwościach kwasowych (pH 3,8–4,2) do stosowania jako środki terapeutyczne podawane przez nabłonek śluzowy	nieokreślone	nanocząstki	2010	WO 2010/111787 A1
chemia	przygotowanie oligosacharydu chitozanu przy użyciu nadkrytycznego dwutlenku węgla	nieokreślone	proszek, mikrocząstki	2019	CN 201811469178 A
chemia	przygotowanie biozgodnego fluorescencyjnego oligosacharydu chitozanu metodami ekologicznymi i ekonomicznymi	nieokreślone	oligosacharyd	2019	CN 201910662043 A
chemia	metoda wydajnej syntezy karboksylowanego chitozanu o ulepszonych właściwościach fizykochemicznych	nieokreślone	roztwór	2019	CN 201910341460 A
chemia	przygotowanie kopolimeru trzeciej generacji oligosacharydu chitozanu szczepionego akrylanem metylu	nieokreślone	polimer	2018	CN 201810034263 A
chemia	przygotowanie fluorescencyjnego chitozanu jako wskaźnika jonów żelaza	nieokreślone	nieokreślone	2020	CN 201911036068 A
chemia	metoda kopolimeryzacji oligosacharydu chitozanu pierwszej generacji z akrylanem metylu	nieokreślone	nieokreślone	2018	CN 201810033904 A

chemia	katalityczna synteza pochodnej pirymidonu w obecności chitozanu modyfikowanego kwasem sulfonowym	nieokreślone	nieokreślone	2017	CN 201710694845 A
chemia	przygotowanie pochodnej chitozanu w postaci zasady Schiffa o aktywności rolniczej i biomedycznej	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201811569886 A
chemia	przygotowanie tiolowanej pochodnej chitozanu o działaniu przeciwdrobnoustrojowym wobec <i>E. coli</i>	nieokreślone	roztwór	2019	CN 201910321066 A
chemia	metoda enzymatycznej syntezy oligosacharydów chitozanu o wydajności ~91%, których stopień polimeryzacji mieści się w zakresie od 2 do 6	nieokreślone	nieokreślone	2019	CN 201911006775 A
chemia	przygotowanie kopolimeru kwasu polimlekowego modyfikowanego chitozanem	nieokreślone	błona, powłoka	2020	CN 201911212936 A
chemia	przygotowanie wychwytywacza fluoru na bazie chitozanu	nieokreślone	nieokreślone	2014	CN 201410346228 A
chemia	przygotowanie pochodnej wanilinowej chitozanu w celu poprawy rozpuszczalności i aktywności przeciwdrobnoustrojowej	nieokreślone	nieokreślone	2016	CN 201610599981 A
chemia	zastosowanie kompleksu miedziowo-chitozanowego jako katalizatora w syntezie związków borowo-organicznych o działaniu przeciwnowotworowym	nieokreślone	nieokreślone	2017	CN 201610271869 A
chemia	metoda pomiaru stopnia acetylacji chitozanu poprzez miareczkowanie	nieokreślone	nieokreślone	2014	CN 2013085727 W
chemia, rolnictwo	przygotowanie oligosacharydu chitozanu z surowców syntetycznych lub naturalnych, do stosowania jako nawóz	nieokreślone	nieokreślone	2020	CN 202010177249 A
chemia, rolnictwo	przygotowanie preparatu zawierającego aktywny ester i chitozan do ochrony roślin przed różnymi chorobami	nieokreślone	nieokreślone	2015	CN 201510373601 A
chemia, materiało- znawstwo	przygotowanie mikrosfer składających się z glutaraldehydu, polifosforanu i hydroksypropylochitozanu w celu zachowania właściwości dielektrycznych oleju roślinnego	nieokreślone	mikrosfery	2018	CN 201711147416 A
chemia, materiało- znawstwo	przygotowanie hydrofilowego i termicznie stabilnego kopolimeru N-linalolu i chitozanu	nieokreślone	nieokreślone	2020	CN 202010580667 A

chemia	metoda kopolimeryzacji oligosacharydu chitozanu drugiej generacji z akrylanem metylu	nieokreślone	nieokreślone	2018	CN 201810033465 A
--------	--	--------------	--------------	------	-------------------------

Tabela 10.5: Wykaz patentów sklasyfikowanych jako dotyczące zastosowań farmaceutycznych.

Dziedzina	Przeznaczenie	Źródło materiału chitynowego	Początkowa lub końcowa forma materiału chitynowego	Rok	Numer patentu
farmacja	przygotowanie koniugatów nanocząstek chitozanu i siarczanu chondroityny do podawania doustnego i kontrolowanego uwalniania leku	nieokreślone	nanocząstki	2008	WO 2008/119824 A1
farmacja	zastosowanie preparatu chitozan/orlistat w leczeniu zespołu wycieku oleistej treści z odbytu	komercyjne	nieokreślone	2000	WO 2000/009123 A1
farmacja	przygotowanie nośnika na bazie chitozanu do podawania benzodiazepin do jamy nosowej	komercyjne	nieokreślone	2009	WO 2009/027705 A1
farmacja	przygotowanie preparatu przeciwłupieżowego do stosowania miejscowego, składającego się z chitozanu, środka przeciwgrzybiczego i bazy kremowej	nieokreślone	preparat kosmetyczny	2010	WO 2010/109421 A1
farmacja	przygotowanie preparatu przeciwgrzybiczego do stosowania miejscowego z wykorzystaniem mieszaniny chitozanu i klotrimazolu	nieokreślone	preparat farmaceutyczny	2010	WO 2010/119365 A2
farmacja	przygotowanie preparatu do stosowania miejscowego, składającego się z chitozanu, propionianu flutykazonu i bazy kremowej, do leczenia stanów zapalnych skóry	nieokreślone	preparat farmaceutyczny	2010	WO 2010/119366 A2
farmacja	przygotowanie preparatu do stosowania miejscowego, składającego się z chitozanu, propionianu flutykazonu i azotanu mikonazolu oraz bazy kremowej do leczenia infekcji grzybiczych	nieokreślone	preparat farmaceutyczny	2010	WO 2010/119387 A2
farmacja, biomedycyna	przygotowanie systemu dostarczania leków za pomocą nanocząstek chitozanu do leczenia chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera	nieokreślone	nanocząstki	2016	WO 2016/101081 A1

farmacja, materiało- znawstwo	przygotowanie nanocząstek chitozanu modyfikowanych klatryną do dostarczania leków do ośrodkowego układu nerwowego	komercyjne	nanocząstki	2021	WO 2021/032894 A1
farmacja	kontrolowane dostarczanie heparyny przez błonę śluzową	komercyjne	nanocząstki chitozanu i heparyny w postaci końcowej	2007	AU 2006/301162 A
farmacja	leczenie infekcji bakteryjnych skóry i gojenie ran do podawania miejscowego	nieokreślone	nieokreślone	2014	RU 2011146231 A
farmacja	usieczony interpolimer glikolu polietylenowego i chitozanu, stosowany jako system implantacyjny do dostarczania leków	komercyjne (pancerze krabów)	biodegradowalny żel	2014	US 12491605 A
farmacja	system dostarczania leków do mózgu	nieokreślone	nanocząstki	2015	IN 2259DE2013 A
farmacja	powłoka do mikrokapsułek z miceli fosfolipidowych ułatwiająca przenikanie z zadaną prędkością	nieokreślone	mikrokapsułki	2011	RU 2009122169 A
farmacja	zastosowanie koniugatu ginsenozydu i glikolu chitozanu w leczeniu nowotworów	komercyjne	preparat farmaceutyczny	2021	US 202016733840 A
farmacja	kontrolowanie wchłaniania tłuszczów w przewodzie pokarmowym	chitozan pochodzący z grzybów	tabletki	2017	EP 17161955 A
farmacja	kontrolowane uwalnianie leku przy użyciu nieaktywnej matrycy zawierającej substancję farmaceutycznie czynną	nieokreślone	proszek w postaci początkowej	2005	EP 03019532 A
farmacja	kontrolowane uwalnianie leku stosowanego w leczeniu schorzeń otorynolaryngologicznych	komercyjne	chitozan-glicerofosforan w postaci końcowej	2019	US 201615167136 A
farmacja	zastosowanie kurkuminy w połączeniu z alginianem chitozanu w formie gąbki do gojenia ran lub do stosowania miejscowego	nieokreślone	proszek w postaci początkowej, gąbka w postaci końcowej	2015	EP 10832404 A
farmacja	obniżanie ciśnienia krwi	nieokreślone	sól	2008	EP 04715573 A
farmacja	podawanie leku przez błonę śluzową	komercyjne	nieokreślone	2011	EP 05717745 A
farmacja	substancja pomocnicza na bazie chitozanu o poprawionej ściśliwości i sypkości, do wiązania tłuszczu lub jako środek opóźniający uwalnianie	nieokreślone	drobny proszek w postaci początkowej, osad w postaci końcowej	2007	EP 05019082 A

farmacja	opatrunek na rany do pierwszej pomocy w celu opanowania krwotoku zagrażającego życiu	krewetki islandzkie	liofilizowany roztwór	2012	EP 02739871 A
farmacja	nanocząstki żeluz do podawania leków	komercyjne	nanocząstki	2016	US 201213474749 A
farmacja	hemostatyczne kompozycje farmaceutyczne, które nie ulegają degradacji w trudnych warunkach przechowywania	nieokreślone	granulat	2019	TR 201713929 A
farmacja	uodpornianie gatunków ptaków przeciwko chorobom zakaźnym	komercyjne	nieokreślony	2013	EP 09782654 A
farmacja	ulepszona metoda wytwarzania biodegradowalnych preparatów do dostarczania leków	nieokreślone	błona lub gąbka	2017	US 201314771617 A
farmacja	zwiększenie czystości enzymów proteolitycznych w leczeniu ran ropno-martwiczych	komercyjne	chitozan aktywowany aldehydem glutarowym	2017	RU 2016130510 A
farmacja	zwiększenie prędkości gojenia się ran i zapobieganie przywieraniu opatrunku do rany	nieokreślone	kompleks chitozanu i glukanu w postaci końcowej	2010	EP 08835284 A
farmacja	donosowe podawanie białek	komercyjne	preparat do nosa	2008	EP 04743222 A
farmacja	lek, suplement diety, nutraceutyk	nieokreślone	kompozycja zawierająca sól N-acetylocysteiny i chitozanu w postaci końcowej	2017	EP 13723129 A
farmacja	wielowarstwowy przeciwbakteryjny opatrunek na rany	komercyjne	granulat lub matryca	2005	EP 05002336 A
farmacja	nieniszcząca enkapsulacja białek, do zastosowań w dostarczaniu leków	komercyjne	nanożel	2019	EP 15859435 A
farmacja	cząsteczki żelaza i chitozanu do doustnego podawania leków	komercyjne	proszek w postaci początkowej; cząsteczki w postaci końcowej	1998	AU 1997/034814 A
farmacja	zapobieganie lub leczenie refluksu żołądkowo-przełykowego	nieokreślone	nieokreślone	2018	EP 13715452 A
farmacja	system przedłużonego uwalniania płynów do podawania doustnego	komercyjne	roztwór	2008	EP 05003405 A
farmacja	hydrożel o działaniu biologicznym do zastosowań profilaktycznych i terapeutycznych	nieokreślone	proszek	2017	RU 2015152528 A
farmacja	ochrona ściany żołądka przed wchłanianiem kwasu żołądkowego, stosowana w leczeniu zapalenia błony śluzowej żołądka	nieokreślone	żel	2018	EP 16812850 A

farmacja	leczenie podrażnień skóry i oparzeń	nieokreślone	proszek w postaci początkowej, żel hydrofilowy w postaci końcowej	2012	EP 09702300 A
farmacja	stabilne polipleksy, które nie wytrącają się ani nie agregują nawet w wysokich stężeniach	komercyjne	polipleksy chitozanu i kwasu nukleinowego	2017	EP 08833604 A
farmacja	zależny od temperatury, biokompatybilny roztwór żelujący stosowany do podawania leków, klejów tkankowych, opatrunków na rany, wypełniaczy i materiałów kompozytowych do wstrzykiwań, inżynierii tkankowej	komercyjne	proszek w postaci początkowej, roztwór termozelujący w postaci końcowej	2018	EP 07762564 A
farmacja	leczenie zatrzymania krążenia lub reakcji alergicznych	pancerze krabów	nanocząstki	2020	US 201815882399 A
farmacja	leczenie struktur lub tkanek w obrębie gardła, uszu, kończyn dolnych i kręgosłupa	komercyjne	glutaminian chitozanu w postaci początkowej	2014	EP 09735002 A
farmacja	szczepionki przeciwko chorobie meningokokowej i infekcjom	komercyjne	alkilowane pochodne chitozanu w postaci początkowej	2009	EP 03727880 A
farmacja, chemia	enkapsulacja leków hydrofilowych i hydrofobowych z wykorzystaniem chitozanu	komercyjne	amfifilowy materiał	2019	EP 16181923 A
farmacja, kosmetyki	ochrona skóry w przypadku trądziku różowatego	nieokreślone	Chitozan hydroksypropyloowy w postaci początkowej	2016	EP 09761818 A
farmacja, chemia, materiało- znawstwo	zastosowanie nanocząstek/mikrocząstek chitozanu jako granulowanych substancji pomocniczych przylegających do błony śluzowej	komercyjne	nano- i/lub mikrosfery oraz granulki	2008	WO 2008/131506 A1
farmacja	przygotowanie koniugatu chitozanu i ibuprofenu w celu zamaskowania gorzkiego smaku i zapewnienia rozpuszczalności leku w wodzie	nieokreślone	roztwór	2008	WO 2008/095586 A2
farmacja	przygotowanie wodnych form leków hydrofobowych (w szczególności ibuprofenu) poprzez koniugację chitozanu do podawania dożylnego	nieokreślone	roztwór	2008	WO 2008/095587 A1
farmacja	przygotowanie koniugatu chitozanu i ibuprofenu do podawania doustnego i kontrolowanego uwalniania leku	nieokreślone	roztwór	2008	WO 2008/095588 A1

farmacja	zastosowanie hydroksypropylochitozanu jako miejscowego środka tworzącego warstwę ochronną w leczeniu grzybicy paznokci (onychomikozy)	nieokreślone	chitozan pochodna hydroksypropylowa; środek błonotwórczy	2015	WO 2015/036369 A1
farmacja	zastosowanie chitozanu jako materiału adhezyjnego w tkankach błony śluzowej w celu ułatwienia uwalniania i dostarczania substancji czynnych farmaceutycznie	nieokreślone	nanocząstki, struktura micelarna, liposomalna lub krystaliczna	2004	WO 2004/069230 A1
farmacja	zastosowanie glutaminianu chitozanu jako adiuwanta szczepionkowego w połączeniu z antygenami do szczepień śluzówkowych	komercyjne	proszek, mikrosfery	1997	WO 1997/020576 A1
farmacja	zastosowanie soli chitozanowych kwasów karboksylowych lub karboksyamino-kwasów jako adiuwantu szczepionkowego w połączeniu z antygenami wirusa grypy do szczepienia śluzówkowego	komercyjne	nieokreślone	1999	WO 1999/027960 A1
farmacja	przygotowanie przeciwgrzybiczego preparatu okulistycznego na bazie soli chitozanu, który może naśladować łyż, do stosowania w leczeniu zespołu suchego oka	komercyjne	preparat farmaceutyczny, roztwór	2000	WO 2000/030609 A1
farmacja	przygotowanie preparatów przeciwtrądzikowych do stosowania miejscowego, składających się z aktywnego środka farmaceutycznego, chitozanu i bazy kremowej	nieokreślone	preparat kosmetyczny	2010	WO 2010/109420 A1
farmacja	zastosowanie chitozanu jako substancji pomocniczej w przygotowaniu preparatu przeciwgrzybiczego do stosowania miejscowego w połączeniu z aktywnym środkiem farmaceutycznym i steroidami	komercyjne	preparat farmaceutyczny	2010	WO 2010/109423 A1
farmacja	przygotowanie preparatu do stosowania miejscowego składającego się z chitozanu, flutikazonu i klotrimazolu oraz bazy kremowej do leczenia infekcji grzybiczych	nieokreślone	preparat farmaceutyczny	2010	WO 2010/119386 A2
farmacja	przygotowanie preparatu przeciwgrzybiczego do stosowania miejscowego zawierającego chitozan, azotan mikonazolu i bazę kremową do leczenia infekcji grzybiczych	nieokreślone	preparat farmaceutyczny	2010	WO 2010/119368 A2
farmacja	przygotowanie preparatów zawierających chitozan o masie cząsteczkowej od 50 kDa do 350 kDa oraz kwas askorbinowy/winowy w celu zmniejszenia grubości blaszki miażdżycowej i zapobiegania chorobom sercowo-naczyniowym	komercyjne	nieokreślone	2021	WO 2021/094610 A1
farmacja	zastosowanie L-karnityny/chitozanu jako preparatu farmaceutycznego do leczenia zaburzeń metabolizmu lipidów	nieokreślone	substancja stała lub płyn	2001	WO 2001/035944 A2
farmacja	zastosowanie chitozanu i soli do przygotowania płynu do płukania nosa w postaci stałej	nieokreślone	mieszanka farmaceutyczna	2015	WO 2015/082965 A2

farmacja	przygotowanie chitozanu skompleksowanego z DNA kodującym peptyd glukagonopodobny do stosowania w leczeniu cukrzycy	nieokreślone	nanocząstki	2011	WO 2011/140638 A1
farmacja	przygotowanie elektrostatycznych kompleksów chitozanu z kwasami nukleinowymi kodującymi białko terapeutyczne do terapii tolerogennej	komercyjne	nanocząstki	2012	WO 2012/040832 A1
farmacja, biomedycyna	zastosowanie chitozanu do przezskórnego dostarczania hydroksytyrozolu i hydrokortyzonu w leczeniu atopowego zapalenia skóry	nieokreślone	nanocząstka, nanoemulsja	2015	WO 2015/072846 A1
farmacja, chemia	przygotowanie N-(N-acetylocysteiny-)chitozanu lub jego soli jako roztworu oftalmicznego	nieokreślone	roztwór	2018	WO 2018/202783 A1
farmacja, chemia	formuła kompleksów karboksymetyloskrobi i polielektrolitu chitozanu do przedłużonego i długotrwałego uwalniania leku	komercyjne (pancerze krabów)	preparat stały	2012	WO 2012/097447 A1
farmacja, chemia	przygotowanie O-karboksymetylochitozanu i jego zastosowanie jako środka zwiększającego retencję w okulistyce	nieokreślone	roztwór	1997	WO 1997/006782 A1
farmacja, materiało- znawstwo	przygotowanie nanocząstek z chitozanu i cyklodekstryny w celu enkapsulacji interferonów i leczenia chorób ośrodkowego układu nerwowego	nieokreślone	nanocząstka	2020	WO 2020/194034 A1
farmacja, materiało- znawstwo	przygotowanie preparatu chitozanu/lecytyny do adsorpcji kwasów żółciowych i obniżenia poziomu złego cholesterolu	komercyjne	proszek cząstek kompozytowych	2008	WO 2008/068762 A2
farmacja, materiało- znawstwo	zastosowanie termozelujących kompozytów chitozanowych wypełnionych substancjami czynnymi w postaci wstrzykiwanej do leczenia tkanek nowotworowych	nieokreślone	kompozyt termozelowy	2004	WO 2004/050100 A1
farmacja	zastosowanie kompleksu chitozanowo-alginianowego do dostarczania immunogenu z <i>Shigella Spp.</i> jako aktywnej szczepionki przeciwko shigelozie	nieokreślone	nanocząstki	2017	WO 2017/191646 A2

Tabela 10.6: Wykaz patentów sklasyfikowanych w kategorii kosmetyka.

Dziedzina	Przeznaczenie	Źródło materiału chitynowego	Początkowa lub końcowa forma materiału chitynowego	Rok	Numer patentu
kosmetyki	stymulacja wzrostu komórek skóry	nieokreślone	nieokreślone	2017	US 201013145285 A
kosmetyki	mieszanka kwasu hialuronowego i chitozanu do nawilżania skóry i poprawy jej elastyczności	nieokreślone	koloidalny preparat kosmetyczny	2004	EP 02022761 A
kosmetyki, chemia	kosmetyk lub produkt do pielęgnacji skóry poprawiający jej wygląd lub zdrowie	nieokreślone	hydrofobowe pochodne chitozanu	2017	CA 3020171 A
kosmetyki	zastosowanie N-(karboksymetylideno)chitozanu jako środka do półtrwałego prostowania włosów	nieokreślone	nieokreślone	2016	EP 12734800 A
kosmetyki, materiało- znawstwo	zastosowanie karboksylanu pirolidonu chitozanu jako jednorazowego środka chłonnego o zwiększonej zdolności pochłaniania zapachów i cieczy	komercyjne	nieokreślone	2001	AU 2001/057202 A
kosmetyki	zastosowanie nanocząstek tlenku cynku, modyfikowanych powierzchniowo za pomocą chitozanu usieciowanego tripolifosforanem, do absorpcji promieniowania UV, do stosowania w formułacji kremu przeciwsłonecznego	nieokreślone	nieokreślone	2018	EP 15780936 A
kosmetyki, chemia	zwiększenie tempa wzrostu paznokci poprzez stosowanie płynnych lub półstałych preparatów do stosowania miejscowego	nieokreślone	sól	2013	EA 200901093 A
kosmetyki, materiało- znawstwo	poprawa właściwości chitozanu, takich jak bioaktywność i rozpuszczalność	komercyjne	nanowłókna	2007	EP 02792233 A
kosmetyki, materiało- znawstwo	wykorzystanie karboksylanu pirolidonu chitozanu do produkcji artykułów adsorpcyjnych do higieny osobistej	komercyjne	powłoka	2009	EP 05013435 A
kosmetyki	wykorzystanie chitozanu do zwiększenia skuteczności związków chloru w przeciwgrzybiczym roztworze czyszczącym	nieokreślone	roztwór	2002	WO 2002/028990 A1
kosmetyki	przygotowanie kompozycji antyperspirantu złożonej z chitozanu o średniej masie cząsteczkowej (300–550 kDa) i pasków chitozanu (250–650 kDa)	grzyby, bakterie lub stawonogi	emulsja typu olej w wodzie stabilizowana przez fazę lamelarną	2018	WO 2018/099931 A1
kosmetyki, farmacja	przygotowanie płynnego preparatu chitozanowego tworzącego membranę, o określonym stopniu deacetylacji, w celu wspomaganie wzrostu mikroflory skóry i leczenia dysbiozy	nieokreślone	ciecz, membrana	2020	WO 2020/207844 A1

kosmetyki	przygotowanie środka do maseczki do twarzy, który składa się głównie z oligosacharydów chitozanu i kolagenu z meduz, zapewniającego lepszą adsorpcję i składniki biologiczne w porównaniu z konwencjonalnymi maseczkami do twarzy	nieokreślone	receptura kosmetyczna	2015	CN 201510044263 A
kosmetyki	przygotowanie formułacji mydła z użyciem pochodnych chitozanu, niewymagającej użycia wody	nieokreślone	ciecz	2017	CN 201610416918 A

Tabela 10.7: Lista patentów sklasyfikowanych w kategorii ochrona środowiska.

Dziedzina	Przeznaczenie	Źródło materiału chitynowego	Początkowa lub końcowa forma materiału chitynowego	Rok	Numer patentu
środowisko	działanie przeciw glonom powodującym zakwity wodne	nieokreślone	nieokreślone	2017	US 201514872032 A
środowisko	przygotowanie biodegradowalnego, wielofunkcyjnego chitozanu modyfikowanego kwasem amikowym jako wymiatacza metali ciężkich	nieokreślone	nieokreślone	2018	CN 201710244595 A
środowisko, nauka o materiałach	zastosowanie nanokompozytów wodorotlenku żelaza i glinu na matrycach chitozanowych do oczyszczania wody z arsenu i fluoru	nieokreślone	kompozytowy materiał adsorpcyjny	2018	WO 2018/122871 A1

Tabela 10.8: Wykaz patentów sklasyfikowanych w kategorii przetwórstwo/technologia żywności.

Dziedzina	Przeznaczenie	Źródło materiału chitynowego	Początkowa lub końcowa forma materiału chitynowego	Rok	Numer patentu
technologia żywności	przygotowanie napojów zawierających chitozan o jednorodnej dyspersji chitozanu przy użyciu witaminy C	nieokreślone	dyspersja/ciecz	2021	EP 3881681 A1

przetwórstwo spożywcze	hamowanie wzrostu mikroorganizmów w jamie ustnej	chityna z komórek drożdży	nanocząstki	2015	IN 689MU2015 A
przetwórstwo spożywcze	obniżenie poziomu lipidów w osoczu i masy ciała	nieokreślone	proszek	2013	EP 06710312 A
przetwórstwo spożywcze	usuwanie leków lub pestycydów z żywności, płynów, napojów i ścieków	nieokreślone	proszek lub granulki	1998	AU 1997/045692 A
technologia żywności	przygotowanie doustnego kompleksu mikrokryształicznego chitozanu i białka sojowego do usuwania tłuszczu i cholesterolu LDL	nieokreślone	materiał jadalny	2002	WO 2002/085142 A1
technologia żywności, materiałoznawstwo	przygotowanie preparatu gumy do żucia zawierającego chitozan o wysokiej masie cząsteczkowej do doustnego dostarczania związków odżywczych fosforu.	nieokreślone	kompozyt gumy arabskiej i chitozanu (guma do żucia)	2012	WO 2012/143011 A1
technologia żywności, materiałoznawstwo	przygotowanie powłoki z nanocząstek chitozanu, mentolu i miedzi do pokrywania produktów rolnych	nieokreślone	powłoka, folia	2018	WO 2018/172827 A1
przetwórstwo spożywcze	preparat przeciwgrzybiczy w roślinach	komercyjne	mleczan chitozanu w postaci początkowej	2011	EP 06721748 A
przetwórstwo spożywcze	jadalna powłoka przedłużająca okres przydatności owoców do spożycia	nieokreślone	nieokreślone	2017	MX 2015014327 A
przetwórstwo spożywcze	jadalna powłoka przedłużająca okres przydatności warzyw i owoców do spożycia	nieokreślone	nieokreślone	2019	MX 2014013173 A
przetwórstwo spożywcze	konserwacja żywności bez wpływu na proces fermentacji	nieokreślone	mikrokapsułki	2020	NL 2026059 A
przetwórstwo spożywcze	obróbka płynnych produktów spożywczych i kontrola rozwoju drożdży	grzyby	mikronizowany proszek	2015	US 201113704840 A
przetwórstwo spożywcze	produkcja napojów herbacianych	komercyjne	roztwór (napój)	2020	EP 18896926 A
przetwórstwo spożywcze	przygotowanie jadalnej folii z chitozanu i polifenoli, w której polifenole są ekstrahowane z brunatnic	nieokreślone	nanocząstki, folia	2019	CN 201811522514 A

Tabela 10.9: Wykaz patentów sklasyfikowanych w kategorii rolnictwo.

Dziedzina	Przeznaczenie	Źródło materiału chitynowego	Początkowa lub końcowa forma materiału chitynowego	Rok	Numer patentu
rolnictwo	poprawa sporulacji grzybów	komercyjne	proszek w początkowej postaci	2009	EP 08718466 A
rolnictwo	zwiększenie plonów, wzmocnienie procesów obronnych roślin	stawonogi	nieokreślone	2020	EP 12730912 A
rolnictwo	zapobieganie rozwojowi bakterii w owocach pomidora	nieokreślone	folia	2018	MX 2013001909 A
rolnictwo	leczenie infekcji wywołanych przez nicienie	nieokreślone	nieokreślone	2017	ES 201631565 A
rolnictwo	przygotowanie pochodnej chitozanu z kwasem galusowym, kwasem oleinowym, bezwodnikiem bursztynowym, glukozą, galaktozą, kwasem salicylowym i formaldehydem, która jest rozpuszczalna w wodzie w zakresie pH 7-12	komercyjne	roztwór	2018	WO 2018/042311 A1
rolnictwo, chemia	przygotowanie pestycydów zawierających chitozan i berberynę	nieokreślone	wyroby, proszek, zawiesina	2019	CN 201910443820 A
rolnictwo, chemia	przygotowanie płynnego nawozu, który składa się głównie z pozostałości po przetwórstwie krewetek/krabów, oligosacharydów chitozanu i aminokwasów	krewetki, kraby	płyn	2018	CN 201810105204 A