

INSTYTUT AGROFIZYKI IM. BOHDANA
DOBRZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Martyna Urszula Krysa

WPLYW DODATKU ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE
CZYNNYCH NA STRUKTURĘ I WŁAŚCIWOŚCI
KOMPOZYTÓW NA BAZIE CELULOZY
MIKROFIBRYLARNEJ I NANOCELULOZY

THE INFLUENCE OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS ADDITIVES ON
THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF COMPOSITES BASED ON
MICROFIBRILLAR CELLULOSE AND NANOCELLULOSE

Rozprawa doktorska przygotowana pod opieką
dr hab. Moniki Szymańskiej-Chargot, prof. IA PAN



© Martyna Krysa

Lublin 2025

OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 25.11.2025r.

Podpis promotora rozprawy

Maria Jędrzej-Russ

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza rozprawa jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data 25.11.2025r.

Podpis autora rozprawy

Marta Krysa

Tę rozprawę doktorską dedykuje mojemu Tacie.

Tato, dziękuje Ci za wszystko.

Najbardziej za upartość i za ciekawość świata.

*Jestem nieskończenie wdzięczna swojej rodzinie,
mojemu mężowi Mikołajowi, córce Alicji oraz mojej Mamie
za wsparcie i za wiarę w to, co robię.*

Bez Was nie byłoby mnie tutaj.

*Dziękuje swojej promotor
dr hab. Monice Szymańskiej-Chargot prof. IA PAN
za bycie Mentorką i przykładem naukowca, którym chce się być.*



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach realizacji projektu
badawczego sfinansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu
OPUS: UMO-2018/29/B/NZ9/00141

Streszczenie:

Związki biologicznie czynne pozyskiwane z roślin są od wielu wieków wykorzystywane przez człowieka. Jedną z grup tych związków stosowanych szeroko w przemyśle oraz medycynie są polifenole. Polifenole to związki powszechnie występujące w roślinach, odpowiadające głównie za reakcje obronne rośliny w odpowiedzi na czynniki biologiczne takie jak fitofagi czy fitopatogeny oraz czynniki fizyczne takie jak np. nadmierne promieniowanie UV. Do rodziny polifenoli należą związki o różnej budowie chemicznej od najprostszych kwasów fenolowych, do bardziej złożonych strukturalnie flawonoidów, w tym antocyjanów. Związki te najczęściej wykazują właściwości antyoksydacyjne, a nasilenie tych właściwości głównie zależy od ich struktury chemicznej (czy to glikozyd/aglikon, jaką mają ilość grup hydroksylowych). Charakteryzują się również właściwościami przeciwbakteryjnymi i przeciwgrzybiczymi. Oprócz wymienionych wyżej właściwości charakterystycznych dla większości polifenoli, flawonoidy są dodatkowo często wykorzystywane jako cząsteczki sygnałowe w symbiozie z bakteriami glebowymi oraz odpowiadają za kolor kwiatów, będąc atraktantami dla zapylaczy.

Mimo tych uniwersalnych funkcji, polifenole poza komórką roślinną są bardzo wrażliwe na utlenianie i degradację pod wpływem światła czy temperatury. W związku z tym substancje te często potrzebują nośnika, który stabilizowałby je w środowisku pozakomórkowym, żeby w pełni wykorzystać ich potencjał.

Celuloza jest najbardziej powszechnie występującym i pozyskiwanym z roślin biopolimerem, o unikalnych właściwościach - niskiej gęstości, dużej wytrzymałości mechanicznej, biokompatybilności i biodegradowalności. Metody wytwarzania oraz modyfikacji materiałów celulozowych są znane i dobrze opracowane. Takimi modyfikacjami mogą być np. karbokymetylacja czy etylacja. Modyfikacje chemiczne celulozy mają poprawiać niekorzystne właściwości takie jak hydrofilowość, chłonność dla tłuszczu czy dużo mniejszą elastyczność w porównaniu do plastiku. Te właściwości materiału są szczególnie niekorzystne w przypadku m.in. wykorzystania celulozy jako składnika kompozytów do przechowywania żywności. Niestety, mogą także one wpływać negatywnie na biodegradowalność takiego materiału.

Przegląd literaturowy pozwolił wyciągnąć wniosek, że możliwe jest połączenie filmów na bazie celulozy z różnymi typami polifenoli, co umożliwiłoby odkrycie interakcji molekularnych zachodzących między nimi. Te najkorzystniejsze interakcje pozwalają zachować właściwości bioaktywne polifenoli oraz pozytywnie wpływać na właściwości filmu.

W tym celu wybrano dwa rodzaje celulozy: celulozę mikro- i nanofibrylną, na których powierzchnie za pomocą adsorpcji naniesiono różne rodzaje polifenoli: kwasy fenolowe (kwas chlorogenowy, kawowy i galusowy), flawonoidy (kwercetyna, rutyna, naringenina i naringina) oraz antocyjany zawarte w ekstraktach z wycieków z owoców (czarna porzeczka, czarny winogron oraz aronia).

Niniejsza rozprawa wykazała, że wzbogacenie filmów na bazie mikro- i nanofibrylnej celulozy pozyskanej z wycieków jabłkowych polifenolami z grupy kwasów fenolowych oraz flawonoidów zmienia ich właściwości funkcjonalne w kontekście opakowań do żywności.

Badania spektroskopii FT-IR i FT-Ramana wskazały charakterystyczne pasma dla różnych grup flawonoidów ułatwiając identyfikację poszczególnych związków i ich wiązań, ułatwiając tym samym wnioskowanie dotyczące oddziaływań celuloza-polifenol.

Badania dotyczące filmów z celulozy mikro- i nanofibrylnej z wybranymi kwasami fenolowymi (kwasem galusowym, kawowym, chlorogenowym) w dwóch stężeniach (450 i 900 PPM) wykazały, że najefektywniej z tej grupy właściwości barierowe i mechaniczne poprawiał dodatek kwasu kawowego, hamując kontaktowo rozwój *E. coli*, *S. capitis* i *Botrytis cinerea*. Dodatek kwasów w wyższym stężeniu zwiększał intensywności pasma w widmie FT-Ramana przy długości fali 1410cm^{-1} , potwierdzając oddziaływania międzycząsteczkowe.

Dokonano także wytworzenia oraz porównania kompozytów na bazie celulozy mikro- i nanofibrylnej z lecytyną oraz zaadsorbowanych na ich powierzchnię liposomalnych form dwóch par flawonoidów (glikozyd/aglikon) z dwóch różnych grup flawonoidów: kwercetyna-rutyna oraz naringina-naringenina. Porównano wszystkie kompozyty pod względem właściwości zwilżalności powierzchni, za pomocą spektroskopii zbadano mechanizmy ich oddziaływania międzycząsteczkowego, oceniono ich właściwości barierowe dla pary wodnej oraz określono przepuszczalność dla światła, stabilność antyoksydacyjną i zdolność do hamowania rozwoju patogenów. Najbardziej obiecującymi kompozytami z tej grupy okazały się kompozyty z kwercetyną, które nie tylko blokowały przechodzenie światła UV praktycznie do zera, ale także miały dużą zdolność antyoksydacyjną oraz jako jedyne z badanych związków

wykazywały wyraźne molekularne wiązania z celulozą. Mimo zwiększonej hydrofilowości powierzchni, testy przepuszczalności dla pary wodnej nie wykazały znaczącego pogorszenia tego parametru dla tych kompozytów. Badania mikrobiologiczne wskazały zdolności hamujące rozwój *S. aureus*.

Badania uzupełniające oparte na celulozie nanofibrylarniej z lecytiną oraz z zaadsorbowanymi wyciągami z trzech wybranych wyłoków owocowych - aronii, czarnej porzeczki oraz czarnego winogrona, wykazały dużą wrażliwość na zmiany pH, zarówno w przypadku zamaczania kawałka filmu w roztworze o konkretnym pH, jak i w przypadku reakcji na związki azotowe uwalniane do powietrza (symulacja psucia się żywności). Wszystkie filmy wykazały się dość dużą hydrofobowością, a najlepsze właściwości zarówno w skali wrażliwości na zmiany pH, jak i barierowości dla przepuszczalności dla pary wodnej, wykazały się filmy z wyciągiem z wyłoku z czarnej porzeczki.

Niniejsza praca stanowi próbę wyjaśnienia molekularnych zależności polifenol-celuloza oraz wykorzystanie ich w celu funkcjonalizacji filmów celulozowych na tzw. inteligentne opakowania do żywności.

Słowa kluczowe: Odpady roślinne, wyłoki jabłkowe, kompozyty polisacharydowe, flawonoidy, kwasy fenolowe, celuloza mikrofibrylarna, celuloza nanofibrylarna, właściwości antyoksydacyjne, właściwości barierowe, struktura molekularna, właściwości powierzchniowe

Abstract:

Bioactive compounds from plants have been extracted and utilized by humans for many centuries. Polyphenols represent one of the most widely applied groups of such compounds in industry. They are responsible for defense mechanisms in response to biological factors such as phytophagous insects and phytopathogens, as well as abiotic stressors, including excessive UV radiation in plants. This group of chemical compounds encompasses both structurally simple phenolic acids and more complex flavonoids, including anthocyanins. Polyphenols primarily exhibit antioxidant properties, which depend on their chemical form (glycosidic/aglycone), as well as antibacterial and antifungal activities. They act as the signaling molecules for symbiosis with soil bacteria and serve as pigments responsible for flower coloration, acting as attractants for pollinators. However, outside plant cells, these compounds are highly susceptible to oxidation and degradation induced by light, temperature, and exposure to oxygen. Consequently, these substances frequently require a carrier matrix to stabilize them in the extracellular environment and fully exploit their biological potential.

Cellulose is the most abundant and widely extracted biopolymer from plants, possessing unique properties including low density, high mechanical strength, biocompatibility, and biodegradability. Cellulose-based materials have well-developed fabrication and modification methodologies. Cellulose modifications aim to improve unfavorable properties for food packaging applications, such as hydrophilicity, lipid absorption capacity, and lower elasticity than synthetic plastics. Such changes include the substitution of hydroxyl groups with carboxymethyl groups (to produce carboxymethyl cellulose) or with ethyl groups (for ethyl cellulose). Nevertheless, these modifications may negatively impact the biodegradability of such materials.

A literature review led to the conclusion that combining cellulose films with various polyphenol types would enable the investigation of molecular interactions between these components without compromising the bioactive properties of polyphenols and determining their effects on film properties. For this purpose, two types of cellulose were selected: micro- and nanofibrillated cellulose. Three polyphenol categories were deposited via adsorption: phenolic acids (chlorogenic, caffeic, and gallic acids), flavonoids (quercetin, rutin, naringenin, and naringin), and anthocyanins derived from fruit pomace extracts (blackcurrant, black grape, and chokeberry).

This study demonstrated that enriching micro- and nanofibrillated cellulose films derived from apple pomace with phenolic acids and flavonoids altered their functional properties for food packaging applications. FT-IR and FT-Raman spectroscopy revealed characteristic bands for various flavonoid groups, facilitating the identification of individual bonds and providing insight into cellulose-polyphenol interactions.

Investigation of micro- and nanofibrillated cellulose films with selected phenolic acids (gallic, caffeic, chlorogenic) at two concentrations (450/900 ppm) demonstrated that caffeic acid addition improved barrier and mechanical properties while contact-inhibiting the growth of *E. coli*, *S. capitis*, and *Botrytis cinerea*. Higher acid concentrations led to increased intensity at 1410 cm^{-1} in FT-Raman spectra, corroborating the presence of intermolecular interactions.

Composites based on micro- and nanofibrillated cellulose with lecithin and liposomal formulations of two flavonoid pairs (glucoside/aglycone) adsorbed on film surface from distinct flavonoid classes - quercetin/rutin and naringin/naringenin - were synthesized and compared. Surface wettability properties, intermolecular interaction mechanisms via spectroscopy, water vapor barrier properties, light transmittance, antioxidant stability, and pathogen inhibition were evaluated. Quercetin-containing composites proved to be the most promising, nearly completely blocking UV light transmission, demonstrating high antioxidant capacity, and being the only compounds tested that exhibited distinct molecular bonding with cellulose. Despite increased surface hydrophilicity, water vapor permeability showed no significant deterioration. Microbiological analysis revealed inhibitory activity against *S. aureus*.

Supplementary studies employing nanofibrillated cellulose and extracts from three selected fruit pomaces - chokeberry, blackcurrant, and grape - demonstrated pronounced pH sensitivity in films, both upon exposure to pH-buffered solutions and in response to nitrogen-containing compounds released into the atmosphere (as food spoilage test). Films exhibited considerable hydrophobicity, with blackcurrant pomace extracts demonstrating optimal properties in both color intensity and water vapor permeability.

This work represents a comprehensive investigation that elucidates the molecular interactions and comparative functional properties of cellulose films enriched with various bioactive polyphenolic compounds for intelligent food packaging applications. The findings provide insights into the development of advanced packaging materials that combine cellulose's structural advantages with the multifunctional bioactivity of polyphenols.

Keywords: Plant waste, apple pomace, polysaccharide-based composites, flavonoids, phenolic acids, microfibrillar cellulose, nanofibrillar cellulose, antioxidant properties, barrier properties, molecular structure, surface properties

Spis treści:

Streszczenie:.....	5
Abstract:	8
Spis treści:	11
Spis skrótów i akronimów:.....	14
Lista publikacji:.....	15
1. Wstęp:.....	16
1.1. Związki polifenolowe jako produkty metabolizmu wtórnego roślin	16
1.2. Właściwości i rola polifenoli w przemyśle	17
1.3. Budowa i właściwości fizykochemiczne celulozy	19
1.4. Modyfikacje celulozy	20
1.5. Nanoceluloza	21
1.6. Biopolimery pochodzące z odpadów żywnościowych jako alternatywa dla plastiku 23	
1.7. Kompozyty na bazie celulozy lub nanocelulozy oraz polifenoli	24
2. Hipoteza badawcza i cele rozprawy doktorskiej	27
3. Materiały i metody badawcze wykorzystane w badaniach:	29
3.1. Materiały:	29
3.1.1. Otrzymywanie i oczyszczanie pulpy celulozowej:	29
3.1.2. Otrzymywanie filmu z celulozy mikrofibrylarnej:.....	29
3.1.3. Otrzymywanie filmu z celulozy nanofibrylarnej:	29
3.1.4. Otrzymywanie wodnej dyspersji lecytyny	30
3.1.5. Otrzymywanie filmu z celulozy mikro/nanofibrylarnej z lecytyną.....	30
3.1.6. Ekstrakcja fosfatydylocholiny z lecytyny:	30
3.1.7. Użyte związki polifenolowe:.....	31
3.2. Metody	31
3.2.1. Interakcje molekularne:	31
3.2.1.1. Spektroskopia FT-IR	31
3.2.1.2. Spektroskopia FT-Ramana	31
3.2.2. Morfologia powierzchni:.....	32
3.2.2.1. Mikroskopia Ramana	32
3.2.2.2. Mikroskopia SEM	32
3.2.2.3. Pomiary zwilżalności powierzchni.....	32
3.2.2.4. Zdolność antyoksydacyjna	33

3.2.3. Badania barierowe:.....	33
3.2.3.2. Przepuszczalność pary wodnej	34
3.2.3.3. Przepuszczalność światła w zakresie UV-Vis-NIR.....	34
3.2.3.4. Właściwości hamujące rozwój drobnoustrojów:.....	35
3.3. Analiza statystyczna:.....	35
4. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach:	36
4.1. Publikacja P1.....	37
4.2. Publikacja P2.....	39
4.3. Publikacja P3.....	42
5. Badania uzupełniające	45
5.1. Wstęp.....	45
5.2. Materiały i metody:	46
5.2.1. Przygotowanie dyspersji nanofibrylnej celulozy:	46
5.2.2. Zbiór owoców i przygotowanie wytlóków owocowych	46
5.2.3. Przygotowanie ekstraktu	46
5.2.4. Przygotowanie filmu:	47
5.3. Metody:	47
5.3.1. Mikroskopia optyczna	47
5.3.2. Interakcje Molekularne:	47
5.3.2.1. Spektroskopia FT-IR	47
5.3.3. Badania spektrofotometryczne:	48
5.3.3.1. Wydajność ekstrakcji:	48
5.3.3.2. Zawartość związków fenolowych w ekstraktach:	48
5.3.3.3. Zawartość antocyjanów:.....	48
5.3.3.4. Zdolność antyoksydacyjna:	48
5.3.4. Oznaczenia RGB w kontekście zmian koloru:.....	49
5.3.4.1. Określenie koloru:	49
5.3.4.2. Zmiana zabarwienia w zależności od stężenia amoniaku:	49
5.3.4.3. Zmiana zabarwienia w reakcji na zmianę pH:	49
5.3.4.4. Symulowany test zepsucia:	49
5.3.5. Badania barierowe:.....	50
5.3.5.1. Przepuszczalność dla światła w zakresie UV-Vis-NIR:	50
5.3.5.2. Kąty zwilżania:.....	50
5.3.5.3. Przepuszczalność dla pary wodnej:.....	51

5.3.6. Analiza statystyczna:	51
5.4. Wyniki:	52
5.4.1. Obraz mikroskopowy kompozytów	52
5.4.2. Interakcje molekularne	53
5.4.3. Określenie zawartości związków polifenolowych oraz pojemności antyoksydacyjnej wyciągów i kompozytów	54
5.4.4. Właściwości barierowe kompozytów	58
5.4.4.1. Przepuszczalność dla światła:	58
5.4.4.2. Zwilżalność powierzchni:	59
5.4.4.3. Przepuszczalność pary wodnej:	60
5.4.5. Zmiany koloru (RGB):	62
5.5. Wnioski	64
6. Podsumowanie i wnioski	65
7. Publikacje własne wykorzystane w rozprawie:	68
7.1. Tekst Publikacji P1:	68
7.2. Tekst Publikacji P2:	83
7.3. Tekst Publikacji P3:	99
8. Bibliografia	123
9. Oświadczenia współautorów:	133
10. Aneks – życiorys naukowy	140

Spis skrótów i akronimów:

Skrót	Wyjaśnienie po polsku	Wyjaśnienie po angielsku
GAL	kwask galusowy	gallic acid
CHL	kwask chlorogenowy	chlorogenic acid
CAF	kwask kawowy	cafeic acid
RUT	rutyna	rutin
QUE	kwercytyna	quercetin
NAG	naringenina	naringenin
NRG	naringina	naringin
NCL	celuloza nanofibrylarna z lecytyną	nanofibrillar cellulose with lecithin
MCL	celuloza mikrofibrylarna z lecytyną	microfibrillar cellulose with lecithin
FT-IR	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
ATR	FT-IR z zastosowaniem osłabionego całkowitego odbicia	FT-IR with Attenuated Total Reflectance
ABTS	2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy kwas)	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
CNF	nanofibrylarna celuloza	nanofibrillar cellulose
CNC	nanokryształy celulozy	nanocrystals cellulose
CMC	karboksymetyloceluloza	carboxymethylcellulose
MC	metylceluloza	methylcellulose
MCC	celuloza mikrokryształiczna	microcrystalline cellulose
MFC	celuloza mikrofibrylarna	microfibrillated cellulose
PLA	polilaktyd	polylactic acid
HPMC	hydroksypropylometylceluloza	hydroxypropyl methylcellulose
FT-Raman	Spektroskopia Raman z analizą transformacji Fouriera	Fourier Transform Raman spectroscopy
TEAC	Pojemność antyoksydacyjna wyrażona w ekwiwalencie Troloxu	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TE	Trolox (pochodna wit. E)	Trolox
C3G	cyjanidyno-3-glukozyd	cyanidin-3-glucoside
WCA	kąt zwilżania wodą	Water contact angle
TPC	ogólna zawartość polifenoli	Total phenol content
WVP	współczynnik przepuszczalności pary wodnej	Water vapor permeability

Lista publikacji:

P1: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, 133430. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133430>

Impact Factor (2025): **9,8**

Punkty MN (2025): **200**

P2: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, 120349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>

Impact Factor (2025): **6,2**

Punkty MN (2025): **200**

P3: Krysa M., Szymańska-Chargot M., Adamczuk A., Pertile G., Frąc M., Zdunek A. (2025). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids – quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form *Food Research International*, 221, 117335

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>

Impact Factor (2025): **8,0**

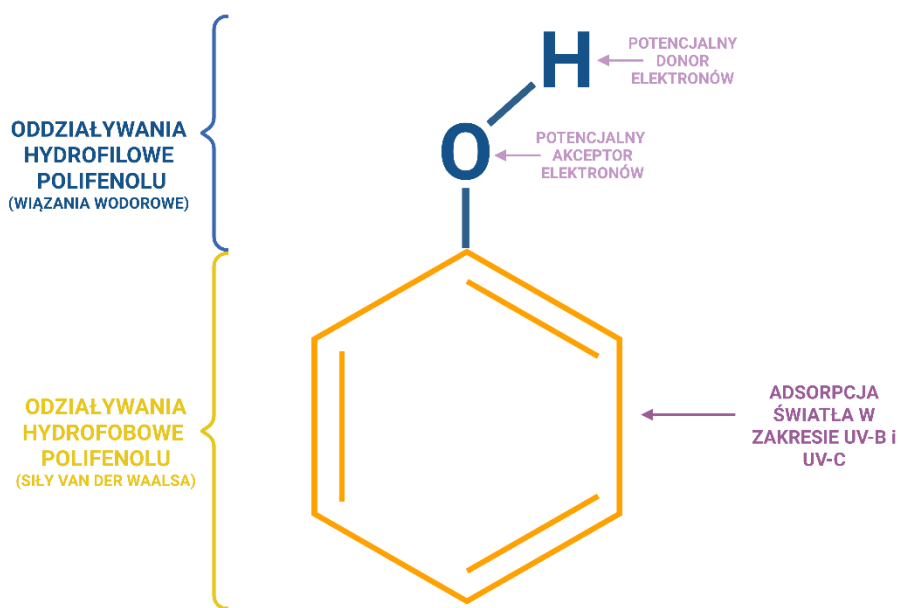
Punkty MN (2025): **140**

1. Wstęp:

1.1. Związki polifenolowe jako produkty metabolizmu wtórnego roślin

Metabolizm wtórny obejmuje syntezę tych składników metabolizmu roślinnego, które nie odpowiadają bezpośrednio za podstawowe funkcje życiowe. Ich odpowiedni profil biochemiczny służy jednak w wielu innych ważnych procesach jak np. reakcje na niekorzystne warunki środowiska (np. terpenoidy, karotenoidy, flawonoidy) (Sana i in., 2025, Al-Khayri i in., 2023) obrona przed fitopatogenami i fitofagami (np. taniny, alkaloidy) (Al-Khayri i in., 2023), czy w przekazywaniu sygnałowym podczas nawiązywania symbiozy z innymi organizmami (np. flawonoidy) (Van de Sande and Bisseling, 1997)

Związki polifenolowe są jednymi z najpowszechniej występujących metabolitów wtórnych w naturze oraz stały się ważnym obszarem zainteresowania ze względu na swoje działanie (Dai, J., i Mumper, R. J., 2010). Definiuje się je, jako grupę związków, które posiadają pierścień aromatyczny z dwiema lub większą ilością grup hydroksylowych (Zhang i in. 2022). Związki polifenolowe są zróżnicowane pod względem budowy np. kwasy fenolowe charakteryzują się hydroksylowanymi pierścieniami aromatycznymi, a flawonoidy w zależności od podklasy posiadają dwa pierścienie połączone poprzez pierścień heterocykliczny piranowy (Saxena i in. 2012), z przyłączonymi grupami funkcyjnymi, od których często zależą ich właściwości fizykochemiczne. Głównym przykładem może być umiejscowienie i ilość dołączonych grup hydroksylowych w grupie flawonoidów, co istotnie wpływa na właściwości antyoksydacyjne tego związku. Ponadto umiejscowienie danej grupy hydroksylowej w pierścieniu jest ważniejsze z punktu widzenia właściwości fizykochemicznych związku, niż ich ilość w cząsteczce (Lin i in. 2014). Grupa karboksylowa w kwasach fenolowych determinuje kwasowy charakter związku, a miejsce jego przyłączenia - zdolność antyoksydacyjną (Chen i in 2020). Związki polifenolowe występują głównie w formie glikozydowej, co pozwala im na efektywną solubilizację w wodzie, utrudnia utlenianie się tych związków, co pozytywnie wpływa na ich stabilność oraz na możliwość ich aktywnego transportu (aglikony mogą dyfundować pasywnie przez błonę) i magazynowania w wakuoli komórki roślinnej (Slámová i in. 2018, Alseekh i in. 2020).



Rys. 1.: Schematyczna i uogólniona budowa związku polifenolowego (opracowanie własne przy pomocy BioRendera i na podstawie Galanakis, C. M. (2018)).

1.2. Właściwości i rola polifenoli w przemyśle

Porównując wszystkie związki polifenolowe, można powiedzieć, że kwasy fenolowe i flawonoidy są jedną z najbardziej wszechstronnie wykorzystywanych przez człowieka, grup związków biologicznie czynnych. Jest to związane m.in. z ich bezpieczeństwem w użyciu. Z tego względu są one stale badane od wielu lat oraz znalazły zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, takich jak przemysł tekstylny (garbowanie skór), spożywczy (jako barwniki), rolniczy (biostymulatory) czy farmaceutyczny (kosmetyki i suplementy diety).

Jednym z najstarszych sposobów wykorzystania polifenoli jest proces garbowania skór, który miał chronić materiał przed zgniciem i negatywnym wpływem wilgoci (Falcão i in. 2018). Taniny (mające w polskim języku nazwę garbniki, pochodzącą właśnie od wykorzystania ich procesie garbowania skór), potrafią zaadsorbować się do macierzy włókien kolagenowych i nadawać materiałowi właściwości bardziej hydrofobowe, skutecznie ograniczające wzrost szkodliwych mikroorganizmów oraz zwiększający ich elastyczność lub sprawiający że materiał stawał się bardziej sztywny i wytrzymały (Falcão i in. 2018).

Rola polifenoli w kontekście przemysłu tekstylnego jest także istotna w kontekście naturalnej alternatywy dla barwników syntetycznych, szczególnie w kontekście barwienia ubrań z tkanin naturalnych takich jak bawełna. Naturalne barwniki zazwyczaj nadają materiałom bawełnianym kolor od żółtego przez pomarańczowy, aż do brązowego i czarnego (Gao i in. 2024). Do tego celu wykorzystuje się wyciągi z roślin zawierających głównie katechiny w tym np. z herbaty (Xu i Song 2025). Co więcej dodatek polifenoli może poprawiać właściwości barierowe dla promieniowania UV czy właściwości przeciwbakteryjne, a nawet odstraszać komary, co może być szczególnie istotne dla ubrań projektowanych na okres letni (Gao i in. 2024a). Mimo to, minusem może być słaba powtarzalność i jednorodność barwienia. Wykazano też, że niektóre flawonoidy takie jak np. naringina, katechiny czy epikatechiny mogą poprawiać wydajność procesu barwienia materiału (Gao i in. 2024a).

Często związki polifenolowe są używane jako barwniki do zwiększania intensywności koloru w żywności, a co za tym idzie atrakcyjności produktów spożywczych np. poprzez dodawanie bogatego w antocyjany wyciągu z czarnej marchwi (Iorizzo i in. 2020). Dzięki zmianom pH wyciąg ten można uzyskać dużą paletę barw docelowego produktu unikając specyficznego posmaku charakterystycznego np. dla ekstraktów barwiących z czerwonej kapusty. Co więcej, jest przy tym dość stabilny na czynniki zewnętrzne takie jak światło czy temperatura (Iorizzo i in. 2020, Baria i in. 2020).

Polifenole badane są również pod kontem biostymulatorów w rolnictwie, czego przykładem może być zastosowanie mieszaniny składającej się z kilku flawonoidów na trzech odmianach ziemniaka (Salvage i in. 2024). W przytoczonym badaniu stwierdzono średnio 5,2% wzrostu plonu całkowitego i zwiększenie o średnio 33% masy bulw, potwierdzając tym samym szanse na ekologiczne i użytkowe wykorzystanie flawonoidów w rolnictwie (Salvage i in. 2024).

W kontekście kosmetycznym, polifenole są głównie wykorzystywane jako antyoksydanty. Oprócz tego wykorzystuje się także ich zdolność blokowania światła z zakresu UV czy minimalizowania skutków narażenia skóry (szczególnie fibroblastów) na promieniowanie w tym zakresie, co w konsekwencji chroni przed powstawaniem wolnych rodników i utlenianiem się lipidów. Powyższe właściwości są wykorzystywane głównie w tzw. preparatach „przeciwstarzeniowych” (Zillich i in. 2015). Jeden z flawonoidów, kwercetyna był też badany na szczurach, jako dodatek do żelowych kompozytów w celu wspomagania trudno gojących się ran (Nalini i in. 2022).

Związki polifenolowe są sprzedawane także jako suplementy diety ze względu na ich właściwości wiążące wolne rodniki, właściwości neuroprotektcyjne, zmniejszające przepuszczalność naczyń krwionośnych (rutyna) czy przeciwzapalne. Jest to istotne np. w przeciwdziałaniu alergiom (kwercetyna), a nawet działaniu prewencyjnym w kontekście wystąpienia nowotworów (kurkumina, kemferol, izoflawony) (Bhosale i in. 2020, Jafarinia i in. 2020, Larijani i in. 2025, Nalini i in. 2022, Naz i in. 2023).

Ciekawym przykładem wykorzystania związków polifenolowych może być pasza dla ryb hodowlanych z dodatkiem polifenoli z herbaty, która powodowała zwiększenie zawartości kolagenu w mięsie karmionych ryb, a także poprawę ich smaku czy nawet poprawieniu właściwości prozdrowotnych w kontekście kwasów omega (Ma i in. 2021).

Mimo tych wyjątkowych cech i powszechnego użycia, polifenole są stosunkowo dość niestabilne w środowisku pozakomórkowym - łatwo się degradują pod wpływem temperatury, zmiany pH, światła i powietrza (Shi i in. 2022). W związku z tym, związki z tej grupy potrzebują albo odpowiednich warunków środowiskowych lub innych substancji o działaniu stabilizującym i protekcyjnym, aby móc optymalnie wykorzystać ich właściwości.

1.3. Budowa i właściwości fizykochemiczne celulozy

Celuloza jest najobficiej występującym biopolimerem na Ziemi o pochodzeniu roślinnym, i z tego względu wszechstronnie wykorzystywanym w przemyśle (Hoo i in. 2022). Jest pozyskiwana głównie z włókien roślinnych, w procesie oczyszczania tkanki roślinnej z innych składników ściany komórkowej (hemicelulozy, ligniny i pektyny) (Lupidi i in. 2023). Celuloza jest polisacharydem, stanowiącym główny komponent ściany komórkowej roślin (Bassyouni i in. 2022). Składa się z podjednostek glukozy, połączonych ze sobą wiązaniami 1,4- β -glikozydowymi, stabilizowanymi w sieciach strukturalnych za pomocą wiązań wodorowych oraz oddziaływań Van der Waalsa (McNamara i in. 2022). Dzięki wiązaniom wodorowym, celuloza może mieć półkrystaliczną formę - oznacza to, że posiada regiony zarówno krystaliczne (tzw. uporządkowane), jak i regiony amorficzne (tzw. nieuporządkowane) (McNamara i in. 2022, Lupidi i in. 2023, Célino, i in. 2014).

Taka budowa pozwala na tworzenie bardzo wytrzymałej, a jednocześnie dość elastycznej struktury włókna roślinnego, która jest chętnie wykorzystywana i modyfikowana

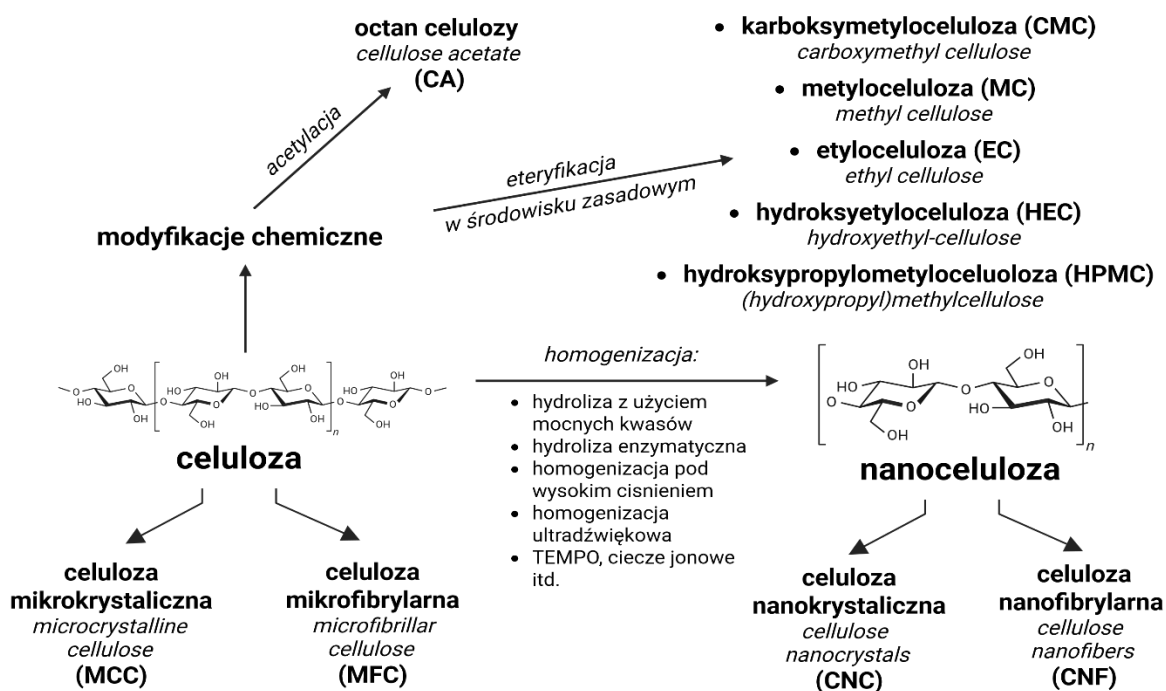
przez różne gałęzie przemysłu. Z celulozy produkowane są zarówno produkty codziennego użytku, jak papier, czy ubrania (Aziz i in. 2022) jak i filtry oraz dodatki do żywności (McNamara i in. 2015). Jest również wykorzystywana do produkcji polioli np. w celu otrzymywania biodegradowalnych pian poliuretanowych do zwiększenia izolacji cieplnej budynków (Szpiłyk i in. 2021). Szerokie wykorzystanie celulozy wynika z niskiego kosztu pozyskania włókien roślinnych, dużej wytrzymałości mechanicznej, zdolności do izolacji ciepła, dużej hydrofilowości (chłonności cieczy) (Célino i in. 2014), czy łatwości w trwałej absorpcji różnych substancji (np. barwników) (Bassyouni i in. 2022). Celuloza jest także stosunkowo łatwo biodegradowalna, jednakże ta właściwość zależy od stopnia krystaliczności. Wysoka krystaliczność materiału celulozowego zmniejsza biodegradowalność materiału (Park i in. 2004).

1.4. Modyfikacje celulozy

W zależności od potrzeb, zalety celulozy, jako materiału używanego w przemyśle mogą być także jej wadą - hydrofilowość i duża porowatość sprawia, że celuloza jest słabym opakowaniem do żywności, łatwa biodegradacja daje dużą nietrwałość i podatność na zakażenie mikroorganizmami, a wytrzymałość i elastyczność jest zbyt mała w porównaniu z opakowaniami plastikowymi, szczególnie przy kontakcie z wilgocią (Grzybek i in. 2024, Chen i in. 2024). By dopasować materiał celulozowy do danej gałęzi przemysłu, celuloza musi zostać poddana modyfikacji. Często robi się to poprzez poddanie celulozy różnym procesom chemicznym takim jak utlenianie w procesie TEMPO, acetylacja, karboksylacja czy eteryfikacja (Hafid i in. 2023, Hoo i in. 2022). W wyniku tych modyfikacji możemy otrzymać np. karboksymetylocelulozę (CMC), hydroksypropylometylocelulozę (HPMC), metylcelulozę (MC) czy octan celulozy (CA) (Rys. 2), które znane są z dużej wytrzymałości mechanicznej, zwiększonej hydrofobowości oraz kompatybilności ze związkami aktywnymi, zwiększając tym samym możliwość ich wykorzystania w kontekście opakowań żywnościowych (Sachin i in. 2025).

Innymi metodami modyfikacji są procesy mechaniczne (np. homogenizacja ultradźwiękowa, czy pod wysokim ciśnieniem) dzięki czemu można uzyskać celulozę mikrofibrylarną (MFC). Natomiast w wyniku trawienia silnym kwasem (np. siarkowym VI) powstaje celuloza mikrokryształiczna (MCC). Są to pochodne o odmiennych właściwościach, zarówno funkcjonalnych, jak i strukturalnych. MFC została otrzymana dość wcześnie – w 1983 roku przez grupę Turbaka (Spence i in. 2010). Posiada części zarówno amorficzne jak i

krystaliczne, dzięki czemu potrafi ona tworzyć sztywną sieć (Spence i in. 2010). Możliwe jest uzyskanie MFC poprzez wysokociśnieniową homogenizację mechaniczną oraz hydrolizę enzymatyczną (Spence i in. 2010). Natomiast, w przypadku MCC uzyskana jest celuloza o wysokim stopniu krystaliczności, dzięki czemu materiał na bazie MCC jest sztywniejszy niż sama celuloza i ma wysoką stabilność termiczną (Lupidi i in. 2023)



Rys. 2. Schemat przedstawiający modyfikacje celulozy (opracowanie własne za pomocą programu Biorender)

1.5. Nanoceluloza

W ostatnich latach jedną z najpowszechniej badanych i modyfikowanych form celulozy jest nanoceluloza. Jest to forma celulozy o średnicy od kilku do kilkuset nanometrów i o długości od kilku nanometrów do kilku mikrometrów (Lv i in. 2025). Nanoceluloza jest otrzymywana zarówno w procesie mechanicznym (homogenizacja ultradźwiękowa, wysokociśnieniowa, itp.) lub chemicznym (stężone kwasy, utlenianie reagentem TEMPO, zastosowanie enzymów, itp.) (Matebie i in., 2021). W zależności od użytego procesu (analogicznie do celulozy) możemy otrzymać formę krystaliczną (CNC, z ang. *cellulose nanocrystals*), jak i fibrylarną (CNF z ang. *cellulose nanofibrils*).

Nanoceluloza jest wykorzystywana jako bardziej hydrofobowa, o zwiększonej wytrzymałości mechanicznej i lepszych właściwościach barierowych alternatywa dla celulozy (Sachin i in. 2025, Krysa i in. 2025b, Phanthong i in. 2018). Wynika to z zależności, że im mniejszy rozmiar włókien celulozy, tym lepsze upakowanie przestrzenne (Sun i in. 2024). Ciasne upakowanie wpływa na zwiększone właściwości barierowe, ponieważ cząsteczki wody oraz składniki powietrza mają fizycznie utrudnione przejście przez taką strukturę (Sun i in. 2024, Du i in. 2021). Szczególnie istotną rolę odgrywa poziom krystaliczności nanocelulozy. Wyższa krystaliczność zapewnia lepsze właściwości barierowe niż w przypadku CNF (Guivier i in. 2024), ponieważ wiąże się z bardziej uporządkowaną i sztywną strukturą materiału - mimo że membrany oparte na CNC są stosunkowo kruche (Jaekel i in. 2022). Należy jednak pamiętać, że zbyt wysokie stężenie CNC oraz wysoka wilgotność materiału (powyżej 80%) zwiększają przepuszczalność gazów. Nadmierne stężenie CNC sprzyja tworzeniu aglomeratów (Pornbencha i in. 2023), natomiast wysoka wilgotność powoduje pęcznienie nanocelulozy (Guivier i in. 2024). W obu przypadkach prowadzi to do powiększania porów w strukturze, a tym samym ułatwia przenikanie gazów.

Nanoceluloza posiada także zwiększoną dostępność wiązań wodorowych, co pozwala jej na zwiększoną adsorpcję różnych związków poprzez te wiązania (Heise i in. 2022, Qiao i in. 2021). W wiązaniu różnych adsorbentów wykorzystywane są siły van der Waalsa, interakcje typu π - π czy oddziaływania elektrostatyczne oraz w wyniku kompleksowania (Qiao i in. 2021). Zwiększone zdolność adsorpcyjne i tak zróżnicowane mechanizmy pozwalają na wykorzystanie materiałów na bazie nanocelulozy jako potencjalnych katalizatorów do usuwania metali ciężkich z wody (Abdelhamid i in. 2024).

Materiały na bazie CNF i CNC wykorzystywane są także do tworzenia różnego typu powłok zarówno w żywności (powlekanie owoców i warzyw), jak i innych materiałów kompozytowych, czy jako nośniki dla leków i nanokapsułki (De France i in. 2020). W inżynierii folie nanocelulozowe wzbogacane o różnego typu związki chemiczne pozwalają na uzyskanie zarówno bardzo wytrzymałych i biokompatybilnych implantów, jak również elastycznych folii o potencjale wykorzystania w elektronice (Sharma i in. 2019). Nanoceluloza może być także używana nie jako sam materiał bazowy, ale jako dodatek wzmacniający inne kompozyty. Dodatek CNC do filmów na bazie innych naturalnych polimerów takich jak chitozan może zwiększać wytrzymałość na rozciąganie oraz zmniejszać przepuszczalność pary wodnej (Yadav i in. 2020).

1.6. Biopolimery pochodzące z odpadów żywnościowych jako alternatywa dla plastiku

Ilość badań określających właściwości kompozytów na bazie celulozy oraz ich różnych modyfikacji wzrosła w ostatnich latach, podkreślając potencjał oraz potrzebę zastąpienia folii plastikowych właśnie tymi na bazie naturalnych polimerów (Shen i in. 2020, Elfawal i in. 2025). Wiąże się to głównie z próbami znalezienia alternatyw mających ograniczyć powszechne zanieczyszczenie środowiska plastikiem (również mikro- i nanoplastikiem) (Elfawal i in. 2025, Krysa 2025a) oraz rozwinąć dalej mocno ograniczony recykling (wg. raportu PlasticEurope z roku 2022 tylko 26,9% odpadów plastikowych w Europie jest recyklingowana). W badaniach zwraca się uwagę również na to, że produkty z plastiku, mogą uwalniać substancje potencjalnie wpływające na układ hormonalny, takie jak ftalany (Rustagi i in. 2011). Istnieją również doniesienia naukowe informujące, że użycie plastiku z recyklingu może powodować większą migrację bisfenolu z materiału wtórnego do żywności, niż z plastiku pochodzącego z produkcji pierwotnej (Núñez, 2024). Na podstawie tych doniesień, ponownie zwrócono się w stronę wykorzystania biopolimerów, w tym celulozy fibrylarnej, która jest od wielu lat używana w kontakcie z żywnością i jest zaliczana do materiałów ogólnie bezpiecznych (Pradhan i in. 2020). Celuloza posiada wiele istotnych zalet, które czynią ją atrakcyjnym surowcem do różnych zastosowań. Przede wszystkim jest to materiał powszechnie występujący w przyrodzie, co czyni go łatwo dostępnym i dobrze poznanym (Aziz i in. 2020). Dodatkowo, celuloza jest łatwo modyfikowalna, co pozwala na dostosowanie jej właściwości do konkretnych potrzeb, a także jest kompostowalna i biodegradowalna, przez co jest przyjazna dla środowiska (Erdal i Hakkarainen, 2022).

Mimo dużej biodegradowalności, odpady żywnościowe (w tym też 1/3 żywności produkowanej, która jest marnowana) stanowią ogromne źródło gazów cieplarnianych (Kamal i in. 2022). Odpady te trafiając na wysypiska śmieci tworzą drugie co do wielkości źródło metanu w skali Unii Europejskiej (dane z strony Zero Waste Europe 2024). Odzyskanie celulozy z odpadów spożywczych takich jak wytloki owocowe i warzywne (Szymańska-Chargot i in. 2017) czy odpady rolnicze (Yadav i in. 2024) mogłoby pozwolić na efektywniejszą gospodarkę odpadami i zwiększać pozytywny wpływ na spowalnianie zmian klimatu.

Jednak celuloza ma również pewne ograniczenia, które w niektórych przypadkach utrudniają jej bezpośrednie zastosowanie. Jednym z głównych problemów jest jej duża hydrofilowość, a pochłaniając wodę traci właściwości barierowe oraz spada jej odporność

mechaniczna (Martínez-Sanz i in. 2013). W konsekwencji, w niesprzyjających warunkach może nawet stać się nośnikiem patogenów, takich jak bakterie czy grzyby, co może ograniczać jej wykorzystanie jako opakowania do żywności (Schmid i in. 2023). Z tych powodów niezbędne jest odpowiednie modyfikowanie celulozy, aby zwiększyć jej trwałość i funkcjonalność.

Najczęściej wykorzystywane substancje pochodzenia roślinnego dodawane do matrycy celulozowej w celu poprawy właściwości mikrobiologicznych, wytrzymałościowych i barierowych mogą być inne naturalne polisacharydy pochodzenia nie tylko roślinnego jak pektyny, skrobia, ale także chitozan, czy alginian. Wszystkie z nich mogą być pozyskane z surowców wtórnych takich jak odpady po żywności - skrobię można pozyskać z resztek owoców (skórki, wyłoki, okrywy nasienne) (Kringel i in. 2019), chitozan może być pozyskany z chityny znajdującej się w pancerzykach skorupiaków morskich np. krewetek (Pérez i in. 2022), a alginian z brunatnic (protisty) (Fenóradosa i in. 2009).

Przykładem użycia kompozytu chitozanu oraz nanocelulozy może być membrana, wykazująca właściwości antybakteryjne mogąca zastąpić tradycyjne podkłady w tackach na mięso (Costa i in. 202). Z drugiej strony dodatek polimerów takich jak chitozan czy alginian ze względu na wzrost hydrofilowości może wpływać na obniżenie właściwości barierowych wobec wody (Mayrhofer i in. 2023, Metha i in. 2024). Poza tym, związki te mogą się łączyć w sposób niejednorodny, np. problemem jest tworzenie wiązań międzycząsteczkowych między chitozaniem a celulozą (chitozan preferuje samoagregację), co może osłabić wytrzymałość filmu (Yang i in. 2018). Z tego względu zaczęto rozważać inne naturalne związki, wzbogacające właściwości barierowe i bakteriostatyczne filmów celulozowych, ale zwiększające hydrofobowość oraz wykazujące się bardziej homogeniczną adsorpcją.

1.7. Kompozyty na bazie celulozy lub nanocelulozy oraz polifenoli

Metodą na zwiększenie hydrofobowości przy równoczesnym zachowaniu biodegradowalności i możliwości pozyskania tych związków z odpadów, mogą być kompozyty celulozowe wzbogacone substancjami bioaktywnymi np. kwasami fenolowymi (Krysa i in. 2025a), flawonoidami (Krysa i in. 2025b) czy olejkami eterycznymi (Casalini i in. 2023). Pozwala to nie tylko na poprawę właściwości barierowych (szczególnie w kontekście

blokowania światła UV), ale także ogranicza wzrost szkodliwych organizmów i wzbogaca te kompozyty o właściwości antyoksydacyjne.

Przykładem takiego połączenia w kontekście biodegradowalnych opakowań do żywności mogą być kompozyty na bazie biopolimerów oraz kwasu galusowego. Jego dodatek poprzez działanie przeciwutleniające wykazał zdolność do hamowania utleniania lipidów, enzymatycznego brązowienia żywności psującego jej wygląd czy hamowania szkodliwych mikroorganizmów (Gangadharan i in. 2024). Dodatek tej substancji do bakteryjnej nanocelulozy oraz skrobi zwiększył wytrzymałość na rozciąganie, zwiększył hydrofobowość oraz poprawił zdolność blokowania UV, co przypisuje się tworzeniu silnych międzycząsteczkowych wiązań wodorowych wpływających na powstanie zwartej struktury. (Almeida i in. 2023).

Innym wykorzystaniem układu celuloza-polifenol są hydrożelowe opatrunki na bazie nanokryształów celulozy z kwercetyną. Polepszyło to biodostępność kwercetyny i przedłużyło jej uwalnianie co poprawiało gojenie się ran u szczurów oraz na mysich modelach ran skórnych (Nayak i in. 2025). Podobne badanie przeprowadzono z użyciem kwasu galusowego, które również potwierdziło przyspieszenie gojenia się ran i lepszą regenerację naskórka (Yan i in. 2025)

Kolejnym ciekawym przykładem są kompozyty wykorzystane jako kolorymetryczne bioindykatory psucia się żywności, szczególnie w kontekście przechowywania mięsa i owoców morza. Tego typu produkty podczas procesu psucia się wydzielają organiczne związki zawierające azot o charakterystycznym zapachu oraz zasadowym odczynie, które mogą zmieniać kolor kompozytu zawierającego indykator pH (Xu i in. 2025b). Taka strategia, ważna w kontekście bezpieczeństwa żywności, może pozwolić na lepsze monitorowanie jej świeżości, tym samym prowadzić do zmniejszania się ilości odpadów spożywczych. W celu wytworzenia tego typu materiałów uzyskano hydrożele 3D z mieszaniny jadalnych biopolimerów takich jak alginian, żelatyna i nanokrystaliczna celuloza oraz indykatorów pH (Popoola i in. 2024). Co więcej, takimi w pełni naturalnymi wskaźnikami mogą być filmy na bazie celulozy bakteryjnej i antocyjanów z czarnej marchwi, które z powodzeniem mogłyby zastąpić syntetyczne pH-wrażliwe barwniki (Moradi i in. 2019). Przedstawione bioindykatory reagowały w czasie rzeczywistym na przechowywanie i proces psucia się filetów pstrąga tęczowego i karpia, monitorowanych przez 15 dni w temperaturze 4°C (Moradi i in. 2019).

Biorąc pod uwagę bardzo duży światowy transport owoców, ciekawym i dość nowym pomysłem na zastąpienie plastiku, którym często zabezpiecza się nawet pojedyncze owoce, jest otoczkowanie ich naturalnymi kompozytami. Proces otoczkowania polega na naniesieniu wybranego polimeru, często wzbogacanego substancjami czynnymi, bezpośrednio na powierzchnię owocu, w celu poprawy jego właściwości barierowych, co wpływa na długość jego przechowywania oraz zachowanie jego pierwotnych właściwości (Matloob i in. 2023). Metody nanoszenia mogą być różne: od maczania owocu w roztworze przez określony czas i określoną ilość powtórzeń (dipping method), przez metodę natryskową (spray coating), do nanoszenia pędzelkiem (brushing) (Dai i in. 2025). Przykładem takiego kompozytu do otoczkowania może być hydrożel z nanowłókien karboksymetylocelulozy wzbogacony ekstraktem z czerwonej kapusty, który wydłużał przydatność do spożycia bananów oraz spowalniał ich brązowienie. Kompozyt tworząc powłokę na ich powierzchni ograniczał proces transpiracji owoców (Kwak i in. 2023).

Mimo tych wszystkich danych dotyczących interakcji i możliwości tworzenia międzycząsteczkowych oddziaływań celuloza-polifenol, wciąż niejednoznaczne jest czy wyłącznie liczba grup wodorowych jest istotna w strukturze związków polifenolowych, czy może chodzi także o strukturę przestrzenną zarówno cząsteczki polifenolu, jak i celulozy do wytworzenia tego typu oddziaływania. Brakuje też prac porównujących kilka rodzajów polifenoli na takiej samej matrycy celulozowej. Co więcej, niejednoznaczne jest również to, czy możliwe jest uzyskanie takiego materiału w pełni pozyskanego z odpadów, jakie właściwości taki materiał posiada i jak potencjalnie można go wykorzystać w kontekście żywnościowym.

2. Hipoteza badawcza i cele rozprawy doktorskiej

Pomimo dużego zainteresowania naukowego na świecie, wciąż brakuje systematycznych prac dotyczących opracowania, metod otrzymywania, badania właściwości oraz oddziaływań pomiędzy składnikami kompozytów celulozowych wzbogaconych związkami polifenolowymi. Dlatego też w niniejszej rozprawie zdecydowano użyć dwóch rodzajów celulozy: mikrofibrylarnej (CMF) oraz nanofibrylarnej (CNF) izolowanej z materiału odpadowego, jakim są wytloki jabłkowe pozostałe po wyciskaniu soku. Natomiast do wzbogacenia filmów otrzymanych z CMF i CNF użyto przedstawicieli trzech grup związków polifenolowych: kwasów fenolowych, flawonoidów oraz mieszaniny antocyjanów pozyskiwanych ze skórek owoców jagodowych. Celuloza może być wykorzystywana do wytwarzania folii oraz kompozytów o dobrych właściwościach barierowych i mechanicznych, a przy tym biodegradowalnych i nietoksycznych. Jednak ze względu na swoją porowatą strukturę niemodyfikowana celuloza może wykazywać niepożądane w kontekście opakowań właściwości hydrofilowe i zbyt niskie właściwości barierowe. W celu poprawy tych właściwości można zastosować inne formy celulozy np. celulozę mikrofibrylarną i nanofibrylarną, która charakteryzuje się lepszymi właściwościami barierowymi i większą hydrofobowością. Jednak zarówno sama celuloza, jak i jej nanostrukturalne formy nie posiadają cech, które mogłyby zwiększać bezpieczeństwo i wydłużać trwałość żywności. Z drugiej strony, polifenole są naturalnymi, biologicznie czynnymi związkami obecnymi w tkankach roślinnych. Wykazują szereg pożądanых właściwości takich, jak antyoksydacyjność, przeciwdrobnoustrojowość, a także pełnią rolę naturalnych barwników. Ich adsorpcja na powierzchni filmu celulozowego mogłaby umożliwić wytwarzanie kompozytów o dodatkowych, korzystnych w kontekście przechowywania żywności właściwościach. Z kolei sam film celulozowy mógłby mieć właściwości stabilizujące związki polifenolowe. Jednocześnie użycie tych materiałów pozwoliłoby otrzymać kompozyt biodegradowalny i wytworzony na bazie surowców odpadowych.

Hipoteza badawcza:

Związki polifenolowe stabilizowane celulozą mikro- i/lub nanofibrylną tworzą bezpieczny dla środowiska kompozyt o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych oraz antyoksydacyjnych.

Cele rozprawy doktorskiej:

- Opracowanie filmu/kompozytu na bazie celulozy mikrofibrylnej lub/i nanofibrylnej oraz wybranych substancji polifenolowych,
- Porównanie właściwości matrycowych mikro- i nanofibrylnej celulozy, jako nośnika dla substancji biologicznie czynnych,
- Podjęcie tematu wyjaśnienia interakcji molekularnych między cząstkami celulozy oraz wybranymi polifenolami oraz wpływ tych interakcji na właściwości powierzchniowe i strukturalne kompozytu,
- Określenie właściwości wytworzonych kompozytów w kontekście ich potencjalnego zastosowania (właściwości barierowe, badania mechaniczne, odporność na UV i pojemność antyoksydacyjna, właściwości bakteriostatyczne),
- Zbadanie możliwych interakcji fizycznych najbardziej obiecującego kompozytu z powierzchnią owoców pod kątem potencjalnego zastosowania jako powłoka owoców,
- Sprawdzenie czy możliwe jest stworzenie w pełni wykonanego z biodegradowalnych surowców bioindykatora do psucia się żywności opartego na antocyjanach zawartych w wyciągach z wycieków owocowych.

3. Materiały i metody badawcze wykorzystane w badaniach:

3.1. Materiały:

3.1.1. Otrzymywanie i oczyszczanie pulpy celulozowej:

Wytłok jabłkowy o końcowej zawartości suchej masy 10%, została otrzymany metodą laboratoryjną. W tym celu użyto tłoczni soku z podwójną śrubą (Green Star Elite GSE-5000, Anaheim, USA) oraz oczyszczonego z pestek gniazda nasennego miąższu owoców jabłoni zwyczajnej (*Malus domestica*), zakupionych na lokalnym rynku (Lublin, Polska). Tak powstały wytłok oczyszczono metodą termo-chemiczną z użyciem HCl (35-38%, Chempur) i NaOH zgodnie z procedurą opisaną przez Szymańską-Chargot i in. (2017), a następnie wybielono w roztworze (około 2%) podchlorynu sodu (NaClO, 25-28%, Biomus), pozbywając się z wytłoku lignin, hemiceluloz, pektyn oraz cukrów. Następnie celuloza była przegotowana w destylowanej wodzie i wielokrotne przepłukiwana w wodzie o temperaturze pokojowej, następnie odsączona, aż do 10% suchej masy, zamknięta w szczelnym pojemniku i przechowywana w 4 °C.

3.1.2. Otrzymywanie filmu z celulozy mikrofibrylarnej:

Zawiesinę celulozy o 0,1% stężeniu z punktu 3.1.1. homogenizowano za pomocą homogenizatora mechanicznego Ultra-Turrax (T10 basic Ultra Turrax, IKA, Niemcy) przez 10 min. Tak przygotowaną dyspersję wylewano na zestaw do sączenia pod ciśnieniem składający się z szklanego zestawu filtracyjnego (kolba 1000 ml, lejek i zacisk; Chempur, Polska) oraz filtra membranowego PVDF (EMD Millipore™ Durapore™, $\phi = 90$ mm) oraz pompy próżniowej z ciśnieniem ustawionym na 0,8 bara (Basic 36, AgaLabor, Polska), a następnie sączone przez maksymalnie 15h. Na końcu, taki film był oddzielany od filtra membranowego i suszony pod naciskiem 7kg przez 72h (Krysa i in. 2025a).

3.1.3. Otrzymywanie filmu z celulozy nanofibrylarnej:

Aby otrzymać celulozę nanofibrylarną użyto dyspersji celulozy o stężeniu 0,2%, przygotowanej zgodnie z opisem z punktu 3.1.2., którą poddano działaniu ultradźwięków za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego Sonics Vibracell (model VCX-130FSJ; Sonics i Materials Inc., USA) o mocy wyjściowej 130 W, amplitudzie roboczej 95% (amplituda nominalna = 120 μ m, częstotliwość = 20 kHz) przez 30 minut. Żeby uniknąć przegrzania próbki, umieszczano ją w łaźni z lodem ($T = 0$ °C). Następnie próbki podzielono na dwie rozcieńczone

dyspersje o stężeniu 0,1% wag. i obie porcje poddano dodatkowej obróbce 60 minut identycznie, jak w publikacji Szymańska-Chargot i in. (2019). Następnie tak przygotowaną porcję filtrowano, jak w punkcie 3.1.2. i otrzymywano w ten sposób film z celulozą nanofibrylarną (nanoceluloza).

3.1.4. Otrzymywanie wodnej dyspersji lecytyny

Dyspersję wodną (10% m/v) lecytyny słonecznikowej (czysta, Biomus, Polska) zhomogenizowano za pomocą Ultra-Turrax (T10 basic Ultra Turrax, IKA, Niemcy) przez 5 minut.

3.1.5. Otrzymywanie filmu z celulozy mikro/nanofibrylarniej z lecytiną

W przypadku celulozy mikrofibrylarniej, przygotowano 200g wodnej dyspersji celulozy z punktu 3.1.2. o stężeniu 0,1% wag. i dodano 0,5g dyspersji lecytyny z punktu 3.1.4. i homogenizowano za pomocą Ultra-Turrax (T10 basic Ultra Turrax, IKA, Niemcy) przez 10 minut. Następnie film był sączony tak jak w przypadku filmów celulozowych, jednakże czas sączenia uległ skróceniu i trwał maksymalnie 6h. Następnie film był zostawiany w układzie do sączenia pod ciśnieniem (0,5 bara) aż do całkowitego wyschnięcia (ok 9h).

W przypadku celulozy nanofibrylarniej do 200g dyspersji z punktu 3.1.3. dodano 0,5g dyspersji lecytyny z punktu 3.1.4. i mieszano przez 2 minuty za pomocą homogenizatora Ultra-Turrax (T10 basic Ultra Turrax, IKA, Niemcy), następnie sączono i suszono tak samo, jak filmy z celulożą mikrofibrylarną (Krysa i in. 2025b).

3.1.6. Ekstrakcja fosfatydylocholiny z lecytyny:

Fosfatydylocholinę (PC) wyekstrahowano z roztworu lecytyny w etanolu (96% EtOH, stężenie 1%) poprzez mieszanie przez 10 minut na mieszadle magnetycznym (metoda opracowana na podstawie badań Cabezas i in., 2009). Następnie dyspersję odwirowano z prędkością $6000 \times g$ przez 5 minut (wirówka MPW-260R, MPW Med. Instruments, Polska) w celu uzyskania alkoholowego roztworu PC oczyszczonego z nierozpuszczalnych tak efektywnie w niskorzędownym alkoholu innych składowych lecytyny. Supernatant ostrożnie przesączono przez filtr nylonowy (średnica porów 0,2 μm , Millipore) i odparowano w temperaturze pokojowej w celu uzyskania jak najbardziej czystej PC (stężenie uzyskanego roztworu PC wynosiło około 1,1 g PC/L EtOH). Potwierdzono uzyskanie głównie PC uzyskując widmo FT-IR i porównując je z danymi literaturowymi Hindarto i in., (2017).

3.1.7. Użyte związki polifenolowe:

Kwas kawowy - CAF - (98%, SIGMA); kwas chlorogenowy - CHL (98 %, AmBeed); kwas galusowy - GAL (bezwodny, 98%, Merck 98%); kwercetyna - QUE ($\geq 95\%$ HPLC, Sigma Life Science); rutyna - RUT (hydrat, $\geq 94\%$ HPLC, Sigma-Aldrich); naringenina - NAG (hydrat, 97%, Glentham Life Sciences); naringina - NRG ($\geq 95\%$, Acros Organics).

3.2. Metody

3.2.1. Interakcje molekularne:

3.2.1.1. Spektroskopia FT-IR

Widma FT-IR uzyskano za pomocą spektrometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, Madison, USA) z przystawką ATR (Smart ITR) i rozdzielaczem wiązki KBr. Pomiar wykonano na trzech próbkach każdego rodzaju kompozytu, skupiając się na powierzchni z adsorpcją emulsji flawonoidu/kwasu fenolowego/antocyjanu. Zebrane dane obejmowały zakres $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$; dla każdego widma uśredniono 200 skanów przy rozdzielczości 4 cm^{-1} . W przedstawionych widmach wykonano korekcję linii bazowej i normalizację do pola powierzchni pod widmem, z użyciem programu ORIGIN (wersja 8.5 PRO, OriginLab Corporation, USA).

3.2.1.2. Spektroskopia FT-Ramana

Widma FT-Raman rejestrowano przy użyciu spektrometru NXR FT-Raman z detektorem InGaAs i rozdzielaczem wiązki CaF_2 (Thermo Scientific, USA) jako kompatybilnej przystawki do FT-IR (Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA). Próbki (fragmenty filmów) umieszczano w stalowych statywach i oświetlano laserem Nd:YAG (długość fali lasera 1064 nm i maksymalnej mocy 1 W). Zebrano widma w zakresie $3500\text{--}150\text{ cm}^{-1}$, każde jako średnia z 256 skanów przy rozdzielczości 8 cm^{-1} . Analizę rozpoczęto od wykonania średniego widma z trzech wybranych widm, korekcji linii bazowej i normalizacji do pola powierzchni pod widmem, wykonując je w programie ORIGIN (wersja 9.0 PRO, OriginLab Corporation, USA).

3.2.2. Morfologia powierzchni:

3.2.2.1. Mikroskopia Ramana

Do badań wykorzystano system obrazowania alpha300R (WITec GmbH, Niemcy) z laserem czerwonym o długości fali 785 nm, mocy 50 mW i czasie integracji 0,5 s. Obserwację próbek prowadzono za pomocą obiektywu powietrznego 50×/0,9 NA (Carl Zeiss, Niemcy). Rozpraszanie ramanowskie zbierano światłowodem (średnica 50 μm), połączonym ze spektrometrem UHTS 300 (WITec, Niemcy) wyposażonym w siatkę dyfrakcyjną o 300 liniach na 1 mm. Sygnał rejestrowano kamerą CCD (DU401A BV, Andor, Irlandia Północna). Podczas analizy map używano filtrów intensywności ramanowskiej dla charakterystycznych pasm poszczególnych związków. W przypadku filmów z celulozą mikrofibrylarną lub nanofibrylarną z lecytyną analizowano odpowiednio pasma 1050 cm^{-1} lub 1120 cm^{-1} charakterystyczne dla celulozy, natomiast dla flawonoidów: 1611 cm^{-1} (dla QUE), 1090 cm^{-1} (RUT), 1591 cm^{-1} (NAG) oraz 1645 cm^{-1} (NRG). Uśredniono zebrane widma ramanowskie, poddano usunięciu tła (wielomian rzędu 9, poziom szumu 3), a następnie znormalizowano do pola powierzchni pod widmem. Dla widm zastosowano również filtr medianowy (rozmiar 4) i algorytm usuwania zakłóceń kosmicznych (parametry 4/8), porównując wyniki w całym zakresie 0–4000 cm^{-1} .

3.2.2.2. Mikroskopia SEM

Analizę morfologii powierzchni filmu wykonano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego Phenom Pro X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), który pracował z napięciem 15 kV. Do badań użyto fragmenty filmów o rozmiarze 1x1cm, napyłone warstwą złota z użyciem napyłarki CCU-010 (Safematic, Zizers, Szwajcaria).

3.2.2.3. Pomiary zwilżalności powierzchni

Zwilżalność filmów oceniano poprzez kąty zwilżania wodą (WCA). Krople o objętości 5 μL (woda MilliQ) dla kompozytów z flawonoidami lub 10 μL dla filmów z kwasami fenolowymi наносzono za pomocą automatycznego podajnika kropli na powierzchnie filmów zamocowanych na szkiełkach za pomocą taśmy dwustronnej. Pomiarów kąta dokonywano przy użyciu goniometru Rame Hart 200Std. Rejestrację prowadzono z opóźnieniem 0,5 ms co 5 s przez 30 sekund, wykonując pięć powtórzeń dla każdego typu próbki (dla kompozytów z flawonoidami) lub co 60 sekund przez 10 minut (dla filmów z kwasami fenolowymi, wykonano 7 powtórzeń). Analizę kątów zwilżania wykonano w programie DROPimage Advanced (Rame

Hart Instrument Co., USA). Istotność statystyczną zmian WCA oceniono, porównując wartości początkowe i końcowe dla każdej grupy. Różnice stężeń flawonoidów w danej grupie oceniano jedynie w punkcie początkowym.

3.2.2.4. Zdolność antyoksydacyjna

Procedurę oznaczenia zdolności antyoksydacyjnej powierzchni filmów zaadaptowano na podstawie metody użytej w publikacji Kusznerewicz i in. (2020). Do oznaczenia zdolności antyoksydacyjnej supernatantu lub wyciągu używano metody opartej publikacji Biskup i in., 2013. Za pomocą dziurkacza biurowego przygotowano krążki o średnicy 0,5 cm z każdego rodzaju filmu. Pojedynczy krążek dla każdego typu umieszczano w probówce Eppendorfa i zalewano 300 μ l wody destylowanej, a następnie 5,7 mL roztworu ABTS wykonanego na podstawie procedury Biskup i in., 2013. Próbkę mieszało na mieszadle obrotowym (neoLab Migge GmbH, Niemcy) przez 30 minut. Po mieszanii krążki usuwano, a pomiar absorbancji prowadzono w kuwetach polipropylenowych w spektrofotometrze UV-Vis (Cary 60, Agilent) przy długości fali 734 nm. W każdym przypadku przeliczono zdolność antyoksydacyjną na podstawie wykonanej krzywej dla Troloxu (syntetyczna pochodna witaminy E), a zdolność antyoksydacyjną płynnych próbek określano jako stężenie równoważnika Trolox (mg TE/L), a dla kompozytów wyniki wyrażano jako mg TE/cm² powierzchni.

3.2.3. Badania barierowe:

3.2.3.1. Badania mechaniczne

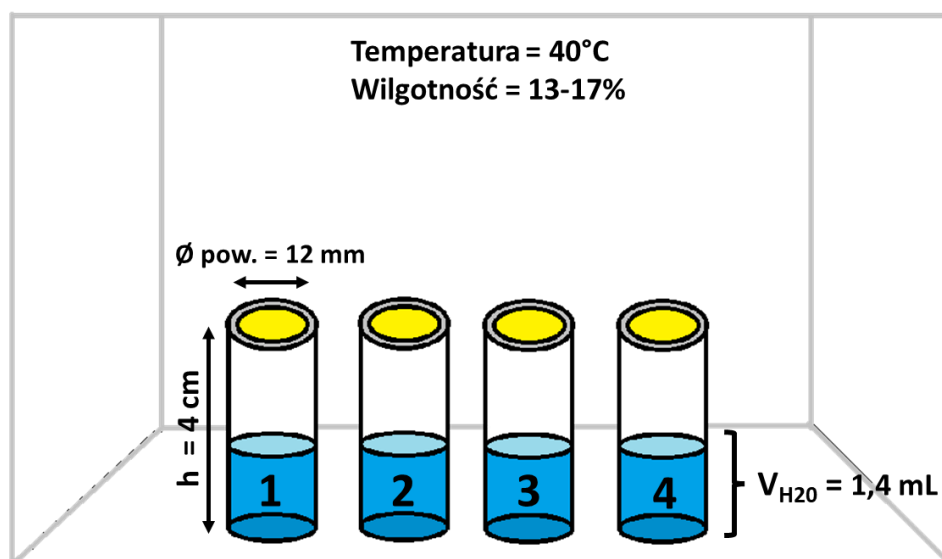
Przed badaniem mechanicznym przygotowano ok. 15 pasków folii celulozowej o wymiarach 40 × 3 mm. Szerokość próbek zmierzono mikroskopem Olympus SZX16 (Japonia) z kamerą DFK 51BU02.H (The Imaging Source Europe GmbH, Niemcy), a grubość mikrometrem cyfrowym BAKER (Baker Gauges India Private Limited, Indie) z dokładnością do 0,001 mm. Testy rozciągania przeprowadzano na mikrotesterze (Deben Microtest, Wielka Brytania) do momentu zerwania próbki (odstęp szczęk 10 mm, szybkość rozciągania 0,1 mm/min). Siłę i wydłużenie przeliczano na naprężenie i odkształcenie za pomocą kodu napisanego w Pythonie. Dzięki temu analizowano powstałe odkształcenie określając: moduł sprężystości, moduł utwardzania, wydłużenie przy zerwaniu i naprężenie przy zerwaniu.

3.2.3.2. Przepuszczalność pary wodnej

Współczynnik przepuszczalności pary wodnej (WVP) oznaczano metodą opracowaną na podstawie metody zawartej w publikacji Cazón i in. (2022), rejestrując ubytek masy próbki w czasie. WVP wyliczano na podstawie zmian masy i różnicy ciśnień zgodnie z właściwym wzorem:

$$C \cdot d \cdot A \cdot \Delta P = \text{WVP} \text{ (wyrażone w } \text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \text{)}$$

Gdzie: gdzie **WVP** podano w **d** to grubość folii (**m**), **A** to pole powierzchni folii poddanej ekspozycji na przepuszczalność pary (**m²**), **ΔP** to różnica ciśnienia pary wodnej po obu stronach folii (**Pa**), a **C** to nachylenie wykresu ubytku masy naczynia względem czasu (**r²**), z dokładnością do 0,0001 g.



Rys. 3.: Schemat przedstawiający badania przepuszczalności pary wodnej (WVP).

Każdy typ folii badano w czterech powtórzeniach, a grubość próbek określano jako średnią z pięciu losowych pomiarów mikrometrem cyfrowym. Wyniki poddano analizie statystycznej zgodnie z punktem 3.3.

3.2.3.3. Przepuszczalność światła w zakresie UV-Vis-NIR

Zdolność barierową kompozytów wobec światła oceniano przy pomocy spektrofotometru (UV-Vis Cary 60, Agilent). Po trzy próbki każdego typu filmu o wymiarach 45mm x 12,5mm (wymiary takie jak użytej kuwety kwarcowej) były przymocowywane do ściany kuwety kwarcowej (droga optyczna 10 mm), a następnie umieszczano w komorze spektrofotometru i

analizowano w zakresie 200–1000 nm (zakres dla UV-Vis-NIR). Wyniki uśredniono i wyrażono jako procent transmitancji światła w badanym zakresie.

3.2.3.4. Właściwości hamujące rozwój drobnoustrojów:

Właściwości hamujące rozwój filmów oceniano za pomocą testów hamowania wzrostu wobec wybranych szczepów grzybów (*Botrytis cinerea* G227/18, *Penicillium* sp. G122/18) i /lub wybranych szczepów bakterii (*Escherichia coli* B4/14, *Staphylococcus capitis* B6/15 czy *Staphylococcus aureus* NCTC 8530, ATCC 12598).

Szczepy bakteryjne i grzybicze pochodziły z kolekcji izolowanych organizmów środowiskowych Zakładu Badań Systemu Gleba-Roślina Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie, oprócz *S. aureus*, który to szczep zostało zakupiony od dystrybutora American Type Culture Collection (ATCC). Grzyby hodowano na bulionie ziemniaczano-glukozowym (PDB), *E. coli* na pożywce Eijkmana, a *S. capitis* i *S. aureus* na pożywce Nutrient Broth. Pierwotna inkubacja prowadzona była przez 5 dni (grzyby) lub 24 godziny (bakterie) w temperaturze 26°C i przy 120 obr./min. Po przygotowaniu zawiesiny grzybiczej i bakteryjnej (300 µL) rozprowadzono ją na odpowiednio przygotowanych płytkach z pożywką agarową ziemniaczano-dekstrozową (Potato Dextrose Agar, PDA) dla grzybów oraz „Plate Count Agar” (Biomaxima, Poland) dla bakterii. Na każdej płytce umieszczano po trzy sterylne krążki (5 mm średnicy). Inkubację przeprowadzano w temperaturze 26°C przez 5 dni, mierząc codziennie średnicę stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów.

3.3. Analiza statystyczna:

Wykonane analizy statystyczne przeprowadzono w programie Statistica (wersja 14.1.0.4, USA). Wszystkie grupy porównawcze obejmowały równą liczbę prób. Rozkład normalny oraz jednorodność wariancji weryfikowano za pomocą testów Lillieforsa i Levene’a. Dla wykrycia istotnych różnic zastosowano analizę ANOVA z testem post-hoc Tukeya. Uzyskano także szczegółowe dane takie jak: średnia, odchylenie standardowe (SD), względne odchylenie standardowe (%RSD), wartość F oraz poziom istotności (p) dla poszczególnych analiz.

4. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach:

W przedstawionych niżej publikacjach skupiono się na molekularnej budowie oraz mechanizmach wiązania i oddziaływania polifenoli, a dokładniej wybranych kwasów fenolowych, flawonoidów, a na koniec bogatych w antocyjany ekstraktów z wyłoków z owoców, z dwoma typami celulozy - celulozą mikrofibrylarną oraz nanofibrylarną wyizolowaną z wyłoków jabłkowych. Celem nadrzędnym badań było zgłębienie sposobu działania i oddziaływania polifenoli na materiały celulozowe, mogące być potencjalnie wykorzystanymi w przyszłości do tworzenia w pełni biodegradowalnych opakowań do żywności, opartych na recyklingu odpadów.

W publikacji P1 szczegółowo są omówione i badane przy pomocy spektroskopii wibracyjnej (FT-IR oraz Ramana) różne grupy flawonoidów pod względem ich budowy molekularnej oraz identyfikacji charakterystycznych pasm dla tych związków.

W publikacji P2 badano w jaki sposób adsorpcja trzech kwasów: galusowego, kawowego oraz chlorogenowego wpływała na właściwości filmów opartych na celulozie mikrofibrylarniej (celuloza) i nanofibrylarniej (nanoceluloza). Praca przybliży również interakcje międzycząsteczkowe między kwasami polifenolowymi a powierzchnią celulozy, co może mieć znaczenie w dalszym opracowywaniu biomateriałów mogących mieć zastosowanie w opakowaniach żywności.

W publikacji P3 zbadano czynniki mogące wpływać na interakcje chemiczne i fizyczne zachodzące między celulozą w dwóch formach (nanofibrylarniej i mikrofibrylarniej), a dwoma parami flawonoidów (glikozydem i aglikonem) z dwóch różnych podgrup flawonoidów: kwercetyną i rutyną (flawonole) oraz naringeniną i nargininą (flawony). Flawonoidy były przygotowane w formie liposomalnej w celu ułatwienia ich adsorpcji na powierzchni kompozytu. Celem badań było określenie związku między obecnością flawonoidu na powierzchni, a ich właściwościami funkcjonalnymi oraz wybór najlepszego kompozytu w celu pokrycia skórki jabłka, jako próba podjęcia tematu otoczkowania ekologicznym kompozytem w pełni powstałym z odpadów spożywczych.

Poniżej znajduje się bardziej szczegółowe omówienie poszczególnych publikacji.

4.1. Publikacja P1

Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., i Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, 133430.

Publikacja P1 jest przeglądem literaturowym, wzbogaconym o wyniki własne, dotyczącym analizy widm spektroskopowych (FT-IR oraz FT-Ramana) dla struktur chemicznych wszystkich grup flawonoidów. Szczegółowy opis oraz podsumowanie podobieństw i różnic zostało wykonane na podstawie danych dostępnych w literaturze oraz widm FT-IR i FT-Ramana wykonanych na czystych związkach będących przykładami danej grupy flawonoidów (najczęściej flawonoidu i jego glikozydu).

Na wstępie opisywane jest pochodzenie flawonoidów oraz ich ogólne właściwości, które opierają się na zdolnościach antyoksydacyjnych, które w konsekwencji mogą wpływać na zdrowie człowieka poprzez neutralizację wolnych rodników, chelatowanie metali ciężkich, a także mających działanie przeciwzapalnie. Następnie opisany został podział flawonoidów na poszczególne podgrupy ze względu na różnice w ich budowie oraz właściwości. Na tej podstawie zostały wyszczególnione następujące grupy: flawonole (których przedstawionym przykładem były kwercetyna i rutyna), flawony (apigenina, luteonina, chryzyna), flawanony (naringenina, hesperydyna), izoflawony (genisteina, daidzeina), antocyjany (peonidyna, cyjanidyna, malvidyna, delfinina), oraz flawanole (epikatechina, epigallaktokatechina), które następnie były analizowane pod kątem charakterystycznych pasm.

Dzięki tym badaniom wskazano i szczegółowo opisano „fingerprints”, czyli charakterystyczne obszary widma najczęściej w zakresie liczby falowej od 1300 – 400 cm^{-1} , dla poszczególnych grup flawonoidów pozwalające na wykrycie ich w próbce. Doprecyzowując, różnice w widmie w tym obszarze, mówią o obecności poszczególnych grup, pierścieni aromatycznych, ale także zmianach w strukturze chemicznej (powstawaniu wiązań pomiędzy związkami oraz rodzaj wiązania).

Wszystkie widma FT-IR flawonoidów zawierały specyficzne pasma odpowiadające drganiom rozciągającym C=C: pierścienia aromatycznego B w zakresie 1650-1560 cm^{-1} oraz pierścienia aromatycznego A w zakresie 1560-1465 cm^{-1} (brak tego pasma w widmach grupy flawanoli). Najbardziej charakterystyczne wiązania C=C dla antocyjanów oraz flawonoli występowały przy 1475-1400 cm^{-1} , a dla flawonów i izoflawonów przy 1380-1350 cm^{-1} . Dla

flawanoli specyficzny uznaje się zakres $1570\text{-}1545\text{ cm}^{-1}$. Jednak należy pamiętać, że w tym zakresie liczb falowych nakładają się drgania grupy karbonylowej ($\text{C}=\text{O}$), wodorowej $\delta(\text{OH})$ oraz te pochodzące od pierścienia $\nu(\text{C}_2=\text{C}_3)$. Spektroskopia FT-Ramana uzupełnia te zakresy o $3189\text{-}2890\text{ cm}^{-1}$ (C-H) obecne w flawonach, izoflawonach i flawononach, $1694\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$) dla flawonów, izoflawonoidów, flawanonów oraz $1575\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$) flawanony i flawonole.

Dane dotyczące widm z FT-IR oraz FT-Ramana zebrane w kompleksowy sposób, jak zostało to zrobione w publikacji P1, pozwalają na skuteczniejsze rozpoznawanie poszczególnych flawonoidów. Pozwala to na szybką analizę próbek pochodzenia naturalnego np. tkanek roślinnych czy liofilizatów różnych ekstraktów roślinnych pod kątem zawartości flawonoidów. Warto również podkreślić, że wykorzystane metody spektroskopii wibracyjnej, jako techniki komplementarne, pozwalają na efektywne badanie niewielkich ilości materiału (już od kilku miligramów), w krótkim czasie, co czyni je szczególnie atrakcyjnymi dla przemysłu farmaceutycznego i spożywczego.

4.2. Publikacja P2

Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose-and nanocellulose-based films, Industrial Crops and Products, 224, 120349

Publikacja P2 prezentuje badania dotyczące wpływu trzech, wybranych kwasów fenolowych - kwasu kawowego (CAF), chlorogenowego (CHL) i galusowego (GAL) – na właściwości filmów na bazie celulozy mikrofibrylarniej (CEL) oraz nanofibrylarniej (NCEL) otrzymywanej i oczyszczonej z wyłoków jabłkowych. Celem pracy było zrozumienie oddziaływania polifenol-celuloza, poprzez użycie związków o prostej budowie (takich jak kwasy fenolowe) z powierzchnią celulozy, a następnie zbadanie wpływu tych interakcji pod kątem wykorzystania takiego kompozytu, jako potencjalny materiał do zastosowań opakowaniowych.

W pierwszym kroku przygotowane zostały filmy celulozowe. W tym celu, celuloza została wyizolowana z wyłoku jabłkowego i oczyszczona. Celuloza mikrofibrylarna (CEL) była przygotowana poprzez homogenizację mechaniczną (tzw. metoda „high speed blending”), natomiast celuloza nanofibrylarna (NCEL) za pomocą homogenizacji ultradźwiękowej (metoda „high intensity ultrasound”). Następnie filmy zostały przygotowane metodą sączenia pod ciśnieniem. Następnie na takie filmy, pod koniec procesu sączenia, wylewano 5% roztwory etanolowe wybranych kwasów fenolowych w dwóch stężeniach (450 ppm oraz 900 ppm), po czym próbki suszono pod obciążeniem 7 kg przez 72h.

Tak przygotowane filmy zostały poddane analizie spektroskopowej FT-Raman w celu określenia międzycząsteczkowych mechanizmów oddziaływania prostych polifenoli z celulozą. Mikroskopia SEM oraz mikroskopia Ramana zostały użyte w celu określenia dystrybucji kwasów fenolowych na powierzchni filmów celulozowych. Pomiar zwilżalności pozwolił określić właściwości hydrofobowe powierzchni. Wykonano testy mechaniczne, określając moduł Younga czy odporność na rozciąganie, żeby scharakteryzować wpływ kwasów fenolowych na strukturę i użyteczności filmów, jako materiału potencjalnie służącego do opakowań. Określanie ogólnej aktywności antyoksydacyjnej (TEAC), jak i tej w wodnym roztworze 0,9% NaCl, który miał kontakt z filmem, jako test uwalniania się związków

fenolowych do żywności. Te wyniki razem z analizą działania przeciwdrobnoustrojowego względem różnych szczepów bakterii i grzybów miały na celu dostarczenie informacji o możliwym wykorzystaniu filmów, jako elementu opakowań funkcjonalnych.

Analiza widm spektroskopowych wykazała, że wybrane kwasy fenolowe preferowały adsorpcje na powierzchni celulozy poprzez wiązania wodorowe. Mimo, że wyniki badań obrazowych nie wykazały widocznych zmian na powierzchni kwasy polifenolowe wpływały na strukturę matrycy celulozowej poprzez zmianę właściwości mechanicznych oraz wskaźników wykazujących możliwy dodatni wpływ na wydłużanie świeżości żywności.

Przeprowadzone testy mechaniczne wykazały, że niższe stężenie kwasów (450 ppm) prowadziło do zwiększonej sztywności i odporności na zerwanie, natomiast wyższe stężenie (900 ppm) do większej elastyczności filmów. Oceniono także stopień zwilżalności i wykazano, że obecność CAF w wyższych stężeniach znacznie podnosi hydrofobowość kompozytów względem kontrolnych filmów CEL, podczas gdy GAL najbardziej zwiększał hydrofilowość.

Aktywność antyoksydacyjna kompozytów wzrastała wraz ze wzrostem stężenia kwasów polifenolowych, szczególnie w przypadku filmów NCEL z dodatkiem 900ppm kwasu galusowego. Badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych dość niejednoznacznie wskazały, że z badanych filmów te z kwasem kawowym miały najsilniejsze efekty hamowania wzrostu wybranych bakterii (*E. coli* i *S. capitis*) i grzybów, ale nadal nie wykraczały one poza strefę inhibicji (3mm). Brak odporności na grzyby z gatunku *Penicillium* sp. mogą wskazywać na możliwości biodegradowalności kompozytów.

Najlepsze właściwości mechaniczne uzyskano dla filmów NCEL z dodatkiem kwasu kawowego - wykazywały się one większą sztywnością, odpornością na deformacje. Filmy te wykazywały również zwiększoną hydrofobowość powierzchni. Ponadto, filmy nanocelulozowe charakteryzowały się bardziej jednorodnym rozkładem badanych kwasów na powierzchni, co pokazało mikrografie SEM. Filmy z kwasem kawowym posiadały także największe zdolności ograniczające wzrost drobnoustrojów, przy ich niskich właściwościach antyoksydacyjnych. Z kolei filmy zawierające kwas galusowy były dużo bardziej hydrofilowe, ale wykazywały największą pojemność antyoksydacyjną.

Na podstawie wyników z publikacji P2 można wyciągnąć wniosek, że filmy nanocelulozowe z dodatkiem kwasu kawowego, mogą być szczególnie przydatne, jako biodegradowalne opakowania o zwiększonej wytrzymałości mechanicznej z kontaktową

odpornością na mikroorganizmy (w porównaniu z czystym filmem nanocelulozowym) i nieznacznym uwalnianiem kwasów fenolowych do roztworu soli fizjologicznej imitującej kontakt z żywnością. Jeśli priorytetem w projektowaniu materiału do opakowań byłoby przedłużenie świeżości żywności najlepszy byłby materiał z wykorzystaniem kwasu galusowego ze względu na jego właściwości antyoksydacyjne; wadą tych kompozytów byłaby ich zwiększona hydrofilowość w porównaniu z innymi kompozytami. Mogłoby to powodować rozwój szkodliwych mikroorganizmów, na które kompozyty z kwasem galusowym nie wykazywały odpowiedniej oporności.

4.3. Publikacja P3

Krysa M., Szymańska-Chargot M., Adamczuk A., Pertile G., Frąc M., Zdunek A. (2025). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids – quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form. *Food Research International*, 221, 117335

W publikacji P3 podjęto próbę opracowania w pełni ekologicznego kompozytu na bazie składników pochodzących z odpadów przemysłu spożywczego. Celulozę, która stanowiła bazę kompozytu, uzyskano tak samo, jak w publikacji P2 z wytlóków jabłkowych; użyto czystych flawonoidów powszechnie występujących w owocach oraz lecytyny słonecznikowej, która jest odpadem po oczyszczaniu oleju.

Badania opierały się na czterech celach głównych: 1. porównaniu celulozy mikrofibrylarnej i nanofibrylarnej, jako nośników dla flawonoidów; 2. zbadaniu i porównaniu dwóch par flawonoidów (glikozyd/aglikon) z dwóch różnych podgrup: flawonoli (kwercetyna i rutyna) oraz flawanonów (naringenina i naringina); 3. określeniu interakcji molekularnych między poszczególnymi flawonoidami a powierzchnią celulozy i ich wpływu na właściwości funkcjonalne tych kompozytów oraz 4. naniesieniu najbardziej obiecującego kompozytu na powierzchnię skórki jabłka i sprawdzenie potencjału kompozytu do zastosowania jako materiału do otoczkowania owoców.

Użyte techniki analityczne obejmowały mikroskopię SEM, mikroskopię ramanowską, analizę widm FT-IR, zwilżalność powierzchni przez wodę, właściwości barierowe takie, jak przepuszczalność pary wodnej, przechodzenie światła, wpływ promieniowania UVC na zdolności antyoksydacyjne flawonoidów oraz badania mikrobiologiczne.

Celuloza do kompozytu w publikacji P3 zostały przygotowane tak samo jak w publikacji P2. Natomiast do dyspersji celulozy mikro- i nanofibrylarnej została dodana lecytyna, jako czynnik emulgujący. Jako substancji bioaktywnych wykorzystano cztery czyste flawonoidy: kwercetynę, rutynę, naringeninę oraz naringinę, które zostały naniesione na wciąż wilgotną powierzchnię filmów celulozowych z lecytyną, w formie 29% alkoholowej dyspersji z fosfatydylocholiną. Tak otrzymane kompozyty były suszone pod ciśnieniem.

Wszystkie tak wykonane roztwory flawonoidu wykazały stabilną adsorpcję na powierzchni celulozy - nie kruszyły się, ani nie oddzielały od powierzchni kompozytu.

Opierając się na zdjęciach, obrazach mikroskopowych SEM oraz Ramana, kompozyty oparte na celulozie nanofibrylarnej były bardziej jednolite, niż te na bazie celulozy mikrofibrylarnej. Najbardziej jednolitą powierzchnią wykazywały się kompozyty z kwercetyną, tworząc praktycznie nieprzenikalną dla światła warstwę na filmie. Kompozyty z rutyną charakteryzowały się bardzo heterogeniczną powierzchnią, z okrągłymi skupiskami flawonoidu na powierzchni. Naringenina tworzyła formy krystaliczne na powierzchni filmów, a kompozyty z naringiną wykazywały najbardziej jednolitą powierzchnię, przypominającą filmy kontrolne bez dodatku flawonoidów.

Analiza widm FT-IR wykazała, że tylko kwercetyna w formie liposomalnej zaadsorbowana na powierzchni wchodziła w interakcje międzycząsteczkowe z powierzchnią celulozy mikro- lub nanofibrylarnej, głównie poprzez związania wodorowe. W widmie FT-IR rutyny, naringiny i naringeniny obecne jest charakterystyczne pasmo z maksimum przy 1800 cm^{-1} , dające podstawę by sądzić, że udało się uformować struktury liposomalne. Natomiast dalsza analiza widm tych flawonoidów, wskazuje, że nie wiązały się one na powierzchni filmów celulozowych poprzez wiązania chemiczne, a raczej przez oddziaływania fizyczne. Na podstawie tych wyników oraz literatury wyciągnięto wniosek, że adsorpcja jest zależna od ilości grup OH flawonoidów oddziałujących z celulozą. Kwercetyna posiadała aż 5 wolnych grup hydroksylowych, najwięcej spośród badanej grupy flawonoidów. Istotny mógł też być rozmiar cząsteczki oraz jej przestrzenna struktura.

Pomiary kąta zwilżania wodą (WCA) wykazały znaczące jego zmniejszenie dla wszystkich wariantów kompozytów z kwercetyną w porównaniu z kontrolą, co świadczy o silnych właściwościach hydrofilowych powierzchni, szczególnie dla kompozytów opartych na nanocelulozie nanofibrylarnej (NCL_QUE_15: $23,84^\circ \pm 1,55$ i NCL_QUE_30 $31,12^\circ \pm 3,47$). Kompozyty z rutyną także wykazywały większą hydrofilowość w porównaniu do filmów kontrolnych. Natomiast, kompozyty z dodatkiem naringiny i naringeniny były najbardziej hydrofobowe, ale nie bardziej niż filmy kontrolne.

Właściwości barierowe filmów zostały określone poprzez przepuszczalność dla pary wodnej oraz przepuszczalność dla światła w zakresie długości fali 200 - 1000 nm. Dodatek flawonoidów w większości powodował zmniejszenie przepuszczalności pary wodnej. Jednakże, istotnie statystyczny spadek występował głównie w kompozytach opartych na celulozie nanofibrylarnej. NCL_NAG_30 wykazał najniższą przepuszczalność pary wodnej spośród wszystkich typów kompozytów. Badania przepuszczalności filmów dla badanego

zakresu światła UV-Vis-NIR ujawniły, że wszystkie typy kompozytów miały znacznie niższą transmitancję światła w porównaniu z filmami kontrolnymi, a wszystkie warianty zawierające kwercetynę miały zdolność blokowania światła w całym badanym zakresie (transmitancja o wartościach bliskich 0%).

Zbadano także odporność flawonoidów na utlenianie pod wpływem promieniowania UVC. W wyniku tego eksperymentu zaobserwowano faktyczny wpływ promieniowania UVC na spadek pojemności antyoksydacyjnej, jednakże należy podkreślić, że wciąż kompozyty zachowały znaczącą zdolność antyoksydacyjną. Kompozyty zawierające kwercetynę charakteryzowały się największą zdolnością antyoksydacyjną ze wszystkich badanych wariantów.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wykazała dość słabe i bardzo selektywne działanie kompozytów z flawonoidami na drobnoustroje, jednakże było ono bardziej widoczne niż to otrzymane dla kwasów fenolowych (publikacja P2). Działanie przeciwdrobnoustrojowe kompozytów wobec bakterii Gram-dodatnich potwierdzono na przykładzie *Staphylococcus aureus*. Tylko kompozyty zawierające kwercetynę wykazywały dość słabą (nie przekraczającą 12mm) strefę zatrzymania wzrostu. Reszta badanych kompozytów nie wykazywała lub wykazywała minimalne właściwości hamujące wzrost bakterii.

Z uzyskanych wyników wyciągnięto wniosek, że kompozyt celulozy nanofibrylarniej z kwercetyną (wariant NCL_QUE_30) wykazał najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową i silne właściwości antyoksydacyjne, przypisywane największej ilości, spośród badanych flawonoidów, grup hydroksylowych w cząsteczce kwercetyny. Pozwoliło to nie tylko na uzyskanie największej pojemności antyoksydacyjnej kompozytu z kwercetyną, ale też na homogeniczne i trwałe pokrycie przez nią powierzchni filmu celulozowego. Kompozyty z kwercetyną utrzymywały również wysoką stabilność antyoksydacyjną nawet po ekspozycji na światło UVC. Poza tymi pożądanymi właściwościami, niestety kompozyty z kwercetyną charakteryzowały się dużą hydrofilowością powierzchni oraz dużą przepuszczalnością pary wodnej (porównywalne z kontrolą). Jednakże badania kompozytu naniesionego bezpośrednio na skórkę jabłka, pokazywały jego duże powinowactwo do hydrofobowej powierzchni owocu, co skutkowało powstaniem dość jednolitej warstwy na powierzchni skórki, zmniejszając przepuszczalność światła, bez widocznej zmiany koloru powierzchni jabłka. Wskazuje to na duży potencjał badanego kompozytu w opracowaniu preparatu do otoczkowania owoców.

5. Badania uzupełniające

5.1. Wstęp

Antocyjany to związki z grupy flawonoidów, które występują naturalnie w owocach, warzywach i w kwiatach. Wymienia się 7 głównych antocyjanów: cyjanidyna (aż około 50% wszystkich występujących w owocach i warzywach antocyjanów), pelargonidyna, delfinina, petunidyna, peonidyna oraz malwidyna, które posiadają dość zróżnicowaną paletę barw (Zhao i in., 2022, Enaru i in., 2021)

Ich charakterystyczną cechą jest to, że ich struktura chemiczna jest wrażliwa na zmiany pH i w niskim pH przyjmuje postać kationu flawyliowego, a wraz ze wzrostem pH następuje deprotonowanie grup hydroksylowych co prowadzi do zmiany adsorbowanej długości światła, a więc w konsekwencji widoczną zmianę koloru z czerwonej, przez fioletową aż do niebieskiej (Khoo i in., 2017). Główną wadą antocyjanów jest jednak ich słaba stabilność w narażeniu na m. in. światło, tlen, temperaturę czy enzymy (Enaru i in., 2021).

W ostatnich latach opracowano wiele bioindykatorów z użyciem antocyjanów i biodegradowalnych polimerów mających stabilizować te związki taki jak chitozan, skrobia czy żelatyna (Li i Li, 2025, Erna i in., 2022, Chen i in. 2022). Poprawiało to często zdolności mechaniczne i hydrofobowość filmu.

Mimo to często opracowywane bioindykatory nie są w pełni pozyskane z surowców pochodzenia odpadowego. W zaprezentowanych badaniach uzupełniających podjęto próbę stworzenia filmu mogącego pełnić funkcje bioindykatora wykrywającego psucie się żywności wytworzonego w całości z surowców odpadowych - wykorzystano celulozę nanofbrylarną oczyszczoną z wyłoków jabłkowych, zrobiono ekstrakty z trzech wyłoków owocowych: z owoców aronii (*Aronia arbutifolia*), czarnej porzeczki (*Ribes nigrum*) i ciemnych winogron (*Vitis vinifera*) oraz lecytyny słonecznikowej, tworząc kompozyt, będący w stanie reagować zmianą barwy w czasie rzeczywistym na psucie się żywności. Ponadto taki kompozyt został zbadany pod względem właściwości antyoksydacyjnych i zawartości antocyjanów w porównaniu do czystych wyciągów. W badaniu porównano także, które wyciągi mają najlepsze właściwości barierowe w kontekście opakowaniowym.

5.2. Materiały:

5.2.1. Przygotowanie dyspersji nanofibrylarnej celulozy:

Celuloza (o zawartości suchej masy 10%) wyizolowana z wyłoków owoców jabłoni zwyczajnej (*Malus domestica*), zakupionych na lokalnym rynku (Lublin, Polska), została wyekstrahowana i oczyszczona metodą termo-chemiczną zgodnie z procedurą opisaną przez Szymańską-Chargot i in. (2017). Następnie otrzymano z niej dyspersję celulozy nanofibrylarnej z lecytyną (NCL) metoda szczegółowo opisaną w publikacji Krysa i in. (2025b) oraz w podrozdziale 3.1.3.

5.2.2. Zbiór owoców i przygotowanie wyłoków owocowych

Owoce aronii (*Aronia arbutifolia*), czarnej porzeczki (*Ribes nigrum*) i ciemnych winogron (*Vitis vinifera*) zostały zebrane z przydomowego ogrodu w fazie pełnej dojrzałości (Puławy, lubelskie, Polska). Z każdego owocu zostały przygotowane wyłoki zawierające głównie skórki owoców. Każde 100g tak przygotowanego wyłoku zostało umieszczone w szklanej zlewce o objętości 2L, zalane do pełna wodą destylowaną o temperaturze pokojowej, mieszane na mieszadzie magnetycznym przez 30 minut, a następnie przesączone przez sito. W celu wypłukania wyłoku z pozostałości po soku, proces ten powtórzono trzykrotnie. Wypłukane wyłoki zostały pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej bez dostępu do światła. Następnie wysuszone wyłoki zmielono w młynie kulowym (częstotliwość drgań 30,0 Hz/s przez 15 minut, Retsch MM 400, Verder Company), szczelnie zamknięto i przechowywano w suchym miejscu bez dostępu do światła.

5.2.3. Przygotowanie ekstraktu

Do 0,5 g wybranego suchego i zmielonego wyłoku, dodano z 3,7 mL etanolu o stężeniu 70% i umieszczono w łaźni ultradźwiękowej (80W, 50Hz, Polsonic) na 3 minuty. Następnie do mieszaniny dodano 21,3 mL wody destylowanej i ponownie poddano sonikacji w łaźni przez 5 minut. Otrzymany ekstrakt odwirowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej przy obrotach $6000 \times g$ (wirówka MPW-260R, MPW Med. Instruments, Polska), a supernatant przefiltrowano przez filtr nylonowy (średnica porów 0,2 μm , Millipore). Tak przygotowano ekstrakty czarnej porzeczki (BC), aronii (CB) oraz ciemnych winogron (BG) w 3 powtórzeniach. Ekstrakty do dalszych analiz zostały zliofilizowane.

5.2.4. Przygotowanie filmu:

Przygotowaną dyspersję celulozy nanofibrylarnej z lecytyną z punktu 5.1.1 filtrowano przez 6h zestawem do filtracji próżniowej (kolba 1000 mL, lejek i zacisk; Chempur, Polska) podłączonym do pompy próżniowej Basic 36 (AgaLabor, Polska) z ustawionym ciśnieniem 0,5 bara. Na powierzchnię wilgotnego filmu wylano przygotowany na świeżo wybrany ekstrakt (BC, CB lub BG) i filtrowano całość przez 17 godzin, aż do całkowitego wyschnięcia filmu. Suchy film zdjęto z filtra i poddano dalszej analizie. Filmem kontrolnym był film z czystej celulozy nanofibrylarnej (NCL). Wszystkie filmy (NCL, NCL_BC, NCL_CB, NCL_BG) przygotowano w trzech powtórzeniach.

5.3. Metody:

5.3.1. Mikroskopia optyczna

Do obrazowania powierzchni próbki wykorzystano mikroskop WITec wyposażony w obiektyw Zeiss EC Epiplan-Neofluar 100x/0.9. Obszar analizowany obejmował powierzchnię o wymiarach $377,564 \times 377,564 \mu\text{m}$ obrazowaną w rozdzielczości 6501×6501 pikseli. Pomiar został przeprowadzony w formie mapy powierzchniowej z zastosowaniem „stitchingu” – połączenia serii 36 obrazów ułożonych w siatkę 6×6 w celu uzyskania obrazu mikroskopowego badanego obszaru. Czas ekspozycji wynosił 1/25 s. Po akwizycji seria obrazów została scalona automatycznie za pomocą oprogramowania ProjectSix (WITec).

5.3.2. Interakcje Molekularne:

5.3.2.1. Spektroskopia FT-IR

Widmo w podczerwieni zostało zmierzone za pomocą spektrometru Nicolet 6700 FT-IR z przystawką Smart iTR i dzielnikiem wiązki KBr (Thermo Scientific, Madison, USA). Zebrano po 200 skanów w trzech powtórzeniach, wykonanych z rozdzielczością 4 cm^{-1} w zakresie $4000\text{--}650 \text{ cm}^{-1}$. W ten sposób zostały wykonane widma zarówno dla kompozytów, jak i dla ekstraktów w formie liofilizatów. Korekcja linii bazowej przeprowadzono przy użyciu oprogramowania OMNIC (OMNIC Spectra Software, Thermo Scientific), a normalizację do pola powierzchni pod widmem przy pomocy programu ORIGIN (wersja 8.5 PRO, OriginLab Corporation, USA).

5.3.3. Badania spektrofotometryczne:

5.3.3.1. Wydajność ekstrakcji:

Dla każdego typu ekstraktu (BC, CB, BG) przygotowanego zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 5.1.3, wykonano oznaczenie masy po odparowaniu wody w trzech powtórzeniach. W tym celu ekstrakty o określonej objętości (25ml) zostały poddane liofilizacji przez 4 dni (Labconco, model 700401015), po czym liofilizaty zostały zważone.

5.3.3.2. Zawartość związków fenolowych w ekstraktach:

Metodę Folin-Ciocalteu wykonano poprzez 20 μ L badanego wyciągu, dodając 1,58 mL wody, 100 μ L odczynnika Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu phenol reagent, Supleco) oraz 300 μ L Na₂CO₃ w stężeniu 1,89mol/L. Następnie mieszanina była inkubowana w ciemności w 40 °w cieplarni (cieplarnia laboratoryjna, DanLaB). Dla przygotowanych prób mierzono absorbancję przy długości fali 765nm (Genesys 10S, Thermo Scientific). Pomiar wykonano w trzech powtórzeniach. Średnie stężenie wyliczono z krzywej wzorcowej otrzymanej dla kwasu galusowego. Zawartość związków fenolowych wyrażono w równoważnikach kwasu galusowego na litr (GAE/L).

5.3.3.3. Zawartość antocyjanów:

Zawartość antocyjanów w zliofilizowanych ekstraktach oznaczono zgodnie z metodą opisaną przez Sganzerla i in. (2021). W przypadku wyciągów, 0,5 mL próbki zmieszano z 5 mL roztworu etanolu z dodatkiem HCl (85% v/v EtOH, 1,5% HCl), a następnie mieszaninę inkubowano bez dostępu światła przez 30 minut. W przypadku kompozytów, najpierw zostały przygotowane krążki o średnicy 0,5 cm, które następnie zanurzono w 10 mL roztworu etanolu z dodatkiem HCl (85% v/v EtOH, 1,5% HCl) i poddano działaniu łaźni ultradźwiękowej przez 5 minut. Następnie również inkubowano je bez dostępu do światła przez 30 minut. Po tym czasie, zmierzono absorbancję przy długości fali 535 nm, (spektrofotometr UV-Vis, Genesys 10S, Thermo Scientific). Dla każdego pomiaru wykonano po 3 powtórzenia. Zawartość antocyjanów wyrażono jako mg cyjanidyno-3-glukozydu (C3G) na gram suchej masy (dla wyciągów) lub przeliczając dodatkowo tę wartość na cm² powierzchni filmu (dla kompozytów).

5.3.3.4. Zdolność antyoksydacyjna:

Pojemność antyoksydacyjną oznaczono metodą TEAC, zgodnie z procedurą opisaną przez Krysa i in. (2025a) - dla wyciągów i Krysa i in. (2025b) - dla kompozytów. W przypadku

wyciągów, po 30 minutach inkubacji próbki bez dostępu do światła, absorbancję mierzono przy długości fali 734 nm za pomocą spektrofotometru UV–Vis (Genesys 10S, Thermo Scientific). Dla każdego rodzaju wyciągu wykonano po 3 powtórzenia, oraz po 5 powtórzeń w przypadku kompozytów. Pojemność antyoksydacyjną obliczono na podstawie krzywej wzorcowej otrzymanej dla ekwiwalentu Troloxu (TE) i wyrażono jako mg TE/L dla wyciągów oraz mg TE/L przeliczone na cm² powierzchni dla kompozytów.

5.3.4. Oznaczenia RGB w kontekście zmian koloru:

5.3.4.1. Określenie koloru:

Kolor filmów został określony przy pomocy skanera Lexmark MX431 (Lexmark International Polska). Każdy wariant kompozytu został zeskanowany w rozdzielczości 600 DPI w trzech powtórzeniach. Następnie otrzymane obrazy zostały zanalizowane pod kątem wartości RGB (czerwony-zielony-niebieski) przy pomocy programu ImageJ (ImageJ, ver. 1.54g, USA).

5.3.4.2. Zmiana zabarwienia w zależności od stężenia amoniaku:

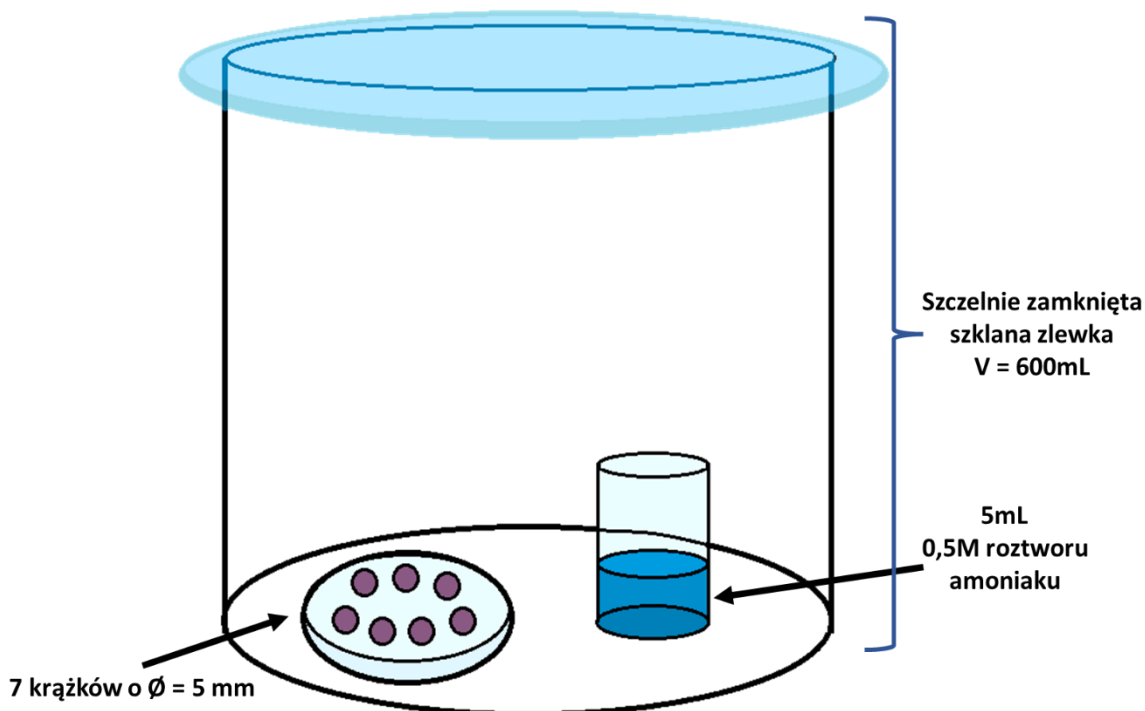
Przygotowano następujące wodne roztwory amoniaku: 0,5M, 0,25M, 0,125M, 0,0625M, 0,03125M. Zanurzono krążek filmem w danym roztworze (5mL) po 10 sekundach wyjęto i wysuszono. Następnie określono zmianę koloru w RGB wg punktu 5.3.4.1.

5.3.4.3. Zmiana zabarwienia w reakcji na zmianę pH:

Roztwory o pH: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, zostały wcześniej przygotowane za pomocą roztworów HCl oraz NaOH. Ustabilizowane pH zostało określone przez pH-metr (TitraLab AT1000 Series, HACH Polska). Następnie 3 skrawki każdego typu filmu o średnicy 0,5cm umieszczono w 5 mL roztworu o wybranym pH na 10 sekund a następnie wysuszono i poddano analizie RGB wg punktu 5.3.4.1

5.3.4.4. Symulowany test zepsucia:

W szklanej zlewce o objętości 600mL umieszczono mniejszą zlewkę z 5mL wodnego roztworu amoniaku (stężenie 0,5M) oraz szalkę Pertiego na której umieszczono 6 krążków danego wariantu kompozytu o średnicy 0,5cm. Całość przykryta była szklaną pokrywą i zostawiona pod dygestorium. Co 10 minut wyjmowano po jednym krążku z badanej puli kompozytu - ostatni został wyjęty 60 minut po rozpoczęciu eksperymentu. Dla każdego rodzaju kompozytu wykonano 3 powtórzenia i oznaczono zmianę koloru tak jak w punkcie 5.3.4.1



Rys. 4.: Schemat wykonania symulowanego test zepsucia z użyciem kompozytów z wyciągami.

5.3.5. Badania barierowe:

5.3.5.1. Przepuszczalność dla światła w zakresie UV–Vis–NIR:

Zdolność kompozytu oraz wyciągu (rozcieńczonego 32-krotnie w celu umożliwienia pomiaru transmisji) do blokowania światła oceniano na podstawie średniej z trzech niezależnych pomiarów dla każdego rodzaju próbki. Na podstawie uzyskanych danych obliczono procentową transmisję światła. Pomiary przeprowadzono w kuwecie kwarcowej, z wykorzystaniem spektrofotometru UV–Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent), w zakresie długości fal od 200 do 900 nm.

5.3.5.2. Kąty zwilżania:

Kąty zwilżania kropli wody (WCA) mierzono za pomocą standardowego goniometru (model 200-U1, Rame-Hart Instrument Co., USA) z automatycznym dozownikiem kropli. Pasek wycięty z filmu o szerokości 0,75cm został przyklejony na całą długość szkiełka mikroskopowego podstawowego za pomocą taśmy dwustronnej. Kroplę wody MilliQ o objętości 5 μ L umieszczano na powierzchni filmu, a kąt zwilżania mierzono co minutę przez łącznie 10 minut. Dla każdego filmu wykonano po 7 powtórzeń. Każdy punkt na wykresie

odpowiada średniej wartości lewego i prawego kąta zwilżania w danym punkcie czasowym (DROPimage Advanced).

5.3.5.3. Przepuszczalność dla pary wodnej:

Przepuszczalność dla pary wodnej (WVP) została określona dla krążków z filmów o średnicy 1,7cm, przymocowanych gumową nakrywką z otworem o średnicy 1,2cm do wylotu szklanych pojemników o wysokości 4cm z wodą destylowaną w środku wg. procedury zawartej w punkcie 3.2.3.2. Czas analizy to 24h w warunkach 40°C i 13-17% wilgotności powietrza. Wykonano 4 powtórzenia.

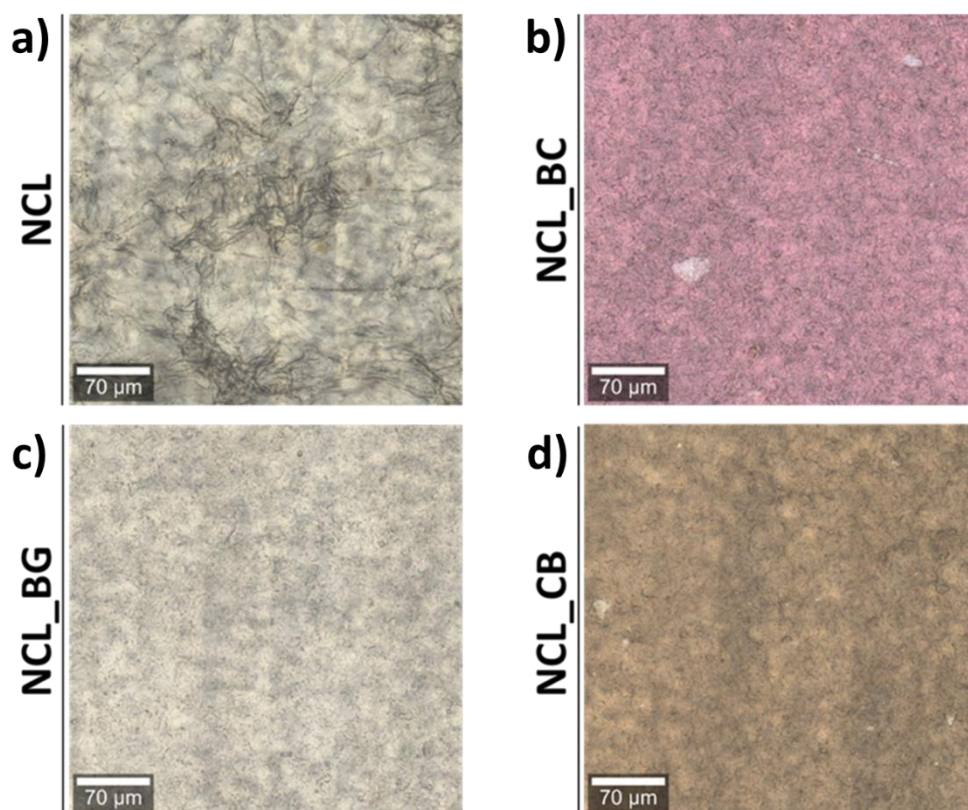
5.3.6. Analiza statystyczna:

Analiza statystyczna została wykonana przy pomocy programu Statistica (ver. 14.1.0.4., USA), Każda przebadana grupa miała taką samą liczbę powtórzeń. Po określeniu rozkładu normalnego i jednorodności został użyty test wariancji ANOVA a następnie post-hoc Tukeya.

5.4. Wyniki:

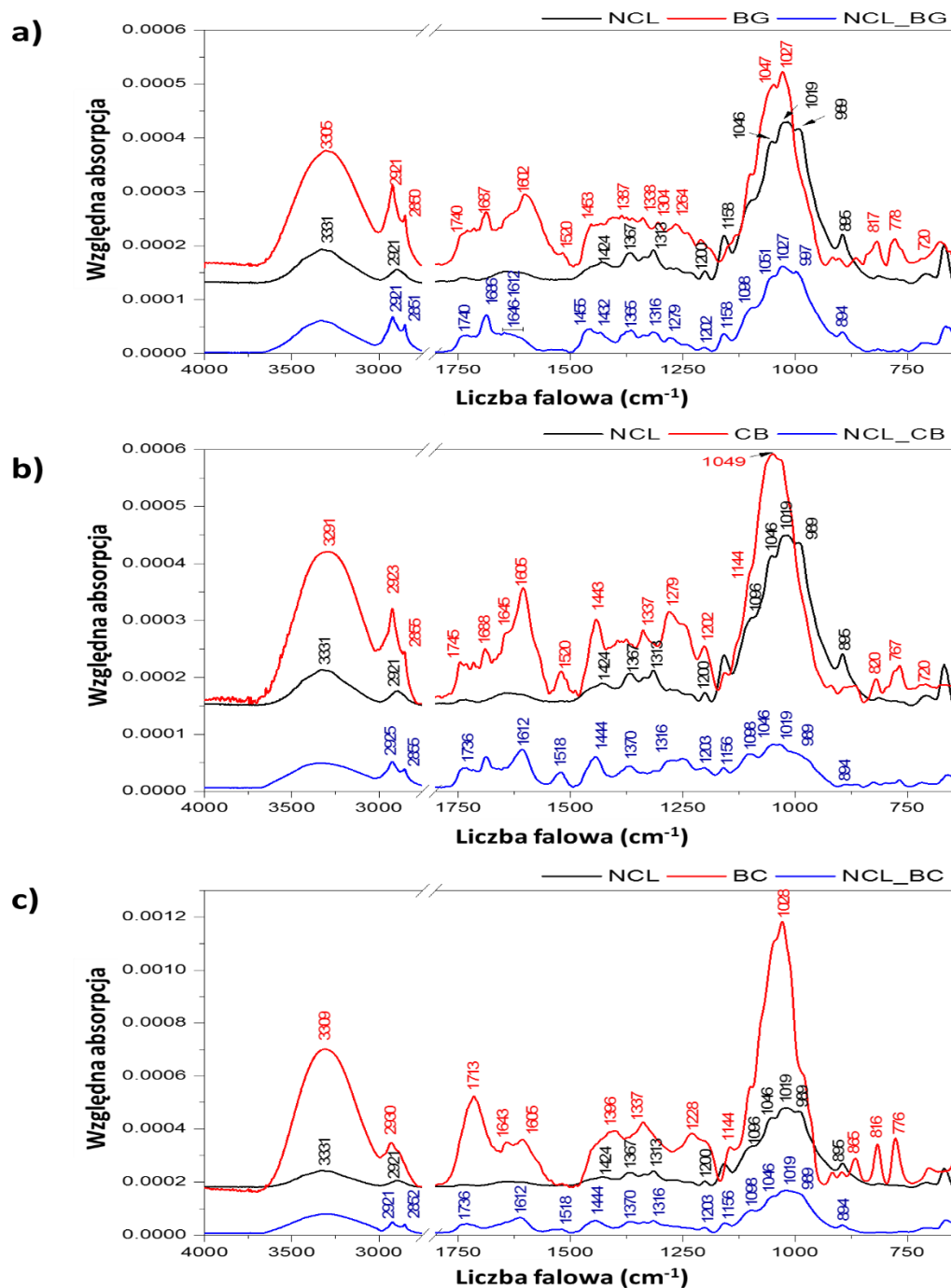
5.4.1. Obraz mikroskopowy kompozytów

Zdjęcia mikroskopowe uzyskane za pomocą mikroskopu świetlnego pokazały różnice w wyglądzie kompozytów. Na rys. 5. widać, że dodatek wyciągu z czarnej porzeczki (rys. 5b) zmienił kolor kompozytu na wyraźnie różowo-fioletowy (wartości w skali RGB dla obrazu: R:179, G:134, B: 145), ten z wyciągiem z ciemnych winogron miał kolor lekko fioletowy (rys. 5c), ale w mikroskopie świetlnym oraz w skanowanych obrazach ten kolor był bardziej szary (R: 189, G:186, B: 173), zaś kompozyty z aronią (rys. 5d) miały kolor brązowy z odcieniem czerwieni (R:156, G:134, B: 108).



Rys. 5.: Zdjęcia mikroskopowe (pow. 100x, wymiar mapy 6501×6501 pikseli) pokazujące kolor i powierzchnie kompozytów: nanofibrylarnej celulozy z lecytyną – NCL (a), NCL z wyciągiem z wytłoku owocu czarnej porzeczki NCL_BC (b), ciemnych winogron - NCL_BG (c) i owocu aronii - NCL_CB (d).

5.4.2. Interakcje molekularne

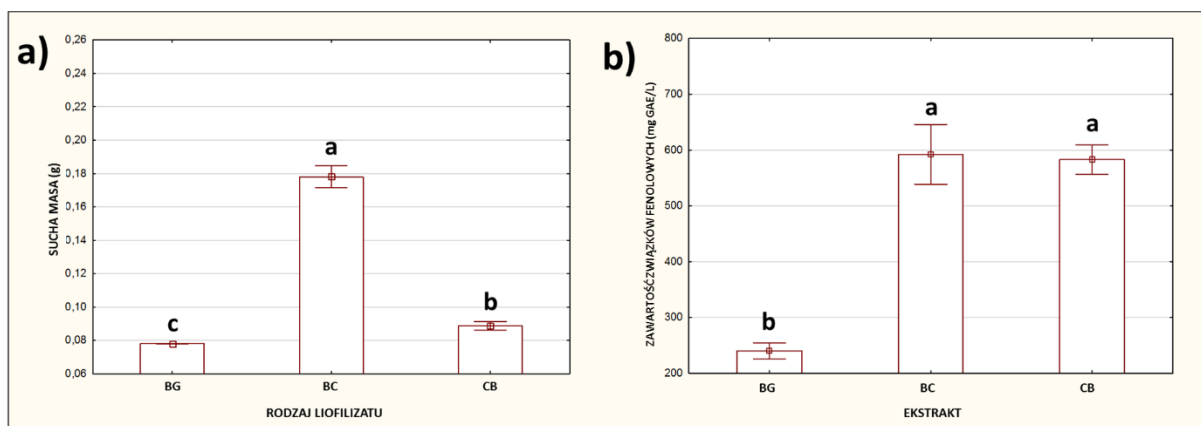


Rys. 6.: Widma FT-IR dla a) filmu z nanofibrylarnej celulozy z lecytyną (NCL), zliofilizowanego wyciągu z wyciągu z ciemnych winogron (BG) i kompozytu z zaadsorbowanym na powierzchni NCL wyciągu z ciemnych winogron (NCL_BG) b) zliofilizowanego wyciągu z wyciągu z owoców aronii (CB) i kompozytu z zaadsorbowanym na powierzchni NCL wyciągu z owoców aronii (NCL_CB) c) zliofilizowanego wyciągu z wyciągu z owoców czarnej porzeczki (BC) i kompozytu z zaadsorbowanym na powierzchni NCL wyciągu z owoców czarnej porzeczki (NCL_BC).

Dla większości kompozytów obecne były zarówno pasma pochodzące od antocyjanów, jak i dla matrycy z celulozy nanofibrylarnej z lecytyną: około 1604 cm^{-1} dla pierścienia aromatycznego antocyjanów (C-C) (Ji i in., 2025), czy 1144 cm^{-1} i 1020 cm^{-1} dla celulozy (Szymańska-Chargot i in. 2019) (rys. 6). Mimo występowania pasm dla antocyjanów w kompozytach, znacząco zmniejszyła się intensywność dla pasma z maksimum około 1053 cm^{-1} (rozciągające wiązanie C-O-C) oraz około 1640 cm^{-1} (C=O) typowych dla związków polifenolowych (antocyjanów) (rys. 6) (Krysa i in. 2022). Dodatkowo, wszystkie kompozyty wykazały się spadkiem intensywności pasma przy 894 cm^{-1} odpowiadającemu drganiom wiązania β -1,4-glikozydowego w celulozie, co może wskazywać na interakcje między celulozą a związkami polifenolowymi. Było to szczególnie widoczne w widmie otrzymanym dla NCL_CB (Chambre i Dochia 2021). Wystąpiło też poszerzenie oraz przesunięcie dla pasm odpowiadającym drganiom grup OH ($3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$), co może również potwierdzać interakcje polifenol-celuloza (Krysa i in. 2025b).

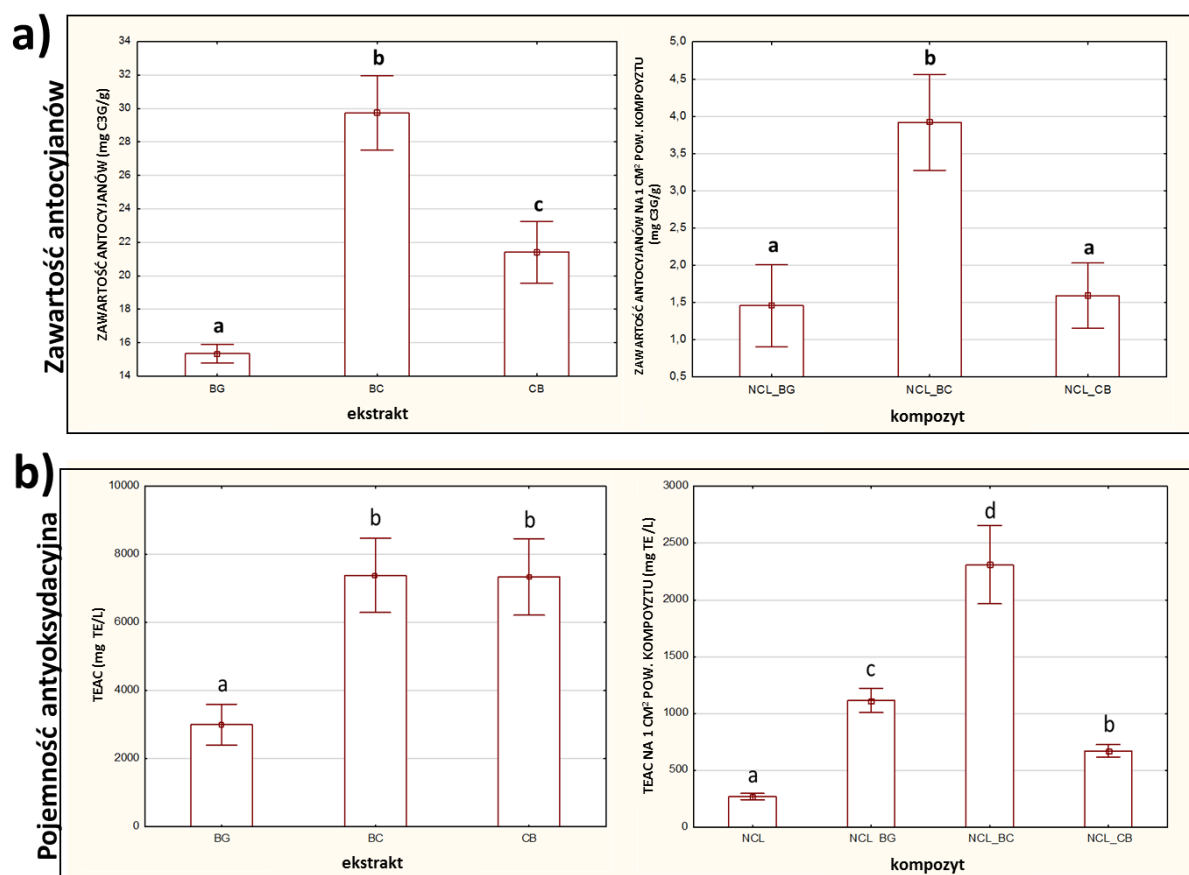
5.4.3. Określenie zawartości związków polifenolowych oraz pojemności antyoksydacyjnej wyciągów i kompozytów

Przygotowane ekstrakty poddano liofilizacji w celu oznaczenia wydajności ekstrakcji (rys. 7a) oraz oszacowaniu ogólnej zawartości wyekstrahowanych składników z wyciągów owocowych (rys. 7b). Największa masa po odparowaniu wody została otrzymana dla liofilizatu ekstraktu z czarnej porzeczki ($178\pm 6,6\text{ mg}$). Liofilizaty z ciemnego winogrona oraz z aronii miały podobne wartości (BG: $78\pm 0,2\text{ mg}$ oraz CB: $89\pm 2,5\text{ mg}$) jednakże były one o ponad połowę niższe niż dla ekstraktu z czarnej porzeczki (rys. 7a.). Interesującym wynikiem jest ogólna zawartości fenoli w ekstraktach (TPC) (rys. 7b.), która mimo znaczącej różnicy dla suchej masy nie jest istotnie statystycznie różna między próbkami dla ekstraktów BC ($592,2\pm 53,73\text{ mg GAE/L}$) i CB ($582,9\pm 26,53\text{ mg GAE/L}$). Dla BG wartość TPC wynosiła $240\pm 14,3\text{ mg GAE/L}$, czyli prawie 3-krotnie niższa niż dla pozostałych. Inny stosunek wartości między ekstraktami w porównaniu do stosunku suchej masy liofilizatów może wynikać z faktu, że sama metoda Folina-Ciocalteu (TPC) jest metoda niespecyficzną tzn. reaguje nie tylko z polifenolami ale również z aromatycznymi aminami, aminokwasami, kwasem cytrynowym czy witaminą C (Dominguez-López i in. 2023).



Rys. 7.: Przedstawia zawartość suchej masy po liofilizacji (a) oraz ogólną zawartość fenoli oznaczoną metodą Folina-Ciocalteu (b) dla wyciągów. BC oznacza liofilizat wyciągu z owocu czarnej porzeczki, BG z ciemnych winogron i CB z owocu aronii. Wartości oznaczone różnymi literami wykazują istotnie statystycznie różnice według testu post-hoc Tukeya (RIR), $p < 0,05$.

Z tego powodu wykonano dodatkowe badania zawartości antocyjanów (rys. 3a) i zdolności antyoksydacyjną (rys. 3b). Największą zawartością antocyjanów wykazał się ekstrakt z czarnej porzeczki ($29,7 \pm 2,2 \text{ mg C3G/g}$), następnie z aronii ($21,4 \pm 1,85 \text{ mg C3G/g}$) i z ciemnych winogron ($15,3 \pm 0,6 \text{ mg C3G/g}$). W tym przypadku wyraźnie widać, że zawartość antocyjanów dla BC i CB nie jest podobna i ta zależność utrzymuje się dla większości wyników. Co ciekawe, dla kompozytów z NCL_BG ($1,46 \pm 0,55 \text{ mg C3G/g}$ przeliczone na 1 cm^2 powierzchni kompozytu) i NC_CB ($1,59 \pm 0,44 \text{ mg C3G/g}^2$) zawartość antocyjanów jest statystycznie podobna, mimo początkowej mniejszej ilości antocyjanów w wyciągu BG. (rys. 7a) Kompozyty NCL_BC charakteryzowały się najwyższą zawartością antocyjanów na powierzchni ($3,92 \pm 0,65 \text{ mg C3G/g}$).



Rys. 8.: Schemat przedstawia: a) zawartość antocyjanów oraz b) pojemność antyoksydacyjną uzyskaną dla wyciągów i kompozytów. Skróty użyte na wykresie oznaczają: NCL – kontrolny film z nanofibrylarnej celulozy z lecytyną; BC – liofilizat wyciągu z owoców czarnej porzeczki; NCL_BC – kompozyt z dodatkiem wyciągu BC; BG – liofilizat z ciemnych winogron oraz NCL_BG – odpowiadający mu kompozyt; CB – liofilizat z owoców aronii i kompozyt NCL_CB. Wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie według testu post-hoc Tukeya (RIR), $p < 0,05$.

Zgodność wyników ogólnej zawartości fenoli (TPC) (rys. 8b) z pojemnością antyoksydacyjną (rys. 8a) w ekstraktach CB i BC jest potwierdzony przez brak statystycznie istotnych różnic w aktywności antyoksydacyjnej (CB: $7337,6 \pm 1123,8$ mg TE/L; BC: $7384,0 \pm 1092,9$ mg TE/L). Być może jest to spowodowane obecnością innych polifenoli o dużych właściwościach antyoksydacyjnych zawartych w aronii, w tym np. glikozydami kwercetyny (w tym rutyną) czy katechinami (w tym epikatechiną) (Gao i in. 2024b).

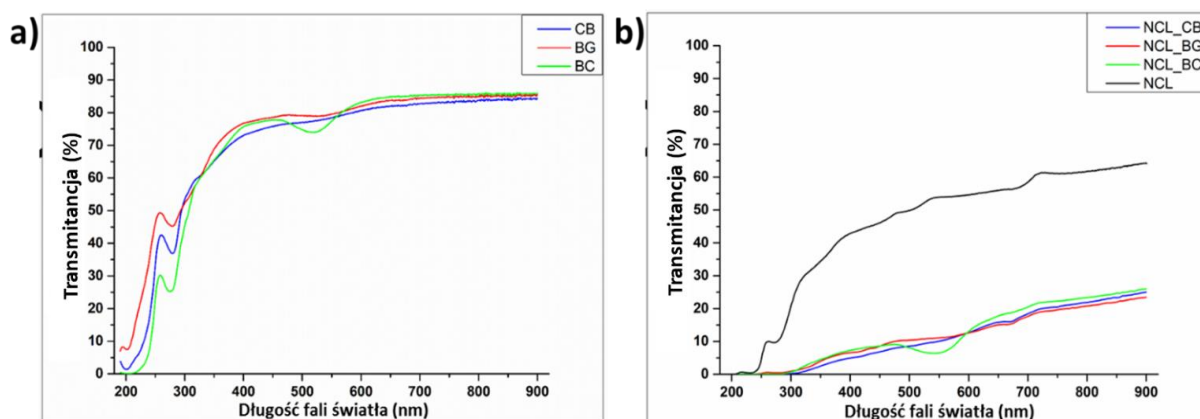
W kwestii zdolność antyoksydacyjnych kompozytów (rys. 8b), utrzymywała się tendencja, że najlepsze właściwości antyoksydacyjne charakteryzujące ekstrakty z BC

przekładały się na lepsze zdolności antyoksydacyjne kompozytu NCL_BC - oznaczono dla nich największą pojemnością antyoksydacyjną ze wszystkich badanych kompozytów ($2309,9 \pm 345,0$ mg TE/L przeliczone na 1 cm^2 pow. kompozytu). Pojemność antyoksydacyjna kompozytu NCL_BG była na poziomie $1115,5 \pm 107,6$ mg TE/L, a kompozytu NCL_CB - $627,1 \pm 53,8$ mg TE/L. Najniższa pojemność antyoksydacyjna kompozytu z CB, może wynikać z tego, że wyłók z aronii posiada głównie pochodne cyjanidyny (Gao i in. 2024b), a skórki z ciemnych winogron posiadają zarówno pochodne cyjanidyny, jak i delfinidyny czy malwidyny. Delfinidyna ma dużo większą zdolność antyoksydacyjną niż cyjanidyna (Koss-Mikołajczyk i Bartoszek, 2023) i może skuteczniej wiązać się z celulozą niż inne antocyjany, podobnie jak ma to miejsce w przypadku jej interakcji z pektyną, gdzie delfinidyno-3-O-glukozyd wykazywał większe powinowactwo do polisacharydu niż pochodna cyjanidyny, co przypisuje się większej liczbie grup hydroksylowych (Fernandes i in. 2014). W związku z tym, można przypuszczać, że delfinidyna odgrywa istotną rolę w wiązaniu antocyjanów z matrycą kompozytu. Biorąc pod uwagę badania wykonane wcześniej (Krysa i in. 2025b), jest to możliwe, że to był główny powód wystąpienia większej pojemności antyoksydacyjnej dla kompozytu NCL_BG niż NCL_CB. Co ciekawe czyste filmy NCL również posiadały nieznaczną zdolność antyoksydacyjną ($269,9 \pm 27,6$ mg TE/L).

5.4.4. Właściwości barierowe kompozytów

5.4.4.1. Przepuszczalność dla światła:

Zbadano przepuszczalność dla zakresu światła UV–Vis–NIR (200–900nm) zarówno kompozytów, jak i rozcieńczonych ekstraktów. Wszystkie kompozyty charakteryzowały się podobną przepuszczalnością od 0–25 %T w całym badanym spektrum, gdzie maksimum dla NCL wynosiło 64 %T dla fali o długości 900 nm. Zaobserwowano istotnie większą redukcję transmitancji dla światła w zakresie UV-C i UV-B przez kompozyty w porównaniu z kontrolą (czysty film NCL), która blokowała głównie przechodzenie światła w zakresie UV-C. W tym zakresie występowało też charakterystyczne zwiększone pochłanianie światła przy zakresie około 285nm dla samych wyciągów (rys. 9a), co jest charakterystyczne dla antocyjanów. (Slimestad i in. 2002)

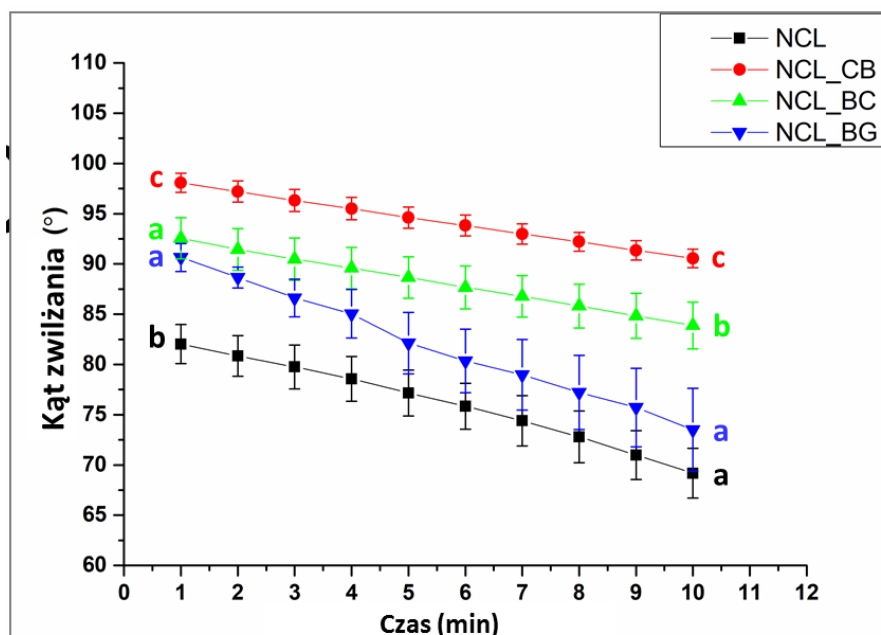


Rys. 9.: Właściwości barierowe dla zakresu światła UV–Vis–NIR dla kompozytów na bazie nanofibrylarniej celulozy z lecytyną (NCL), kompozytu (NCL_BC) oraz rozcieńczonego 32-razy ekstraktu z wyciągu z czarnej porzeczki (BC), kompozytu z wyciągiem z aronii (NCL_CB) i samego rozcieńczonego ekstraktu (CB) oraz kompozytu z ekstraktem z czarnego winogrona (NCL_BG) i samego ekstraktu (BG). Wyniki przedstawiono jako procentową przepuszczalność dla światła (transmitancję) w zakresie 200–900 nm.

Lokalny spadek przepuszczalności dla światła wystąpił także w zakresie długości 480–595nm dla NCL_BC (rys. 9b). Absorbencja dla tego zakresu długości fali jest charakterystyczna

dla glikozydów delfinidyny i cyjanidyny, co wskazuje na obecność tych antocyjanów w ekstrakcie z czarnej porzeczki (Slimestad i in. 2002, Sganzerla i in. 2021).

5.4.4.2. Zwilżalność powierzchni:



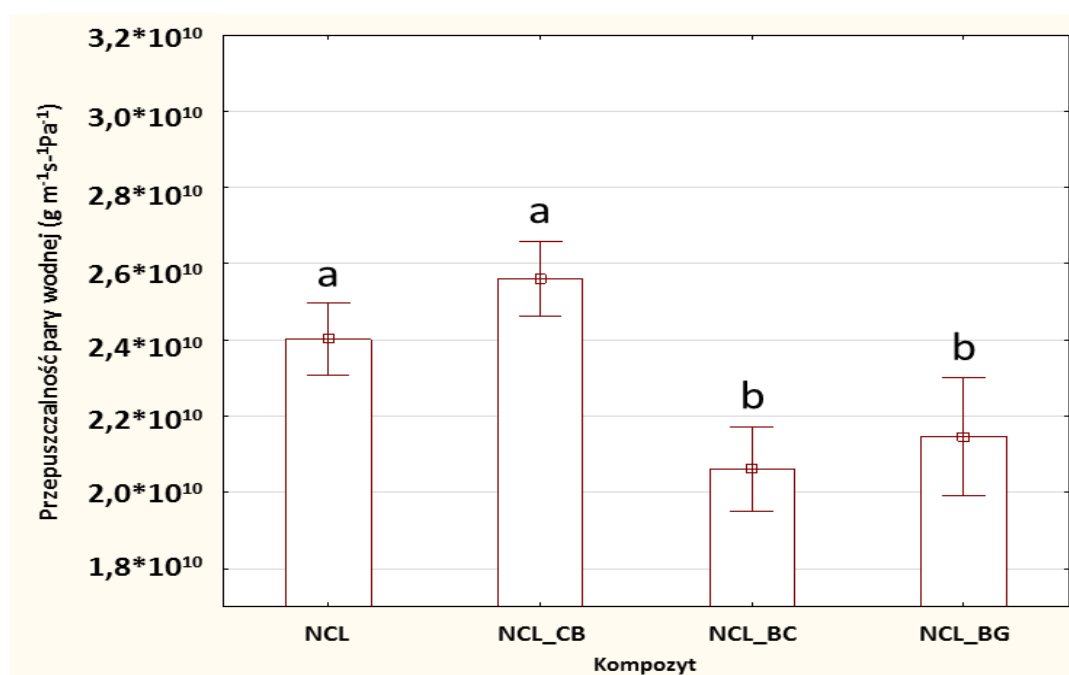
Rys. 10.: Badania zwilżalności powierzchni kompozytów. NCL - oznacza kompozyty na bazie celulozy nanofibrylarnej z lecytyną, NCL_BC - kompozyt z wyciągiem z wytłoku z czarnej porzeczki, NCL_CB - kompozyt z wyciągiem z aronii i NCL_BG kompozyt z wyciągiem z wytłoku z ciemnego winogrona. Litera w indeksie górnym oznaczają statystycznie istotne różnice w grupie wartości początkowych oraz w grupie wartości końcowych, wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie wg. testu post hoc Tukeya (RIR, $p < 0,05$).

W badaniach zwilżalności powierzchni wszystkie kompozyty wykazywały bardzo dużą hydrofobowość. Kąty zwilżania dla kontroli NCL były na poziomie ($82,0 \pm 2,1^\circ$), co jest typowe dla tego rodzaju powierzchni (Krysa i in. 2025b). Interesujące jest to, że dodatek wyciągów zwiększał hydrofobowość powierzchni (rys 10.). Największym kątem zwilżania wykazały się kompozyty z wyciągiem z aronii ($98,1 \pm 0,9^\circ$) i tendencja ta utrzymywała się przez całość trwania badania (po 10 min - $90,6 \pm 0,9^\circ$). Koreluje to z wcześniejszymi badaniami dotyczącymi zawartości polifenoli oraz pojemności antyoksydacyjnej - najprawdopodobniej z ekstraktu wykstrahowały się również inne polifenole, które mogą tworzyć na powierzchni warstwę sprawiając, że powstaje bardziej hydrofobowa powierzchnia (Tang i in. 2003). Możliwe też, że

między polifenolami, a matrycą celulozową powstały wiązania oparte na grupach OH. Obecność tych wiązań determinuje właściwości hydrofilowe, więc mniejsza ilość wolnych grup OH na powierzchni zwiększa właściwości hydrofobowe (Krysa i in. 2025b, Wu i Li, 2022). W przypadku kompozytu NCL_BC początkowa wartość kąta zwilżania wynosiła: $92,6 \pm 1,9^\circ$, a końcowa: $83,9 \pm 2,2^\circ$). Kompozyt NCL_BG pomimo początkowej wartości kąta zwilżania $90,6 \pm 2,2^\circ$ różniący się istotnie od kontroli po 10 minutach osiągnął wartość podobną do kontroli ($73,5 \pm 8,5^\circ$).

5.4.4.3. Przepuszczalność pary wodnej:

Zmierzono przepuszczalność dla pary wodnej kompozytów z wyciągami w porównaniu do filmu kontrolnego (NCL) (Rys. 11.). Kompozyty NCL_BC wykazywały najmniejszą przepuszczalność dla pary wodnej ($2,062 \cdot 10^{10} \pm 1,10 \cdot 10^{11} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$), kompozyty NCL_BG miały tę wartość nieznacznie większą ($2,134 \cdot 10^{10} \pm 1,56 \cdot 10^{11} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$). Kompozyty z NCL_CB przepuszczały więcej pary wodnej ($2,56 \cdot 10^{10} \pm 9,89 \cdot 10^{12} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$) niż kontrola ($2,4 \cdot 10^{10} \pm 9,58 \cdot 10^{12} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$), choć ta różnica nie była istotna statystycznie.



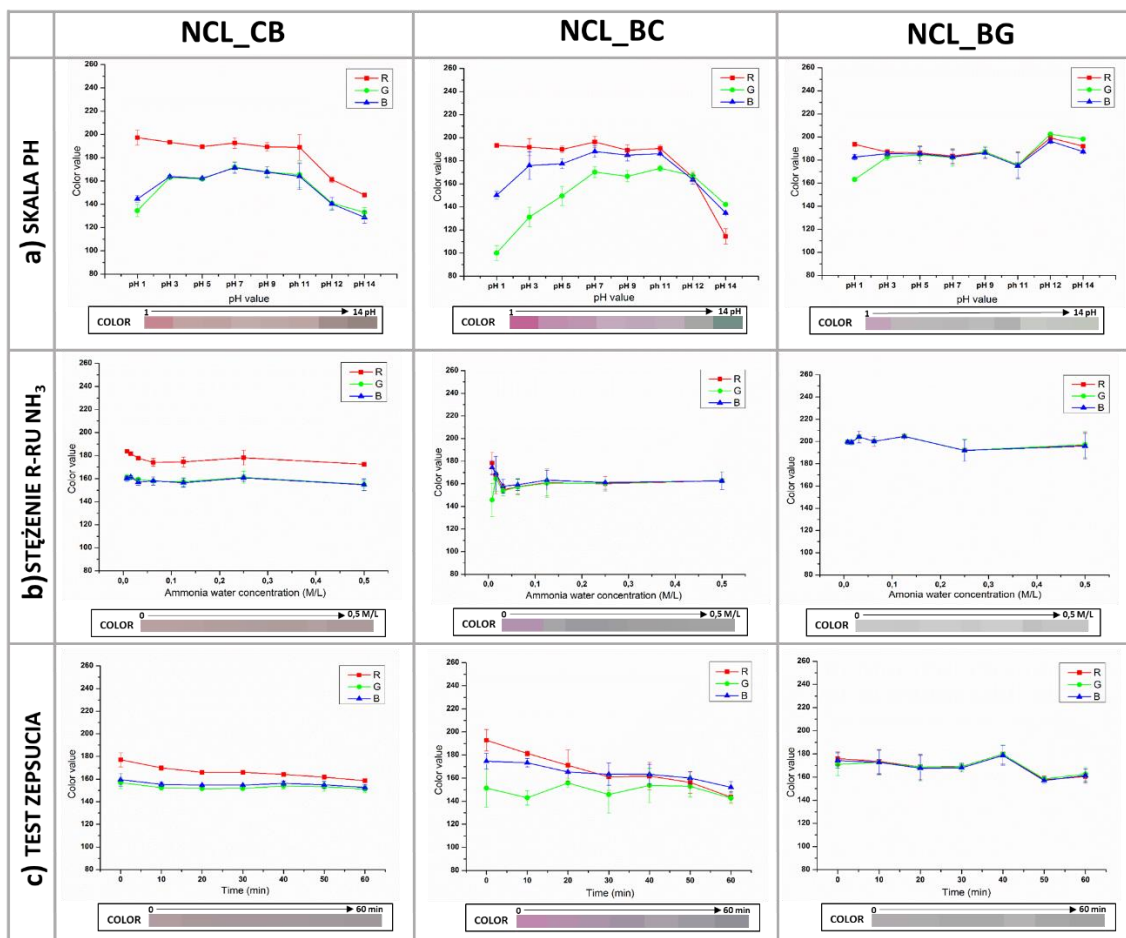
Rys. 11.: Przepuszczalność pary wodnej dla kompozytów na bazie nanofibrylarnej celulozy z lecytyną - NCL, kompozytem z wyciągiem z wytloku z czarnej porzeczki - NCL_BC, kompozyt z wyciągiem z aronii - NCL_CB i kompozyt z wyciągiem z wytloku czarnego winogrona - NCL_BG. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu ANOVA post-hoc z testem Tukeya - różnice pomiędzy kompozytami zostały oznaczone różnymi literami jako statystycznie istotne.

Mimo najlepszych właściwości hydrofobowych kompozytu NCL_CB, ma on jednocześnie największą przepuszczalność dla pary wodnej (rys.11.). Ten paradoks może wynikać z dużej interakcji między matrycą celulozową, a polifenolami, które zazwyczaj łączą się ze sobą przez wiązania wodorowe, które z kolei odpowiadają za właściwości hydrofilowe powierzchni - kompozyt staje się bardziej hydrofobowy. Natomiast sama wysoka przepuszczalność może wynikać z wysokiej porowatości kompozytów (mikroszczeliny) (Yue i in. 2022). Kompozyty z NCL_BC najprawdopodobniej wykazują się najlepszą równowagą hydrofobowo-hydrofilową, dzięki czemu przy zwiększonej hydrofobowości posiadają także duże właściwości zatrzymujące wodę (Othman i in. 2021)

Ta hipoteza zgadza się także z analizą widma FTIR gdzie dla kompozytów NCL_CB widać spadek intensywności pasma 894 cm^{-1} odpowiadającego drganiom wiązań β -1,4-glikozydowych celulozy. Może to sugerować zmniejszenie liczby dostępnych miejsc wiązania poprzez wiązanie polifenoli (Chambre i Dochia 2021).

5.4.5. Zmiany koloru (RGB):

Wyznacznikiem zmiany barwy antocyjanów jest zmiana intensywność dwóch głównych kolorów - czerwonego (R) oraz niebieskiego (B). W środowisku kwaśnym, które zazwyczaj występuje w owocach, antocyjany przyjmują barwy czerwone i wtedy występuje wyższa intensywność dla barwy czerwonej (rys. 12c), a w środowisku zasadowym barwa zmienia się na niebieską.



Rys. 12.: Wartości kolorów RGB (czerwony-zielony-niebieski) dla kompozytów: NCL_BC - kompozytu z wyciągiem z wyciągu z czarnej porzeczki, NCL_CB - kompozytu z wyciągiem z aronii i NCL_BG - kompozytu z wyciągiem z wyciągu czarnego winogrona, zbadane dla: a) skali pH (wartości RGB dla pH 1, 3, 5, 7, 9, 11, 12, 14), b) reakcji na stężenie amoniaku (wartości RGB dla 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015625, 0,0078125 M/L NH₃), c) test zepsucia czyli zmiana koloru kompozytu w czasie reakcji na parowanie wodnego roztworu amoniaku (stęż. 0,5M) po 10, 20, 30, 40, 50 i 60 minutach. Paski na dole każdego wykresu dają poglądową zmianę koloru kompozytu, uzyskaną z uśrednionych wartości RGB w danych warunkach.

Ta zależność występuje dla NCL_BC oraz NCL_BG, dla których znacząca różnica zazwyczaj występuje w mocno zasadowym środowisku (wysokie pH) (rys. 12a). Dla NCL_CB taka zależność nie wystąpiła dla żadnej użytej wartości pH (rys. 12a, b, c) - nasycenie barwą R i B zmniejszało lub zwiększały swoją intensywność równolegle tj. jeśli rosła intensywność barwy czerwonej, rosła też intensywność barwy niebieskiej i na odwrót. Jedynym wyjątkiem, zarówno dla stężenia NH_4 , jak i skali pH, jest spadek intensywności barwy niebieskiej ($B=144,5$) i wzrost intensywności barwy czerwonej ($R=197,2$) przy $\text{pH} = 1$ lub przy bardzo małym stężeniu amoniaku w roztworze wodnym ($0,0078125 \text{ M/L}$). Najprawdopodobniej zmiana barwy na bardziej brązową w środowisku zasadowym dla NCL_CB wynikała z obecności innych polifenoli (np. katechin), które utleniając się mogły maskować odcień antocyjanów (Gao i in. 2024a). Dla NCL_BC zazwyczaj ta zależność była dość liniowa - im wyższe pH tym mniejsza intensywność R, a większa B ($\text{pH} 14$: $R=114,5$ $B=134,7$). Różnice te były również wyraźne wizualnie, jednak w przypadku kompozytów NCL_BG ze względu na bardzo zbliżone wartości intensywności kolorów RGB (odcienie szarości), ocena zmian była utrudniona zarówno na podstawie obserwacji, jak i przy użyciu programu ImageJ.

Wszystkie kompozyty wykazywały reakcje poprzez zmianę barwy już przy małych ilościach amoniaku, zarówno w postaci roztworu ($0,015625 \text{ M NH}_3/\text{L}$), jak i uwalnianego gazowego amoniaku NH_3 (rys. M c). Po porównaniu barw uzyskanych dla testu zepsucia oraz stężenia wodnego roztworu amoniaku do skali pH, możemy zobaczyć, że wszystkie próbki mieszczą się w zakresie od 8-11 pH, typowym dla środowiska zasadowego tworzonego przez amoniak. Pierwsza niewielka zmiana koloru występowała po 10 minutach od umieszczenia kompozytów w szalce z roztworem dla NCL_BG spadek intensywności koloru R wynosił 1,4%, dla NCL_CB - 3,95%, a dla NCL_BC - 5,96%. Końcowy spadek wartości R wynosił: NCL_BG - 9,09%, NCL_CB - 9,89%, NCL_BC - 18,47%, co dodatkowo potwierdza, że najlepszym bioindykatorem zmian pH lub obecności grup aminowych był kompozyt z wyciągiem z wyciągu z czarnej porzeczki.

5.5. Wnioski

Kompozytem o najlepszych właściwościach zarówno pod względem zawartości antocyjanów, odpowiednich właściwościach antyoksydacyjnych, barierowych względem pary wodnej czy hydrofobowych oraz małej przepuszczalności dla światła w zakresie UV okazał się kompozyt na bazie celulozy nanofibrylarniej z wyciągiem z czarnej porzeczki (NCL_BC). Ponadto jego dodatkowym atutem była najszersza skala zmiany koloru pod wpływem pH spośród wszystkich badanych kompozytów oraz wysoka czułość na różne stężenia związków aminowych, uwalnianych podczas psucia się mięsa. Kompozyty z wyciągiem aronii (NCL_CB) mimo odpowiednich właściwości hydrofobowych, dużej pojemności antyoksydacyjnej oraz zdolności blokowania promieniowania UV miały bardzo dużą przepuszczalność dla pary wodnej oraz bardzo słabo reagowały na zmianę barwy pod wpływem zmian pH, co czyni je gorszym wyborem niż kompozyty NCL_BC. Najmniej użytecznymi właściwościami wykazały się kompozyty z wyciągiem ze skórki winogron (NCL_BG). Być może w celu osiągnięcia lepszych efektów, wskazane by było użycie innej metody ekstrakcji, biorąc pod uwagę niską ilość ogólną polifenoli, antocyjanów oraz pojemność antyoksydacyjną w ekstrakcie.

Podsumowując, wybrane kompozyty zostały wykonane w całości z surowców, które są typowymi odpadami po produkcji soków. Pod tym względem, mogą więc stanowić ekologiczną i bezpieczną alternatywę dla materiałów opakowaniowych z plastiku używanych do zabezpieczania żywności. Także ich właściwości optyczne, szczególnie kompozytów NCL_BC, powodują, że mogą również stać się łatwymi do odczytania przez potencjalnego konsumenta bioindykatorami świeżości produktu, co stanowi dodatkowy atut.

6. Podsumowanie i wnioski

W rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki dotyczące badań kompozytów na bazie celulozy oraz związków polifenolowych. Wyniki zgromadzone w dwóch z trzech opublikowanych prac pokazują, że możliwe jest stworzenie biodegradowalnego i opartego w pełni na surowcach wtórnych kompozytu wzbogaconego o funkcjonalne związki bioaktywne z grupy polifenoli. W badaniach użyto celulozy wyizolowanej z wyłoku jabłkowego jako matrycy do nanoszenia i stabilizowania związków polifenolowych. Użyte zostały dwie formy celulozy: mikro- i nanofibrylarna. Natomiast, związki polifenolowe zostały użyte jako substancje o właściwościach przeciwutleniających w celu potencjalnego przedłużenia świeżości żywności. Przebadane zostały następujące grupy związków polifenolowych: kwasy fenolowe (kwas galusowy, kawowy oraz chlorogenowy), flawonoidy (kwercetyna, rutyna, naringina i naringenina) oraz ekstrakty wyizolowane ze skórek owoców jagodowych (aronii, czarnej porzeczki i czarnych winogron) zawierające znaczące ilości antocyjanów.

Najlepszą matrycą do stworzenia kompozytów ze związkami polifenolowymi okazała się celuloza nanofibrylarna. Kompozyty na bazie celulozy nanofibrylarniej posiadały większą przepuszczalność dla światła w zakresie widzialnym, charakteryzowały się najbardziej jednorodnym rozmieszczeniem związków polifenolowych na powierzchni oraz lepszymi właściwościami barierowymi względem pary wodnej, przy jednoczesnym zachowaniu właściwości antyoksydacyjnych polifenoli. Najlepszym zaś, ze względu na te właściwości, związkiem polifenolowym z grupy kwasów okazał się kwas kawowy, a z grupy flawonoidów kwercetyna. Spośród ekstraktów wyizolowanych ze skórek owoców jagodowych najlepsze właściwości barierowe i pod względem posiadanego spektrum zmiany koloru okazał się ekstrakt z czarnej porzeczki.

Najlepsze, chociaż bardziej w kontakcie niż powodując strefę inhibicji, właściwości bakteriostatyczne z grupy filmów z kwasami fenolowymi posiadał kwas kawowy, a w grupie flawonoidów kwercetyna. Jednakże w przypadku kompozytów z kwercetyną zdolności hamujące wystąpiły tylko w przypadku *S. aureus*, choć dla tego patogenu strefy inhibicji były silniejsze niż w przypadku filmów z kwasami fenolowymi. Kompozyty zawierające rutynę oraz naringinę wykazały najwyższą stabilność podczas długotrwałego naświetlania światłem UV-C,

zachowując pojemność antyoksydacyjną na poziomie zbliżonym do kompozytów niepoddanych naświetlaniu. Z kolei kompozyty z kwercetyną charakteryzowały się najwyższą aktywnością antyoksydacyjną spośród wszystkich analizowanych próbek i pomimo największego spadku tej pojemności w czasie, nawet po 48 godzinach ekspozycji zachowywały one najwyższe właściwości antyoksydacyjne spośród wszystkich badanych typów kompozytów. Natomiast najlepszymi bioindykatorami psucia się żywności i ogólnej reakcji na zmianę pH okazały się filmy z wyciągiem z wytłoku z czarnej porzeczki.

W toku badań pokazano, że znaczący wpływ na adsorpcję na powierzchni filmu celulozowego ma ilość i lokalizacja grup wodorotlenowych w strukturze chemicznej polifenoli. Na podstawie przedstawionych wyników i wiedzy literaturowej wysuwa się wniosek, że właśnie przez te grupy polifenoli oddziałują z powierzchnią celulozy. Przy dalszym opracowywaniu odpowiedniej metody równoważącej równomierną dystrybucję polifenoli na zmodyfikowanej matrycy celulozowej z zachowaniem ich pierwotnych właściwości jest możliwe wykorzystanie tego typu kompozytów zarówno jako materiał opakowaniowy do żywności zarówno w postaci folii, jak i jako otoczki do świeżej żywności.

W toku prac badawczych w pełni zostały zrealizowane postawione cele:

- Opracowano metody otrzymywania kompozytów na bazie celulozy mikrofibrylarnej i nanofibrylarnej oraz wybranych substancji polifenolowych,
- Pokazano, że najlepszą matrycą i nośnikiem do substancji polifenolowych jest celuloza nanofibrylarna,
- Pokazano, że największy wpływ na oddziaływanie związków polifenoli z powierzchnią celulozy ma ilość i lokalizacja grup OH w ich strukturze, a także wielkość cząsteczki związku polifenolowego co pokazano na przykładzie flawonoidów,
- Określone zostały właściwości wytworzonych kompozytów w kontekście ich potencjalnego zastosowania jako materiałów opakowaniowych z potencjałem przedłużania świeżości żywności: właściwości barierowe, badania mechaniczne, odporność na UV i pojemność antyoksydacyjna, właściwości bakteriostatyczne
- Wybrany kompozyt został przetestowany jako potencjalny materiał do otaczania świeżych owoców
- Utworzono materiał mogący w pełni pochodzić z odpadów spożywczych, który równocześnie posiada właściwości bioindykatora, zmieniając kolor pod wpływem zmiany pH oraz obecności grup aminowych imitujących proces psucia się żywności.

Biorąc powyższe wnioski pod uwagę, uważam, że można potwierdzić postawioną na początku badań hipotezę badawczą - związki polifenolowe stabilizowane celulozą i/lub nanocelulozą mogą tworzyć bezpieczny dla środowiska kompozyt o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych oraz antyoksydacyjnych.

7. Publikacje własne wykorzystane w rozprawie:

7.1. Tekst Publikacji P1:

Autorzy: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., i Zdunek, A.

Data publikacji: 1 Listopad 2022

Tytuł: FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review.

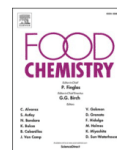
Czasopismo: Food Chemistry, Volume 393, 133430.

DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133430>



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Review

FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review

Martyna Krysa, Monika Szymańska-Chargot^{*}, Artur Zdunek

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Flavonoids
Antioxidant
Chemical structure
Spectroscopy
FT-Raman spectroscopy
FT-IR spectroscopy

Chemical compounds studied in this article:

Naringin (PubChem CID:442428)
Naringenin (PubChem CID:932)
Quercetin (PubChem CID:5280343)
Rutin (PubChem CID:5280805)
(-)-Epicatechin, (PubChem CID:72276)
Epigallocatechin gallate (PubChem CID:65064)
Hesperetin (PubChem CID:72281)
Hesperidin (PubChem CID:10621)

ABSTRACT

Flavonoids are secondary metabolites commonly found in plants. They are known for their antioxidant properties, are part of the defense mechanisms of plants and are responsible for the pigmentation of fruit and flowers petals. Consumption foods rich in flavonoids in the daily diet brings a number of pro-health benefits - for example blood pressure regulation, delaying the aging process or anti-cancer effect. These compounds in synthetic or natural form are also used in pharmacy. The profile of flavonoid compounds can be quickly, accurately and easily determine in the test sample by using the infrared and Raman spectroscopy. Those methods are successfully used in the food and pharmaceutical industries. Spectroscopy methods allow us to determine the chemical structure of these compounds. This review describes and compares differences between the spectroscopic spectra of individual compounds with the chemical structure for the flavonoids subgroups: flavones, isoflavones, flavanones, flavonols and anthocyanins.

1. Introduction

Human daily diet, in most cases, is rich in flavonoids. These compounds are mostly found in vegetables, fruits, seeds, tea, coffee, and wine. Daily consumption per person in Western Europe averages between 100 and 1000 mg of flavonoids (Kozłowska & Szostak-Wegierek, 2014). For example, in Japan, flavonoid consumption reaches up to 2 g per day due to various types of soy products and tea drinking traditions. Also, vegetarians and vegans eat a lot of legumes rich in these compounds (Lyons Wall & Samman, 1997), therefore consumption of flavonoids daily depends on lifestyle and type of diet.

The main feature of flavonoids is their antioxidant capacity. First of all, they block free radicals chain reactions through ion chelation, especially iron and copper, that participate in the initiation of these reactions and reduces a reactive oxygen species to a stable, nonreactive forms (Matławska, 2008). Flavonoids inhibit activity of the enzymes that take part in free radical chain reactions: xanthine oxidase (5-LOX), protein kinase (15-LOX), lipoxygenase (12-LOX), cyclooxygenase (COX 1 and 2). They decrease prostaglandin PGE₂, leukotriene B₄ and thromboxane A₂ synthesis. Moreover they stop arachidonic acid chain reactions and reduce the amount of proinflammatory and

proaggregational agents, also causing the inhibition of the oxygenation of LDL lipid fraction and regulation of the blood pressure (Kozłowska & Szostak-Wegierek, 2014). Flavonoids also have an anti-inflammatory effect, decrease local pain and block aggregation of platelets in the blood vessels (Panche et al., 2016). They also inhibit ascorbic oxygenase activity. The inhibition prevents oxidation of vitamin C. This increases the time of action of the vitamin C in human organism, which leads to more efficient antioxidation processes (Matławska, 2008). Flavonoids also exert an anti-edematous effect. Quercetin is an example of the flavonoid that inhibits conversion of histidine to histamine. Flavonoids like kaempferol cause sealing of the endothelium of blood vessels, strengthens the connective tissue, which causes improved blood flow in a tissue and reduces the permeation that leads to edema. Such activity can be observed in the pharmaceutical use of flavonoids in the treatment of varicose veins, bleeding, and allergies (Matławska, 2008).

Flavonoids belong to phenolic secondary metabolites produced by bacteria, fungi and primarily by the higher plants. The basic skeleton structure of flavonoids is a heterocyclic ring with oxygen atom (ring C), like pyran, that contains two benzene rings (A and B) [Fig. 1A] (Matławska, 2008). The different members of this large compounds group can be classified based on differences in the chemical structure, mainly:

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: m.krysa@ipan.lublin.pl (M. Krysa), m.szymanska@ipan.lublin.pl (M. Szymańska-Chargot), a.zdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133430>

Received 21 February 2022; Received in revised form 20 May 2022; Accepted 6 June 2022

Available online 8 June 2022

0308-8146/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

the amount and localization of methyl and hydroxyl group, type of glycoside binding, amount carbohydrate molecules, size of molecules and presence of sulfone groups. Flavonoids are solid substances, rarely colorless, most often yellow (mainly flavones and chalcones), blue, red and purple (mainly anthocyanins). They may also give flavor to plants and products in which they appear, e.g. naringenin gives grapefruit a bitter taste, capsaicin - chili spiciness. The division of flavonoids into groups with the examples of each group representatives with the detailed characterization of each group structure is presented in Fig. 2. (Panche et al., 2016).

The most common method of isolation of the flavonoids involves liquid extraction for example in water, alcohol, ether, chloroform. To

increase the yield and rate of extracted compound the ultrasound or microwave-assisted methods are used (Watson, 2014). The characterization of profile of flavonoids is usually based on chromatographic techniques coupled with mass spectrometry (Watson, 2014). In comparison to those techniques, FT-IR and Raman spectroscopies are relatively easy, cheap and does not require extended preparation methods of samples or additional chemicals (Gerales, 2020). On the other hand, they often require the use of a spectrum library or an experienced user to interpret spectrum, as each compound has different and unique pattern of spectroscopic bands. Those techniques differentiate classes of functional groups, the structure of bonds within compounds and their conformation, making them useful in identification and quantification

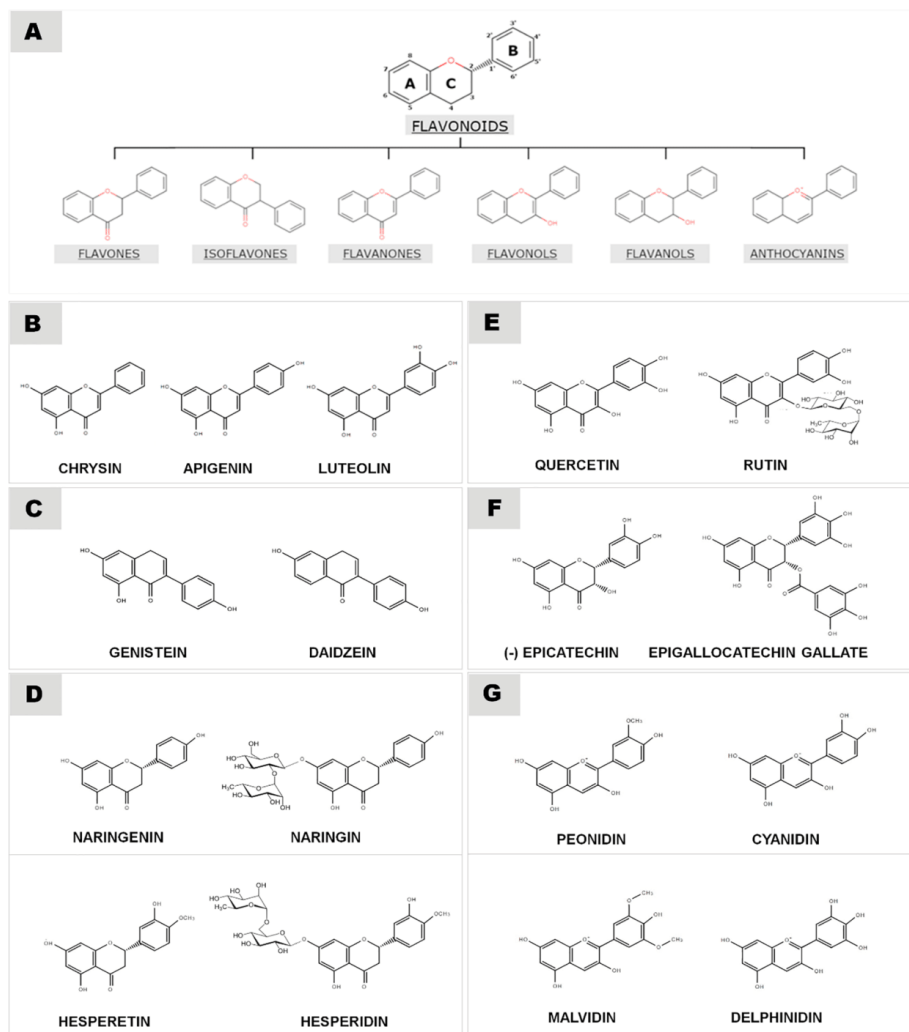


Fig. 1. Section of flavonoids by chemical structure (A) and example compounds from each group of flavonoids: flavones: chrysin, apigenin, luteolin (B); isoflavones: genistein and daidzein (C); flavanones: naringenin and naringin (D); hesperetin and hesperidin (D); flavonols: quercetin and rutin (E); flavanols: (-)-epicatechin and epigallocatechin gallate (F); anthocyanins: peonidin and cyanidin (G); malvidin and delphinidin (G).

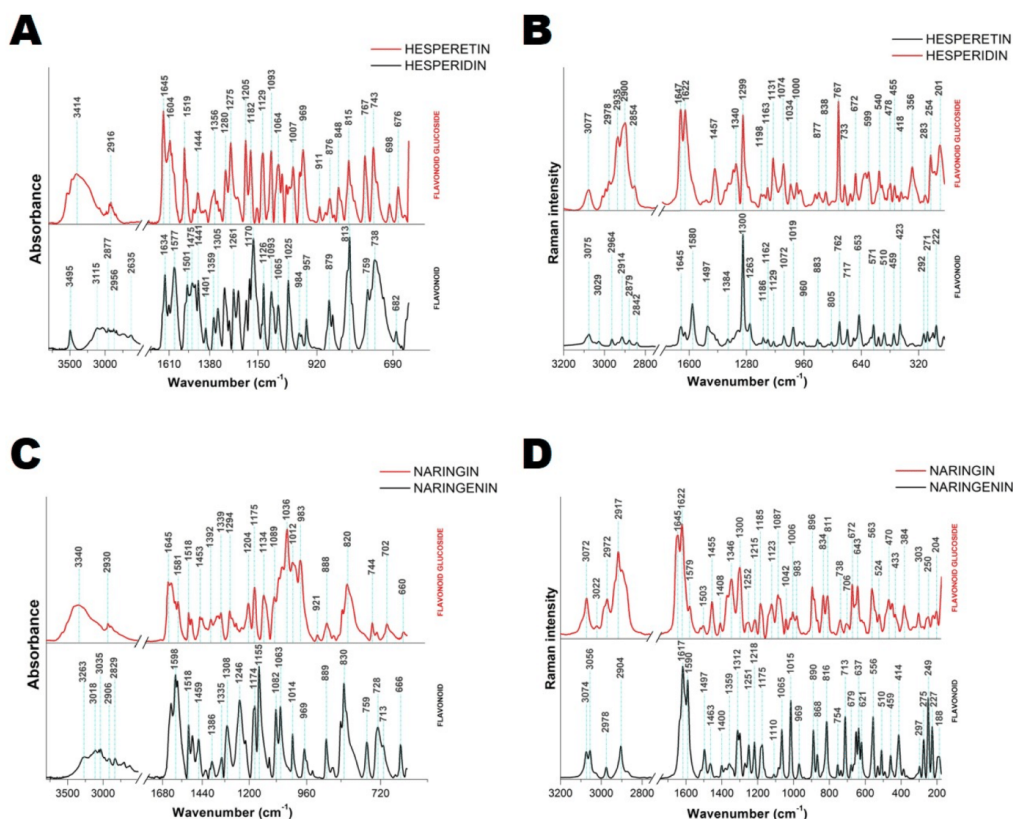


Fig. 2. FT-IR (A, C) and FT-Raman (B, D) spectra of hesperetin and hesperidin (A, B) and naringin and naringenin (C, D).

of compounds (Gniadecka et al., 1997). The information about the structure is most often critical for functional characteristic of molecules, as example for flavonoids, where the structure is directly related to their antioxidant and antibacterial/antifungal properties (Brown et al., 1998). Therefore the Raman and FT-IR spectroscopies give an insight on the chemical structure and enable to see substituents regulating function of molecules.

The mid-infrared and Raman spectroscopies are widely used in investigation of biomolecules. The nature of the phenomena behind both techniques makes them complementary. The infrared spectroscopy is absorption technique, where vibration of molecules are excited by infrared light ($0.7\ \mu\text{m} - 1\ 000\ \mu\text{m}$ wavelength, $14\ 000\ \text{cm}^{-1} - 10\ \text{cm}^{-1}$). The bonds in this range are used to compare and determine individual chemical compounds. The IR light is absorbed by the molecules and causes a change in molecule's dipole moment, thus inducing vibrations. The infrared light emitted by the global is absorbed and then reflected or emitted by the molecule. The change in vibration energy can be related to a particular bond. This feature enables to determine the chemical composition of the studied sample. The most popular is mid-infrared region in the range of $4\ 000 - 400\ \text{cm}^{-1}$ ($2.5 - 25\ \mu\text{m}$). Most of the bonds characteristic of functional groups of compounds are found in the region of $4\ 000\ \text{cm}^{-1} - 1\ 300\ \text{cm}^{-1}$. Bonds that are unique to each molecule called "fingerprint" are found in the $1\ 300\ \text{cm}^{-1} - 400\ \text{cm}^{-1}$ region. However, the limitations of the FT-IR method should be always

on mind: the presence of water interfere spectrum (samples should be very carefully dehydrated) and infrared light must change dipole moment of given compound (Boskey & Pleshko Camacho, 2007).

Raman spectra are result of light scattering by vibrating molecules. Raman spectroscopy technique uses monochromatic light beam of high intensity laser in UV, visible or IR regions. The Raman scatter is the result of photon interaction with molecule's electron cloud. As a result, the molecule is excited, resulting in the photon emission from the sample. Most of the light is reflected from the sample in the same length as the light emitted (Rayleigh), but some are of shorter (Stokes shift) or longer (anti-Stokes shift) wavelength. The shifts depend on the polarization of the molecule - a change in dipole-electric polarization must occur. This causes that the Raman spectrum is dependent on the rotation-vibration-electrical state of the test molecule, which is specific for each chemical compound. The advantage of Raman spectroscopy over IR spectroscopy is that the water in the sample does not interfere with spectroscopic measurement, and the samples do not need special preparation. On the other hand, the Raman scattering is very weak and spectrum is very sensitive to fluorescence which also hinder Raman bands (Barnett et al., 1990; Harris et al., 1977).

Spectroscopic techniques, especially the FT-IR technique, have been widely used for many years to study the quality and composition of food (Osborne, 2000). The advantage of these techniques is quick and accurate analysis, often without the need for special sample preparation for

measurement and the use of chemicals to determine changes in food (Liu et al., 2020). An example of the use of spectroscopic studies is the determination of the degree of thermal oxidation of edible oils or their contamination with other oils. During the spectrum analysis, it is possible to detect changes in the content of, among others, aldehydes, ketones or the acid value, which is related to the degree of oxidation of fats. This is for example used in determining the fatty acid profile which helps to detect adulteration associated with the addition of other types of oil to extra-virgin olive oil (Mahesar et al., 2019). Referring to polyphenolic compounds, FT-IR spectroscopy and Raman spectroscopy so far have been used to study the profile of polyphenolic compounds and the antioxidant capacity of honey, which are important quality parameters for the consumer (Tahir et al., 2017).

Spectroscopy is a commonly used technique to improve winemaking techniques (Miramont et al., 2020). Especially combination of FT-IR and chemometric methods was used in prediction of the concentration of phenolic compounds, mainly the profile of flavonoids, anthocyanins and total phenolic in fermented products (Miramont et al., 2020). The profile of phenolic compounds also influences parameters important for consumers such as taste, color and health value of the wine (Petrozziello et al., 2018). Also, the differentiation of individual types of wine can be made by determining the content of carbohydrate and polyphenols, which can be also possible using spectroscopic techniques (Conduro et al., 2018).

Spectroscopic techniques are also used as a method to determine the profile of chemical compounds in post-production food waste. For example the polyphenol profile in an instant coffee production waste was determined, which gave insight how to reuse the waste (Pujol et al., 2013). The obtained polyphenols could serve to improve the quality of other food products, for instance. An example of such use may be the enrichment of wheat flour dough with polyphenols for the production of e.g. bread (Krekora et al., 2020).

The aim of this review is to collect and systematize the existing data on FT-IR and Raman spectra of main groups of flavonoids. So far there are only scattered fragments of spectroscopic literature data about flavonoid compounds. The main reasons for this are the difficulties in obtaining and isolating individual flavonoids, their multitude, but also the requirements of spectroscopic techniques. While Raman techniques do not require much preparation of sample, infrared spectroscopy requires thorough dehydration of the samples. On the other hand, Raman spectroscopy requires the selection of the appropriate laser length for the substance under study.

2. Classification and spectroscopic specification of the group of flavonoids

Flavonoids differ by their structure among the groups. They have a different degree of oxidation in the pyran C ring, they possess double bonded oxygen or hydroxyl group in the C-4 position or the B ring is connected either to C-2 or C-3 position. This structure determines the division of flavonoid compounds into subclasses. Among those subclasses several thousand different flavonoids are known. Such an amount and variety of compounds is a result of presence of hydroxyl, methoxy or sugar groups. Sugars, such as glucose, galactose, rhamnose, xylose, arabinose or glucuronic acid, can be linked by an O- (which is more often) or C-glycosidic bond. In flavones and isoflavones, the glycosidic bond is often found at position C-7, in flavonols at position C-3 and C-7, and in anthocyanidins at position C-3 and C-5. Diversity is also due to the possibility of creating polymer structures (Barbehenn & Peter Constabel, 2011; Khoo et al., 2017; Krížová et al., 2019; Paczkowska et al., 2015; Rudrapal & Chetia, 2016).

Vibration spectroscopy with the use of complementary FT-IR and Raman techniques is a very good method to identify and compare the structure of various compounds, including flavonoids. In this section, the biological function and the wavenumbers' characteristic chemical bonds to illustrate the differences and similarities in the chemical

structure of each flavonoid group will be discussed (Schulz & Baranska, 2007).

2.1. Flavones

Flavones (together with flavonols) are responsible for very bright pigmentation of the flowers - white and cream color of the petals in the inflorescences. As copigments with anthocyanins, they form a blue color of flowers (Barbehenn & Peter Constabel, 2011). Other functions of flavones in the plant is to protect the plant from UV-B rays while they absorb the light range 280–315 nm or to defense against fungal parasites and herbivorous insects (Barbehenn & Peter Constabel, 2011). Moreover they enable symbiosis between the plant and the nitrogen-fixing bacteria or mycorrhizal fungi (Barbehenn & Peter Constabel, 2011). They are found in the ground parts of plants, mainly in the leaves and skins of the fruit. The main sources of flavones are parsley and celery as well as green tea, citrus, grapes, apples, tomatoes and red peppers. About 100 different flavones have been identified in plants, among them the most common is apigenin and luteolin.

Flavones in their overall structure have a double bond in the middle ring between the C2 and C3 carbon and additional oxygen (ketone group) at the C4 position compared to the general formula for flavonoids (Fig. 1 A). (Barbehenn & Peter Constabel, 2011). The differences between each member of flavone groups is based on substitution with hydroxyl group in the phenyl rings e.g. apigenin have 3 hydroxyl groups in C-5, C-7 and C-4' positions, luteolin have 4 hydroxy groups in C-5, C-7, C-3' and C-4' positions and 6-hydroxyflavone have 1 hydroxy group in C-6 position, etc. (Fig. 1 B).

The summarized FT-IR and FT-Raman bands of flavones group are gathered in Suppl. Mat. Table 1. For the most compounds the IR bands around 3100–3400 cm^{-1} are characteristic for hydroxyl groups and intermolecular hydrogen bonds and with maximum around 2900–3000 cm^{-1} for stretching of C—H. The flavone with simplest structure is chrysin and apart of abovementioned bands IR spectrum also contains bands typical for carbonyl group stretching in benzopyrone C ring (1655 cm^{-1}), $\nu(\text{C}=\text{C})$ in aromatic rings (1620, 1505, 1460 cm^{-1}), in plane bending of hydroxyl groups (1168 cm^{-1}) and out of plane bending of C—H groups (850, 815 cm^{-1}) (Pusz et al., 2000). Apigenin is a flavone abundant in vegetables such as parsley or celery but also in chamomile flower (Švehlíková et al., 2004). The typical IR bands of apigenin are similar positions as for chrysin for example conjugated band with maximum around 1655–1646 cm^{-1} originating from carbonyl group C=O and C2 = C3 of C ring, bands at 1578 and 1497 cm^{-1} originating from ring C=C, 1466 - C—O—H, and 1024 cm^{-1} stretching of C—O—C of central heterocyclic ring (El Shoubaky et al., 2016; Peng et al., 2016). Apigenin also occurs in glycoside forms, and for instance apigenin-7- β -D-glycoside isolated from aerial parts of *E. splendens* contain β -coupled D-glucose to the C7 substituting H in hydroxyl group in apigenin (Peng et al., 2016). The characteristic bands for apigenin-7- β -D-glycoside involves band typical for apigenin core such as: at 1655 cm^{-1} stretching of carbonyl group, 1609, 1590 and 1510 cm^{-1} - vibration of C=C of aromatic rings, 1371 and 1276 cm^{-1} - hydroxyl at aromatic rings, 1499, 1452 cm^{-1} - C—H of aromatic rings, 1416, 910, 834, 771 cm^{-1} - related to especially bending vibration of groups C—O and C—H in aromatic rings and vibration of C—O characteristic for glycoside at 1100, 1082, 1030 cm^{-1} (Peng et al., 2016).

The comparative study of Raman spectra of chrysin, apigenin and luteolin was made (Corredor et al., 2009). All of them had similarities in Raman spectrum, mostly involving conjugated stretching vibration of C=O and C2 = C3 groups stretching of carbonyl group around 1600 cm^{-1} and 1633 cm^{-1} , respectively, and the greatest differences involves the bands in range of 1500–1000 cm^{-1} related to B ring which can vary in hydroxylation degree. In the range of 1100–900 cm^{-1} ring breathing mode occur which for chrysin is at 1002 cm^{-1} with accompanying band at 1101 cm^{-1} , while for apigenin this band is present at 983 cm^{-1} and is very weak due to presence of C4' hydroxyl group, and for luteolin this

band is present at 1000 cm^{-1} . C ring band position differences are present, for example C3-H in plane bending vibration appeared at 1247 cm^{-1} for chrysin, at 1245 cm^{-1} for apigenin, and at 1270 cm^{-1} for luteolin. Finally, bands allowing discrimination of those flavones were determined: 1002 cm^{-1} breathing B ring mode for chrysin, 1171 cm^{-1} C-H of B ring in plane bending for apigenin, and 1505 cm^{-1} stretching of C-H at C3' in B ring for luteolin (Corredor et al., 2009).

2.2. Isoflavones

The most known isoflavones are genistein, daidzein and biochanin A. The main source of isoflavones are soybeans and products from soybeans. They are especially popular in Asian countries, the people on a vegetarian and vegan diet. The isoflavones in soy products which are often fermented are present in their aglycone form as fermentation leads to sugar molecule release from the isoflavone glycoside (Zaheer & Humayoun Akhtar, 2017). Also preparations from soy isoflavones are very popular. They are thought to be a safer alternative to standard hormonal drugs that are used in treatment of many conditions such as some hormone-dependent cancers, obesity, diabetes or reducing menopause symptoms (including osteoporosis). This is possible due to their chemical structure, reminiscent of the chemical compound estradiol. Due to this property, isoflavones are also called phytoestrogens (Zaheer & Humayoun Akhtar, 2017).

Isoflavones in terms of structure are flavone isomers, differing in location of phenyl group – B ring is in the C-3 position (Fig. 1A) (Zaheer & Humayoun Akhtar, 2017). Similarly to flavones, the structural differences among this group are mainly due to the ring substitution by chemical groups mainly hydroxyl. For example genistein has 3 hydroxyl groups in C-5, C-7 and C-4' position, daidzein has 2 hydroxyl groups in C-7 and C-4' position and biochanin A has two hydroxyl group in C-5 and C-7 position and one methoxy group in C-4 position (Fig. 1C).

The most characteristic IR and Raman bands for isoflavones are presented in Suppl. Mat. Table 2. Singh et al. (2014) determined with help of DFT simulation the main FT-IR and Raman bands of daidzein (Singh et al., 2014). Stretching of hydroxyl groups in IR spectrum was determined at 3173 cm^{-1} for A ring and at 3223 cm^{-1} for B ring, while their deformation for both rings was assigned at 1188 cm^{-1} for IR spectrum and 1183 cm^{-1} for Raman spectrum. Other IR bands are stretching vibration of C-H in range $3100\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$, stretching of carbonyl group at 1667 cm^{-1} , stretching of ring C=C: $1634\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, stretching of ring C—C around 1227 cm^{-1} , rings breathing modes around 1000 cm^{-1} , C-H bending: in plane in the range of $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ and out of plane $700\text{--}500\text{ cm}^{-1}$. The Raman bands had similar positions, slightly shifted comparing with IR bands.

Skeine et al. (2011) presented differences in IR and Raman spectra calculated by DFT of genistein, biochanin, prunetin and 4',7-dimethoxygenistein, all shearing hydroxyl group at C5 position (Skeine et al., 2011). The main differences between those substances is different substitution of C7 and C4': genistein contain two OH groups, biochanin OH group at C7 and OCH_3 at C4', prunetin has OH group at C4' and OCH_3 at C7, 4',7-dimethoxygenistein contain two OCH_3 groups. Therefore the differentiating bands in IR and Raman spectra are mainly connected with vibration with those hydroxylation and O-methylation substitutions. In plane bending vibration of C4'-OH and C7-OH can be found at 1146 cm^{-1} in IR, and 1149 cm^{-1} in Raman spectrum, additionally bending vibration of C4'-OH is also assigned to bands at 1320 cm^{-1} and 1318 cm^{-1} in IR and Raman spectra, respectively. Bond of C4'-O is represented by out of plane bending vibration found at $536\text{--}522\text{ cm}^{-1}$ and stretching vibration band between 1274 cm^{-1} and 1260 cm^{-1} for both IR and Raman spectra. Stretching of O7-CH₃ bands are weak with maximum at around $1018\text{--}1022\text{ cm}^{-1}$ (for both IR and Raman spectra) and don't enable to distinguish between prunetin and 4',7-dimethoxygenistein. While stretching of O7-CH₃ IR band has maximum at around 1028 cm^{-1} (biochanin) and at 1038 cm^{-1} (4',7-dimethoxygenistein), Raman band for this mode is only visible for 4',7-dimethoxygenistein at

1041 cm^{-1} .

2.3. Flavanones

Flavanones are most often found in various citrus fruit species. They are direct precursors of most of other flavonoids and are synthesized from the phenylalanine or tyrosine (Fowler & Koffas, 2009). Naringin is the dominant flavanone in grapefruit (up to 10% of dry matter) and is responsible for the bitter taste of this fruit (Ribeiro & Ribeiro, 2008). Naringin has importance in pharmacy as an inhibitor of cytochrome P450 enzymes, and strongly affects the metabolism of a large part of drugs, by slowing down or inhibiting drug metabolism, causing the increase of the concentrations of medications in human tissues (Ameer & Weintraub, 1997; Ueng et al., 1999).

The basic skeleton of flavanones is characterized by the saturation of the C2-C3 double bond (Fig. 1A). Moreover the B ring is behind the plane of A and C rings. This group of flavonoids is represented by e.g. naringenin substituted with 3 hydroxyl groups in C-5, C-7 and C-4' position or by hesperetin substituted with 3 hydroxyl groups in C-5, C-7 and C-3' position and with methoxy group in C-4' position (Fig. 1D). Most often they are present in form of glycosides. For instance naringin a naringenin glycoside and hesperidin a hesperetin glycoside both contain disaccharide composed of rhamnose and glucose.

The most characteristic IR and Raman bands for flavanones are presented in Suppl. Mat. Table 3. The Fig. 2. presents FT-IR and Raman spectra of naringenin and naringenin, and hesperidin and hesperetin. The typical bands for naringenin such as carbonyl stretching at around 1660 cm^{-1} for both IR and Raman spectra or vibration of C—C in aromatic ring around at 1618 cm^{-1} and 1019 cm^{-1} for IR and at around 1613 cm^{-1} and 1104 cm^{-1} for Raman spectra are present. The bending vibration of HCC were represented by $1452, 1335, 1211\text{ cm}^{-1}$ (C ring) and 1183 cm^{-1} (A and B ring) in IR spectra. Related Raman bands appear at $1451, 1235$ (C ring) and 1191 cm^{-1} (A and B ring). The bending vibration of C-OH (A ring) were present at $1161, 1283$ and 1296 cm^{-1} (IR spectra) and 1284 cm^{-1} (Raman spectra). Stretching vibration of CO groups are more visible in IR spectra (bands at $1388, 1083, 1034, 971, 824\text{ cm}^{-1}$) than in Raman spectra (only 1357 cm^{-1}). Below 100 cm^{-1} the torsion, wagging and bending vibration were detected in Raman spectrum (Unsalan et al., 2009). In the case of hesperetin the carbonyl stretching vibration was detected at 1646 cm^{-1} and at 1609 cm^{-1} in IR and Raman spectra, respectively. The C—C stretching vibration (aromatic ring) were observed at $1609, 1518, 1444, 1402$ and 1294 cm^{-1} in FT-IR spectrum and Raman bands were identified at $1563, 1485, 1464, 1454, 1301$ and 1291 cm^{-1} . Range between 1260 and 1000 cm^{-1} are characteristic for stretching vibration of C—O. Below 1000 cm^{-1} mostly bending and torsion vibration are to be found (Govindammal et al., 2019). While the naringenin and hesperetin are the most studied flavanones, there is lack of comparative study of those aglycons and their glycosidic forms by vibrational spectroscopy. In the case of glycosidic forms of hesperetin and naringenin the similar bands are present as those named above and related to the flavanone core. But additionally the bands characteristic for rhamnose and glucose can be found. The most typical are IR bands related to the pyranose ring which in the case of naringenin is 921 cm^{-1} and 911 cm^{-1} for hesperetin.

2.4. Flavonols

They are the most common flavonoids in food. The accumulation of flavonols is regulated by the amount of light reaching the plant's tissues. Flavonols have been shown to have an inhibitory effect on auxin transport (Silva-Navas et al., 2016). Due to the structural similarity of flavonols to androgens (like testosterone), these compounds influence androgen receptors. Additionally low possibility of side effects makes this group a potential agent in the prevention and treatment of prostate cancer, as demonstrated in *in vitro* and *in vivo* studies (Boam, 2015). The most widespread and studied flavonols are quercetin and its glycoside

form rutin (quercetin-3-O-rutinoside).

The basic flavonol structure is a 3-hydroxyflavone (Fig. 1 A). The number of hydroxyl groups in the skeleton structure affects the antioxidant and vasorelaxant properties of flavonols (Leo & Woodman, 2015). The differences among the flavonols is caused by their substituents to the main 3-hydroxyflavone structure e.g. additional 3 hydroxyl groups in C-5, C-7 and C-4' position in kaempferol or 4 additional hydroxyl groups in C-5, C-7, C-3' and C-4' positions in quercetin (Fig. 1 E).

The most characteristic IR and Raman bands for flavonols are presented in Suppl. Mat. Table 4. And more specific differences in vibrational spectra between flavonol aglycons and glycosides are described on the basis of quercetin and rutin (Fig. 3) (Hanuza et al., 2017). Hydroxyl groups of quercetin which are at C 3, 3', 4', 5 and 7 are represented in IR spectra by stretching vibration at 3400–3200 cm^{-1} , in plane bending at 1504, 1350 and 1160 cm^{-1} (Fig. 3.) While for Raman spectra bands related OH stretching is at 3260 cm^{-1} , in plane bending at 1498, 1367, 1179 cm^{-1} , out of plane bending at 846, 599, 403 and 347 cm^{-1} . The carbonyl group stretching vibration is visible at 1604 cm^{-1} in IR spectra and at 1615 and 1586 cm^{-1} in Raman spectra. Bending vibrations of carbonyl group are visible at 930, 842, 786 (out of plane) for IR spectra, and for Raman spectra at 846, 690 and 642 cm^{-1} (out of plane). Below 700 cm^{-1} for both IR and Raman spectra are visible wagging vibration of C—O—H groups. In this range the breathing modes of rings are represented by bands at 786 cm^{-1} (IR) and 790 cm^{-1} (Raman) (Hanuza et al., 2017).

Rutin molecule has quercetin's C3 hydroxyl group substituted with disaccharide rutinose (α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranose). Therefore the most differences of IR and Raman spectra are connected with C ring vibration and vibration of pyranosyl rings (Paczkowska et al., 2015). For example IR band at 999 cm^{-1} is superposition of wagging vibrations of C—H at rhamnopyranosyl ring and bond between rhamno- and glucopyranosyl rings. This vibration is represented by Raman band at 946 cm^{-1} . Rocking vibration of C—H bonds of rhamnopyranosyl and glucopyranosyl is located at 1121 cm^{-1} and 1168 cm^{-1} . The vibration of C—O bond between rhamnopyranosyl and glucopyranosyl is represented in IR spectrum by bands at 1041 cm^{-1} and 1093 cm^{-1} . The Raman spectra of rutin apart of bands typical for quercetin core contain only three characteristic for rutinose: 846 cm^{-1} (C—C stretching vibration of glucopyranosyl ring), 1130 cm^{-1} (breathing of rhamnopyranosyl ring, stretching of C—O at rhamnopyranosyl ring and between rhamnopyranosyl and glucopyranosyl rings), 1298 cm^{-1} (bending vibration of C—C—H and C—O—H groups at chromen, dihydroxyphenyl ring and rhamnopyranosyl ring)

(Paczkowska et al., 2015).

2.5. Flavanols

Flavanols are a group of compounds closely related to the human diet. They can be found in tea, chocolate or red wine. Flavan-3-ols (or flavanols) are derivatives of flavans that possess a 2-phenyl-3,4-dihydro-2H-chromen-3-ol skeleton (Fig. 1A). They form class of flavonoids without carbonyl group. Among them the most common is family of catechin and its derivatives. They often appear in the form of polymers called tannins made up of catechin molecules. Tannins have the ability to nonspecifically bind to proteins or metals through hydrogen and covalent bonds. As a result, tannins are included in the plant's defense system, having antioxidant, antimicrobial, antiparasitic properties and prevent oxidative stress response to heavy metals. In the human body it causes the astringent of mucous membranes (especially helpful in diarrhea). It also influences the circulatory system: it prevents platelet aggregation, atherosclerosis, regulates blood pressure and has a positive effect on the overall metabolism of the whole organism (de Pascual-Teresa et al., 2010; Gupta & Pandey, 2019).

Catechin itself occur in four diastereoisomers with the most common isomer which is (+) - catechin. The diversity of the structure among the flavanols group is due to their hydrogen group and their esterification with gallate group. The members of the flavanol group are e.g. catechin substituted with 4 hydroxyl groups in C-3 and C-4 position on benzene ring and C-5, C-7 position in chromone structure. There are also members of the flavanol group esterified with gallate group eg. epigallocatechin gallate substituted with hydroxyl groups in the same position as the catechin with an additional hydroxyl group in C-5 on ring B and esterified with gallate group on the position of C-3 hydroxyl group of the flavan-3-ol (Fig. 1 F).

The typical IR and Raman bands assignments are presented in Suppl. Mat. Table 5. Spectra of catechins' family ((+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-gallocatechin, epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate obviously contains similarities in bands position. Most of the bands were assigned to phenolic hydroxyl group stretching (3372 cm^{-1}), carbonyl group vibration (1613 and 1518 cm^{-1}), 1460 (phenyl ring), deformation vibration of OH group (1280 cm^{-1}), C—O stretching vibration of an aromatic alcohol (1144 cm^{-1}), and C—O—C stretching vibration (1034 cm^{-1}) (Geng et al., 2016; Robb et al., 2002). The region of 900 – 750 cm^{-1} is dominated by wagging vibration of hydroxyl groups. The differences among catechins are mostly connected with the position of OH group e.g. for (+)- catechin and gallocatechin,

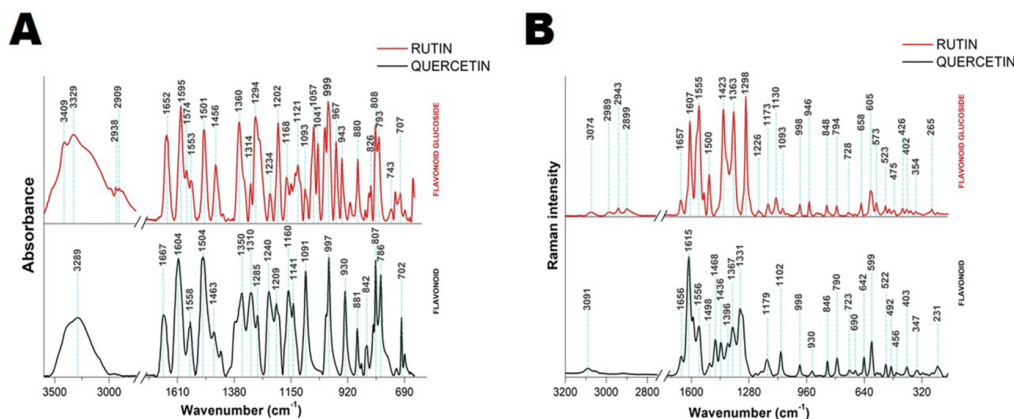


Fig. 3. FT-IR (A) and FT-Raman (B) spectra of rutin and quercetin.

which structures differ in presence of hydroxyl group at C5' and spectra exhibit differences in bands related to OH and CO vibrations. Band characteristic for OH stretching which is sharp and present at 1280 cm^{-1} for catechin, it forms broad peak from 1373 to 1280 cm^{-1} for gallo catechin. Gallo catechin IR spectrum also contain additional band at 740 cm^{-1} assigned to out of plane wagging of CH in aromatic ring, which isn't present for catechin itself (Robb et al., 2002). The similar differences in those spectral regions were also observed for (-)-epicatechin, epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate (Xia et al., 2020). The example FT-IR spectra of epicatechin and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) are presented in Fig. 4A. The most striking difference is the presence of band at 1690 cm^{-1} assigned to ester C=O in the case of EGCG which is absent for epicatechin (Liang et al., 2014; D. Wang et al., 2019). Other bands characteristic for aromatic C=O are bands at 1612 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} , and 1466 cm^{-1} . While, the bands around 1342 cm^{-1} , 1218 cm^{-1} , 1140 cm^{-1} , and 1013 cm^{-1} can be assigned to vibration of alcohol C—O, aromatic O—H, antisymmetric stretching of C—O—C, alcohol C—OH, and C—O, respectively. The FT-IR bands characteristic for epicatechin 1619 cm^{-1} , 1518 cm^{-1} , 1467 cm^{-1} —C=O (phenyl ring), 1139 cm^{-1} and 1042 cm^{-1} (C—O—C stretching vibration).

In the case of Raman spectra there is very little information about flavanols. Xia et al. presented calculated and experimental Raman spectra of catechins which are tea components however without in depth band assignment (Xia et al., 2020). While Pompeu et al. performed detailed chemometric analysis of Raman spectra of several phenolic acids and flavonoids with flavanols among them. They showed that the most pronounced bands differentiating catechins are those with maximum in the range between 1700 and 1600 cm^{-1} , characteristic for stretching vibration of C=C (Pompeu et al., 2018). The example Raman spectra of epicatechin and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) are presented in Fig. 4B. As in the case of FT-IR spectra the most striking difference is the presence of band at 1692 cm^{-1} for EGCG Raman spectrum which can be assigned to vibration of ester C=O.

2.6. Anthocyanins

The most characteristic function of anthocyanins is the pigmentation of flowers and fruits of higher plants (pigmentation is due to their aglycon group). They provide a red to blue color depending on soil pH (blue in alkaline, purple in neutral, red in acidic pH) This is because of the molecular structure of anthocyanins having an ionic nature [Fig. 1 G] (Khoo et al., 2017). Their stability, like the most of flavonoids, is dependent on pH, light and temperature.

Anthocyanins are made of a sugar residue combined with an aglycon. Anthocyanidins (anthocyanins aglycons) can be grouped by their position into: 3-hydroxyanthocyanidins, 3-deoxyanthocyanidins and O-methylated anthocyanidins e.g. cyanidin substituted with 5 hydroxyl groups in C-3, C-5, C-7, C-3', C-4' positions or peonidin substituted with 4 hydroxyl group in C-3, C-5, C-7, C-4' positions and methoxy group in C-3' position. Anthocyanins are commonly in the form of anthocyanidin glycosides and acylated anthocyanins.

There is little information in literature regarding the spectroscopic investigation of anthocyanins and describing the relationship between bands pattern and structure of those compounds. The typical IR and Raman bands assignments characteristic for anthocyanins are presented in Suppl. Mat. Table 6. In the FT-IR spectra the bands around 3600 – 3200 cm^{-1} are connected with the H-bonds and around 3000 – 2800 cm^{-1} with C—H groups. The spectra of anthocyanin dye extracted from purple cabbage contained bands characteristic for C=O stretching vibration around 1639 cm^{-1} (probably other than anthocyanins flavonoid compounds) and stretching vibration of C—O—C esters around 1053 cm^{-1} (Chang et al., 2013). Also blue pigment from corn-flower was investigated and the band around 1600 cm^{-1} was attributed to the skeletal stretching vibration of the aromatic ring A and B of flavonoids and the functional group =C—O—C of the C ring of flavones. Bands at 1516 , 1450 , 1270 and 1072 cm^{-1} were assigned to the stretching vibration of the =C—O—C group in the aromatic ring of flavonoids. The ring vibration in anthocyanins can be associated with the bands at 818 cm^{-1} and 762 cm^{-1} (Rózyło et al., 2021).

The Raman spectroscopy was found to be sensitive to changes of anthocyanins structure under the different pH (Buchweitz et al., 2012). At low pH values the dominant structure in anthocyanins is flavylium cation in the C-ring which as results causing red color of anthocyanins solutions. The raising of pH to neutral value causes the predominance of hemiacetal form of anthocyanins and color loss, and further increase of pH value leads to other forms such as quinoidal base and the chalcone. The most promising bands distinguishing these forms are in the range of 1700 – 1000 cm^{-1} (Zaffino et al., 2015). The cyanidin based anthocyanidin at pH 4 exhibited the strongest signal connected with vibration characteristic to ring stretching vibrational modes (1330 , 1530 , 1590 and 1640 cm^{-1}) and to the stretching of C—OH bond (1240 cm^{-1}). While in neutral pH, the bands attributed to cyanidin-3-glucoside (1190 cm^{-1}), ring stretching vibrational modes (1250 , 1320 – 1330 cm^{-1}) and to C=O stretching (1630 cm^{-1}) characteristic for anthocyanidin blue quinoidal form (Zaffino et al., 2015).

Also the interaction of anthocyanins with metal ions especially crucial for winemaking can be detected by Raman spectroscopy. For

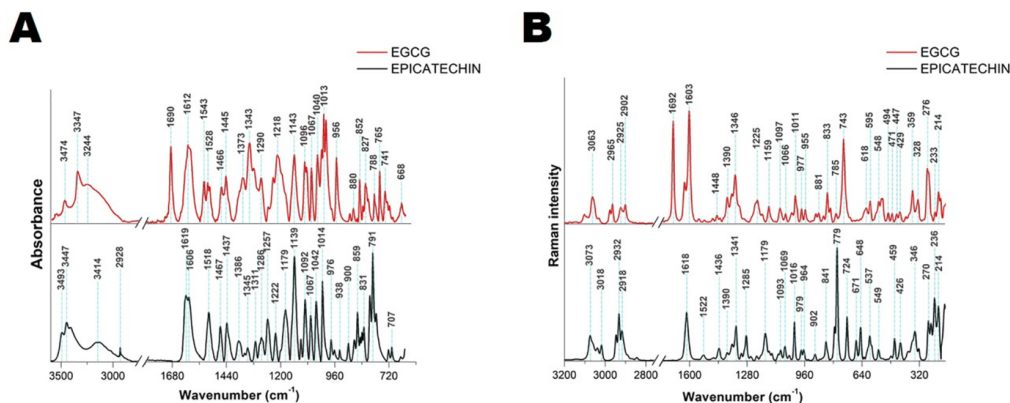


Fig. 4. FT-IR (A) and FT-Raman (B) spectra of epicatechin and epigallocatechin gallate (EGCG).

example bands 729 and 725 cm^{-1} characteristic to a $-\text{CH}$ out of plane twist vibration of the aromatic system disappear for chloride salts of cyanidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside at pH 5.0, but after addition of aluminium or ferric ions to these anthocyanins the bands appeared again. While in the case of ferric ions addition a very intense additional signal appeared at approximately 1510 cm^{-1} attributed to an in-plane deformation vibration of the phenyl ring (Buchweitz et al., 2012). The Raman spectrum blue pigment from cornflower exhibited bands 1353, 1322 and 623 cm^{-1} characteristic to anthocyanins complexed with metal ions (Różyło et al., 2021).

2.7. Similarities and differences between the flavonoid spectra

Both methods, FT-IR and Raman spectroscopy reflects the structural differences between samples. However, the structural similarities makes difficult to differentiate samples on the basis of vibrational spectra. For example all the spectra contain the bands characteristic of stretching vibrations of ring $\text{C}=\text{C}$ but present for slightly different wavenumbers. In the case of FT-IR spectra this vibration is present at c.a. 1650–1560 cm^{-1} for all of the flavonoids. At c.a. 1560–1465 cm^{-1} the band ascribed to vibrations of ring $\text{C}=\text{C}$ is present for all of the flavonoid groups except flavanols. The band at c.a. 1475–1400 cm^{-1} (assigned to the $\text{C}=\text{C}$ bond) is present in flavonols and anthocyanins groups. Similarly the band at c.a. 1380–1350 cm^{-1} (assigned to the $\text{C}=\text{C}$ bond) is present in the flavones and isoflavones group. Other bands ascribed to the $\nu(\text{C}=\text{C})$ of the ring is present at c.a. 1310–1200 cm^{-1} for all flavonoid groups except anthocyanins, at c.a. 1225–1180 cm^{-1} is present only for isoflavones, flavonols and flavanols spectra, at c.a. 1046–970 cm^{-1} is present only for isoflavones, flavonols and anthocyanins. In the case of FT-IR spectra the band ascribed to the $\nu(\text{C}=\text{O})$ present at c.a. 1700–1625 cm^{-1} , in the case of anthocyanins it is present only for their quinoidal form. The band at 1570–1545 cm^{-1} assigned to $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{OH})$ and $\nu(\text{C}2=\text{C}3)$, the band at 1255–1235 cm^{-1} assigned to $\tau(\text{C}-\text{C})$ of ring B and C, the band at 1140–1125 cm^{-1} ascribed to $\delta(\text{C}-\text{H})$ of ring A and the band at 1095–1075 cm^{-1} assigned to $\delta(\text{C}-\text{H})$ of ring B are specific for the flavonols. The band specific to flavanols is at 1135–1120 cm^{-1} and is ascribed to the $\nu(\text{C}=\text{C})$ of A and B ring. The bands below 970 cm^{-1} are unique for each flavonoid group however mainly by their ascription, not by their position.

The Raman spectra also presented some similarities. The band at c.a. 3189–2890 cm^{-1} ascribed to the $\nu(\text{C}-\text{H})$ was presented by flavones, isoflavones and flavanones. The bands characteristic for $\nu(\text{C}=\text{O})$ at c.a. 1694–1590 cm^{-1} was present the flavones, isoflavones, flavanones groups. The band at 1575–1540 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$) was found in the flavanones and flavonols group. The band assigned to the $\delta(\text{C}-\text{C}-\text{C})$ of the flavonoid ring at c.a. 900–880 cm^{-1} was found for isoflavones and flavonols spectra. As in the case of FT-IR spectra, also there are several Raman bands that can be ascribed to the $\nu(\text{C}=\text{C})$ vibration of the ring. The bands characteristic for this vibration was present at 1640–1600 cm^{-1} for all the flavonoid groups except flavanones. Band with the same ascription at 1530–1480 cm^{-1} was found in the flavonols and anthocyanins group, the band at 1490–1420 cm^{-1} and at 1380–1350 cm^{-1} (with the same ascription) in the flavones and flavonols group, at 1345–1240 cm^{-1} in flavanones, flavonols and anthocyanins, at 1250–1160 cm^{-1} in flavones, isoflavones and flavonols, at 1025–970 cm^{-1} in isoflavones, flavonols and flavanols and at 545–510 cm^{-1} in flavonols and anthocyanins. There were also several bands in the 880–545 cm^{-1} range that was unique to each flavonoid group, however mostly to their ascription. The spectra of flavanones group also contains several bands characteristic for deformation and torsion vibration such as $\delta(\text{HCC})$ of ring C at 1500–1480 cm^{-1} , the $\delta(\text{HCC})$ of ring C at 1460–1445 cm^{-1} and $\tau(\text{HCCC})$ of ring C at 1010–990 cm^{-1} . Moreover, the specific pattern band in the 880–545 cm^{-1} region was found for the isoflavone group. They also presented characteristic band at 1185–1179 cm^{-1} ascribed to the $\nu(\text{C}=\text{C})$ of the flavonoid rings. Flavanol group presented characteristic bands at 1190–1180 cm^{-1} and at 1140–1115

cm^{-1} ascribed to the $\nu(\text{C}-\text{OH})$ and $\delta(\text{C}-\text{H})$ of ring B and $\delta(\text{C}-\text{H})$ of ring A, respectively. Whereas, the specific band for flavanol group was assigned to $\nu(\text{OH})$ of C-3 position on the flavonoid rings and at 3670–3660 cm^{-1} , that was only present in the not esterified flavanols. The band specific to the most flavonoids at 880–545 cm^{-1} range had different ascription (usually tetrasubstituted flavylum cation) in the anthocyanins group. Anthocyanins were also characterized by the band at the 1280–1240 cm^{-1} ascribed to the $\nu(\text{C}=\text{O})$.

3. Conclusions

Both methods, FT-IR and Raman spectroscopy reflects the structural differences between samples. Their unquestionable advantages are simplicity and low cost of obtaining spectra. However the main disadvantage concerning the difficulties in distinguishing the spectra of substances with a similar structure should also be mentioned. Most of the bands characteristic to different flavonoid groups are assigned to stretching vibration between the carbons in the flavonoid ring. Despite the fact that there are some bands characteristic for specific groups of flavonoids they should be carefully interpreted, because each flavonoid apart from bands characterizing whole group also has bands characteristic for substituted groups. That is why rather than searching for the bands characteristic only to the specific flavonoid group, the fingerprint and discrimination method should be applied when the flavonoid sample is to be identified. Moreover the best results in the differentiation of flavonoid samples would be assessed when both Raman and FT-IR techniques are used.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This study was partially supported by project nr NCN OPUS UMO-2018/29/B/NZ9/00141.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133430>.

References

- Ameer, B., & Weintraub, R. A. (1997). Drug interactions with grapefruit juice. *Clinical Pharmacokinetics*, 33(2), 103–121. <https://doi.org/10.2165/00128415-199806950-00004>
- Barbehenn, R. V., & Peter Constabel, C. (2011). Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), 1551–1565. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>
- Barnett, S. M., Dicaire, F., & Ismail, A. A. (1990). Application of FT-Raman spectroscopy to the study of selected organometallic complexes and proteins. *Canadian Journal of Chemistry*, 68(7), 1196–1200. 10.1139/v90-185.
- Boam, T. (2015). Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer. *Eccancermediscience*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.585>
- Boskey, A., & Pleshko Camacho, N. (2007). FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials*, 28(15), 2465–2478. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.043>
- Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., & Rice-evans, C. A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: Implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330, 1173–1178.
- Buchweitz, M., Gudi, G., Carle, R., Kammerer, D. R., & Schulz, H. (2012). Systematic investigations of anthocyanin-metal interactions by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(12), 2001–2007. <https://doi.org/10.1002/jrs.4123>
- Chang, H., Kao, M. J., Chen, T. L., Chen, C. H., Cho, K. C., & Lai, X. R. (2013). Characterization of natural dye extracted from wormwood and purple cabbage for dye-sensitized solar cells. *International Journal of Photoenergy*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/159502>
- Condurso, C., Cincotta, F., Tripodi, G., & Verzera, A. (2018). Characterization and ageing monitoring of Marsala dessert wines by a rapid FTIR-ATR method coupled with

- multivariate analysis. *European Food Research and Technology*, 244(6), 1073–1081. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3025-9>
- Corredor, C., Teslova, T., Cañameres, M. V., Chen, Z., Zhang, J., Lombardi, J. R., & Leona, M. (2009). Raman and surface-enhanced Raman spectra of chrysin, apigenin and luteolin. *Vibrational Spectroscopy*, 49(2), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2008.07.012>
- de Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1679–1703. <https://doi.org/10.3390/ijms11041679>
- El Shoubaky, G. A., Abdel-Daim, M. M., Mansour, M. H., & Salem, E. A. (2016). Isolation and identification of a flavone apigenin from marine red alga *Acanthophora spicifera* with antinociceptive and anti-inflammatory activities. *Journal of Experimental Neuroscience*, 10(1), 21–29. <https://doi.org/10.4137/JEn.s25096>
- Fowler, Z. L., & Koffas, M. A. G. (2009). Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(5), 799–808. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2039-z>
- Geng, S., Shan, S., Ma, H., & Liu, B. (2016). Antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory activities of the polycondensate of catechin with glyoxylic acid. *PLoS ONE*, 11(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150412>
- Geraldes, C. F. G. C. (2020). Introduction to infrared and raman-based biomedical molecular imaging and comparison with other modalities. *Molecules*, 25(23). <https://doi.org/10.3390/molecules25235547>
- Gniadecka, M., Wulf, H. C., Nielsen, O. F., Christensen, D. H., & Hercovogova, J. (1997). Distinctive Molecular Abnormalities in Benign and Malignant Skin Lesions: Studies by Raman Spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 66(4), 418–423. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03167.x>
- Govindammal, M., Prasath, M., Kamaraj, S., & Sathya, B. (2019). In vivo, molecular docking, spectroscopy studies of (S)-2,3-Dihydro-5,7-dihydroxy-2(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one: A potential uptake PI3/AKT inhibitor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18(November 2018), 101086. 10.1016/j.bcab.2019.101086.
- Gupta, A., & Pandey, A. K. (2019). Antibacterial lead compounds and their targets for drug development. In *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817890-4.00018-4>
- Hanuza, J., Godlewski, P., Kucharska, E., Ptak, M., Kopacz, M., Mączka, M., ... Macalik, L. (2017). Molecular structure and vibrational spectra of quercetin and quercetin-5'-sulfonic acid. *Vibrational Spectroscopy*, 88, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.11.007>
- Harris, C. B., Shelby, R. M., & Cornelius, P. A. (1977). Effect of energy exchage on vibrational dephasing times in raman scattering. *Energy Research and Development Administration*.
- Kho, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*, 61(1). <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Kozłowska, A., & Szostak-Wegierek, D. (2014). Flavonoids—food sources and health benefits. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 65(2), 79–85.
- Krekora, M., Szymańska-Chargot, M., Niewiadomski, Z., Miś, A., & Nawrocka, A. (2020). Effect of cinnamic acid and its derivatives on structure of gluten proteins – A study on model dough with application of FT-Raman spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105935>
- Křizová, L., Dadáková, K., Kašparovský, J., & Kašparovský, T. (2019). Isoflavones. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061076>
- Leo, C. H., & Woodman, O. L. (2015). Flavonols in the Prevention of Diabetes-induced Vascular Dysfunction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65(6), 532–544. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000180>
- Liang, J., Cao, L., Zhang, L., & Wan, X. C. (2014). Preparation, characterization, and in vitro antitumor activity of folate conjugated chitosan coated EGCG nanoparticles. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 569–575. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0078-4>
- Liu, H., Chen, Y., Shi, C., Yang, X., & Han, D. (2020). FT-IR and Raman spectroscopy data fusion with chemometrics for simultaneous determination of chemical quality indices of edible oils during thermal oxidation. *Lwt*, 119(July 2019), 108906. 10.1016/j.lwt.2019.108906.
- Lyons Wall, P., & Samman, S. (1997). Flavonoids-dietary perspectives and health benefits. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*, 21, 106–114.
- Mahekar, S. A., Lucarini, M., Durazzo, A., Santini, A., Lampe, A. I., & Kiefer, J. (2019). Application of Infrared Spectroscopy for Functional Compounds Evaluation in Olive Oil: A Current Snapshot. *Journal of Spectroscopy*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5319024>
- Matławska, I. (2008). *Farmakognozja*. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań: Podręcznik dla studentów farmacji. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im.
- Miramont, C., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2020). Development of UV-vis and FTIR partial least squares models: Comparison and combination of two spectroscopy techniques with chemometrics for polyphenols quantification in red wine. *Oeno One*, 54(4), 779–792. <https://doi.org/10.20870/OENO-ONE.2020.54.4.3731>
- Osborne, B. G. (2000). Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–14. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1018>
- Paczowska, M., Lewandowska, K., Bednarski, W., Mizera, M., Podborska, A., Krause, A., & Ciolecka-Piontek, J. (2015). Application of spectroscopic methods for identification (FT-IR, Raman spectroscopy) and determination (UV, EPR) of quercetin-3-O-rutinoside. Experimental and DFT based approach. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 140, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.12.050>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Peng, H., Zhang, X., & Xu, J. (2016). Apigenin-7-O- β -D-glucoside isolation from the highly copper-tolerant plant *Elsholtzia splendens*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 17(6), 447–454. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500242>
- Petrozziello, M., Torchio, F., Piano, F., Giacosa, S., Ugolino, M., Bosso, A., & Rolle, L. (2018). Impact of increasing levels of oxygen consumption on the evolution of color, phenolic, and volatile compounds of Nebbiolo wines. *Frontiers. Chemistry*, 6(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00137>
- Pompeu, D. R., Larondelle, Y., Rogez, H., Abbas, O., Fernández, J. A., & Baeten, V. (2018). Characterization and discrimination of phenolic compounds using Fourier transform Raman spectroscopy and chemometric tools. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 22(1), 13–28. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=s2.0-85042757463&partnerID=40&md5=ac10ce9ef5e9d59dba115a693941d37>
- Pujol, D., Liu, C., Gominho, J., Olivella, M.À., Fiol, N., Villaseca, L., & Pereira, H. (2013). The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops and Products*, 50, 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.056>
- Pusz, J., Nitka, B., Zielinska, A., & Wawer, I. (2000). Synthesis and physicochemical properties of the Al(III), Ga(III) and In(III) complexes with chrysin. *Microchemical Journal*, 65(3), 245–253. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(00\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00121-1)
- Ribeiro, I. A., & Ribeiro, M. H. L. (2008). Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*, 19(4), 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.007>
- Robb, C. S., Geldart, S. E., Seelenbinder, J. A., & Brown, P. R. (2002). Analysis of green tea constituents by HPLC-FTIR. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 25(5), 787–801. <https://doi.org/10.1081/JLC-120003036>
- Rózto, R., Szymańska-Chargot, M., Gawlik-Dziki, U., & Dziki, D. (2021). Spectroscopic, mineral, and antioxidant characteristics of blue colored powders prepared from cornflower aqueous extracts. *Food Chemistry*, 346(October 2020), 101616/j.foodchem.2020.128889.
- Rudrapal, M., & Chetia, D. (2016). Plant flavonoids as potential source of future antimalarial leads. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8(1), 13–18. <https://doi.org/10.5530/srp.2017.1.4>
- Schulz, H., & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.06.001>
- Sekine, R., Robertson, E. G., & McNaughton, D. (2011). Raman, infrared and computational analysis of genistein and its methoxy derivatives. *Vibrational Spectroscopy*, 57(2), 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.09.005>
- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Téllez-Robledo, B., Navarro-Neila, S., Carrasco, V., ... Del Pozo, J. C. (2016). Flavonols mediate root phototropism and growth through regulation of proliferation-to-differentiation transition. *Plant Cell*, 28(6), 1372–1387. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00857>
- Singh, H., Singh, S., Srivastava, A., Tandon, P., Bharti, P., Kumar, S., & Maurya, R. (2014). Conformational analysis and vibrational study of daidzein by using FT-IR and FT-Raman spectroscopies and DFT calculations. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 120, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.10.045>
- Svehlíková, V., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Needs, P. W., Piacente, S., Kroon, P. A., & Bao, Y. (2004). Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry*, 65(16), 2323–2332. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.07.011>
- Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Zhihua, L., Jiyong, S., Zhai, X., Wang, S., & Mariod, A. A. (2017). Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 226, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.024>
- Ueng, Y.-F., Chang, Y.-L., Oda, Y., Park, S. S., Liao, J.-F., Lin, M.-F., & Chen, C.-F. (1999). In Vitro and In Vivo Effects of Naringin on Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase in Mouse Liver. *Life Sciences*, 65(24), 2591–2602.
- Unsalan, O., Erdogdu, Y., & Gulluoglu, M. T. (2009). FT-Raman and FT-IR spectral and quantum chemical studies on some flavonoid derivatives: Baicalein and Naringenin. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(5), 562–570. <https://doi.org/10.1002/jrs.2166>
- Wang, D., Kim, D., Shin, C. H., Zhao, Y., Park, J. S., & Ryu, M. (2019). Evaluation of epigallocatechin gallate (EGCG) to remove Pb(II) using spectroscopic and quantum chemical calculation method. *Environmental Earth Sciences*, 78(5), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8127-1>
- Watson, R. R. (2014). *Polyphenols in Plants Isolation, Purification and Extract Preparation* (R. R. Watson (ed.); First). Elsevier. ISBN 978-0-12-813768-0.
- Xia, J., Wang, D., Liang, P., Zhang, D., Du, X., Ni, D., & Yu, Z. (2020). Vibrational (FT-IR, Raman) analysis of tea catechins based on both theoretical calculations and experiments. *Biophysical Chemistry*, 256(November 2019), 106282. 10.1016/j.bpc.2019.106282.
- Zaffino, C., Russo, B., & Bruni, S. (2015). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of anthocyanidins. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.04.039>
- Zaheer, K., & Humayoun Akhtar, M. (2017). An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1280–1293. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.989958>

P1 Supplemental material:

1. Supplementary materials

Materials and methods

Materials

The pure substances in powder were measured: Naringin (hydrate, 97% purity, ACROS ORGANICS), Naringenin (Glentham Life Sciences), Quercetin (95% purity HPLC, SIGMA), Rutin (hydrate, 94% purity, HPLC, SIGMA), (-)-Epicatechin (AmBeed) and Epigallocatechin gallate (SIGMA-ALDRICH), Hesperetin and Hesperidin (Glentham Life Sciences).

Methods

FT-IR ATR

FT-IR spectra of chosen polyphenols were measured on Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) with a diamond attenuated total reflectance attachment (ATR). A small amount of pure solid substance was placed on the ATR crystal and measured. Spectra in the range of 4000–400 cm^{-1} with 4 cm^{-1} resolution were collected. Each spectrum was average of 200 scans. Spectra were baseline-corrected using OMNIC software (version 8.2, Thermo Fischer Scientific Inc., Madison, WI, USA). For each sample the analyzed spectrum was averaged over three measured spectra. Spectra were normalized to the highest peak for each flavonoid pair.

FT-Raman

The FT-Raman spectra were measured on FT-Raman with InGaAs detector (Thermo Scientific, Madison, USA). The small amount of pure substance in solid was placed in stainless cubes. The spectra were recorded over the range of 3500–150 cm^{-1} with a resolution of 8 cm^{-1} . The laser power was 1W and each spectrum was average of 200 scans. The spectra were baseline corrected and normalized to the highest peak using ORIGIN (v.9.0 PRO, OriginLab Corporation, USA). For each sample the analyzed spectrum was averaged over three measured spectra. Spectra were normalized to the highest peak for each flavonoid pair.

Tables

Suppl. Mat. Tab. 1 Region and assignments of infrared and Raman characteristic bands of the flavones group (Abbas et al., 2017; Baranović & Šegota, 2018; Mariappan et al., 2012; Paczkowska et al., 2015; Teslova et al., 2007).

band	FT-IR	RAMAN
$\nu(\text{C-H})$	3287-3060 cm^{-1}	3189-3042 cm^{-1}
$\nu(\text{C=O})$	1670-1625 cm^{-1}	1660-1590 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$	1620-1560 cm^{-1}	1620-1605 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$	1510-1480 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C=O})$		1490-1450 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C=O})$	1380-1350 cm^{-1}	1380-1350 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$	1250-1200 cm^{-1}	1250-1200 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$	740-700 cm^{-1}	
$\delta(\text{CCC})$ of ring	635-610 cm^{-1}	640-620 cm^{-1}

δ - bending vibration, ν – stretching vibration, τ – torsion vibration

Suppl. Mat. Tab. 2 Region and assignments of Infrared and Raman characteristic bands of the isoflavones group (Machado et al., 2013; Sekine et al., 2011; Tao et al., 2016).

band	FT-IR	RAMAN
$\nu(\text{C-H})$	3090-3070 cm^{-1}	3100-3000 cm^{-1}
$\nu(\text{C=O})$ of ring B	1702-1654 cm^{-1}	1649-1694 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$ of ring	1616-1611 cm^{-1}	1623-1608 cm^{-1}
$\delta(\text{C-H}) + \nu(\text{C=C})$ of ring B	1520-1516 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=C})$	1362-1354 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=O}) + \nu(\text{C=C})$	1260-1252 cm^{-1}	1200-1160 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$	1184-1180 cm^{-1}	1185-1179 cm^{-1}
$\nu(\text{C=O}) + \nu(\text{C=C})$	1046-1043 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=C})$		991-970 cm^{-1}
$\delta(\text{C-C-C})$ ring C + $\nu(\text{C=C})$ ring A	886-867 cm^{-1}	890-880 cm^{-1}
$\sigma(\text{C-C})$ of aromatic ring	730-704 cm^{-1}	
$\delta(\text{C-C-C})$ of ring B + $\delta(\text{C-O})$	568-547 cm^{-1}	566-547 cm^{-1}

δ - bending vibration, ν – stretching vibration, τ – torsion vibration

Suppl. Mat. Tab. 3 Region and assignments of Infrared and Raman characteristic bands of the flavanones group (Govindammal et al., 2019; Unsalan et al., 2009).

band	FT-IR	RAMAN
$\nu(\text{C-H})$	3135-2910 cm^{-1}	3110-2890 cm^{-1}
$\nu(\text{AR-C=O})$	1670-1625 cm^{-1}	1660-1590 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$ of ring B	1620-1560 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=C})$ of ring A	1530-1510 cm^{-1}	1555-1575 cm^{-1}
$\delta(\text{HCC})$ of ring C		1500-1480 cm^{-1}
$\delta(\text{HCC})$ of ring C		1460-1445 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$ of ring A and B	1300-1235 cm^{-1}	1300-1240 cm^{-1}
$\tau(\text{HCCC})$ of ring C		1010-990 cm^{-1}
$\tau(\text{HCCC})$ of ring C	975-960 cm^{-1}	
$\tau(\text{HCCC})$ of ring B	880-845 cm^{-1}	
$\tau(\text{HCCC})$ of ring A	780-770 cm^{-1}	780-770 cm^{-1}
$\delta(\text{CCC})$ of ring A	545-515 cm^{-1}	

δ - bending vibration, ν – stretching vibration, τ – torsion vibration

Suppl. Mat. Tab. 4 Region and assignments of Infrared and Raman characteristic bands of the flavonols group (Hanuza et al., 2017; Milenković et al., 2019; M. Wang et al., 2007).

band	FT-IR	RAMAN
$\nu(\text{CH})$ of B ring	3230-3200 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{OH})$, $\nu(\text{C}_2=\text{C}_3)$	1665-1645 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=O})$ and $\nu(\text{C}_2=\text{C}_3)$	1620-1605 cm^{-1}	1620-1600 cm^{-1}
$\nu(\text{C=O})$, $\delta(\text{OH})$ and $\nu(\text{C}_2=\text{C}_3)$	1570-1545 cm^{-1}	1570-1540 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$ of A ring and $\delta(\text{CH})$	1520-1485 cm^{-1}	1515-1485 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$ of B ring and $\delta(\text{OH})$	1475-1435 cm^{-1}	1475-1420 cm^{-1}
$\delta(\text{OH})$ and $\nu(\text{C=C})$ of A ring		1370-1350 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$ of A and B ring and $\delta(\text{OH})$	1310-1270 cm^{-1}	1320-1275 cm^{-1}

$\tau(\text{C-C})$ of ring B and C	1255-1235 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=C})$ of ring C	1225-1205 cm^{-1}	1230-1210 cm^{-1}
$\nu(\text{C-OH})$ and $\delta(\text{C-H})$ of ring B		1190-1180 cm^{-1}
$\delta(\text{C-H})$ of ring A	1140-1125 cm^{-1}	1140-1115 cm^{-1}
$\delta(\text{C-H})$ of ring b	1095-1075 cm^{-1}	
$\nu(\text{C-C})$ of ring A, B and C		1010-995 cm^{-1}
$\nu(\text{C-C})$ of ring A, B and C	1000-970 cm^{-1}	
$\nu(\text{OH})$ and $\delta(\text{C-C})$ of ring A, B and C		900-880 cm^{-1}
$\nu(\text{C-C})$ of ring A, B and C		850-825 cm^{-1}
$\nu(\text{C-C})$ of ring A, B and C		695-670 cm^{-1}
$\nu(\text{C-C})$ of ring B		640-620 cm^{-1}
$\nu(\text{C-C})$ of ring A, B and C		600-575 cm^{-1}
$\nu(\text{C-C})$ of ring A, B and C		525-510 cm^{-1}

δ - bending vibration, ν – stretching vibration, τ – torsion vibration

Suppl. Mat. Tab. 5 Region and assignments of Infrared and Raman characteristic bands of the flavanols group (Pompeu et al., 2018; Torreggiani et al., 2008; Xia et al., 2020).

band	FT-IR	RAMAN
$\nu(\text{OH})$ of C-3 position (only in not esterified flavanols)		3670-3660 cm^{-1}
$\nu(\text{C=O})$	1680-1690	1680-1690
$\nu(\text{C=C})$ of A ring	1625-1580 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=C})$ of A and B ring		1630-1600 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$ of B ring	1305-1215 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=C})$ of A and C ring	1210-1190 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=C})$ of A and B ring	1135-1120 cm^{-1}	
$\nu(\text{C=C})$ of B ring and $\nu(\text{CH})$		1025-1000 cm^{-1}
δ of ring A, $\delta(\text{C-O-C})$, $\delta(\text{C-C-C})$		780-740 cm^{-1}

δ - bending vibration, ν – stretching vibration, τ – torsion vibration

Suppl. Mat. Tab. 6 Region and assignments of Infrared and Raman characteristic bands of the anthocyanins group (Abbas et al., 2017; Zaffino et al., 2015).

band	FT-IR	RAMAN
v(C=C) of the ring	1650-1615 cm ⁻¹	
v (C=C)		1640-1610
v(C=C) of the ring	1560-1465 cm ⁻¹	
v(C=C)		1530-1480
v(C=C) of the ring	1450-1400 cm ⁻¹	
v(C=C)		1345-1315
v(C=O)		1280-1240
v(C=C) of the ring	1000-970 cm ⁻¹	
v(C-H) of 2,3,4,6-tetrasubstituted flavylum cation	~920 cm ⁻¹	
v(C-H) of 2,3,5,6-tetrasubstituted flavylum cation	900-880 cm ⁻¹	
v(C-H) of 2,3,4,6-tetrasubstituted flavylum cation	890-870 cm ⁻¹	
v(C=H) of 2,3,5,6-tetrasubstituted flavylum cation	~705 cm ⁻¹ A small amount of pure solid substance was placed on the ATR crystal and measured.	
v(C=C) of the ring		545-510

δ- bending vibration, v – stretching vibration, τ – torsion vibration.

7.2. Tekst Publikacji P2:

Autorzy: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A.

Data publikacji: 20 Grudnia 2024

Tytuł: The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films

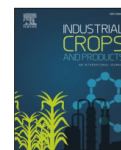
Czasopismo: Industrial Crops i Products, Volume 224, 120349.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films

Martyna Krysa, Monika Szymańska-Chargot^{*}, Piotr M. Pieczywek, Agnieszka Adamczuk, Giorgia Pertile, Magdalena Frąc, Artur Zdunek

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, Lublin 20-290, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Plant waste-based composites
Apple pomace
Polysaccharide films
Antioxidant properties
Molecular structure
Surface properties

ABSTRACT

The study of plant waste-based composites as alternatives to plastic is significant due to their biodegradability and environmental impact. However, composites based on natural plant fibers still need improvement, particularly in terms of mechanical, hydrophobic, antioxidant, and antimicrobial properties. Bioactive compounds such as phenolic acids may enhance these properties. This study aims to elucidate the mechanisms and effects of polysaccharide films made from micro- and nanofibrillated cellulose derived from apple pomace, and the adsorption of phenolic acids (caffeic, chlorogenic, and gallic acids) on their surface. Molecular interactions affecting the surface, mechanical, antioxidant, and antimicrobial properties of the composites were investigated. Raman spectroscopy revealed spectral changes in C-O and C-OH bonds, which influenced the composites' surface wettability. Nanocellulose-based composites with caffeic acid exhibited the best packaging properties, including a homogeneous structure, increased stiffness, deformation resistance, and enhanced hydrophobicity. Composites with gallic acid showed the highest surface hydrophilicity and antioxidant capacity. Understanding these molecular interactions can aid in the further development of packaging materials.

1. Introduction

The issue of plastic waste pollution has become one of the most important challenges facing the world today (Rhein and Schmid, 2020). The production of various types of packaging accounts for up to 40 % of the global production of plastics (Pathak et al., 2023). Plastic material despite benefits to consumers such as affordability, transparency, lightweight, and durability, has long-term negative impact on the environment (Demeneix, 2020). Packaging discarded by consumers (without proper disposal) alters landscapes, creates garbage patches in oceans, destroys coral reefs, and even leads to the direct death of wildlife (PlasticsEurope, 2022, Horn et al., 2019). Unfortunately, as of 2021, global plastic packaging recycling amounted to only 8.3 % (PlasticsEurope, 2022). Moreover, plastic decomposition takes thousands of years (Bläsing and Amelung, 2018). These global challenges have prompted researchers to explore natural polymers and modify them to create alternatives to conventional food packaging. Reprocessing and utilizing raw materials or waste from post-industrial, agricultural, or forest areas are considered the most sustainable approaches to

waste management, as opposed to widespread practices such as land-filling or incineration (Li et al., 2018; Rossetto et al., 2020). Even a basic method of directly collecting food waste can provide a significant raw material base for reuse (Tu et al., 2020). This method allows for the collection of 60 to even 100 kg of waste per year from the average resident in the European Union, where fruits, vegetables, and roots constitute up to 50 % of the content (Favoio and Giavini, 2020; De Laurentiis et al., 2018). Plant residues of this type contain unused plant fibers, primarily cellulose, but also hemicellulose and lignin (Li et al., 2018; Debnath et al., 2021). On the other hand, peels, seeds, and pomace serve as a source of diverse secondary plant metabolites, especially phenolic compounds, which are present in fruit tissues (Sharma et al., 2019; Campos et al., 2022).

Cellulose, the most abundant natural polymer on Earth, has the potential to replace petroleum-derived polymers (Szymańska-Chargot et al., 2018). This type of polymer has been long used in sectors such as paper and clothing production, mainly obtained from cotton or wood pulp (Chang, 2023). Cellulose microfibrils consist of both amorphous and crystalline fragments, and the hydroxyl groups present on their

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: m.krysa@ipan.lublin.pl (M. Krysa), m.szymanska@ipan.lublin.pl (M. Szymańska-Chargot), p.pieczywek@ipan.lublin.pl (P.M. Pieczywek), a.adamczuk@ipan.lublin.pl (A. Adamczuk), g.pertile@ipan.lublin.pl (G. Pertile), m.frac@ipan.lublin.pl (M. Frąc), a.zdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>

Received 7 August 2024; Received in revised form 2 December 2024; Accepted 16 December 2024

Available online 20 December 2024

0926-6690/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

surface facilitate the binding of a wide range of chemicals (Nizam et al., 2021). While nanocellulose in form of nanocrystals or nanofibrillated cellulose presents processed cellulose material with improved new functionality and performance (Dufresne, 2012). Due to increasing demands for polymers, researchers are increasingly focusing on the utilization of nanocellulose and microfibrillated cellulose due to their natural origin, safety, biodegradability, and ease of processing (Chang, 2023; Szymańska-Chargot et al., 2019a). Despite these properties, the unmodified form of cellulose is more hydrophilic and less mechanically durable, which limits its use as a packaging material (Ci et al., 2024). Moreover, nanocellulose forms a thin film material with unique properties such as transparency, thermal stability, and mechanical strength. The high availability, biocompatibility, and biodegradability of cellulose materials could make them also ideal packaging materials (Jin et al., 2021). On the other hand, the mechanical resistance and hydrophobicity still need to be improved. A possible way to increase hydrophobicity as well as introduce antimicrobial or antioxidant properties could be the addition of biologically active compounds that also occur in plant material (Chen and Chi, 2021). For instance, research on nanocellulose films with added starch demonstrated that the inclusion of polyphenolic compounds like gallic acid resulted in a slight increase in the material's resistance to deformations and overall stability (Luo et al., 2023). Agricultural and industrial waste, such as peels, seeds, and pomace, also constitute a source of diverse secondary plant metabolites, especially phenolic compounds, which are present in fruit tissues (Sharma et al., 2019; Rossetto et al., 2020). In the context of food, polyphenols can inhibit the growth of harmful microorganisms and protect products from lipid oxidation, which may extend the products' shelf life (Almeida et al., 2023). Plant polyphenols have antimicrobial and antioxidant properties and for this reason serve plants as defense mechanisms against harmful factors (Treutter, 2006). On the other hand, to meet the assumptions of the circular economy the plant wastes can be also used as a source of cellulose and nanocellulose. Usually, the wood pulp is used, however agro-industrial, fruit and vegetable wastes become important source of cellulose and nanocellulose (Kumar et al., 2024; Zaini et al., 2023; Khiari et al., 2011; Saberi Riseh et al., 2024). In our previous research of different compositions, the apple and carrot pomace, residue after juice production as the nanocellulose source was used (Szymańska-Chargot et al., 2017, 2018, 2019b, 2019a).

So far, the study of cellulose- or nanocellulose containing composites enriched by phenolic acids are scarce and usually focused on gallic, *p*-coumaric or vanillic acids (Harlen et al., 2024; Lin et al., 2024; Javed et al., 2024; Criado et al., 2016). Moreover, in most of them the nanocelluloses is mixed with other polymers. Only, LakshmiBalasubramaniam et al. (2022) presented research on composites of nanofibrillated cellulose films esterified to vanillic and syringic acid. Therefore, the study aims to investigate the properties of composites based on microfibrillated and nanofibrillated cellulose isolated from apple pomace and enriched by phenolic acids. To achieve this objective, three phenolic acids: gallic, caffeic, and chlorogenic acid, were selected due to their abundance, low cost, and wide distribution in various plant tissues. These acids were then adsorbed onto the surface of cellulose and nanocellulose films derived from apple pomace cellulose. The use of both types of cellulose—microfibrillated and nanofibrillated cellulose—can provide a broader understanding of the interactions between phenolic acid and cellulose. Additionally, it can help determine how changing the composite substrate to a more hydrophobic one affects acid adsorption on surfaces and the overall film properties (Szymańska-Chargot et al., 2019a; Luo et al., 2021). Moreover, a simplified method of obtaining composites that does not require many chemical reagents was proposed. The properties of the films were determined by the following methods: Raman spectroscopy, determination of contact angles, antimicrobial properties, surface imaging (SEM, Raman microscopy), and mechanical tests. Utilizing the collected data on the properties of the generated composites, distinctions between the various composite variants with specific acids were delineated,

determining which of the selected phenolic acids exerted the most favorable influence on the characteristics of polysaccharide films.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Cellulose and nanocellulose preparation

Never-dried cellulose (approx. 10 % solid-to-water ratio) was extracted from apples pomace. The pomaces were prepared in laboratory using a de-pulping machine with a double screw shredder (Twin Gear Juice Extractor, Green Star Elite GSE-5000, Anaheim, CA, USA) using apples purchased at the local market in an attempt to replicate typical waste from juice production (Szymańska-Chargot et al., 2017). The preparation of cellulose was described in detail by Szymańska-Chargot et al. (2019a). Briefly, the thermochemical method by Szymańska-Chargot et al. (2017) was used to remove free sugars, starch, pectin, hemicelluloses, and lignins. The thermochemical method uses the acidic and alkaline treatment at 85 °C followed by lignin removal in sodium hypochlorite at 90 °C. After purification, cellulose was boiled in hot distilled water to remove reagents, and several times rinsed in water (25 °C) and left in a wet state (10 % dry matter) in the cold (4 °C).

The isolated apple cellulose was used for the preparation of cellulose (microfibrillated cellulose) and nanocellulose (nanofibrillated cellulose) dispersions as the basis of composites (Szymańska-Chargot et al., 2019a). First, 300 g of 0.2 % wt cellulose suspension in water was prepared using Ultra-Turrax (T10 basic ULTRA TURRAX, IKA, Germany) for 10 min. At this stage, the microfibrillated cellulose suspension after dilution to 0.1 % wt was used to prepare cellulose-based composites. Then initially dispersed cellulose was introduced to ultrasound treatment to prepare nanocellulose suspensions using an ultrasonic homogenizer (Sonics Vibracell, VCX-130FSJ; Sonics & Materials Inc., USA) with a net power output equal to 130 watts and a frequency of 20 kHz was used (Szymańska-Chargot et al., 2019a). The processor was equipped with a 6-mm-diameter probe with a maximum oscillation (nominal) amplitude equal to 120 µm. The operating amplitude of the ultrasonic homogenizer was maintained at 95 % of the nominal amplitude. The sonication system contained a temperature probe, and an ice bath was used to avoid heating the samples. The dispersed cellulose after Ultra-Turrax treatment was subjected to ultrasonication for 30 min. Afterward, the samples were divided into two portions and then diluted to obtain 0.1 % weight (wt) dispersions (300 g each). Each portion was subsequently subjected to ultrasonication for 30 min. Afterward, a 0.1 % wt of nanofibrillated cellulose dispersion was obtained and used further for nanocellulose-based composites preparation.

The properties of the obtained cellulose and nanocellulose (raw material and films) have been characterized in the following publications: Szymańska-Chargot et al., (2019b) and Szymańska-Chargot et al., (2019a).

2.1.2. Cellulose and nanocellulose-based composites preparation

The composites were prepared by high vacuum filtration method (Szymańska-Chargot et al., 2019a). For each composite 300 g of 0.1 % wt of either cellulose or nanocellulose suspension was used. The filtration system was composed of a Basic 36 vacuum pump with pressure set to 0.8 bar (AgaLabor, Poland) and a filtration set (1000 mL flask, funnel, and clamp; Chempur, Poland). In each case, a 0.2 µm pore diameter nylon membrane filter (EMD Millipore™ Durapore™, φ = 90 mm) was used. The filtration process lasted approximately 15 h. The cellulose (CEL) and nanocellulose (NCEL) control films were prepared by simply removing them from nylon filter and then drying them under load of 7 kg for 72 h. Three films with a diameter of 7.5 cm were produced of each type of films (SM Fig. 1).

In the case of the phenolic acids additives, onto the still-wet cellulose or nanocellulose film, a solution of selected phenolic acids: caffeic (CAF) (SIGMA 98 % purity, PubChem: CID 689043), chlorogenic (CHL)

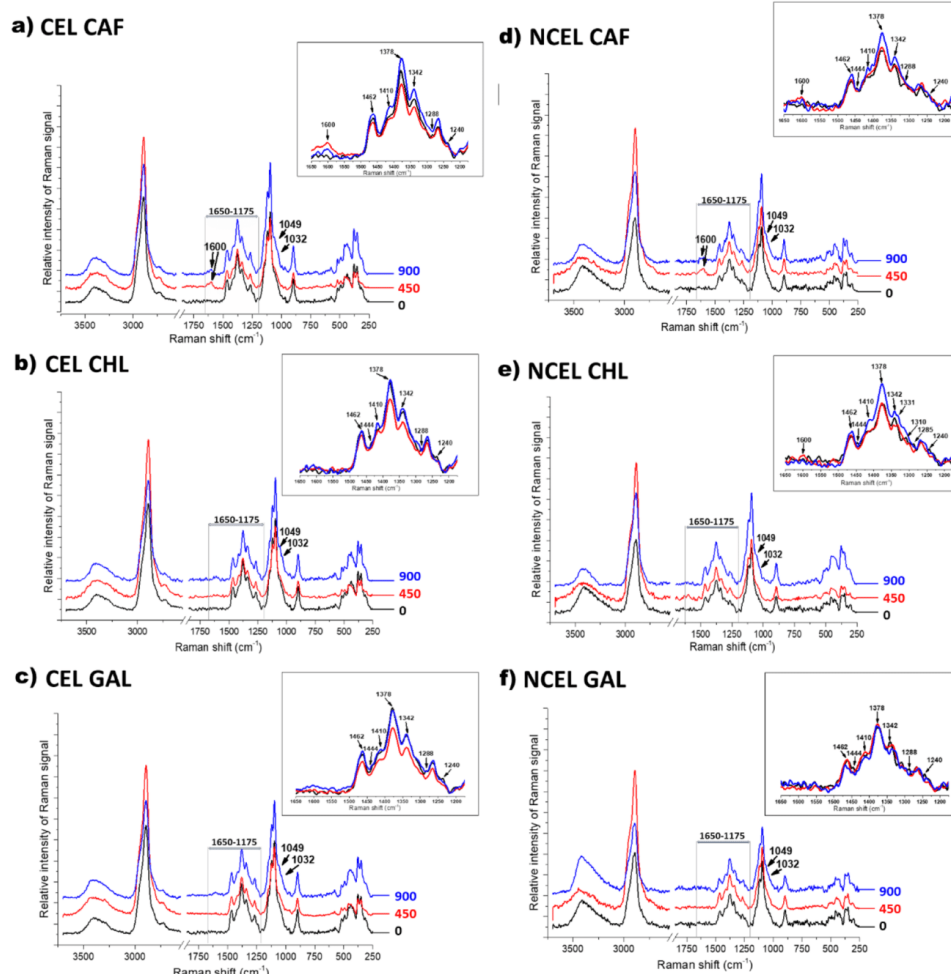


Fig. 1. FT-Raman spectra of cellulose- (CEL) (2a,b,c) and nanocellulose-based (NCEL) (2d,e,f) composites with the addition of 900 or 450 ppm of caffeic (CAF) (a, d), chlorogenic (CHL) (b,e) and gallic (GAL) (c,f) acids in range 3750–250 cm^{-1} . 0 is for control films i.e. cellulose or nanocellulose. The region of 1650–1175 cm^{-1} was maximized to highlight the differences. The region 2550–1850 cm^{-1} was removed as it didn't contain any spectral features.

(AmBeed 98 % purity, PubChem: CID 1794427), or gallic (GAL) (anhydrous, Merck 98 % purity HPLC, PubChem: CID 370) in two concentrations of 450 ppm or 900 ppm was poured and filtered again. The concentration of 900 ppm for the solutions was the maximum solubility achieved for all three selected acids (for a 5 % EtOH solution). Thereafter, each composite was removed from the nylon filter and dried under a load of 7 kg for 72 h. Three films with a diameter of 7.5 cm were produced for each variant of the composites (SM Fig. 1)

2.2. Methods

2.2.1. Intermolecular interactions by Raman Spectra

The FT-Raman spectra were acquired on an FT-Raman (NXR) FT-Raman for a Nicolet 6700 FT-IR bench using an InGaAs detector and CaF₂ beam splitter (Thermo Scientific, Madison, USA). The samples in

the form of composite cuts were placed in stainless cubes and were illuminated using Nd: YAG excitation laser operating at 1064 nm. The maximum laser power was 1 W. The spectra were recorded over the range of 3500–150 cm^{-1} and each spectrum was an average of 256 scans at 8 cm^{-1} resolution. The spectra were baseline-corrected and normalized to the area under the peaks composing the spectrum, using the ORIGIN program (v.9.0 PRO, OriginLab Corporation, USA).

2.2.2. Mechanical properties

Before mechanical testing samples of cellulose films were cut into approx. 15 rectangular strips, with a length of 40 mm and a width of 3 mm. Precise measurements of the sample width were carried out using the Olympus SZX16 (Olympus Corporation, Japan) microscope with an SDF PLAPO 0.5 XPF lens, equipped with a DFK 51BU02.H digital camera (The Imaging Source Europe GmbH, Bremen, Germany). The thickness

of each sample was measured using a digital micrometer BAKER IP54 (Baker Gauges India Private Limited, India) with a measurement accuracy equal to 0.001 mm. Following uniaxial tensile tests were performed using a miniature tensile stage (Deben Microtest, Suffolk, UK). Tests were carried out until sample mechanical failure. The initial gap between grips was set up to 10 mm. The samples' deformation rate was equal to 0.1 mm/min. Force-elongation curves were analyzed automatically using Python code (<https://github.com/ppieczywek/TDA>). Sample dimensions were used to recalculate the captured tensile force and elongation into stress and strain, respectively. Obtained bilinear stress-strain curves were characterized by four parameters: elastic modulus (slope in the first linear section of the curve), strain hardening modulus (slope in the second linear section, due to the bimodal nature of the curves), strain at break, and stress at break. The detailed measurement procedure and its stages were presented in the work by Chibrikov et al. (2024).

2.2.3. Surface morphology by scanning electron microscope

The surface of the composites was analyzed using the scanning electron microscopy technique (SEM). Samples were prepared by cutting 1×1 cm squares, followed by coating with thin Au conductive layers using a CCU-010 sputtering machine (Safematic, Zizers, Switzerland). Microscopic images were made using a Phenom Pro X scanning electron microscope (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at an accelerating voltage of 15 kV and magnifications of 200 and 2000x. Micrographs were taken from three different parts of composite, and only for composites at a concentration of 900 ppm.

2.2.4. Surface imaging by Raman microscopy

The imaging system used in this study was alpha300RA (WITec GmbH, Germany) equipped with a laser with redlight ($\lambda = 785$ nm). The laser power was set at 50 mW and integration time at 0.5 s was chosen. The 50x/0.9NA (Carl Zeiss, Germany) air objective was used. The Raman light was detected with an optic multifiber (50 μ m diameter) directed to a spectrometer UHTS 300 (WITec, Germany; 300 g mm⁻¹ grating) and finally to the CCD camera DU401A BV (Andor, Belfast, North Ireland). Raman images were recorded with a spatial resolution of 1 μ m in both directions, x, and y. The vertical z displacement was fixed. The Control Six (WITec) acquisition software was used for the Raman imaging setup. The true component analysis was performed using The Wittec Project Six (Witec, Germany).

The composite samples for Raman imaging were attached to the microscope glass with double-sided tape. Additionally, for the true component analysis, the spectra of pure phenolic acids, cellulose, and nanocellulose were collected (single spectrum, integration time = 0.5 s, number of accumulations = 10).

2.2.5. Wettability of composites

The contact angles of water droplets were measured using the Rame-Hart model 200-U1 standard goniometer (Rame-Hart Instrument co., USA). The control films and phenolic acids composites were attached to the microscopic glass by double-sided tape (T: 23.5 ± 0.1 °C; RH: 31.6 %). A 10 μ L droplet was dispensed onto a composite surface, and the contact angle was measured every minute for 10 min. For each film, 6 droplets were measured. Each point on the plot corresponds to the mean value of the left and right contact angle at a given point and time.

2.2.6. Antioxidant activity of composites by TEAC

The punch was used to make 0.5 cm diameter disks of each type of composite. 1 disc from each type of composite was put into an Eppendorf and poured with 1 mL of 0.9 % NaCl water solution. The analysis was carried out on 4 samples of each composite type. Samples were mixed on a rotary mixer (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Germany) for 30 min and 7 days (after 7 days results were showed in Supplemental material Fig. 4). After mixing the supernatant was taken. The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) was determined following the method of

Biskup (Biskup et al., 2013). Measurement was performed in 3 mL polypropylene cuvettes - 75 μ L of sample and 1425 μ L of ABTS^{•+} radical solution was used. Measurements on the UV-VIS spectrophotometer (Genesys 10S, Thermo Scientific) were taken after 30 min at a wavelength of 734 nm. The Dunn's test with Benjamini-Hochberg's Test correction and HSD Tukey Test was performed (Python).

2.2.7. Antimicrobial properties of composites

The antimicrobial effect of different composites was tested against fungal (*Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp.) and bacterial (*Escherichia coli*, *Staphylococcus capitis*) representatives using inhibition tests. The microbial strains (*B. cinerea* G227/18, *Penicillium* sp. G122/18, *E. coli* B4/14, *S. capitis* B6/15) were selected from the environmental microorganisms isolates of the Laboratory of Molecular and Environmental Microbiology, Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences (Lublin, Poland). The fungi were cultivated on Potato Dextrose Broth (PDB), *E. coli* on Eijkman Broth, and *S. capitis* in Nutrient Broth. All cultures were incubated at 26 °C at 120 rpm by 5 days or 24-h for fungi and bacteria, respectively. Successively, the fungal mycelium was homogenized and 300 μ L of inoculum was spread on the Potato Dextrose Agar (PDA) in each Petri dish. The bacterial inoculum (300 μ L was spread on Plate Count Agar. Then, 3 sterile discs 5 mmØ for each tested composites were placed on the surface of the media inoculated with each tested bacterial and fungal strains. All the Petri discs were incubated at 26 °C for 6 days. The inhibition zone were measured each day during incubation period.

3. Results

3.1. Molecular mechanisms of cellulose-polyphenol interactions

The Raman spectra of cellulose and nanocellulose composites with phenolic acids are presented in Fig. 1. Generally, Raman spectroscopy can reveal comparable spectral patterns between cellulose/nanocellulose and other composite materials (Szymańska-Chargot et al., 2019b, LakshmiBalasubramaniam et al., 2022). No characteristic bands for phenolic acids were found in the spectrum. Observation emerged at a concentration of 900 ppm across all cases, showing peaks at 1049 cm⁻¹ and 1032 cm⁻¹ from cellulose (Lau and Wong, 2000). The peak at 1049 cm⁻¹ corresponds to the vibrational modes of C-C and C-O stretching, while the 1032 cm⁻¹ peak signifies vibrations related to C-OH bonds within the ring structure. The bands at frequencies of 1049 cm⁻¹ and 1039 cm⁻¹ were not observed in the case of the control sample and for composites with acid concentrations of 450 ppm. Such bands on the spectra of nanocellulose and cellulose films derived from apple pomace residue (as in this case) were also not observed by Szymańska-Chargot (2019b), which may indicate the influence of higher acid concentrations on the appearance or exposure of these bonds on the surface of the films (Szymańska-Chargot et al., 2019b). This may indicate the stabilization of phenolic acids on the surface of the composites through C-O and C-OH bonds or at a concentration of 900 ppm, hydrogen and methyl groups present in the structural structure of selected phenolic acids become visible on the surface of the composites.

Interestingly, in composites containing 450 ppm of phenolic acids, a doubled relative intensity of the Raman signal at 2894 cm⁻¹ for C-H stretching bonds (Edwards et al., 1997) was observed and compared to 900 ppm concentration or control samples. Notably, the intensity within the fingerprint region (in this case 1462–893 cm⁻¹) remained consistent across all cases. The higher intensity of the 2908 cm⁻¹ band for the 450 ppm composites would suggest greater hydrophobicity of the composites by exposing the CH bonds from the carbon chain, however, we did not observe such a trend in the wettability studies (please see Fig. 4). Therefore, the increase in intensity in this band may be related to the presence of polyphenols, which can affect the intensity of the band in this range to a small degree (Szymańska-Chargot et al., 2019b).

In the range of 1650–1175 cm⁻¹, slight differences in the occurrence

of specific bands are observed. For all types of composites with caffeic acid and NCEL CHL 900, a peak was observed at 1600 cm^{-1} attributed to the stretching vibration of the C-C ring, most likely originating from phenolic acids (Olszewska et al., 2020). For these same composites, an increase in intensity is also noticeable for the band at 1378 cm^{-1} (vibrations for $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{HCC})$, $\delta(\text{HCO})$, and $\delta(\text{COH})$ bonds, associated with cellulose skeleton deformation) (Machado et al., 2009, Edwards et al., 1997). For composites at a concentration of 450 ppm of phenolic acid, the intensity was either the same or lower compared to the control (Fig. 1). For all types of composites at a concentration of 900 ppm, an increase in intensity was observed at the band 1410 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$), along with the absence of bands at 1288 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$ twisting) and 1240 cm^{-1} ($\delta(\text{COH})$ out-of-plane), which are present in the spectrum for cellulose and nanocellulose (Zhang et al., 2011).

3.2. Mechanical properties

The mechanical properties of the composites were characterized by determining Young's modulus (elastic modulus, E), strain hardening modulus (Eh), strain at break, and stress at break (Fig. 2).

The Young's modulus of pure cellulose and nanocellulose films was 5.78 GPa and 8.98 GPa, respectively. The addition of phenolic acids at a concentration of 450 ppm increased Young's modulus in all cases compared with pure cellulose or nanocellulose films, ranging from 6.66 GPa (CHL) to 9.96 GPa (CAF) for cellulose-based composites, and between 9.68 GPa (CHL) for 12.11 GPa (CAF) for nanocellulose-based

composites (Fig. 3a). Doubling the amount of phenolic acids in the composites generally resulted in a decrease in Young's modulus (except for CEL CHL 900, where the modulus value slightly increased). In the case of nanocellulose-based composites, Young's modulus value decreased by 1 GPa - 3.5 GPa between composites with lower and higher acid concentrations (Fig. 2a). The strain hardening modulus for cellulose-based composites decreased only for CEL GAL 900 (0.78 GPa) and CEL CAF 900 (0.55 GPa), while nearly doubling occurred for CEL CAF 450 (1.62 GPa) (Fig. 2b). Regarding nanocellulose-based composites, all modulus values were lower than the control (1.56 GPa), except for NCEL CAF 450, which had a significantly higher value (2.03 GPa).

Nanocellulose-based films exhibited a slightly higher strain at break values compared to cellulose films (NCEL 6.74 %, CEL 5.81 %). The least resilient material among all types of composites was CEL CHL 450, which demonstrated a strain at break of 2.80 %. The remaining cellulose-based composites ranged from 5.36 % (CEL CAF 450) to 6.90 % (CEL GAL 900). Composites with higher concentrations in this group exhibited greater deformation compared to composites with lower concentrations of phenolic acid and the control (except for CEL CHL 900 - 5.81 %), suggesting they were more extensible and less rigid at the point of rupture (see Fig. 2c). In the group of nanocellulose-based composites, such a clear relationship could not be established. The highest degree of deformation among all types of composites was observed in NCEL CAF 900 (10.36 %), followed by NCEL GAL 450 (9.06 %). The lowest deformation in this group was recorded for NCEL CAF 450 (4.92 %). Composites with chlorogenic acid at both

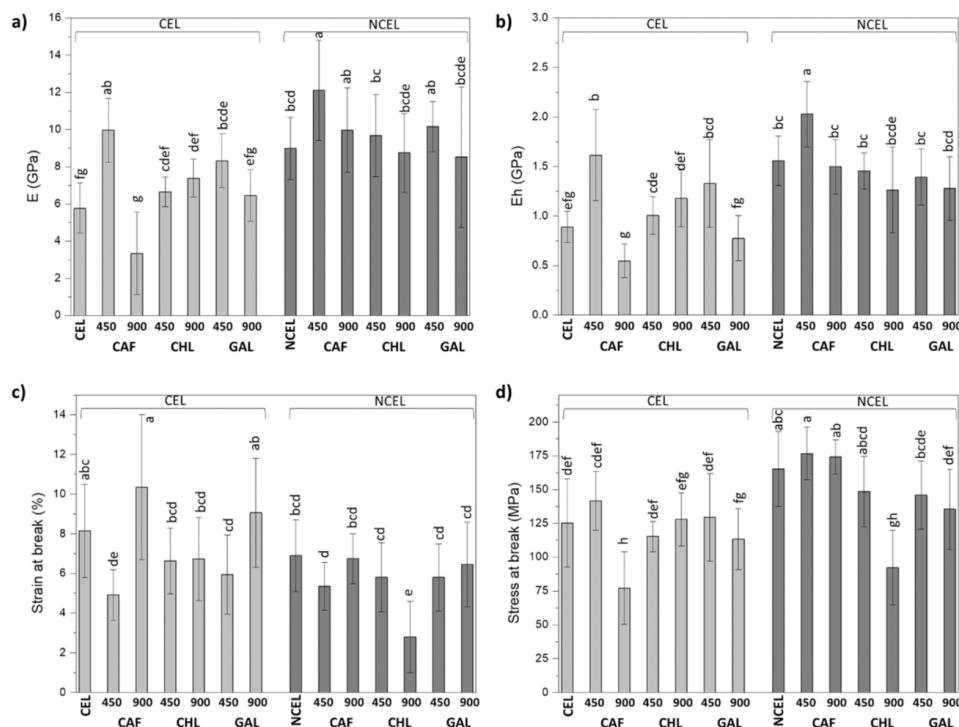


Fig. 2. Mechanical properties: elastic modulus E (a), strain hardening modulus Eh (b), strain at break (c), stress at break (d) of cellulose- (CEL) and nanocellulose-based (NCEL) composites with addition of 900 or 450 ppm of gallic acid (GAL), chlorogenic acid (CHL), and caffeic acid (CAF). Data points stand for mean values of measured parameters, while bars indicate standard deviations. Treatments with the same letter are not significantly different. Groups calculated according to the HSD Tukey test of the probability of means differences with alpha level 0.05.

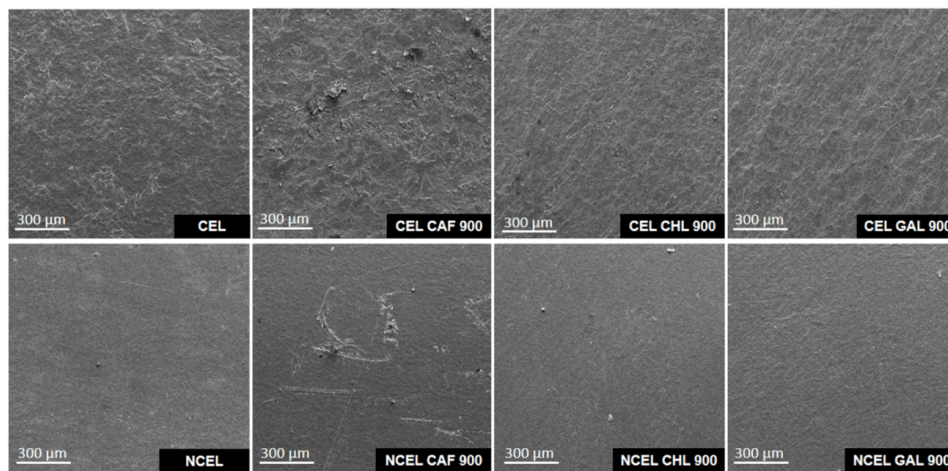


Fig. 3. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs in magnification (200x) of cellulose- (CEL) and nanocellulose-based (NCEL) composites with addition of 900 ppm of gallic acid (GAL), chlorogenic acid (CHL), and caffeic acid (CAF). High-magnification (2000x) scanning electron microscope (SEM) images had been included in the [supplementary material](#) (SM Fig. 2).

concentrations exhibited the most similar values compared to the control (CHL 450 – 6.64 %, CHL 900 – 5.95 %) (see Fig. 2c).

The addition of phenolic acids to cellulose-based composites resulted in lower stress at break (CEL CHL 450–92.4 MPa, CEL GAL 450–135.5 MPa) compared to the control for cellulose films (CEL - 148.6 MPa) in the 450 ppm concentration group. An exception was CEL CAF 450, which had a stress at a break value of 176.7 MPa. Adding acids at higher concentrations increased the mechanical stress resistance (CEL GAL 900 – 165.3 MPa, CEL CAF 900–174.1 MPa) except for the addition of chlorogenic acid (CEL CHL 900–145.9 MPa). For nanocellulose-based composites, the most significant differences between concentrations and compared to the control (NCEL - 128.0 MPa) were observed with the addition of caffeic acid at higher (NCEL CAF 900–77.24 MPa) and lower concentrations (NCEL CAF 450–141.7 MPa) (see Fig. 3.d). The mechanical resistance of nanocellulose-based composites with gallic and chlorogenic acids decreased after adding acids at lower concentrations (NCEL CHL 450–115.4 MPa, NCEL GAL 450–113.4 MPa). However, incorporating these acids at higher concentrations did not significantly change the resistance to rupture (NCEL CHL 900–129.6 MPa, NCEL GAL 900–125.3 MPa) (Fig. 2d).

Nanocellulose-based composites exhibited greater resistance to mechanical deformation compared to cellulose-based films (Fig. 2. a,b), which likely resulted from the composite's structure - nanocellulose films are composed of smaller units, which may lead to a more densely packed film structure (please see Fig. 3). Lower concentrations of phenolic acids resulted in increased stiffness compared to 900 ppm concentrations. These composites also showed differences in Young's modulus, suggesting that the addition of phenolic acids at 450 ppm concentration results in stiffer, more resistant but less extensible composites, whereas the addition at 900 ppm reduces the stiffness and increases flexibility (Fig. 2). Specifically, among all composites, NCEL CAF 450 emerged as the most resistant in tensile stress, contrary to CEL CAF 900, which exhibited the lowest mechanical resilience. Comparing the addition of other ingredients of natural origin, e.g. chitosan to films made from cellulose derived from apple pomace, as in this case, resulted in a decrease in the strength of the composites and reduced tensile strength (Szymańska-Chargot et al., 2019a). On the other hand, films made from cellulose nanofibers with the addition of syringic or vanillic acid did not show significant differences in tensile strength or Young's

modulus values (LakshmiBalasubramaniam et al., 2022). In comparison, Lin et al. (2024) showed that in the case of chitosan-cellulose nanocrystal films, adding gallic acid increased tensile strength and decreased elongation at break values. Contrary, Ru et al. (2021) presented that the addition of p-coumaric acid to the quaternized nanofibrillated cellulose films caused the decrease of both tensile strength (from 126 MPa to 99 MPa) and Young modulus (From 4.4 GPa to 3.4 GPa). In this study, lower concentrations of phenolic acids typically increased stiffness and mechanical strength, while higher concentrations often led to increased film flexibility. Additionally, significant structural heterogeneity of the samples is observed, possibly due to large deviations that occurred.

3.3. Surface morphology

The surface morphology was evaluated using SEM microscopy and Raman imaging (supplementary material Fig. 2).

SEM micrographs of composites revealed a more ordered structure in the case of nanocellulose-based films than cellulose-based ones. Cellulose-based composites exhibited a heterogeneous surface with phenolic acid aggregates, particularly prominent for caffeic acid (CEL CAF 900) (Fig. 3., upper panel). Conversely, nanocellulose and phenolic acid composites displayed a smooth surface compared to those based on cellulose (Fig. 3., lower panel). Only in the case of NCEL CAF 900 were some aggregates observed for nanocellulose films, albeit smaller than those for CEL CAF 900. SEM micrographs confirmed the assumption regarding the uneven adsorption of polyphenolic compounds on the surface of cellulose and nanocellulose films, especially evident for composites with caffeic acid.

The results of SEM analysis were corroborated by maps obtained from Raman microscope surface imaging (SM Fig. 3). Spectroscopic surface imaging confirmed the presence of each type of phenolic acid on the film surface and noted that the distribution of acids in cellulose films is more clustered (as in the case of nanocellulose-based films) than homogeneous. It is also notable that there is significantly less substance on the surface of nanocellulose films than on cellulose film surfaces.

The surface smoothness of nanocellulose composites with phenolic acids is confirmed by the study of Almeida et al., (2023), where gallic acid showed no aggregation on the base film surface, unlike in the films examined in this publication (Luo et al., 2021). The surface porosity

observed in microcrystalline cellulose-based films was also confirmed by Wu et al. (2020). In the mentioned study, the phenolic acid, gallic acid, also did not lead to surface smoothing and closure of pores normally present in microfibrillated cellulose films (Chakraborty et al., 2022).

3.4. Wettability

The contact angles of the composites indicate that cellulose-based composites (Fig. 4. a,c,e) were more hydrophilic than nanocellulose-based composites (Fig. 4. b,d,f). In the wettability studies, the contact angle of all composites decreased relatively evenly, decreasing by an average of 1.5° per minute. After 10 min, all composites showed reduced wetting angles by 15° – 13° degrees compared to the initial state (Fig. 4). Due to the uniform decrease in angles in all types of composites, the degree of wettability between the composites was compared based on the angles after 1 min.

In all cases (except for composites with gallic acid), composites with higher concentrations of phenolic acids were more hydrophobic than those with lower concentrations (Fig. 4). At lower concentrations, the composites were more hydrophilic than the CEL and NCEL control

samples (57.8° and 48.4° , respectively). The composite with the addition of 900 ppm of caffeic acid had the most hydrophobic surface in the cellulose-based composites group (CEL CAF 900– 67.7°), while in the nanocellulose-based composites group, chlorogenic acid (NCEL CHL 900– 75.6°) exhibited the most hydrophobicity. CEL GAL 450 composites were the most hydrophilic among all composites (40.2°). CEL CHL 450 and CEL CHL 900 composites had similar hydrophilic properties to cellulose film (Fig. 4. a, b).

Overall, the addition of gallic acids increased the hydrophilicity of the sample surfaces (Fig. 4. c, f). Surprisingly, cellulose-based composites with 900 ppm caffeic acid exhibited significant hydrophobicity, both in cellulose and nanocellulose films, which was not observed in CHL, which, despite having the highest hydrophobicity in nanocellulose-based composites, did not exhibit this capability in cellulose-based composites.

The surface of the produced composites is amorphous due to the spatial arrangement of cellulose fibers (Szymańska-Chargot et al., 2019b). Tang et al. (2003) indicate that hydrogen bonds and hydrophobic interactions are important in the interactions between cellulose and polyphenols, and that both interactions depend on the polarity of

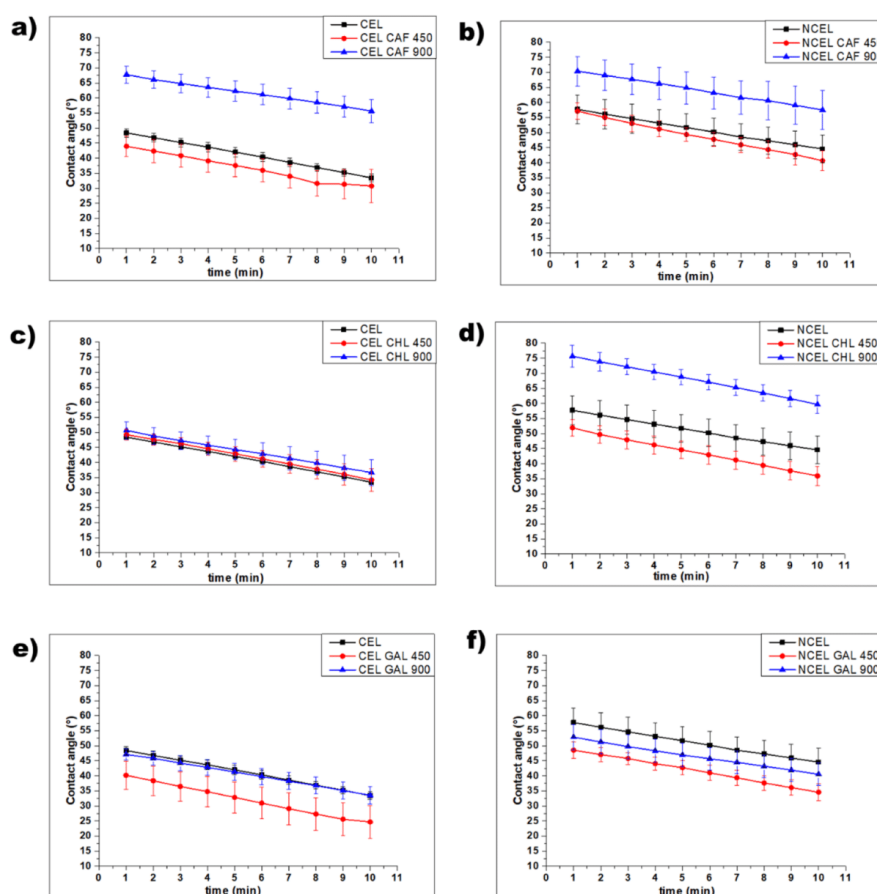


Fig. 4. Contact angles of water drop obtained on the surface of cellulose- (a, c, e) and nanocellulose-based composites (b, d, f) with addition of 450 ppm or 900 ppm of caffeic (CAF), gallic (GAL) or chlorogenic (CHL) acids.

the solvents used (Tang et al., 2003). In this case, it is possible that at the lower concentration of phenolic acids in the aqueous solution (450 ppm composites) the solution was more hydrophilic, thus favoring hydrophobic interactions, which (referring to the spectroscopic spectra in Fig. 1) were revealed with greater intensity in the 2908 cm^{-1} band, characteristic of CH_2 bonds. At higher concentrations (900 ppm), the solution became more hydrophobic, so the polyphenols preferred to adsorb to the surface via hydrogen bonds. This would confirm the presence of hydrogen bonds (1032 cm^{-1}) in the spectrum for all composites (Fig. 1). Based on these wettability results, this relationship can be confirmed - for higher concentrations, the composites are more hydrophobic than the control (occupied hydrophilic bonds, i.e., OH on the surface of amorphous cellulose), while composites with lower concentrations of adsorbed phenolic acid are similarly or more hydrophilic than the control. The exception is composites with the addition of gallic acid, which at higher concentrations are similarly hydrophilic as the control. This may be because gallic acid is the most water-soluble compound among the selected phenolic acids (the rest are poorly soluble), making it similarly hydrophilic to cellulose. (Tang et al., 2003, Daneshfar et al., 2008, Ji et al., 2016)

3.5. Antioxidant activity

The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity revealed that the released polyphenolic acids into the solution were predominantly higher for nanocellulose-based films than cellulose films (Fig. 5). For each type of acid, the highest antioxidant activity was observed in the supernatant samples obtained from the mixing of nanocellulose composites at a concentration of 900 ppm in 0.9 % NaCl solution. Due to the suspected higher concentration on the surface, phenolic acids from 900 ppm films were released to a greater extent than in 450 ppm films - especially notable in the case of NCEL GAL composites, with an approx. six-fold difference (Fig. 5). The smallest changes between groups for caffeic acid occurred (Fig. 5) For the chlorogenic acid the difference between concentrations in nanocellulose-based composites was nearly twofold

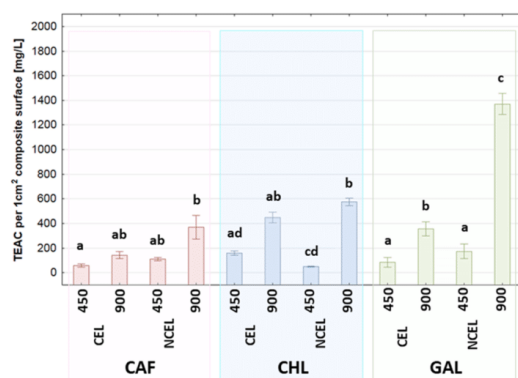


Fig. 5. Antioxidant activity of cellulose- (CEL) and nanocellulose-based (NCEL) composites. Phenolic acids: gallic acid (GAL), chlorogenic acid (CHL), and caffeic acid (CAF) adsorbed on the surface at a concentration of 900 ppm or 450 ppm on cellulose (CEL) and nanocellulose (NCEL) based composites. The antioxidant capacity results were measured for 1 film measuring 0.5 cm in diameter after 30 min of macerating in 1 mL of 0.9 % NaCl solution. The results were recalculated to Trolox equivalent antioxidant capacity per 1 cm² of surface area was determined. The control (CEL and NCEL) did not show any antioxidant properties. Groups calculated according to Dunn's test with Benjamini-Hochberg's Test correction was performed, and only the gallic acid group was determined by the HSD Tukey Test. The same superscript letters denote no statistically significant differences within each phenolic acid group.

(Fig. 5). The results demonstrated that the composite with caffeic acid exhibited the lowest antioxidant capacity compared to all other types of composites, particularly with a focus on CAF CEL 450 (Fig. 5). Similarly, CHL CEL 450 demonstrated a low antioxidant capacity, which doubles after a 7-day rotate mixing exposure in an aqueous saline solution (SM Fig. 4). The antioxidant capacity of the composites after 7 days of rotor mixing increases slightly in almost all cases, except for the composites with chlorogenic acid, where the antioxidant capacity increases up to five times (CHL NCEL 450). This may be due to the better binding of chlorogenic acid to the film surface, and the prolonged contact with the solution allows for more acid to be released, resulting in significant differences in antioxidant capacity between day zero and day seven (SM Fig. 4). The control (CEL and NCEL) did not show any antioxidant properties, therefore data were not included in the Fig. 5.

All composites, exposed to 0.9 % NaCl, release phenolic acids into the supernatant but variously. In the release study of phenolic acids, a 0.9 % NaCl solution was utilized because it is isotonic to cells, potentially providing an indication of the release of these compounds upon contact with the potential food product. This suggests that binding between cellulose and polyphenolic acid is not permanent. The polar solvent environment (0.9 % NaCl) may have influenced the degree of release into the solution of acids, especially caffeic acid (which strongly prefers nonpolar solvents) (Daneshfar et al., 2008)

Almeida et al. (2023) suggest that incorporating polyphenols into packaging currently appears to be a better choice due to avoiding the issue of flavor alteration. However, according to the results presented above, such changes may still occur due to the release of polyphenols into the solution (Almeida et al., 2023). The release of substances into the solution may imply that the presence of surface-adsorbed polyphenols could influence the taste, given that polyphenols are recognized for their bitter flavor (Soares et al., 2018). The antioxidant efficacy of polysaccharide-based films has been corroborated by numerous researchers who integrated polyphenol-rich extracts or powders into diverse film matrices (Chen and Chi, 2021, Wu et al., 2020). Considering the antimicrobial properties (Fig. 5) and the health-promoting attributes of polyphenolic acids, this could be an advantage for using composites in the food industry (Szymańska-Chargot et al., 2017).

3.6. Antimicrobial properties

The evaluation of antimicrobial properties of tested composites (Table 1) showed that the composites with phenolic acids presented high growth inhibition of *B. cinerea* and both bacterial strains. In the opposite, no evident inhibition of *Penicillium* sp. was observed. The highest inhibitory effect against microorganisms was exhibited by caffeic acid at both concentrations, especially in nanocellulose composites (NCEL CAF 450/900), whereas cellulose/caffeic acid (CEL CAF 450/900) exhibited a negative effect only on bacterial strains. Chlorogenic acid showed a very ambiguous effect. In cellulose composite, its antimicrobial properties were mainly evident at higher concentrations, whereas in nanocellulose-based composites, only at lower concentrations. In general all composites with the addition of gallic acid exhibited the weakest inhibitory effect of growth on tested bacterial and fungal strains.

The addition of phenolic acids to composites exerted a comparable effect on both Gram-negative (*E. coli*) and Gram-positive bacteria (*S. capitis*) (SM Fig. 5). In the case of *B. cinerea*, fungi changed the shape, density, and structure of mycelium compared to the control, indicating an inhibitory effect on fungal growth upon contact with the composite. None of the selected phenolic acids showed clear growth inhibition of upon contact with *Penicillium* sp. inoculum, responsible for mold on fruits or vegetables. These results indicate that composites enriched with selected phenolic acids show contact inhibitory activity against the growth of microorganisms (*E. coli* and *S. capitis*) and exhibit weaker but noticeable inhibitory activity against phytopathogenic fungi (*B. cinerea*). The lack of inhibition of *Penicillium* sp. may confirm the potential biodegradability of composites, as fungi of this type participate in

Table 1

Microbial growth inhibition under the influence of composites after 6 days of incubation. 900 ppm or 450 ppm of gallic acid (GAL), chlorogenic acid (CHL), and caffeic acid (CAF) was adsorbed on the surface cellulose- (CEL) and nanocellulose-based (NCEL). The inhibition ability of the composites was determined based on the average calculated radius measured around three discs of 0.5 cm diameter from each composite type placed on Petri dishes inoculated with bacteria or fungi. '+' microbial growth inhibition – signifies that the average inhibition zone around the composite ranged from 1 to 3 mm; '+/-' uncertain microbial growth inhibition – indicates inhibition up to 1 mm; '-' no microbial growth inhibition – denotes the absence of inhibition zones around the composite.

Samples/ Microbial strains	CEL	CEL CAF 450	CEL CAF 900	CEL CHL 450	CEL CHL 900	CEL GAL 450	CEL GAL 900	NCEL	NCEL CAF 450	NCEL CAF 900	NCEL CHL 450	NCEL CHL 900	NCEL GAL 450	NCEL GAL 900
<i>Botrytis cinerea</i> (G277/18)	-	-	-	+	+/-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>Penicillium</i> Sp. (G122/18)	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (B4/14)	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>Staphylococcus capitis</i> (B6/15)	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-

cellulolytic reactions and can remove or deactivate phenolic compounds (Leitão, 2009)

Differences in the action of phenolic acids are confirmed by studies by Lima et al. (2016), was observed that caffeic acid exhibited increased antibacterial activity against three groups of tested bacteria (*S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) while gallic acid showed activity only against *S. aureus* (despite being combined with conventional antibiotics) (Lima et al., 2016). On the other hand, studies by Kabir et al. (2014) conducted for pure phenolic acids showed that chlorogenic acid had a greater inhibitory ability against *E. coli* infections than caffeic acid, contrary to the results obtained in this study. Chitosan films with gallic acid showed a significant impact on inhibiting the growth of *E. coli*, however, at much higher concentrations (0.5 g-1.5 g per 100 g of film) than those used in this study, which may explain the lack of inhibition zones for such composites (Sun et al., 2014).

4. Conclusions

In this study, the effects of selected phenolic acids on the surface properties, mechanical properties, molecular structure, antioxidant capacity and antimicrobial potential of cellulose- and nanocellulose-based films derived from apple waste were investigated.

Adsorption of caffeic acid at a concentration of 900 ppm onto the surface of nanocellulose films resulted in the formation of the most extensible material among all variants produced in the study, while at a lower concentration (450 ppm), the composites exhibited the greatest stiffness and resistance to deformation. Characteristic peaks for polyphenolic compounds (at 1600 cm⁻¹) were observed in the vibrational spectra, which did not appear for other types of composites. Composites of CEL and NCEL with 900 ppm of caffeic acid had the most homogeneously distributed polyphenolic compound on the surface of the polysaccharide film and exhibited high surface hydrophobicity. All variants of composites with this acid demonstrated the ability to reduce the growth of microorganisms (bacterial and fungal) in contact with the composite, especially nanocellulose-based films. However, the composites were not resistant to *Penicillium* spp. infection, which may indicate the retention of their biodegradability. The weakest antioxidant activity may result from both the activity of the pure compound and the use of an unfavorable solvent for the leaching of caffeic acid, which prefers nonpolar solvents.

The addition of chlorogenic acid at a concentration of 450 ppm to both types of cellulose/nanocellulose films resulted in the greatest reduction in Young's modulus values compared to the control, suggesting that the material becomes the most elastic among all variants for the lower concentration. Higher resistance to deformation was observed only for CEL CHL 900 composites, which were also the stiffest in the cellulose-based group at higher concentrations. The addition of chlorogenic acid at a 900 ppm concentration to nanocellulose film

(NCEL CHL 900) resulted in the most hydrophobic surface among all created composites. SEM images revealed smooth composite surfaces comparable to the control. Adsorption of this acid on the surfaces led to antioxidant properties, much greater than caffeic acid and most comparable among the variants in the acid group. Such composites demonstrated the ability to inhibit the development of pathogens, mainly in the CEL 900 group. However, NCEL 900 showed no inhibitory capacity, and for the rest of the composites at lower concentrations, no clear ability to limit the growth of microorganisms was observed.

Gallic acid at a higher concentration adsorbed to cellulose film increased the stiffness of the composite but to a lesser extent than the addition of caffeic acid. Nanocellulose-based composites, particularly at lower concentrations, showed a decrease in mechanical strength, suggesting that the material becomes more susceptible to cracking. The gallic acid in every concentration and variant increased surface hydrophilicity compared to the control (except for CEL GAL 900, which was equally hydrophilic as the cellulose film) and exhibited the smoothest and most homogeneous surface of all studied composites. Composites with gallic acid at the applied concentrations practically did not possess the ability to inhibit the growth of microorganisms.

The results of these studies aim to elucidate certain mechanisms and the effects of polyphenols on the properties of cellulose/nanocellulose films, enabling the preparation of material from apple pomace. It was suggested that 900 ppm of caffeic acid adsorbed it on the nanocellulose film's surface had the best properties. This composite demonstrated superior hydrophobic properties, ability to reduce the growth of undesirable microorganisms, increased strength, and enhanced extensibility compared to other polyphenols investigated. Further research is needed, including typical packaging tests such as gas and water vapor permeability and food contact performance assessments such as shelf life.

CRediT authorship contribution statement

Magdalena Frąc: Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Artur Zdunek:** Writing – review & editing. **Giorgia Pertile:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Piotr M. Pieczywek:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Agnieszka Adamczuk:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Martyna Krysa:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Monika Szymańska-Chargot:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was partially funded by The National Center for Research and Development (grant number NCN OPUS UMO-2018/29/B/NZ9/00141).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.indcrop.2024.120349](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349).

Data Availability

Data will be made available on request.

References

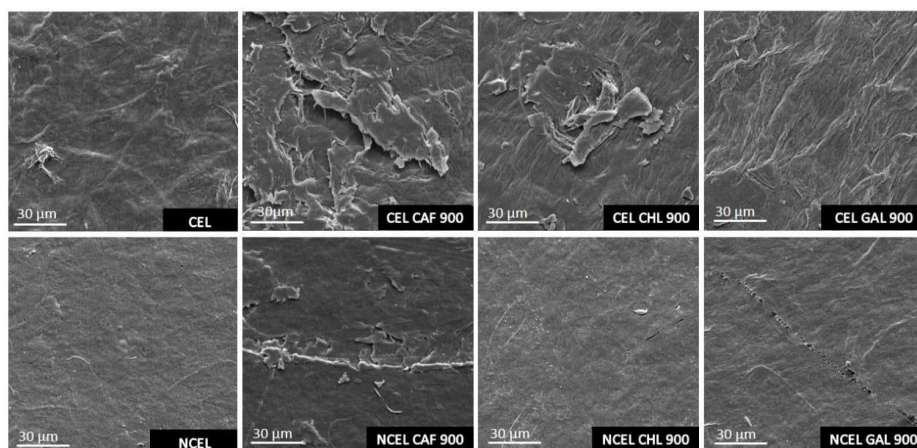
- Almeida, T., Karaymshva, A., Valente, B.F.A., Silva, J.M., Braz, M., Almeida, A., Silvestre, A.J.D., Vilela, C., Freire, C.S.R., 2023. Biobased ternary films of thermoplastic starch, bacterial nanocellulose and gallic acid for active food packaging. *Food Hydrocoll.* 144, 108934. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108934>.
- Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A., Sroka, Z., 2013. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postępy Hig. i Med. doświadczalnej* (Online) 67, 958–963. <https://doi.org/10.5604/17322693.1066062>.
- Bläsing, M., Amelung, W., 2018. Plastics in soil: analytical methods and possible sources. *Sci. Total Environ.* 612, 422–435. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.086>.
- Campos, L., Seixas, L., Henriques, M.H.F., Peres, A.M., Veloso, A.C.A., 2022. Pomegranate peels and seeds as a source of phenolic compounds: effect of cultivar, by-product, and extraction solvent. *Int. J. Food Sci.* <https://doi.org/10.1155/2022/9189575>.
- Chakraborty, I., Rongpipi, S., Govindaraju, I., B. R., Mal, S.S., Gomez, E.W., Gomez, E.D., Kalita, R.D., Nath, Y., Mazumder, N., 2022. An insight into microscopy and analytical techniques for morphological, structural, chemical, and thermal characterization of cellulose. *Microsc. Res. Tech. Adv. Online Publ.* <https://doi.org/10.1002/jemt.24057>.
- Chang, S.H., 2023. Plastic waste as pyrolysis feedstock for plastic oil production: a review. *Sci. Total Environ.* 877, 162719. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162719>.
- Chen, F., Chi, C., 2021. Development of pullulan/carboxylated cellulose nanocrystal/tea polyphenol bionanocomposite films for active food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* 186, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.025>.
- Chibrikov, V., Pieczywek, P.M., Cybulska, J., Zdunek, A., 2024. Coarse-grained molecular dynamics model to evaluate the mechanical properties of bacterial cellulose-hemicellulose composites. *Carbohydr. Polym.* 330, 121827. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.121827>.
- Ci, Y., Lv, D., Yang, X., Du, H., Tang, Y., 2024. High-performance cellulose/thermoplastic polyurethane composites enabled by interaction-modulated cellulose regeneration. *Carbohydr. Polym.* 346, 122611. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122611>.
- Criado, P., Fraschini, C., Salmieri, S., Becher, D., Safrany, A., Lacroix, M., 2016. Free radical grafting of gallic acid (GA) on cellulose nanocrystals (CNCs) and evaluation of antioxidant reinforced gellan gum films. *Radiat. Phys. Chem.* 118, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.05.030>.
- Daneshfar, A., Ghaziaskar, H.S., Homayoun, N., 2008. Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. *J. Chem. Eng. Data* 53 (3), 776–778. <https://doi.org/10.1021/je700633w>.
- De Laurentiis, V., Corrado, S., Sala, S., 2018. Quantifying household waste of fresh fruit and vegetables in the EU. *Waste Manag.* 77, 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.001>.
- Debnath, B., Haldar, D., Purkait, M.K., 2021. A critical review on the techniques used for the synthesis and applications of crystalline cellulose derived from agricultural wastes and forest residues. *Carbohydr. Polym.* 273, 118537. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118537>.
- Demeneix, B.A., 2020. How fossil fuel-derived pesticides and plastics harm health, biodiversity, and the climate. *Lancet, Diabetes Endocrinol.* 8 (6), P462–P464. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30116-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30116-9).
- Dufresne, A., 2012. Cellulose and potential reinforcement. In: Dufresne, A. (Ed.), *Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials*. De Gruyter, pp. 1–37. <https://doi.org/10.1515/9783110254600>.
- Edwards, H.G.M., Farwell, D.W., Webster, D., 1997. FT Raman microscopy of untreated natural plant fibers. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 53 (13), 2383–2392. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(97\)00178-9](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(97)00178-9).
- Favoio, E., & Giavini, M. (2020). Bio-waste generation in the EU: current capture levels and future potential (Report No. 2) [Commissioned by: Bio-based Industries Consortium (BIC)]. Zero Waste Europe.
- Harlen, W.C., Prakash, S., Yuliani, S., Bhandari, B., 2024. Characterization of alginate-crystalline nanocellulose composite hydrogel as polyphenol encapsulation agent. *Food Res. Int.* 195, 114989. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114989>.
- Horn, D.A., Granek, E.F., Steelen, C.L., 2019. Effects of environmentally relevant concentrations of microplastic fibers on Pacific mole crab (*Emerita analoga*) mortality and reproduction. *Limnol. Oceanogr. Lett.* <https://doi.org/10.1002/lol2.10137>.
- Javed, M., Huang, H., Ma, Y., Ettoumi, F.-e, Wang, L., Xu, Y., El-Seedi, H.R., Ru, Q., Luo, Z., 2024. Construction of self-assembled nano cellulose crystals/chitosan nanobubbles composite hydrogel with improved gallic acid release property. *Food Chem.* 438, 137948. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137948>.
- Ji, W., Meng, Q., Ding, L., Wang, F., Dong, J., Zhou, G., Wang, B., 2016. Measurement and correlation of the solubility of caffeic acid in eight mono and water-ethanol mixed solvents at temperatures from (293.15 to 333.15) K. *J. Mol. Liq.* 224 (PartB), 1275–1281. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.10.110>.
- Jin, K., Tang, Y., Liu, J., Wang, J., Ye, C., 2021. Nanofibrillated cellulose as coating agent for food packaging paper. *Int. J. Biol. Macromol.* 168, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.066>.
- Kabir, F., Katayama, S., Tanji, N., et al., 2014. Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 57, 359–365. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4056-6>.
- Khiari, R., Mhenni, M.F., Belgacem, M.N., Mauret, E., 2011. Valorisation of vegetal wastes as a source of cellulose and cellulose derivatives. *J. Polym. Environ.* 19, 80–89. <https://doi.org/10.1007/s10924-010-0207-y>.
- Kumar, J., Alam, I., Kumar, A., Kumar, A., Singh, S.K., Singh, S.P., Sharma, C., 2024. Sustainable utilization of pineapple fruit waste as a potential source of regenerated cellulose for the development of high-strength paper. *Biomass. Bioenergy* 182, 107068. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107068>.
- LakshmiBalasubramaniam, S.P., Howell, C., Tajvidi, M., Skonberg, D., 2022. Characterization of novel cellulose nanofibril and phenolic acid-based active and hydrophobic packaging films. *Food Chem.* 374, 131773. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131773>.
- Lau, I.-W., Wong, S.-K., 2000. Contamination in food from packaging material. *J. Chromatogr. A* 882 (1–2), 255–270. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00356-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00356-3).
- Leitão, A.L., 2009. Potential of penicillium species in the bioremediation field. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6 (4), 1393–1417. <https://doi.org/10.3390/ijerph6041393>.
- Li, Y.-Y., Wang, B., Ma, M.-G., Wang, B., 2018. Review of recent developments on preparation, properties, and applications of cellulose-based functional materials. *Mater. Sci. Rev.* 25 (4), 789–802. <https://doi.org/10.1155/2018/8973643>.
- Lima, V.N., Oliveira-Tintino, C.D.M., Santos, E.S., Morais, L.P., Tintino, S.R., Freitas, T.S., Geraldo, Y.S., Pereira, R.L.S., Cruz, R.P., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., 2016. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microb. Pathog.* 99, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.004>.
- Lin, K., Zhu, Y.-z, Ma, H.-w, Wu, J.-c, Kong, C.-n, Xiao, Y., Liu, H.-c, Zhao, L.-l, Qin, X.-l, Yang, L.-f, 2024. Preparation, characterization, and application of gallic acid-mediated photodynamic chitosan-nanocellulose-based films. *Int. J. Biol. Macromol.* 277 (Part1), 134008. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134008>.
- Luo, Q., Shen, H., Zhou, G., Xu, X., 2023. A mini-review on the dielectric properties of cellulose and nanocellulose-based materials as electronic components. *Carbohydr. Polym.* 303, 120449. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120449>.
- Luo, Y., Wu, Y., Wang, Y., Yu, L., 2021. Active and robust composite films based on gelatin and gallic acid integrated with microfibrillated cellulose. *Foods* 10 (11), 2831. <https://doi.org/10.3390/foods10112831>.
- Machado, N.F.L., Calheiros, R., Gaspar, A., Garrido, J., Borges, F., Marques, M.P.M., 2009. Antioxidant phenolic esters with potential anticancer activity: solution equilibria studied by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* 40, 80–85. <https://doi.org/10.1002/jrs.2083>.
- Nizam, P.A., Gopakumar, D.A., Pottathara, Y.B., Pasquini, D., Nzihou, A., Thomas, S., 2021. Nanocellulose-based composites. *Nanocellulose Based Compos. Electron.* 15–29. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822350-5.00002-3>.
- Olszewska, M.A., Gêdas, A., Simões, M., 2020. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: applications and limitations in the food industry. *Food Res. Int.* 134, 109214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109214>.
- Pathak, G., Nichter, M., Hardon, A., Moyer, E., Latkar, A., Simbaya, J., Pakasi, D., Taqeban, E., Love, J., 2023. Plastic pollution and the open burning of plastic wastes. *Glob. Environ. Change* 80, 102648. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2023.102648>.
- PlasticsEurope. (2022). *Tworzywa Fakty-2022_PL_web.pdf*. Retrieved from (https://plasticseurope.org/pl/wp-content/uploads/sites/7/2022/12/Tworzywa_Fakty-2022_PL_web.pdf), access 03/02/2024.
- Rhein, S., Schmid, M., 2020. Consumers' awareness of plastic packaging: more than just environmental concerns. *Resour. Conserv. Recycl.* 162, 105063. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.105063>.
- Rossetto, R., Maciel, G.M., Bortolini, D.G., Ribeiro, V.R., Isidoro Haminiuk, C.W., 2020. Acai pulp and seeds as emerging sources of phenolic compounds for enrichment of residual yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) through the bioisopropion process. *LWT Food Sci. Technol.* 128, 109447. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109447>.
- Ru, J., Wang, Z., Tong, C., Liu, H., Wang, G., Peng, Z., 2021. Nonleachable antibacterial nanocellulose with excellent cytocompatible and UV-shielding properties achieved

- by counterion exchange with nature-based phenolic acids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9 (47), 15755–15767. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c03561>.
- Saberi Rishi, R., Gholizadeh Vazvani, M., Hassanisaadi, M., Thakur, V.K., 2024. Agricultural wastes: a practical and potential source for the isolation and preparation of cellulose and application in agriculture and different industries. *Ind. Crops Prod.* 208, 117904. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117904>.
- Sharma, A., Thakur, M., Bhattacharya, M., Mandal, T., Goswami, S., 2019. Commercial application of cellulose nano-composites – a review. *Biotechnol. Rep.* 21, e00316. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316>.
- Soares, S., Silva, M.S., García-Estevéz, L., Großmann, P., Brás, N., Brandão, E., Mateus, N., de Freitas, V., Behrens, M., Meyerhof, W., 2018. Human bitter taste receptors are activated by different classes of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 66 (33), 8814–8823. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03569>.
- Sun, X., Wang, Z., Kadouh, H., Zhou, K., 2014. The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *LWT - Food Sci. Technol.* 57 (1), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.037>.
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Gdula, K., Koziol, A., Zdunek, A., 2017. Isolation and characterization of cellulose from different fruit and vegetable pomaces. *Polymers* 9 (10), 495. <https://doi.org/10.3390/polym9100495>.
- Szymańska-Chargot, M., Cieśla, J., Chylińska, M., et al., 2018. Effect of ultrasonication on physicochemical properties of apple based nanocellulose-calcium carbonate composites. *Cellulose* 25, 4603–4621. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1900-6>.
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P., Zdunek, A., 2019b. Tailored nanocellulose structure depending on the origin. Example of apple parenchyma and carrot root celluloses. *Carbohydr. Polym.* 210, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.070>.
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pertile, G., et al., 2019a. Influence of chitosan addition on the mechanical and antibacterial properties of carrot cellulose nanofibre film. *Cellulose* 26, 9613–9629. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02755-9>.
- Tang, H.R., Covington, A.D., Hancock, R.A., 2003. Structure–activity relationships in the hydrophobic interactions of polyphenols with cellulose and collagen. *Biopolymers* 70, 403–413. <https://doi.org/10.1002/bip.10499>.
- Treutter, D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4, 147–157. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>.
- Tu, H., Zhu, M., Duan, B., Zhang, L., 2020. Progress report: recent progress in high-strength and robust regenerated cellulose materials. *Adv. Mater.* <https://doi.org/10.1002/adma.202000682>.
- Wu, C., Li, Y., Sun, J., Lu, Y., Tong, C., Wang, L., Yan, Z., Pang, J., 2020. Novel konjac glucomannan films with oxidized chitin nanocrystals immobilized red cabbage anthocyanins for intelligent food packaging. *Food Hydrocoll.* 98, 105245. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105245>.
- Zaini, H.M., Saallah, S., Roslan, J., Sulaiman, N.S., Munsu, E., Wahab, N.A., Pindi, W., 2023. Banana biomass waste: A prospective nanocellulose source and its potential application in food industry – a review. *Heliyon* 9 (8), e18734. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18734>.
- Zhang, K., Feldner, A., Fischer, S., 2011. FT Raman spectroscopic investigation of cellulose acetate. *Cellulose* 18, 995–1003. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9545-8>.

8. Supplemental material

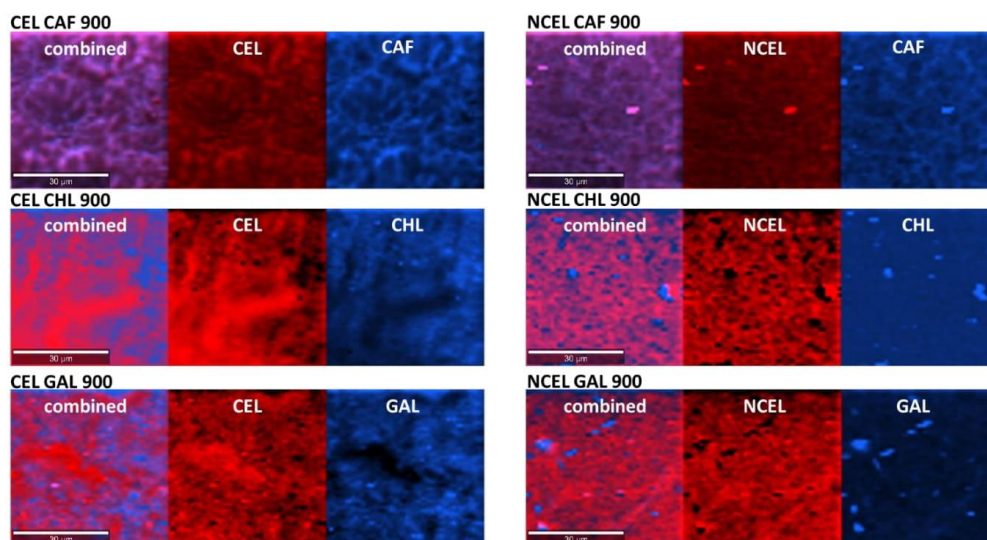


SM Fig. 1. Photo of composites with selected phenolic acids gallic acid (GAL), chlorogenic acid (CHL), and caffeic acid (CAF) adsorbed on the surface at a concentration of 900 ppm and 450 ppm on cellulose (CEL) and nanocellulose (NCEL) based.

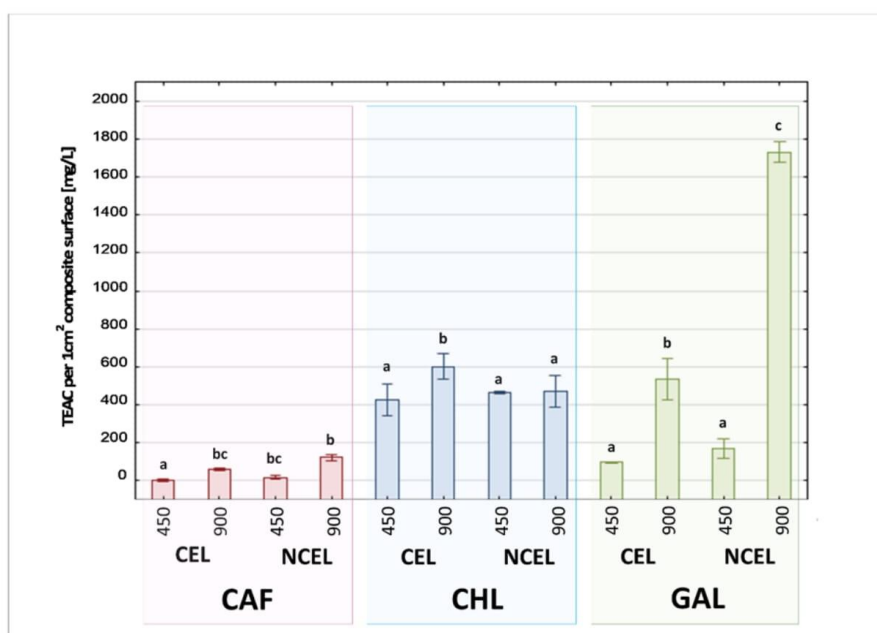


SM Fig. 2.: Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of cellulose/nanocellulose-based composite for 900 ppm phenolic acid concentration (2000x). Phenolic acids: gallic acid (GAL), chlorogenic acid (CHL), and

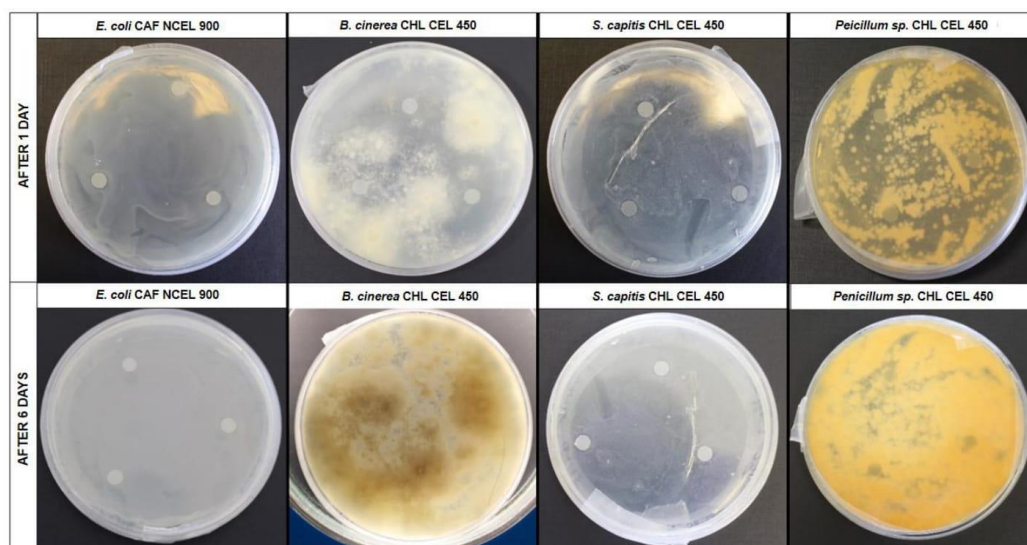
caffeic acid (CAF) adsorbed on the surface at a concentration of 900 ppm and 450 ppm on cellulose (CEL) and nanocellulose (NCEL) based.



SM Fig. 3: True component analysis of cellulose/nanocellulose-based composites with phenolic acids. As basis Raman spectra the pure phenolic acids, cellulose, and nanocellulose were used. The distribution of each phenolic acid (blue), cellulose, or nanocellulose (red), and combined images are presented. Phenolic acids: gallic acid (GAL), chlorogenic acid (CHL), and caffeic acid (CAF) adsorbed on the surface at a concentration of 900 ppm and 450 ppm on cellulose (CEL) and nanocellulose (NCEL) based.



SM Fig. 4: Antioxidant activity of cellulose- (CEL) and nanocellulose-based (NCEL) composites. Phenolic acids: gallic acid (GAL), chlorogenic acid (CHL), and caffeic acid (CAF) adsorbed on the surface at a concentration of 900 ppm or 450 ppm on cellulose (CEL) and nanocellulose (NCEL) based composites. The antioxidant capacity results were measured for 1 film measuring 0.5 cm in diameter after 7 days of macerating in 1 ml of 0.9% NaCl solution. The results were recalculated to Trolox equivalent antioxidant capacity per 1cm² of surface area was determined. The control (CEL and NCEL) did not show any antioxidant properties. Groups calculated according to Dunn's test with Benjamini-Hochberg's Test correction were performed, and only the gallic acid group was determined by the HSD Tukey Test. The same superscript letters denote no statistically significant differences within each phenolic acid group.



SM Fig. 5.: Inhibitions zone for 3 discs of composites (CAF NCEL 900, CHL CEL 450, CHL CEL 900) on Petri Dish after 1 day and after 6 days of treatment in *Escherichia coli*, *Botrytis cinerea* *Staphylococcus capitis* and *Penicillium sp.* infection. Phenolic acids: gallic acid (GAL), chlorogenic acid (CHL), and caffeic acid (CAF) adsorbed on the surface at a concentration of 900 ppm and 450 ppm on cellulose (CEL) and nanocellulose (NCEL) based.

7.3. Tekst Publikacji P3:

Autorzy: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A.

Data publikacji: 17 sierpień 2025

Tytuł: Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids– quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form

Czasopismo: Food Research International, Volume 221, 117335.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>



Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids–quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form

Martyna Krysa, Monika Szymańska-Chargot^{*}, Agnieszka Adamczuk, Giorgia Pertile, Magdalena Frąc, Artur Zdunek

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Nanofibrillated cellulose
Flavonoids
Food wastes

Chemical compounds studied in this article:

Naringin (PubChem CID:442428)
Naringenin (PubChem CID:932)
Quercetin (PubChem CID:5280343)
Rutin (PubChem CID:5280805)
Phosphatidylcholine (PubChem CID:10425706).

ABSTRACT

Flavonoids possess valuable food-preserving activities such as antioxidant, antibacterial, and UV-blocking effects, but are prone to rapid degradation outside plant cells. To protect these properties, this study developed a composite based on ingredients derived from food industry by-products. The research compared micro- (MCL) and nanofibrillar (NCL) cellulose films with surface-adsorbed, liposomal-form flavonoids - two aglycone/glycoside pairs: quercetin/rutin and naringenin/naringin, each at two concentrations. Morphological analysis showed smoother, more uniform surfaces in NCL films, with quercetin exhibiting the most even distribution. Flavonoid incorporation, especially in NCL at higher concentrations, improved water vapor barrier properties, despite the increased hydrophilicity of the composites. Spectral analysis showed reduced light transmittance, particularly with quercetin almost completely blocking UV-Vis-NIR wavelengths, while other flavonoids primarily reduced UVA. Antioxidant tests confirmed notable stability improvements, especially in NCL with quercetin. Antimicrobial assays showed selective activity against Gram-positive *Staphylococcus aureus*, most pronounced in quercetin-NCL composites. The NCL-quercetin composite showed the greatest potential as a multifunctional, plant-based food-protection material.

1. Introduction

One of the world's most pressing challenges is combating climate change. A key aspect of this effort involves reducing food waste and developing biodegradable materials for fresh food packaging. These materials must not only preserve food and ensure food security but also extend freshness (Xu et al., 2024). Among promising alternatives to plastics, cellulose and its derivatives, such as carboxymethyl cellulose, cellulose acetate, and nanocellulose, have attracted significant attention (Amara et al., 2021; Xu et al., 2024).

Nanocellulose, produced by mechanical or chemical processing of cellulose into nanofibers or nanocrystals (Nagarajan et al., 2021), is renewable, biodegradable, and biocompatible. It can be sourced from plant wastes, including wood chips, agricultural by-products, and food processing residues (Jonoobi et al., 2015). Cellulose-based materials have been explored as food additives, biomedical materials, cosmetic ingredients, and, notably, as additives in packaging composites (Amara

et al., 2021). Nanocellulose is typically used to reinforce other biodegradable polymers, thereby improving the mechanical, thermal, and barrier properties of these composites (Amara et al., 2021; Szymańska-Chargot, Chylińska, Pertile, et al., 2019; Szymańska-Chargot et al., 2020). Recently, nanocellulose composites have also been tested as edible and safe coatings for fresh products (Wang et al., 2023). The application of additional barriers reduces moisture loss, delays ripening, and maintains physico-chemical properties, thereby extending fruit shelf life (Priya et al., 2023).

The production of cellulose from agri-food wastes such as apple pomace is a cost-effective and sustainable approach for obtaining high-quality natural polymers, providing a more responsible strategy for packaging material development (Leonel et al., 2020; Krysa et al., 2025). These materials, especially when produced from renewable sources, are favored due to their biodegradability, minimal environmental impact, and ability to incorporate natural active agents (Liu et al., 2023; Samir et al., 2022). Moreover, the cellulose from apple pomace, due to

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: m.krysa@ipan.lublin.pl (M. Krysa), m.szymanska@ipan.lublin.pl (M. Szymańska-Chargot), a.adamczuk@ipan.lublin.pl (A. Adamczuk), g.pertile@ipan.lublin.pl (G. Pertile), m.frac@ipan.lublin.pl (M. Frąc), a.zdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>

Received 8 May 2025; Received in revised form 23 July 2025; Accepted 17 August 2025

Available online 18 August 2025

0963-9969/© 2025 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

insignificant quantities of lignin, is easily accessible and does not require harsh treatment during isolation and purification (Szymańska-Chargot et al., 2017).

Cellulose derivative-based materials might also be enriched with bioactive compounds to impact antioxidant and antimicrobial properties (Krysa et al., 2025). Flavonoids possess such properties, which make them a promising enrichment group. Flavonols are among the most common flavonoid subgroups, while flavanones predominate in citrus fruits, making them readily available bioactive components (Panche et al., 2016). Among these, flavonoids such as quercetin, rutin, and naringenin are particularly promising due to their natural origin, availability, safety, and well-documented properties (Al-Naymi et al., 2024; Ezati & Rhim, 2021; Jin et al., 2021; Li & Yang, 2020; Nagula & Wairkar, 2020; Yusmaniar et al., 2023).

However, achieving a homogeneous dispersion of flavonoids for adsorption onto the cellulose surface to obtain an eco-friendly composite is challenging. The use of highly stable organic solvents such as trifluoroacetic acid (TFA) for dissolving flavonoids can result in composites with limited degradability (Arp et al., 2024; Guzman-Puyol et al., 2022). A potential, nature-origin solution to this challenge is the incorporation of flavonoids in liposomal form (Gurtovenko et al., 2018; Halevas et al., 2022; Hao et al., 2017; Kerdudo et al., 2014; Liu et al., 2024; Park et al., 2013; Toniazzi et al., 2017; Wang et al., 2020). Lecithin, a natural emulsifier, can facilitate the formation of aqueous flavonoid emulsions (Ramadan, 2012; Ramadan & Asker, 2009). It is a mixture of phospholipids, predominantly phosphatidylcholine (PC), which is integral to cell membrane structure and is commonly used in the food industry to improve texture (Ramadan & Asker, 2009). Moreover, sunflower lecithin is an allergen-free alternative to soy lecithin, which has similar phosphatidylcholine content (Cabezas et al., 2009; Wu & Wang, 2003). Among lecithin's main phospholipids, phosphatidylcholine exhibits the best emulsifying abilities and greater solubility in low-grade alcohols compared to phosphatidylcholine and phosphatidylinositol (Cabezas et al., 2009; Cabezas et al., 2016).

Enrichment of cellulose films with flavonoids, especially in liposomal form, enables more efficient and durable binding to the polymer carrier, while preserving the antioxidant and antimicrobial properties of flavonoids and reducing their tendency to oxidize (Halevas et al., 2022; Vidal et al., 2024). Using entirely natural substrates, such as cellulose, lecithin, and flavonoids, enables the production of fully natural and safe composites with potential for use as food packaging materials (Xu et al., 2024).

Based on these properties, this research attempted to develop an eco-friendly composite based on ingredients derived from the food industry by-products. For this purpose, microfibrillated and nanofibrillated cellulose from apple pomace were used as a carrier for two pairs of flavonoids to investigate differences in adsorption behavior and properties of composites. Utilizing fruit waste as a cellulose source further enhances the ecological value of the composites, while flavonoids serve as bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial properties (Szymańska-Chargot, Chylińska, Pieczywek, et al., 2019; Krysa et al., 2025; Krysa et al., 2022). Liposomes of each flavonoid form were obtained via mixing with phosphatidylcholine from sunflower lecithin and then immobilized on the surface of microfibrillar or nanofibrillar cellulose (Vidal et al., 2024). Based on the obtained results, the composite with the best properties, which can be used in the future as a fruit coating, was chosen.

Therefore, the objectives of this study were to: (1) compare microfibrillated and nanofibrillated cellulose from apple pomace as carriers for flavonoids; (2) examine the effects of the selected flavonoid form (aglycone/glycoside) from two pairs belonging to different subgroups (flavonols and flavanones) on the properties of the composites; (3) investigate the relationship between flavonoid presence and the functional properties of the resulting composites including barrier, antioxidant, and antimicrobial activities; and (4) explore possible physical interactions of the most promising composite with the apple skin surface

as a potential application for fruit coating.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Cellulose and nanocellulose preparation

Never-dried cellulose derived from apple pomaces was prepared in the laboratory according to the methodology for cellulose extraction detailed in prior work (Szymańska-Chargot et al., 2017). Briefly, the apples purchased at the local market in an attempt to replicate typical waste from juice production, the pomaces were prepared in a laboratory using a de-pulping machine with a double screw shredder (Twin Gear Juice Extractor, Green Star Elite GSE-5000, Anaheim, CA, USA). Then, the thermochemical method was used for cellulose extraction (Szymańska-Chargot et al., 2017). This method effectively eliminated free sugars, starch, pectin, hemicelluloses, and lignins. Post-extraction, the cellulose underwent boiling in distilled water to remove any residual reagents, followed by thorough rinsing with water at 25 °C and subsequent storage in a moist state (10 % dry matter) at 4 °C (Krysa et al., 2025).

2.1.2. Lecithin dispersion preparation

Water dispersion (10 % w/v) of sunflower lecithin (pure, Biomus, Poland) was suspended with Ultra-Turrax for 5 min at high speeds (T10 basic ULTRA TURRAX, IKA, Germany).

2.1.3. Microfibrillar cellulose-lecithin film preparation

Initially, a 200 g dispersion of 0.1 % wt cellulose in water with 0.5 g lecithin dispersion was prepared using an Ultra-Turrax apparatus (T10 basic ULTRA TURRAX, IKA, Germany) for 10 min. The dispersed microfibrillar cellulose (MC) was obtained according to method described by Szymańska-Chargot et al. (2019). Then, 0.5 g water solution of lecithin (point 2.1.2.) was added to MC and mixed for 2 min at high speed. The prepared dispersion of microfibrillar cellulose with lecithin (MCL) was poured on a high vacuum filtration set (1000 mL flask, funnel, and clamp; Chempur, Poland) linked to the Basic 36 vacuum pump with pressure set to 0.5 bar (Agalabor, Poland) to obtain dry MCL film PVDF membrane filter (EMD Millipore™ Durapore™, $\phi = 90$ mm), to obtain dry MCL film (filtration time up to 6 h and 9 h left to dry on the vacuum pump set with pressure 0.5 bar) (Krysa et al., 2025).

2.1.4. Nanofibrillar cellulose-lecithin film preparation

To obtain nanocellulose (NC), the dispersed cellulose (MC) underwent ultrasonication treatment using a Sonics Vibracell ultrasonic homogenizer (power output = 130 W, VCX-130FSJ; Sonics & Materials Inc., USA), equipped with a temperature probe and a 6-mm diameter horn. The ultrasonication was conducted at an operational amplitude of 95 % of the nominal amplitude (120 μ m) and a frequency of 20 kHz, while an ice bath ($T = 0$ °C) was employed to prevent sample overheating (Szymańska-Chargot, Chylińska, Pieczywek, et al., 2019). Following Ultra-Turrax treatment, the dispersed cellulose underwent ultrasonication for 30 min. Subsequently, the samples were divided into two equal portions, each of which was further diluted to achieve 0.1 % wt dispersions (200 g each, solid content = 0.2 g). Both portions underwent an additional 60-min ultrasonication step, resulting in the production of 0.1 % wt nanocellulose dispersions (NC), which were then utilized for the fabrication of nanocellulose-based composites. Lecithin dispersion (point 2.1.2.) was added to nanocellulose dispersion and the nanofibrillar cellulose with lecithin (NCL) dispersion was obtained. The NCL film was prepared in an analogous way to MCL film (point 2.1.3).

2.1.5. Phosphatidylcholine extraction from lecithin

Phosphatidylcholine was extracted from a lecithin solution in ethanol (96 % EtOH, 1 % concentration) by stirring for 10 min on a magnetic stirrer (Cabezas et al., 2009). Subsequently, the dispersion was

centrifuged at 6000 ×g for 5 min. (Centrifuge MPW-260R, MPW Med. Instruments, Poland) to obtain an alcoholic solution of phosphatidylcholine from lecithin. The supernatant was filtered by nylon filter (0.2 μm pore, Millipore) and evaporated at room temperature to obtain pure phosphatidylcholine (PC, PubChem CID:10425706). The extracted concentration of PC was about 1.1 g/L. The FTIR spectrum confirmed the successful extraction of purified phosphatidylcholine in alcohol (FTIR spectra in Fig. SM2e).

2.1.6. Flavonoid-phosphatidylcholine solution

The flavonoids used for flavonoid-phosphatidylcholine solution were: quercetin – QUE (≥95 % HPLC, Sigma Life Science, PubChem CID:5280343), rutin – RUT (hydrate, ≥94 % HPLC, Sigma-Aldrich, PubChem CID:5280805), naringenin – NAG (hydrate, 97 %, Glentham Life Sciences, PubChem CID:932), and naringin – NRG (≥95 %, Acros Organics, PubChem CID:442428). Ethanol solutions of each flavonoid were prepared to obtain final concentrations of 300 mg L⁻¹ and 150 mg L⁻¹, with 0.1 % (w/v) phosphatidylcholine (PC) and a final ethanol concentration of 28.8 %. (from point 2.1.5). During mixing with an Ultra-Turrax (T10 basic ULTRA TURRAX, IKA, Germany) for 5 min, distilled water was slowly added until a water-based solution was obtained, resulting in a flavonoid concentration of 0.03 % (w/v) in both cases. The flavonoid content in the solution was 30 mg and 15 mg, respectively.

2.1.7. Flavonoid-cellulose composites preparation

Hundred (for 30 mg) or fifty milliliters (for 15 mg) of the aqueous flavonoid emulsion (see Section 2.1.6) was poured onto the still-moist microfibrillar or nanofibrillar film (as described in Sections 2.1.3 or 2.1.4) and filtered for 15 h under a pressure of 0.5 bar at room temperature (22 ± 2 °C) and relative humidity 45 ± 5 % (vacuum pump: AgaLabor, Poland). The main solvent drainage and adsorption occurred during the up to 4 h of filtration. Subsequently, the composite was left to dry for the remainder of the process (11h), resulting in a fully dried and flat material ready for removal from the filter (PVDF membrane filter - EMD Millipore™ Durapore™, φ = 90 mm).

The initial dry mass ratio of the components used in the composites is for 15 mg: MC/NC:LEC:PC:FLAV = 200:50:8:15 and for 30 mg: MC/NC:LEC:PC:FLAV = 200:50:8:30.

2.2. Methods

2.2.1. Scanning electron microscope

The composite surface was examined through scanning electron microscopy (SEM). To prepare the samples, 1 × 1 cm squares were cut and coated with gold using a CCU-010 sputtering machine (Safematic, Zizers, Switzerland) before SEM imaging. Microscopic observations were carried out with a Phenom Pro X scanning electron microscope (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at an operating voltage of 15 kV (Krysa et al., 2025).

2.2.2. Raman microscopy

The alpha300RA imaging system (WITec GmbH, Germany) was employed in this study, featuring a red-light laser (λ = 785 nm) with a power setting of 50 mW and an integration time of 0.5 s. A 50×/0.9 NA air objective (Carl Zeiss, Germany) facilitated sample observation. Raman scattering was collected via an optical multifiber (50 μm diameter) linked to a UHTS 300 spectrometer (WITec, Germany) equipped with a 300 g/mm grating. The recorded signal was captured using a CCD camera (DU401A BV, Andor, Belfast, Northern Ireland). The spectra underwent post-processing, including median filtering, cosmic ray removal, and polynomial fitting for background correction (ProjectSix WITec, Germany). For the analysis of individual maps, Raman signal intensity filters for characteristic bands of each compound were applied (Project Six, WITec, Germany). The specific bands used for MCL or NCL were 1050 cm⁻¹ or 1120 cm⁻¹. At the same time, the characteristic

bands used for compounds with flavonoids were 1611 cm⁻¹ (QUE), 1090 cm⁻¹ (RUT), 1591 cm⁻¹ (NAG), and 1645 cm⁻¹ (NRG).

The average Raman spectrum of the map was extracted. Polynomial background correction was performed (order 9 + noise level 3), followed by area normalization. The cosmic ray remover (parameters: 4/8) and median filter (size: 4) were applied. The spectra were compared across the entire spectral range (0–4000 cm⁻¹).

2.2.3. FT-IR spectra

The FT-IR spectra were acquired using a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Thermo Scientific, Madison, USA) equipped with a Smart ITR ATR sampling accessory and a KBr beam splitter. Measurements were performed on three samples of each composite type, focusing specifically on the side with surface adsorption of the flavonoid emulsion. The data were collected across the range of 4000–650 cm⁻¹, with each spectrum representing an average of 200 scans at a resolution of 4 cm⁻¹ (Krysa et al., 2025). Post-processing involved baseline correction and normalization to the area under the peaks, performed using ORIGIN software (version 8.5 PRO, OriginLab Corporation, USA).

2.2.4. Wettability of composites

The wettability of the composites was assessed by measuring static water contact angles (WCA) (Szymańska-Chargot, Chylińska, Pertile, et al., 2019; Krysa et al., 2025). Droplets of 5 μL MilliQ water were dispensed onto the composite surfaces, which were mounted on microscope slides using double-sided tape. A Rame Hart 2005td goniometer was employed to measure the water contact angles. Measurements were recorded with a 0.5 ms delay and at 5-s intervals, with a total of 5 measurements taken for each sample. The analysis of contact angles was performed using DROPimage Advanced program (Rame Hart Instrument Co., USA). The statistical significance of the WCA changes in time was determined by comparing the beginning and the end points for each composite type. The differences between flavonoid concentrations in the given flavonoid group were determined only at the beginning point.

2.2.5. Water vapor permeability (WVP)

The water vapor permeability was determined according to the wet-cup method of Cazón et al. (2022). The water vapor transferred through the film was determined by measuring the weight loss. WVP was calculated from the following equation:

$$WVP = C \cdot d \cdot A \cdot \Delta P \quad (1)$$

where WVP is in g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹, d is the film thickness (m), A is an area of the exposed film (m²), ΔP is the water vapor pressure differential across the film (Pa), and C is the slope of the weight loss of the dish, to the nearest 0.0001 g, versus time. Generally, weighing was taken over a 1–24 h period at 40 °C and 13–17 % humidity. Slopes were calculated by linear regression and the correlation coefficient (r²) for all reported data was above 0.99. Four replicates of each film type were tested for WVP. Composite thickness was measured using a Baker Electronic Outside Micrometer thickness gauge (India), with the final thickness value calculated as the average of five random measurements taken at different parts of the film for WVP testing. Statistical analysis was conducted to evaluate WVP among composites.

2.2.6. UV-vis-NIR light barrier property

The light-blocking performance of the composite was evaluated by scanning three samples of each type in a quartz cuvette using a UV-Vis spectrophotometer (Cary 60 UV-Vis, Agilent) over a wavelength range of 200–1000 nm. The results were averaged, and the percentage transmittance was calculated.

2.2.7. Antioxidant capacity in UV-C resistance of composites

Nine discs (5 mm in diameter) from each type of composite were placed in separate Petri dishes dedicated to each composite type. The

discs were grouped within each dish based on exposure time into three sets of three discs each. All films were exposed to UVC light at a distance of 30 cm (bulb: Philips UV 15W/G15T8, lamp: UltraViol NBV-15 N, Poland) for 0, 24, and 48 h. After the exposure period, 300 μ L of distilled water was added to each disc, followed by 5.7 mL of ABTS solution. The samples were mixed using a rotary mixer (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Germany) for 30 min. After mixing, the disks were removed and measurements were taken using a UV-VIS spectrophotometer (Cary 60 UV-Vis, Agilent) in polypropylene cuvettes at a wavelength of 734 nm. The procedure was adapted from the method described by Kusznierevicz et al. (2020). The Trolox standard was used for preparing a calibration curve, and further antioxidant capacity of samples was measured as Trolox equivalent (TE) concentration. Statistical differences of composites were performed between time-exposure groups for the same type of composite in mg TE/cm² on composite surface.

2.2.8. Antimicrobial activity

Escherichia coli (B4/14), isolated previously from soil, was selected from the microorganism collection of the Laboratory of Molecular and Environmental Microbiology, Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences (Lublin, Poland), and *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (strain designation NCTC 8530 from American Type Culture Collection (ATCC) catalog number 12598) were tested to evaluate antimicrobial activity of composites. *E. coli* was cultivated in Eijkman medium (Biomaxima, Poland), and *S. aureus* was cultured in Nutrient Broth (Biomaxima, Poland). Both cultures were incubated at 26 °C with shaking at 120 rpm to ensure strain activation to grow (Atlas, 2005; Krysa et al., 2025). For inhibition tests, 300 μ L of each microorganism suspension was evenly spread onto Plate Count Agar (Biomaxima, Poland). Subsequently, three sterile 5 mmØ discs for each type of

composite were placed on the agar surface inoculated with the respective bacterial strains. The evaluation of microbial growth and inhibition was performed according to Krysa et al. (2025), with slight modifications concerning 5-day incubation time instead of 6 days due to quicker bacterial growth.

2.2.9. Statistical analysis

All statistical analysis was performed using the Statistica software (Statistica ver. 14.1.0.4., USA). Normal distribution and homogeneity of variance were confirmed using the Lilliefors and Levene's tests, respectively. Each group in all studies comprised an equal number of subjects. Based on these results, to identify significant differences, ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used (Statistica 14.1. StatSoft Inc. USA). More detailed results, including the mean, standard deviation (SD), relative standard deviation (%RSD), F-statistic, and *p*-value for the individual analyses, were obtained (Tables SM1, SM2, and SM3 in Supplemental material).

3. Results and discussion

3.1. Flavonoid distribution on the film surface

The photographs in Fig. 1. illustrate the macroscopic appearance of the composite from the side where the flavonoid was adsorbed. All surface adsorptions were relatively stable, showing no flaking upon touch or during the slicing of the composite. However, adsorbed flavonoids could be extracted from those composites into a solution upon exposure to solvent (e.g., ethanol, water). Generally, comparing microfibrillar and nanofibrillar cellulose films the nanofibrillar film is more uniform.

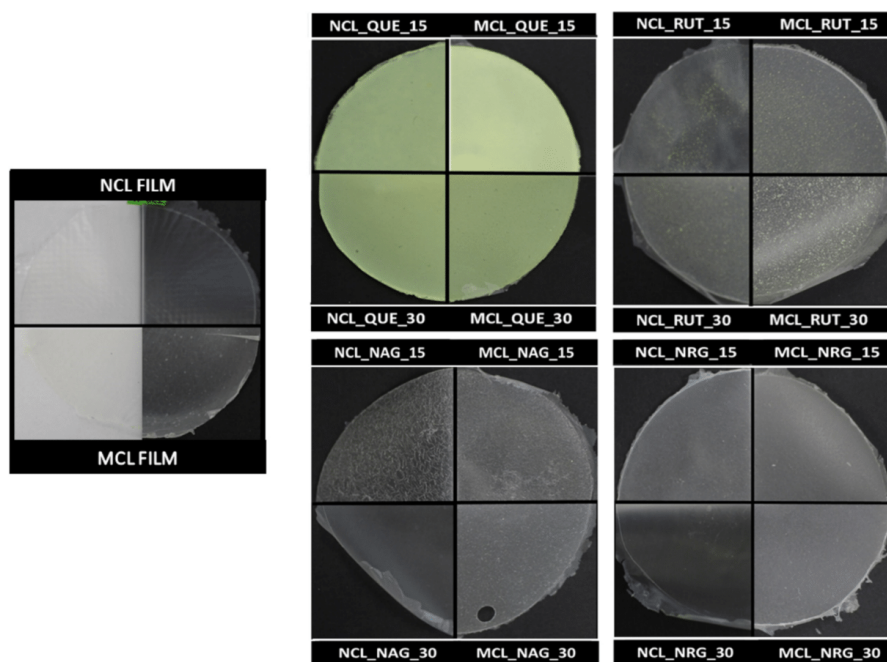


Fig. 1. Photographs of composites containing four flavonoids, including two types of flavonoids and their glucosides: quercetin (QUE) and rutin (RUT), naringenin (NAG) and naringin (NRG), at concentrations of 15 mg or 30 mg (15/30), adsorbed into liposomal form onto the surface of films based on microfibrillar- (MCL) and nanofibrillar (NCL) cellulose with lecithin.

In the case of films with QUE, all the films were uniformly covered by a yellow layer of flavonoid, and films were opaque. RUT formed visible aggregates on the film surface; these aggregates were larger in the case of MCL-based films. Similarly, for films with the addition of NAG and NRG, the films based on nanofibrillar cellulose were more transparent and uniform (Fig. 1).

3.1.1. Scanning Electron microscope

The SEM micrographs showed more details on the surface of the films (Fig. 2). The surface of nanofibrillar cellulose at the microscale level is visibly more uniform and smooth due to the smaller fibril size than microfibrillar cellulose (Fig. 2a, b). The surfaces of microfibrillar and nanofibrillar cellulose films were most uniformly covered by the liposomal form of QUE, forming an even layer on the surface (Fig. 2b, g). Composites containing RUT exhibited a very heterogeneous surface, similar to those with NAG, which formed characteristic shapes: circular for RUT (Fig. 2b, g) and crystalline structures for NAG, distributed quite symmetrically across the surface (Fig. 2d, i), which are more clearly visible in the micrographs from the Raman microscopy (Fig. 3h). The surface of NRG was the most uniform and visually resembled the control films (Fig. 2e, j).

3.1.2. Raman microscopy

Additionally, the Raman maps of film surfaces were obtained (Fig. 3) at a similar scale as SEM images (Fig. 2). Raman maps combine the ability to image surface data with the identification of individual substances based on Raman spectra obtained at each point (pixel) of the map. The maps were presented using the single-band method. The bands around 1090 cm^{-1} and 1120 cm^{-1} were characteristic for C—O—C bonds in the glycosidic ring in glucose molecules of microfibrillar and nanofibrillar cellulose (Szymańska-Chargot et al., 2016). The stretching vibrations of the B-ring in flavonoid molecules bands were presented at 1611 cm^{-1} for quercetin and 1601 cm^{-1} for rutin, while stretching vibrations of the carbonyl groups (C=O) and stretching vibrations (C=C) from the aromatic ring were characteristic for naringenin (1591 cm^{-1}) and naringin (1645 cm^{-1}), respectively (Krysa et al., 2022; Puri et al., 2011).

The Raman maps of microfibrillar and nanofibrillar cellulose films are similar, showing smooth surfaces with some voids (darker zones that are out of the focal plane of the microscope) (Fig. 3a, b). On the other hand, QUE composites presented the uniform map of the Raman signal

from the band characteristic for this flavonoid (Fig. 3c, d). In the case of RUT the aggregates on the surface were revealed, which were bigger for the microfibrillar cellulose-based film (Fig. 3e). Similarly, the composite with NAG contained some large rectangular forms resembling the crystallites (Fig. 3h). Finally, the Raman maps of NRG composites confirmed the homogeneous distribution of flavonoids on the surface of the film (Fig. 3i, j).

Additionally, the average Raman spectrum from each map was obtained (Fig. SM 1). Generally, the average Raman spectra of composites with QUE are mostly composed of bands typical of pure quercetin regardless of the MCL or NCL used (Fig. SM 1a, e). Moreover, the band's intensity can be related to the concentration of flavonoid used in the composite. In the case of composites of MCL or NCL with RUT, the Raman spectra exhibit the bands that can be related to the rutin (bands in the range $1700\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$), but also to the MCL or NCL (1121 , 1090 , and 892 cm^{-1}) (Fig. SM 1b, f). Raman spectra observed for the composite of MCL or NCL with either NAG or NRG were very similar to those of MCL or NCL (Fig. SM 1c, d, g, h). Only the low-intensity bands around 1660 cm^{-1} can be assigned to the carbonyl stretching vibration of NAG and NRG (Krysa et al., 2022).

3.2. Cellulose-flavonoid intermolecular interactions

3.2.1. FT-IR spectra

The FT-IR spectra of MCL, NCL, PC and pure flavonoids and their composites in two concentrations of liposomal form of flavonoid are presented in Fig. 4. Generally, in the case of composites, FT-IR spectra resemble either MCL/NCL spectrum (MCL_RUT_30, MCL_NRG_15, MCL_NRG_30, NCL_NRG_15, NCL_NRG_30, MCL_NAG_15, MCL_NAG_30, NCL_NAG_30) or given flavonoid spectrum (MCL_RUT_30, NCL_RUT_15, NCL_RUT_30, NCL_NRG_15). Only bands in the spectra of composites with QUE cannot be attributed to either MCL/NCL (Fig. 4a and b), PC, or the pure flavonoid (Fig. SM2), therefore, only QUE composite spectra are analyzed to study interactions. The first region, $3500\text{--}2750\text{ cm}^{-1}$, is characteristic of OH and CH₂ stretching vibrations. In the case of composites with QUE, the broad OH band contained two small maxima around 3400 and 3297 cm^{-1} , which can result from the interaction of QUE/PC liposome with MCL/NCL surface (Fig. 4a, b). The first maximum can be associated with changes of vibration of the intramolecular O2H...O6 bonds, while the second with the changes of intermolecular O6H...O3' bonds, both in cellulose (Szymańska-Chargot,

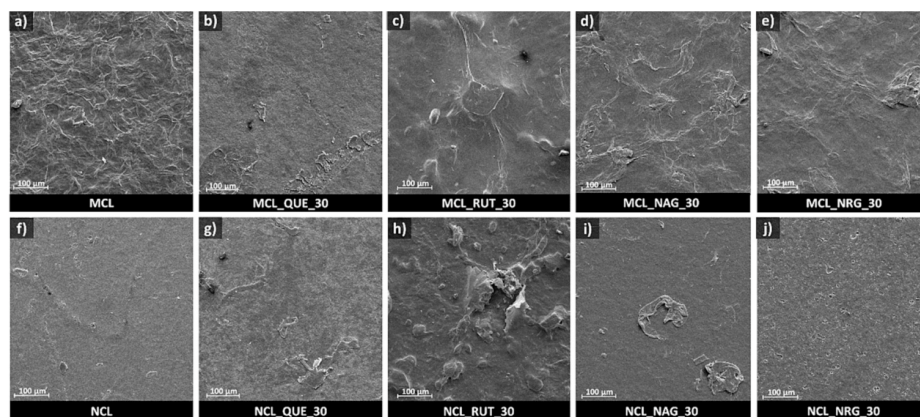


Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs at $500\times$ magnification. The surface of microfibrillar cellulose and nanofibrillar cellulose films with lecithin (a – MCL and b – NCL) and their composites with liposomal form of flavonoids: quercetin (b, g – QUE), rutin (c, h – RUT), naringenin (d, i – NAG), naringin (e, j – NRG) in the highest concentration (30 mg).

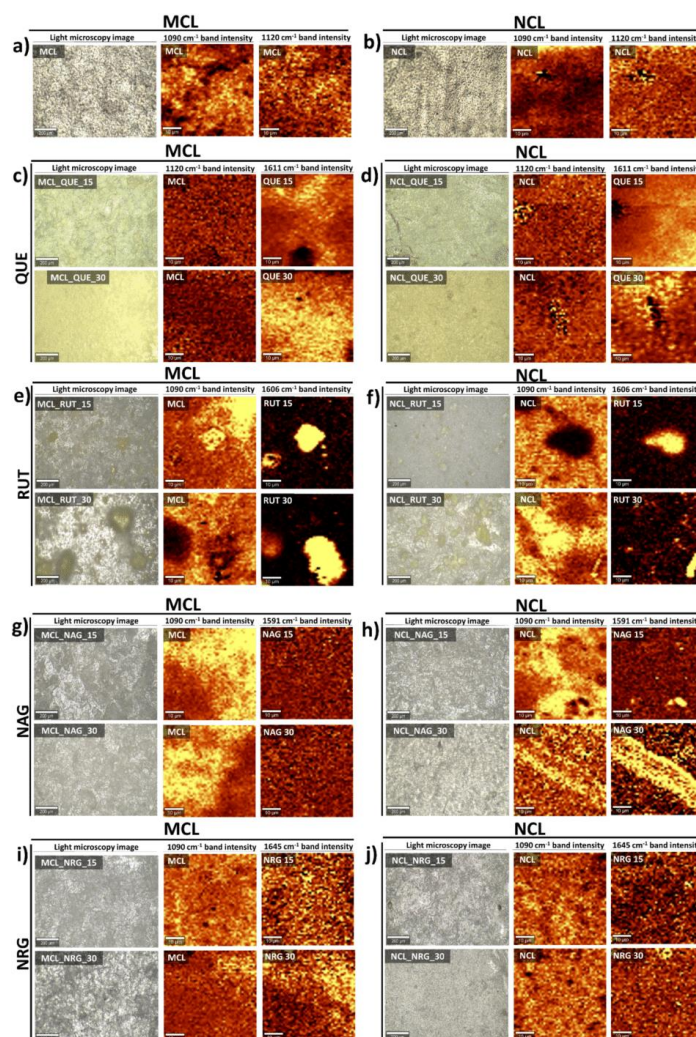
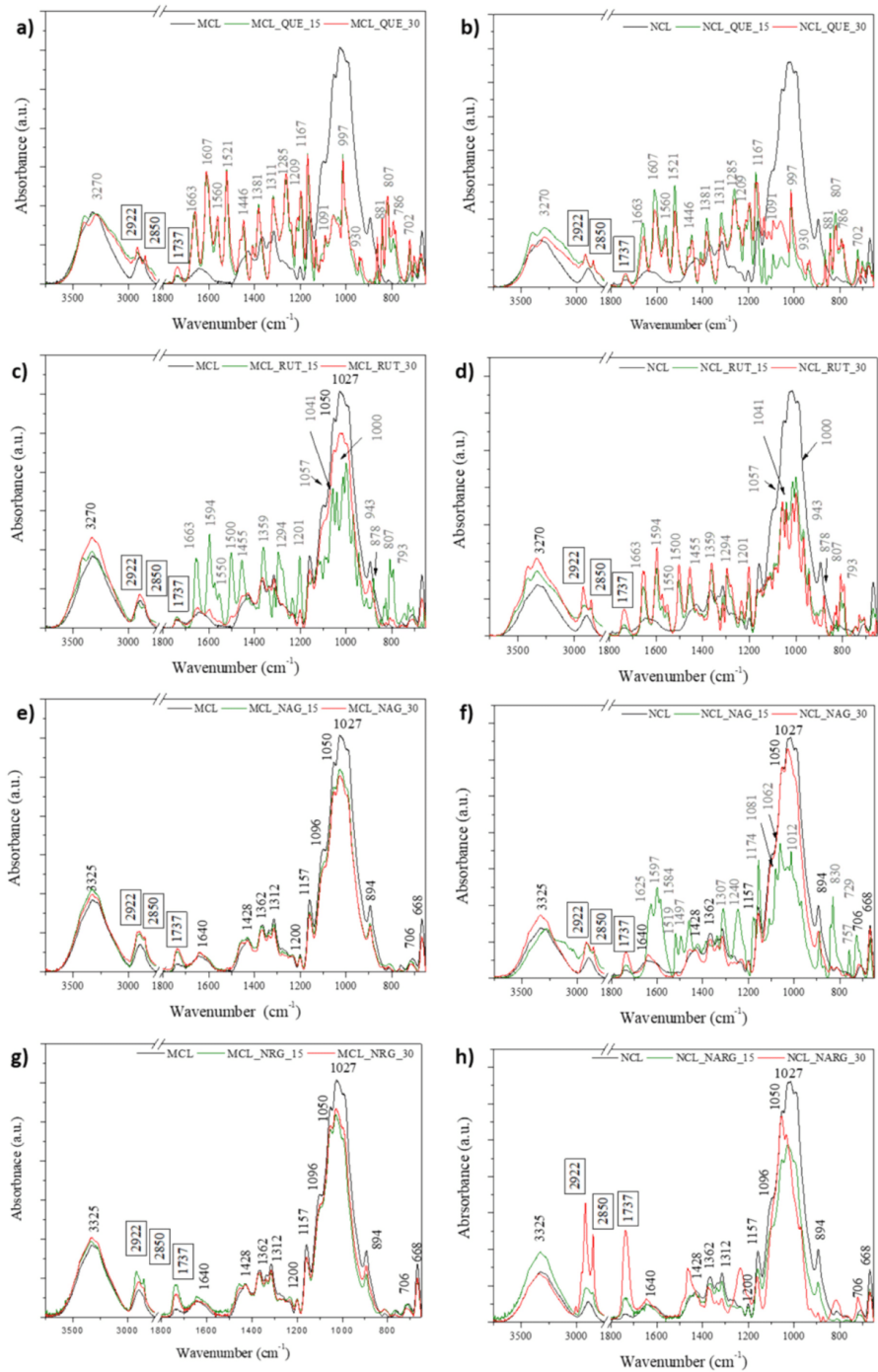


Fig. 3. Raman and light micrographs of surface control films (MCL and NCL) (a, b) and their composites with flavonoids: quercetin (QUE, c,d), rutin (RUT, e,f), naringenin (NAG, g,h), naringin (NRG, i, j) in two concentration (15 and 30 mg). The specific bands used for MCL and NCL were 1090 cm^{-1} or 1120 cm^{-1} , for QUE 1611 cm^{-1} , for RUT 1606 cm^{-1} , for NAG 1591 cm^{-1} , and for NRG 1645 cm^{-1} . Yellow colour means high intensity of Raman signal, black – low intensity. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Chylińska, Pieczywek, et al., 2019). This can result from the interaction between the MCL or NCL surface and QUE/PC liposomes. The bands with maxima at 2925 and 2852 cm^{-1} are associated with stretching vibration of CH_2 and CH_3 of PC molecules, respectively (Liu et al., 2024). Below 1800 cm^{-1} bands characteristic of liposomal forms of QUE are present. The bands at 1506 , 1348 , and 1160 cm^{-1} , which are characteristic of in-plane bending of hydroxyl groups in quercetin, are shifted to 1521 , 1382 , and 1167 cm^{-1} for composites, which is the result of the interaction of QUE with PC (Krysa et al., 2022). Additionally, the band at 1464 cm^{-1} , which is characteristic of the bending vibration of the polymethylene chain ($-(\text{CH}_2)_n$) of the phospholipid, is shifted to

1446 cm^{-1} in the composite, which results from the interaction of flavonoid with the hydrophobic tail of phospholipid (Toniazzi et al., 2017). The FTIR spectra confirmed that only quercetin interacted with the surface of microfibrillar or nanofibrillar cellulose. RUT, NAG, and NRG, despite the presence of the characteristic band at 1800 cm^{-1} , which would indicate the formation of their liposomal forms, did not adsorb on the surface of the MCL- or NCL-based films via molecular bonds.

The appearance of composites showing the adsorption result of a given flavonoid on the surface may result from several things, e.g., the number of free OH groups in the aglycone, which interact with cellulose



(caption on next page)

Fig. 4. FTIR-ATR spectra of microfibrillar and nanofibrillar cellulose film with lecithin (MCL/NCL) present by black line and MCL/NCL-based composites in two concentrations of flavonoid in liposomal form (15 mg - green line/30 mg red line) quercetin (QUE) - a,b; rutin (RUT) - c,d; naringenin (NAG) - e,f; or naringin (NRG) - g,h. The 2750–1800 cm^{-1} region was removed. The bands denoted in grey are connected with adsorbed flavonoid, black - MCL/NCL; in a black square - phosphatidylcholine. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

via hydrogen bonds and hydrophobic interactions (Phan et al., 2015; Rocchetti et al., 2022). Quercetin has five free hydroxyl groups, rutin - four groups (due to the disaccharide attached to it), naringenin - three groups, and naringin only two OH groups (Krysa et al., 2022). The conformation of the selected flavonoid molecules may also have an impact on adsorption. These two pairs of flavonoids differ in their spatial structure - quercetin has a planar aromatic ring structure in contrast to naringenin (Tu et al., 2015). Another important fact may be that the naringenin/naringin pair has a saturated C ring in its structure, which limits the possibility of π - π interactions with cellulose (Ermeýdan et al., 2012; Madureira et al., 2023). The size of the molecule may also be important, as glycosides are larger molecules than aglycones (e.g., RUT: 611 g/mol, QUE: 302 g/mol) (PubChem). In the case of naringin and naringenin, which have fewer available OH groups, even the use of liposomal forms did not improve their affinity for cellulose and failed to obtain their uniform adsorption on the cellulose surface (Fig. 1 and Fig. 2).

3.3. Composite properties

3.3.1. Water contact angle

Fig. 5 shows air-water contact angle (WCA) changes in time for each composite (Fig. 5). The values of WCA relate directly to surface wettability. Generally, it is assumed that liquid with good wettability of a given surface has a water contact angle lower than 90° , and poor wettability - between 90° and 180° (Zhang et al., 2024).

The initial WCA values obtained for the MCL and NCL were $59.82^\circ \pm 2.82$ and $84.56^\circ \pm 1.40$, respectively, and were stable during the measurement period. These values indicate that the MCL surface has better hydrophilic properties compared with NCL films (Fig. 5).

Significant WCA reduction was noted for all QUE MCL-based and NCL-based samples compared to the control samples. The WCA reduction was especially high in 15 and 30 mg NCL.QUE composites (to $23.84^\circ \pm 1.55$ and $31.12^\circ \pm 3.47$, respectively) compared to 15 and 30 mg MCL.QUE composites (to $31.66^\circ \pm 1.98$ and $23.56^\circ \pm 0.99$, respectively) since the MCL-based control composites had lower WCA (Table SM 1).

MCL.RUT group presented a smaller but still significant decrease, after the addition of 15 and 30 mg of RUT (to $36.98^\circ \pm 5.23$ and $50.82^\circ \pm 4.54$, respectively), compared with NCL.RUT (Fig. 5c). In the case of NCL.RUT_15, the WCA was around $18.62^\circ \pm 2.30$, and was $35.98^\circ \pm 1.48$ for NCL.RUT_30 (Fig. 5d).

Interestingly, the addition of NAG or NRG to the MCL-based composites caused a decrease in wettability, and the obtained WCA values were higher than those for MCL (Fig. 5e, g). However, the WCA of composites after adding 15 mg of NAG was around $61^\circ \pm 4.42$, and for 30 mg - $80^\circ \pm 2.05$. Conversely, for NCL films, the addition of NAG caused a decrease in WCA compared with NCL film alone (68.5 ± 3.40 for 15 mg and 83.92 ± 6.49 for 30 mg).

The addition of NRG in the case of NCL films caused the decrease of WCA to $73.08^\circ \pm 1.59$ for 15 mg and $65.86^\circ \pm 2.57$ for 30 mg. For NRG adsorbed onto MCL, the initial value of WCA was $63.34 \pm 2.74^\circ$ and $78.06^\circ \pm 1.40$ for 15 mg and 30 mg of NRG, respectively. A fast drop below the WCA value obtained for MCL.NRG was observed in the range 49.56 – 54.86° and 46.16 – 48.92° MCL.NAG (Fig. 5 g).

Statistical differences in start point and end point WCA, %RSD, p, and F value for the composite group with adsorbed liposomal flavonoids are shown in Table SM 1.

According to Stoyanova et al. (2022), the addition of quercetin and rutin to cellulose acetate/polyethylene glycol mats improved their

wettability, thus causing hydrophilicity of the surface. Liposomal forms could also reduce wettability compared to the control, which may enhance the adhesion of such composites to hydrophobic food surfaces (Vidal et al., 2024). In the study by Surya et al. (2022), the surface of CNF films derived from seaweed with silane surface treatment exhibited a significant increase in water contact angle (WCA), which the authors attributed to a reduction in the number of free hydroxyl groups on the surface. In the present case, this phenomenon may be related to the higher number of hydroxyl groups present in the chemical structure of QUE and RUT compared to NAR and NRG (Krysa et al., 2022), thereby increasing the number of sites capable of binding water on the surface (Cichosz et al., 2023). On the other hand, at higher flavonoid concentrations, flavonoid molecules can form multilayered structures and interact with each other with hydrophobic π - π stacking and hydrogen bonding, which can lead to a more hydrophobic surface (Deogratias et al., 2022).

3.3.2. Water vapor permeability

Water vapor permeability (WVP) is one of the important factors for the materials used for biocoatings. In the case of pure MCL and NCL films, the WVP was $1.59 \cdot 10^{-10} \pm 5.56 \cdot 10^{-13}$ and $1.39 \cdot 10^{-10} \pm 6.21 \cdot 10^{-12}$ ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$), respectively, and those values are similar to those reported previously (Grzybek et al., 2024).

The addition of flavonoids generally caused a decrease in WVP values except for MCL.RUT_30, however, the significant decrease was only present in NCL-based composites (Fig. 6 and Table SM 2). In the case of MCL composites, the WVP was on the level of 1.31 – $1.53 \cdot 10^{-10}$ ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$), and for NCL on the level of 1.04 – $1.30 \cdot 10^{-10}$ ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) (Table SM2). These results showed that the addition of flavonoids enhances the vapor barrier properties of the nanocellulose films. In the group of composites with QUE, the addition of the flavonoid significantly reduced the WVP only in the case of NCL.QUE_15. (Fig. 6b). However, the WVP obtained for films with surface-adsorbed QUE remained relatively low value (not exceeding those observed for MCL or NCL), despite exhibiting the lowest WCA indicative of their hydrophilic surface properties (Fig. 5a, b). This result is in line with what was previously observed - the addition of quercetin to the chitosan/cellulose microcrystals composite influenced the WVP value, i.e. a quercetin concentration above 5 % w/w increased the permeability of the composite, while a concentration below this level maintained the WVP at a similar level as for the pure composite (Yusmaniar et al., 2023).

In the case of NAG, all samples differed significantly, and NCL.NAG_30 exhibited the lowest water vapor permeability among all composite types. This decrease in the water vapor transmission rate might be explained by the presence of naringenin, which reduces the void spaces within the cellulose film (Guzman-Puyol et al., 2022).

These results demonstrate that nanofibrillated cellulose-based composites are more sensitive to flavonoid type and concentration compared to microfibrillated cellulose-based composites, particularly with naringenin and quercetin. A higher flavonoid concentration had a non-significant effect on WVP of composites in most cases (only in case NCL.NAG_30 differed significantly from lower concentration). Comparing aglycone-glycoside pairs in NCL-based composites, a greater effect of the glycoside form on permeability values was observed at the 30 mg concentration for flavonols. For flavanones, the opposite trend was observed - NCL.NAG_30 exhibited lower permeability than NCL.NRG_30.

3.3.3. UV-vis-NIR light barrier properties

The transmittance values of the composites were investigated across

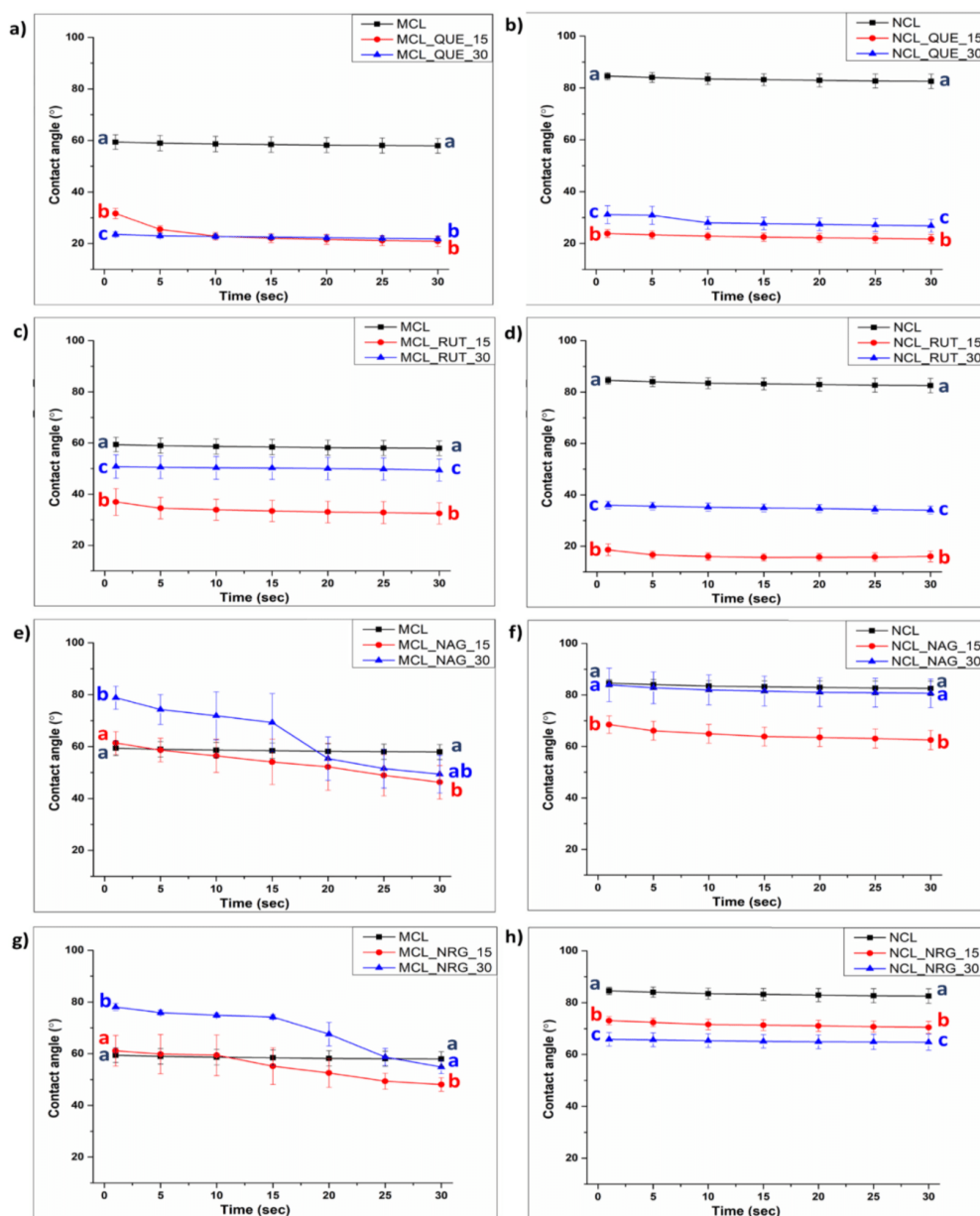


Fig. 5. Determination of the surface wettability of composites. Air-water contact angles (WCA) measured on the surfaces of microfibrillated (MCL) and nano-fibrillated (NCL) cellulose films with lecithin and adsorbed liposomal forms of flavonoids: quercetin (QUE; a, b), rutin (RUT; c, d), naringin (NAG; e, f), and naringenin (NRG; g, h) at two concentrations (15/30 mg), compared to control samples. Statistical differences (RIR Tukey's post hoc test ($p < 0.05$)) were carried out for each flavonoid group separately for start and end points; therefore, the same superscript letter for the start point in a given group indicates no significant difference. The same is true for the endpoints. %RSD, p and F value for the composite group were presented in Table SM 1.

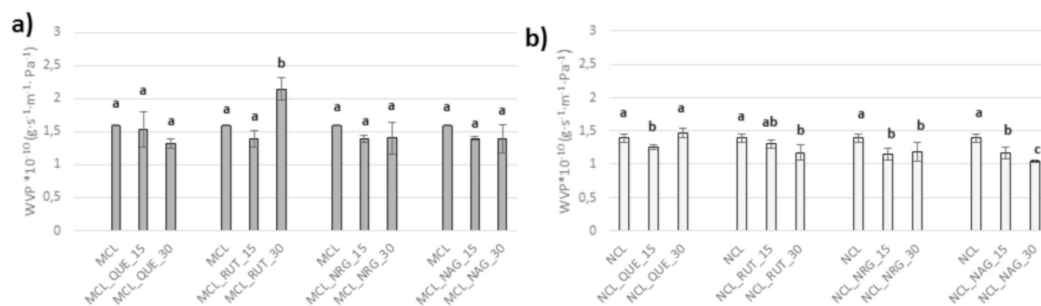


Fig. 6. The water vapor permeability (WVP) of microfibrillar cellulose with lecithin (MCL), MCL-based (a), and nanofibrillar cellulose with lecithin (NCL), NCL-based composites (b) with the liposomal forms of quercetin (QUE), rutin (RUT), naringenin (NAG), and naringin (NRG) in two concentrations (15/30 mg) was analyzed. The analysis of statistical differences was conducted for each flavonoid group separately; values with the same letters are not significantly different in the RIR Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). The values of WVP, SD, %RSD, F-statistic, and p -value from the analysis are presented in the table included in the supplementary material (Table SM 2).

the entire UV light spectrum (UV-C: 200–280 nm, UV-B: 280–315 nm, and UV-A: 315–400 nm), the entire visible light spectrum (Vis: 400–780 nm), and a small range of the near-infrared spectrum (NIR: 780–1000 nm, which is part of the broader 780–2500 nm range).

For MCL-based films, the transmittance across the entire investigated range reached values up to 27 %, while for NCL-based films transmittance was higher - about 66 % (Fig. 7). All types of composites

significantly reduced light transmittance, most likely due to the presence of a physical, visible layer on the surface of the adsorbed composite (Fig. 1). MCL-based composites consistently exhibited greater thickness (0.084–0.050 mm) than their NCL-based counterparts (0.061–0.038 mm), which may also contribute to reduced light transmission through the composites in the MCL group. For NCL-based composites, the transmittance within the investigated range varied from approximately

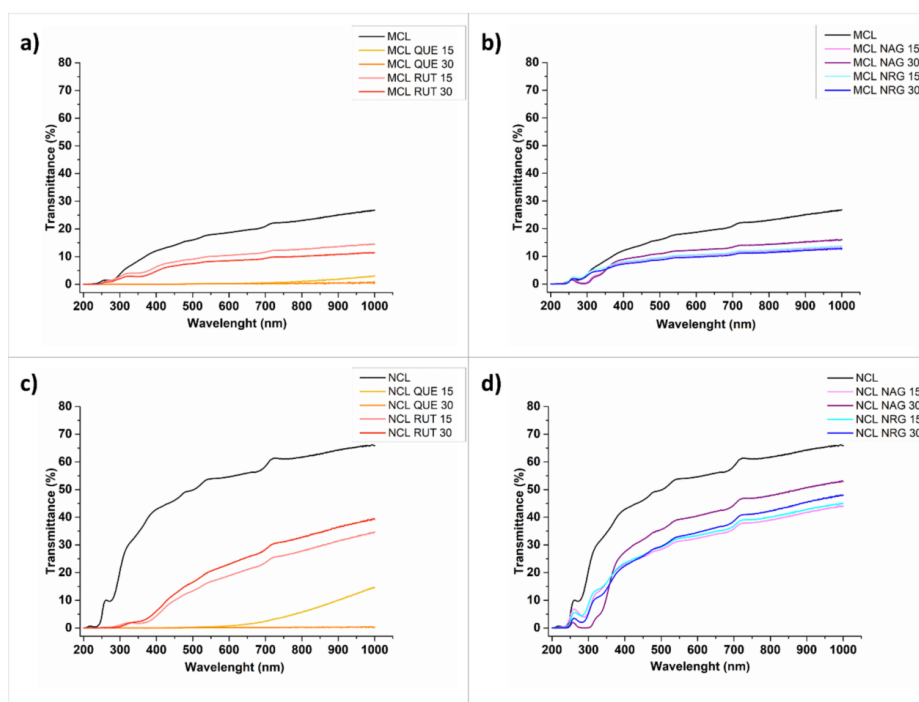


Fig. 7. UV-Vis-NIR light barrier properties of liposomal flavonoids adsorbed on the surface: quercetin (QUE) and rutin (RUT) on microfibrillated cellulose (MCL) – (a) and nanofibrillated cellulose (NCL) – (c); naringenin (NAG) and naringin (NRG) on MCL (b) and NCL (d), each at two concentrations (15 and 30 mg). Results for each flavonoid group are compared to MCL and NCL films without flavonoids (controls). Data are presented as percent transmittance in the 200–1000 nm range.

53 % (for NCL_NAG_30) to 0 % (for NCL_QUE_15), while for MCL-based composites, the maximum transmittance value was 16 % (MCL_NAG_30). The most surprising results were observed for composites containing QUE at all concentrations and based on all types of cellulose used in this study (Fig. 7a and b). These composites blocked the entire spectrum of investigated light to values close to 0 % (Fig. 7). At lower QUE concentrations, the composites exhibited slight light transmittance (up to 15 %) in the near-infrared range (Fig. 7a, b). This difference was particularly significant for highly permeable NCL-based films across the entire spectrum (for Vis: 33–47 % T). Composites with RUT specifically blocked light transmission in the UV range, which was particularly evident in NCL-based composites (Fig. 7c and d). For composites with NAG and NRG, no specific blocking of UV-C light was observed; the differences were in the UVA range (Fig. 7e, f, g, h). Composites with NAG and NRG performed comparably; however, in the case of NRG-based composites, light transmittance was approximately half that of the control across the entire investigated spectrum, with no significant differences between higher (30 mg) and lower (15 mg) flavonoid concentrations (Fig. 7e, f, g, h). Only in the case of NCL_NAG_30, an initial higher transmittance for visible light and part of the NIR range was obtained, but it shows increased blocking of UV light transmission (Fig. 7f).

Ito et al. (2018) measured the light transmission through films based on nanofibrillated cellulose, observing that light transmission stabilized at approximately 80 %. Flavonoids exhibit the capacity to absorb these wavelengths; however, they generally do not block light in the visible range (Ferreira et al., 2021; Ye et al., 2017). A potential drawback of the developed films lies in their low transparency to visible light, which may affect visibility through the composite and limit their use as a potential coating material. However, here the opaqueness of films is also caused by their thickness. Another limitation is that UV-B light, which has been reported to induce the internal synthesis of flavonoid compounds in plant foods, may be less effective in the case of the studied composites (Santín et al., 2023). Nevertheless, in the context of progressing climate change, light-blocking properties could be critical in preventing fruit browning caused by excessive UV-B radiation and high temperatures, which ultimately lead to spoilage (Xu et al., 2022).

3.3.4. Antioxidant capacity in UV-C resistance of composites

The potential protective function of MCL and NCL as carriers of antioxidant properties of flavonoids was tested. The antioxidant properties of the obtained composite were also tested before and after UV-C exposure for 24 and 48 h. The antioxidant capacity test revealed that MCL and NCL exhibited limited antioxidant properties - MCL: 831.4 ± 75.8 mg TE/1 cm² on composite surface and NCL: from 823.0 ± 102.3 mg TE/cm², which decreased to MCL: 227.9 ± 55.0 and NCL: 153.9 ± 36.7 in terms of TEAC after 48 h of UV-C exposure. The initial antioxidant properties of MCL and NCL are most likely due to the presence of lecithin, known for its antioxidant properties (Ramadan, 2012). The addition of flavonoids caused TEAC value to increase in every case compared to the control. However, the aglycone form exhibited 3–4 times higher antioxidant capacity compared to the glycosidic form. This is typical for these compounds, as aglycones contain a greater number of free hydroxyl groups (Table SM 3). A significant reduction in antioxidant capacity was observed after 48 h of UV-C exposure for all composites, except for the NCL_QUE_30, NCL_RUT_30, and NCL_NAG_30 variants. The results suggest that the stability of the antioxidant capacity is determined by the carrier not only depend of aglycone and glucoside form - in this case, but the NCL-based composites also provide greater oxidation resistance (Fig. 8). QUE has exceptionally high antioxidant potential (approximately 20,000 mg TE/cm² on composite surface in our samples) compared to the lowest NRG composites potential (about 1800 mg TE/cm² on composite surface). The composites most resistant to antioxidant degradation after irradiation are both MCL-based and NCL-based composites with NAG. Although NAG exhibits lower antioxidant activity than QUE, it shows greater oxidative stability.

Therefore, despite also being an aglycone, it behaves differently. UV-C illumination is a widely used method for reducing microbial growth and extending the shelf life of food products (Zhu et al., 2024). However, in studies on blueberries exposed to UV-C light, it was shown that the polyphenol content (including two quercetin derivatives) decreased by nearly half after 24 h of exposure (Wang et al., 2009). The superior antioxidant capacity of quercetin (a flavonol) can be attributed to its structure: it is an aglycone, contains catechol groups, and has the highest number of hydroxyl groups among the studied compounds, which are critical for scavenging free radicals (Mendes et al., 2012; Dueñas et al., 2011). Rutin also belongs to the flavonol group, but its antioxidant capacity is lower than that of its aglycone due to its sugar moiety (Krysa et al., 2022; Mendes et al., 2012).

3.3.5. Antimicrobial activity of the composite films

Flavonoid-based composites were evaluated for their antimicrobial activity against two bacterial species: *Escherichia coli*, representing Gram-negative bacteria, and *Staphylococcus aureus*, representing Gram-positive bacteria (Fig. 9). In the case of *E. coli*, the composites did not exhibit any inhibitory effect, despite the reported ability of quercetin and rutin to suppress such infections (Baqer et al., 2024; Veiko et al., 2023). This lack of effect may be attributed to the inherent resistance of Gram-negative bacteria to flavonoids, due to their unique cell wall structure, and the too low concentration of flavonoids on the composite surface (Baqer et al., 2024). Liposomal forms of flavonoids, themselves also exhibit stronger activity against bacteria, especially Gram-positive bacteria (Halevas et al., 2022).

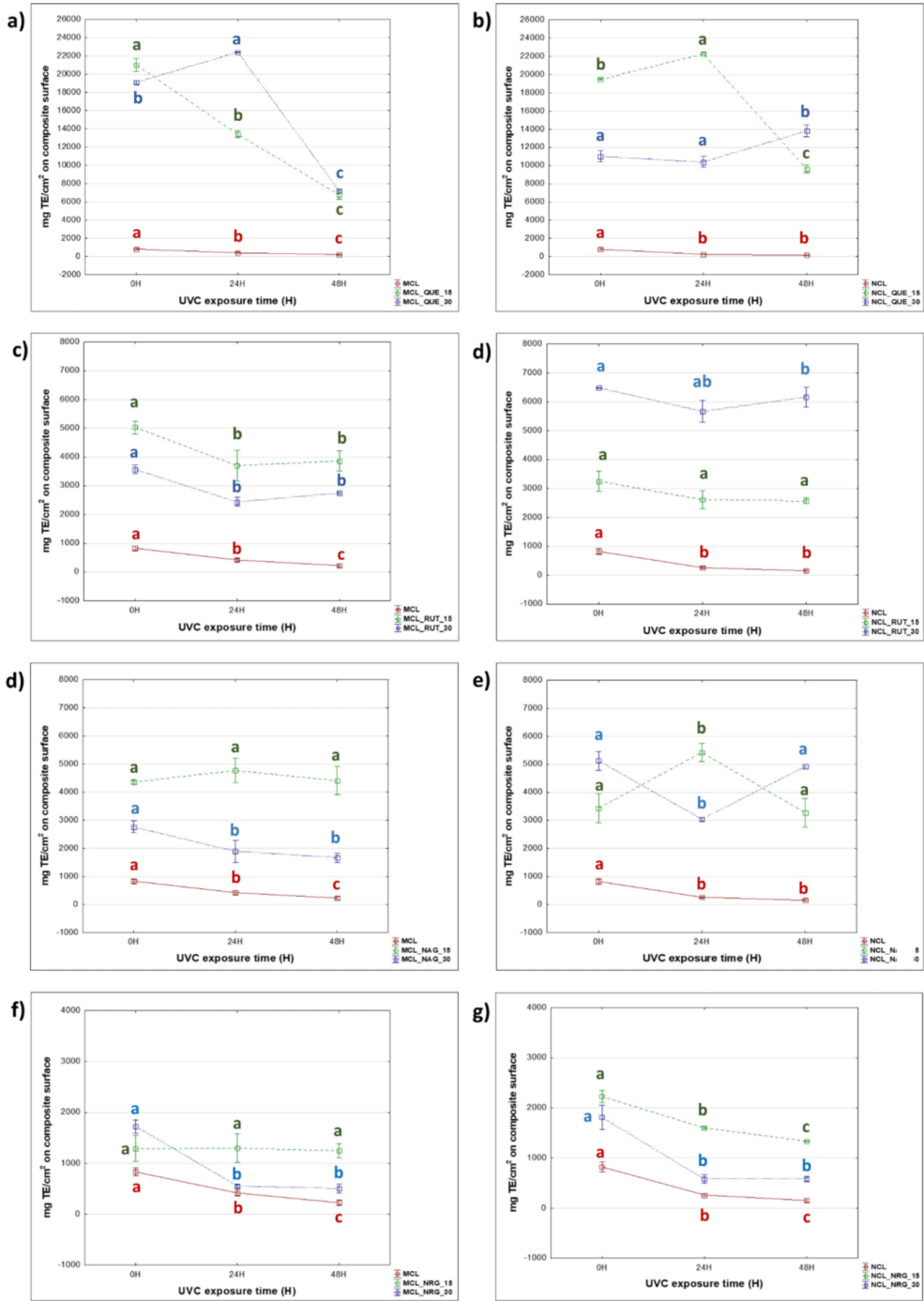
Quercetin displayed the strongest antimicrobial activity, particularly in its lipophilic form, as confirmed in these results (Veiko et al., 2023). For *S. aureus*, tested composites containing quercetin at both concentrations and on both cellulose substrates demonstrated significant inhibitory effects against *S. aureus*. Composites on MCL-based produced inhibition zones of approximately 10 mm in diameter, whereas those on NCL-based yielded zones of about 12 mm. The inhibitory effects of other composite variants were less pronounced. Small inhibition zones were observed adjacent to the composites containing naringenin (Fig. 9).

3.3.6. Application on apple skin

This study investigated potential application of developed composites as coatings for fruits, using apple skin as a model system (the methodology of this experiment is described in Supplemental Material). The NCL_QUE_30 was chosen as exhibiting the best properties among all tested composites. Further, the apple skin coated by composite was analyzed by Raman microscopy to determine the distribution of coating within the apple skin (Fig. SM 3), and light transmission (200–1000 nm) through the peel coated with the composite (Fig. SM 4). Additionally, contact angle interactions between the skin and NCL, and NCL_QUE_30 (Fig. SM 5).

The Raman depth imaging (measured at 1611 cm⁻¹ wavelength) revealed a visible layer of composite on the apple skin surface with a thickness of approximately 1 μm. The layer was visualized using a quercetin-ascribed 1611 cm⁻¹ band (Fig. SM 3). Research by Solovchenko and Merzlyak (2003) demonstrated that UV-A and UV-B absorption in apple skin is dependent on the polyphenol composition of the cuticle, with a significant role played by specific flavonoids, such as quercetin glycosides in their study Solovchenko and Merzlyak (2003). In this experiment involving the application of different composite types (NCL and NCL_QUE_30) to the surface, the quercetin-coated composites reduced light transmission across the entire tested wavelength range (Fig. SM 4).

The addition of quercetin reduced the contact angle compared to NCL, indicating a higher affinity for the peel surface, which may enhance adhesion to such surfaces (Fig. SM 5). As it was stated above, the liposomal forms of flavonoids can enhance the adhesion to a hydrophobic surface which was confirmed by contact angles of NCL_QUE_30 dispersions on apple skin (Fig. SM 5).



(caption on next page)

Fig. 8. Antioxidant capacity reported as Trolox Equivalent (TEAC) per 1 cm² of surface area, assessing the resistance of flavonoids to oxidation under UV-C exposure at 0 h, 24 h, and 48 h. Line graph included control films microfibrillar- (MCL) and nanofibrillar-based (NCL) with lecithin, and composites with liposomal form of flavonoids: quercetin (QUE), rutin (RUT), naringenin (NAG), and naringin (NRG) at two concentrations (15/30 mg). Letters in superscript indicate statistically significant differences between time-exposure groups (the same type of composite compared in 0, 24, and 48 h): values with the same letters are not significantly different in the RIR Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). %RSD, F-statistic, and p-value for the composite group were presented in Table SM 3.

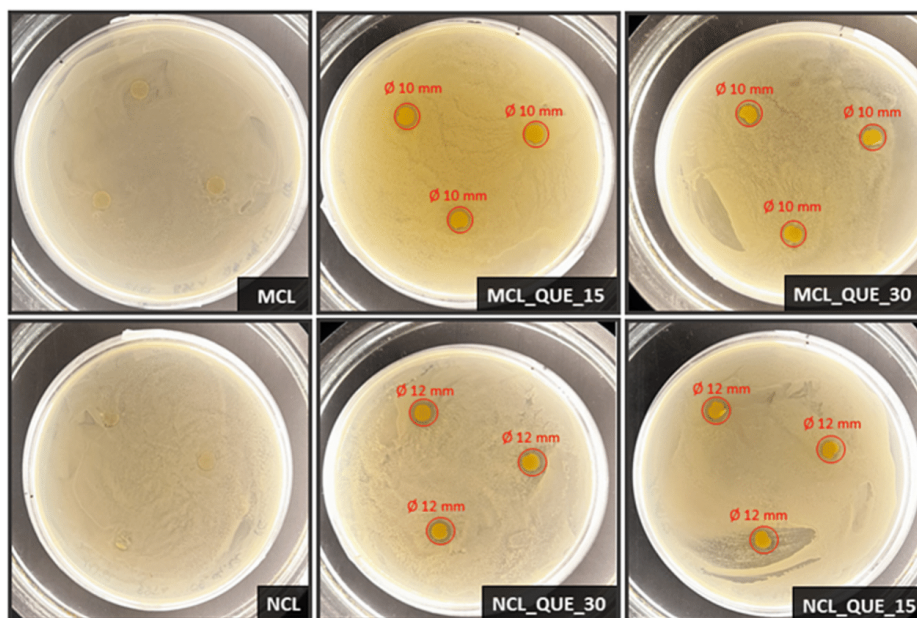


Fig. 9. *Staphylococcus aureus* was utilized to examine the antibacterial activity of different composites. The photographs were taken 5 days after the start of incubation. Control films (MCL and NCL) and micro- (MCL) and nanofibrillar-based (NCL) composites with liposomal form of flavonoid: quercetin (QUE) in two concentrations (15/30).

4. Conclusions

This study aimed to identify the most effective fully plant-based, biodegradable, cellulose-lecithin-flavonoid composite for application in food protection. The results indicated that a composite containing a higher concentration of quercetin in liposomal form within a nanocellulose matrix (NCL_QUE_30) demonstrated the most promising properties. Specifically, this formulation exhibited the highest antimicrobial activity and robust antioxidant properties, attributed to QUE abundance of free hydroxyl groups. These groups not only enhanced antioxidant capacity but also facilitated hydrogen bonding with the cellulose substrate, resulting in a homogeneous distribution of liposomal quercetin throughout the composite.

Furthermore, the composite with QUE maintained high antioxidant stability even after exposure to UV-C light, likely due to stabilization effects provided by the NCL. Additionally, the composite can offer strong UV-blocking capability, which further enhances its potential for use in the food protection industry. However, this formulation also increased hydrophilicity and did not affect water vapor permeability - ideally, both of these properties should be reduced for optimal food-protection applications.

Importantly, this research demonstrates that highly hydrophobic flavonoids can be successfully incorporated into cellulose-based composites when first encapsulated within phospholipid liposomes. Moreover, our findings suggest a direction for future improvement: aglycone

flavonoids with numerous free hydroxyl groups exhibit greater potential than their glycoside or less hydroxylated counterparts as composite additives. Future research should focus on exploring other such flavonoids, as well as assessing the mechanical properties of these composite films, to further advance their practical utility in the food protection industry. Further studies should also address the application of coatings to whole fruits as well as the assessment of their storage stability.

CRediT authorship contribution statement

Martyna Krysa: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Monika Szymańska-Chargot:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Agnieszka Adamczuk:** Methodology, Investigation, Formal analysis. **Giorgia Pertile:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Magdalena Frąc:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Artur Zdunek:** Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was partially funded by The National Science Centre, Poland (grant number NCN OPUS UMO-2018/29/B/NZ9/00141).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Al-Naymi, H. A. S., Oladzadabbasabadi, N., Karim, D. K., Al-Musawi, M. H., Mohammadzadeh, V., Torki, S. H., & Ghorbani, M. (2024). Development of an innovative reinforced food packaging film based on corn starch/Hydroxypropyl methylcellulose/Nanocrystalline cellulose incorporated with Nanogel containing quercetin. *Food and Bioprocess Technology*, 2024, 1–20. <https://doi.org/10.1007/S11947-024-03545-3>
- Amara, C., El Mahdi, A., Medimagh, R., & Khwaldia, K. (2021). Nanocellulose-based composites for packaging applications. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 31, Article 100512. <https://doi.org/10.1016/J.COGLSC.2021.100512>
- Arp, H. P. H., Gredelj, A., Glüge, J., Scheringer, M., & Cousins, I. T. (2024). The global threat from the irreversible accumulation of trifluoroacetic acid (TFA). *Environmental Science & Technology*, 58(45), 19925–19935. <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c06189>
- Atlas, R. M. (2005). *Handbook of Media for Environmental Microbiology* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420037487>
- Baqer, S. H., Al-Shawi, S. G., & Al-Younis, Z. K. (2024). Quercetin, the potential powerful flavonoid for human and food: A review. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 16(3), 30. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1603030>
- Cabezas, D. M., Diehl, B., & Tomás, M. C. (2009). Effect of processing parameters on sunflower phosphatidylcholine-enriched fractions extracted with aqueous ethanol. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 993–1002. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900001>
- Cabezas, D. M., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2016). Emulsifying properties of hydrolysed and low HLB sunflower lecithin mixtures. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 975–983. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500182>
- Cazón, P., Morales-Sanchez, E., Velazquez, G., & Vázquez, M. (2022). Measurement of the water vapor permeability of chitosan films: A laboratory experiment on food packaging materials. *Journal of Chemical Education*, 99(6), 2403–2408. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.2C00449>
- Cichosz, S., Peško, M., & Masek, A. (2023). Empirically distinguished anti-aging behaviour of quercetin physically and chemically supported on cellulose carrier: In-situ examination for ethylene-norbornene copolymer. *Sustainable Materials and Technologies*, 36, article e00590. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2023.e00590>
- Deogratias, G., Shadrack, D. M., Munissi, J. J. E., Kinunda, G. A., Jacob, F. R., Mtei, R. P., ... Nyandoro, S. S. (2022). Hydrophobic π - π stacking interactions and hydrogen bonds drive self-aggregation of luteolin in water. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 116, Article 108243. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2022.108243>
- Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., & Santos-Buelga, C. (2011). Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *European Food Research and Technology*, 232(1), 103–111. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1363-y>
- Ermeidan, M. A., Cabane, E., Masic, A., Koetz, J., & Burgert, I. (2012). Flavonoid insertion into cell walls improves wood properties. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4(11), 5782–5789. <https://doi.org/10.1021/am301266k>
- Ezati, P., & Rhim, J. W. (2021). Fabrication of quercetin-loaded biopolymer films as functional packaging materials. *ACS Applied Polymer Materials*, 3(4), 2131–2137. <https://doi.org/10.1021/acscapm.1c00177>
- Ferreira, M. L. F., Serra, P., & Casati, P. (2021). Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia Plantarum*, 173(3), 736–749. <https://doi.org/10.1111/ppl.13543>
- Grzybek, P., Dudek, G., & van der Bruggen, B. (2024). Cellulose-based films and membranes: A comprehensive review on preparation and applications. *Chemical Engineering Journal*, 495, Article 153500. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2024.153500>
- Gurtovenko, A. A., Mukhamadiev, E. I., Kostritskii, A. Y., & Karttunen, M. (2018). Phospholipid-cellulose interactions: Insight from atomistic computer simulations for understanding the impact of cellulose-based materials on plasma membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(43), 9973–9981. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b07765>
- Guzman-Puyol, S., Hierrezuelo, J., Benítez, J. J., Tedeschi, G., Porras-Vázquez, J. M., Heredia, A., ... Heredia-Guerrero, J. A. (2022). Transparent, UV-blocking, and high barrier cellulose-based bioplastics with naringin as active food packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 1985–1994. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.177>
- Halevas, E. G., Avgoulas, D. I., Katsipis, G., & Pantazaki, A. A. (2022). Flavonoid-liposomes formulations: Physico-chemical characteristics, biological activities and therapeutic applications. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 5, Article 100059. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100059>
- Hao, J., Guo, B., Yu, S., Zhang, W., Zhang, D., Wang, J., & Wang, Y. (2017). Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 37–44. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.06.048>
- Ito, H., Sakata, M., Hongo, C., Matsumoto, T., & Nishino, T. (2018). Cellulose nanofiber nanocomposites with aligned silver nanoparticles. *Nanocomposites*, 4(4), 167–177. <https://doi.org/10.1080/20550324.2018.1556912>
- Jin, T., Yan, L., Liu, W., Liu, S., Liu, C., & Zheng, L. (2021). Preparation and physicochemical/antimicrobial characteristics of asparagus cellulose films containing quercetin. *Food Science and Human Wellness*, 10(2), 251–257. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2021.02.015>
- Jonoobi, M., Oladi, R., Davoudpour, Y., Oksman, K., Dufresne, A., Hamzeh, Y., & Davoodi, R. (2015). Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: A review. *Cellulose*, 22(2), 935–969. <https://doi.org/10.1007/S10570-015-0551-0>
- Kerdudo, A., Dings, A., Fernandez, X., & Faure, C. (2014). Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chemistry*, 159, 12–19. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.03.005>
- Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frac, M., & Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, Article 120349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>
- Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, Article 133430. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133430>
- Kusznierewicz, B., Staroszczyk, H., Malinowska-Pańczyk, E., Parchem, K., & Bartoszek, A. (2020). Novel ABTS-dot-blot method for the assessment of antioxidant properties of food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 24, Article 100478. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100478>
- Leonel, L. V., Sene, L., da Cunha, M. A. A., et al. (2020). Valorization of apple pomace using bio-based technology for the production of xylitol and 2G ethanol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43, 2153–2163. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02401-w>
- Li, B., & Yang, X. (2020). Rutin-loaded cellulose acetate/poly(ethylene oxide) fiber membrane fabricated by electrospinning: A bioactive material. *Materials Science and Engineering: C*, 109, Article 110601. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110601>
- Liu, L., Lv, L., Dai, W., & Nie, J. (2024). The effect of naringenin-phospholipid complex on thermal oxidative stability of soybean oil under heating condition. *Food Chemistry*, 444, Article 138631. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2024.138631>
- Liu, X., Qin, Z., Ma, Y., Liu, H., & Wang, X. (2023). Cellulose-based films for food packaging applications: Review of preparation, properties, and prospects. *Journal of Renewable Materials*, 11(8), 3203–3225. <https://doi.org/10.32604/jrm.2023.027613>
- Madureira, M. B., Concato, V. M., Cruz, E. M. S., Bitencourt de Moraes, J. M., Inoue, F. S. R., Concimo Santos, N., ... Pavanelli, W. R. (2023). Naringenin and hesperidin as promising alternatives for prevention and co-adjuvant therapy for breast cancer. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(3), 586. <https://doi.org/10.3390/antiox12030586>
- Mendes, A., Borges, R., Neto, A., Macedo, L., & Silva, A. (2012). The basic antioxidant structure for flavonoid derivatives. *Journal of Molecular Modeling*, 18(4), 4073–4080. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1397-0>
- Nagarajan, K. J., Ramanujam, N. R., Sanjay, M. R., Siengchin, S., Rajan, B. S., Basha, K. S., ... Raghav, G. R. (2021). A comprehensive review on cellulose nanocrystals and cellulose nanofibers: Pretreatment, preparation, and characterization. *Polymer Composites*, 42(4), 1588–1630. <https://doi.org/10.1002/pc.25929>
- Nagula, R. L., & Wairkar, S. (2020). Cellulose microsponges based gel of naringenin for atopic dermatitis: Design, optimization, in vitro and in vivo investigation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 717–725. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.07.168>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, Article e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Park, S. N., Lee, M. H., Kim, S. J., & Yu, E. R. (2013). Preparation of quercetin and rutin-loaded ceramide liposomes and drug-releasing effect in liposome-in-hydrogel complex system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(3), 361–366. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.04.093>
- Phan, A. D. T., Netzel, G., Wang, D., Flanagan, B. M., D'Arcy, B. R., & Gidley, M. J. (2015). Binding of dietary polyphenols to cellulose: Structural and nutritional aspects. *Food Chemistry*, 171, 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.118>
- Priya, K., Thirunavookarasu, N., & Chidanand, D. V. (2023). Recent advances in edible coating of food products and its legislations: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, Article 100623. <https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2023.100623>
- Puri, M., Kaur, A., Schwarz, W. H., Singh, S., & Kennedy, J. F. (2011). Molecular characterization and enzymatic hydrolysis of naringin extracted from kinnow peel waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.10.006>

- Ramadan, M. F. (2012). Antioxidant characteristics of phenolipids (quercetin-enriched lecithin) in lipid matrices. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.10.008>
- Ramadan, M. F., & Asker, M. M. S. (2009). Antimicrobial and antiviral impact of novel quercetin-enriched lecithin. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 557–571. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00237.x>
- Rocchetti, G., Perez Gregorio, R., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., García Oliveira, P., Prieto, M. A., ... Motilva, M.-J. (2022). Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(3), 2557–2580. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12921>
- Samir, A., Ashour, F. H., Hakim, A. A. A., et al. (2022). Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications. *npj Materials Degradation*, 6, 68. <https://doi.org/10.1038/s41529-022-00277-7>
- Santin, M., Simoni, S., Vangelisti, A., Giordani, T., Cavallini, A., Mannucci, A., Ranieri, A., & Castagna, A. (2023). Transcriptomic analysis on the Peel of UV-B-exposed peach fruit reveals an upregulation of phenolic- and UVR8-related pathways. *Plants*, 12(9), 1818. <https://doi.org/10.3390/plants12091818>
- Solovchenko, A., & Merzlyak, M. (2003). Optical properties and contribution of cuticle to UV protection in plants: Experiments with apple fruit. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2, 861–866. <https://doi.org/10.1039/b302478d>
- Stoyanova, N., Spasova, M., Manolova, N., Rashkov, I., Georgieva, A., & Toshkova, R. (2022). Quercetin- and Rutin-containing electrospun cellulose acetate and polyethylene glycol fibers with antioxidant and anticancer properties. *Polymers*, 14(24), 5380. <https://doi.org/10.3390/POLYM14245380/S1>
- Surya, I., Hazwan, C. M., Abdul Khalil, Yahya, E. B., Suriani, A. B., Danish, M., & Mohamed, A. (2022). Hydrophobicity and Biodegradability of Silane-Treated Nanocellulose in Biopolymer for High-Grade Packaging Applications. *Polymers*, 14(19), 4147. <https://doi.org/10.3390/polym14194147>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Gdula, K., Koziol, A., & Zdunek, A. (2017). Isolation and characterization of cellulose from different fruit and vegetable pomaces. *Polymers*, 9(10), 495. <https://doi.org/10.3390/polym9100495>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pertile, G., Pieczywek, P. M., Cieślak, K. J., Zdunek, A., & Frać, M. (2019). Influence of chitosan addition on the mechanical and antibacterial properties of carrot cellulose nanofibre film. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(12), 47999. <https://doi.org/10.1002/app.47999>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., Walkiewicz, A., Pertile, G., Frać, M., ... Zdunek, A. (2020). Evaluation of nanocomposite made of polylactic acid and nanocellulose from carrot pomace modified with silver nanoparticles. *Polymers*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/POLYM12040812>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., & Zdunek, A. (2019). Tailored nanocellulose structure depending on the origin. Example of apple parenchyma and carrot root celluloses. *Carbohydrate Polymers*, 210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.070>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., et al. (2016). Raman imaging of changes in the polysaccharides distribution in the cell wall during apple fruit development and senescence. *Planta*, 243, 935–945. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2456-4>
- Toniazzo, T., Peres, M. S., Ramos, A. P., & Pinho, S. C. (2017). Encapsulation of quercetin in liposomes by ethanol injection and physicochemical characterization of dispersions and lyophilized vesicles. *Food Bioscience*, 19, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.05.003>
- Tu, B., Liu, Z.-J., Chen, Z.-F., Ouyang, Y., & Hu, Y.-J. (2015). Understanding the structure–activity relationship between quercetin and naringenin: In vitro. *RSC Advances*, 5(128), 106171–106181. <https://doi.org/10.1039/C5RA22551E>
- Veiko, A. G., Olchowik-Grabarek, E., Sekowski, S., Roszkowska, A., Lapshina, E. A., Dobrzynska, L., ... Zavodnik, I. B. (2023). Antimicrobial activity of quercetin, Naringenin and Catechin: Flavonoids inhibit Staphylococcus aureus-induced hemolysis and modify membranes of Bacteria and erythrocytes. *Molecules*, 28(3), 1252. <https://doi.org/10.3390/molecules28031252>
- Vidal, C., Lopez-Polo, J., & Osorio, F. A. (2024). Physical properties of cellulose derivative-based edible films elaborated with liposomes encapsulating grape seed tannins. *Antioxidants*, 13(8), 989. <https://doi.org/10.3390/antiox13080989>
- Wang, C. Y., Chen, C.-T., & Wang, S. Y. (2009). Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. *Food Chemistry*, 117(3), 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.037>
- Wang, Q., Wei, H., Deng, C., Xie, C., Huang, M., & Zheng, F. (2020). Improving stability and accessibility of quercetin in olive oil-in-soy protein isolate/pectin stabilized O/W emulsion. *Foods*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/FOODS9020123>
- Wang, Y., Zhang, J., Wang, D., Wang, X., Zhang, F., Chang, D., You, C., Zhang, S., & Wang, X. (2023). Effects of cellulose nanofibrils treatment on antioxidant properties and aroma of fresh-cut apples. *Food Chemistry*, 415, Article 135797. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.135797>
- Wu, Y., & Wang, T. (2003). Soybean lecithin fractionation and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(4), 319–326. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0697-x>
- Xu, H., Watanabe, Y., Ediger, D., Yang, X., & Iritani, D. (2022). Characteristics of sunburn Browning fruit and rootstock-dependent damage-free yield of Ambrosia™ apple after sustained summer heat events. *Plants*, 11(9), 1201. <https://doi.org/10.3390/plants11091201>
- Xu, Y., Wu, Z., Li, A., Chen, N., Rao, J., & Zeng, Q. (2024). Nanocellulose composite films in food packaging materials: A review. *Polymers*, 16(3), 423. <https://doi.org/10.3390/POLYM16030423>
- Ye, Y., Sun-Waterhouse, D., You, L., & Abbasi, A. M. (2017). Harnessing food-based bioactive compounds to reduce the effects of ultraviolet radiation: A review exploring the link between food and human health. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 595–607. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13344>
- Yusmaniar, Y., Fadillah, I., Paristiwati, M., & Saputra, I. (2023). Effect of quercetin addition on chitosan film composite of cellulose microcrystals from coconut fibers (Cocos Nucifera). *Journal of Physics: Conference Series*, 2596(1), Article 012029. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2596/1/012029>
- Zhang, M., Chu, L., Chen, J., Qi, F., Li, X., Chen, X., & Yu, D.-G. (2024). Asymmetric wettability fibrous membranes: Preparation and biologic applications. *Composites Part B: Engineering*, 269, Article 111095. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2023.111095>
- Zhu, B., Yang, Y., Jing, S., Wang, K., Wang, C., Nian, S., Shi, Y., Xu, H., & Kou, L. (2024). Effect of ultraviolet radiation C treatment on preservation of Naematelia aurantialba in modified atmosphere packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 45, Article 101343. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2024.101343>

P3 Materiały dodatkowe:

Supplementary material:

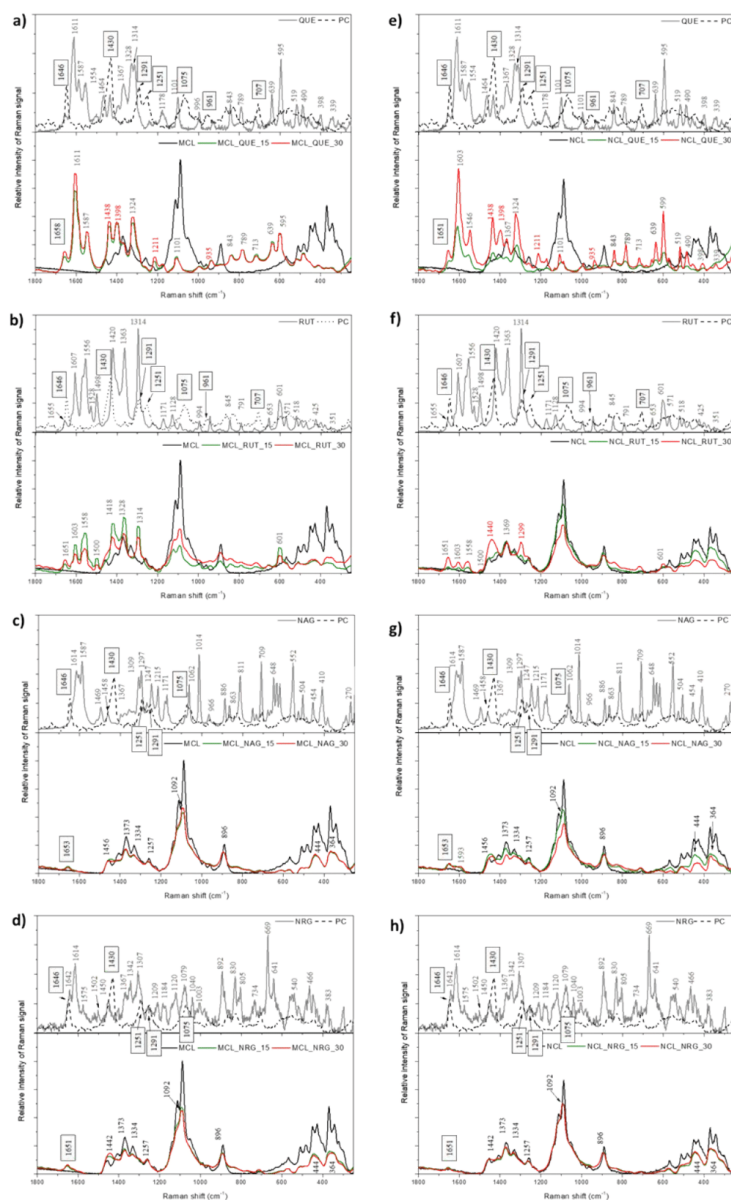


Fig. SM1. The average Raman spectra extracted from Raman maps of composites, microfibrillar cellulose with lecithin (MCL), and nanofibrillar cellulose with lecithin (NCL) with liposomal form of flavonoids and pure substance (quercetin (a, e) - QUE, rutin (b, f) - RUT, naringenin (c, g)- NAG, naringin (d, h)- NRG), and phosphatidylcholine (PC) were measured. Additionally, the bands used in Raman maps for presenting the distribution of each compound are highlighted in the spectra.

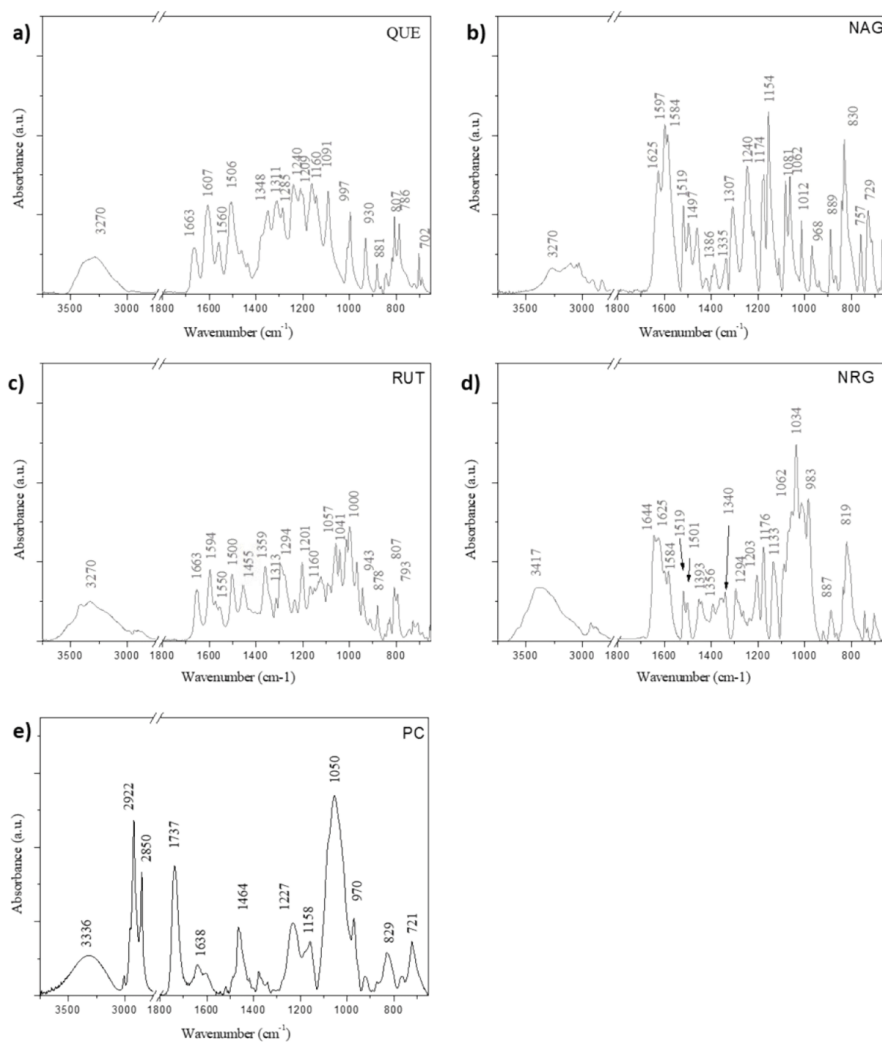


Fig. SM2. The average FTIR-ATR spectra for microfibrillar cellulose with lecithin MCL, and nanofibrillar cellulose with lecithin (NCL) in the range of 3600–650 cm⁻¹. The reference spectra of flavonoids (quercetin (a) – QUE, rutin (b) – RUT, naringenin (c) – NAG, naringin (d) – NRG) and phosphatidylcholine (e) – PC, were obtained as the averages of single spectra measured for the powdered samples.

Table SM1. Initial wettability (°) assessment of composites: contact angles measured at t=0 min (BEG) and at t = 10 min (END). Water droplet contact angles were determined on composite surfaces containing liposomal form of flavonoids: quercetin – QUE, rutin – RUT, naringenin – NAG, naringin – NRG at concentrations of 15 mg and 30 mg, alongside control samples (MCL/NCL, 0 mg flavonoid). The presented values include mean WCA, standard deviation (SD), relative standard deviation (%RSD), F-statistic, and p-value have been defined for group (control + flav 15 + flav 30) by the analysis of variance (ANOVA) (Statistica 14.1, StatSoft Inc. USA).

SAMPLE	WCA (°)	SD	%RSD	p	F	SAMPLE	WCA (°)	SD	%RSD	p	F
MCL BEG	59.40	2.82	4.74	-	-	NCL BEG	84.56	1.40	1.66	-	-
MCL END	57.94	2.87	4.95			NCL END	82.58	2.78	3.37		
MCL_QUE_15 BEG	31.66	1.98	6.26	$8.62 \cdot 10^{-12}$	413.0	NCL_QUE_15 BEG	23.84	1.56	6.54	$4.52 \cdot 10^{-16}$	2160.1
MCL_QUE_30 BEG	23.56	0.99	4.19			NCL_QUE_30 BEG	31.12	3.47	11.15		
MCL_QUE_15 END	20.90	2.00	9.56	$2.41 \cdot 10^{-12}$	512.2	NCL_QUE_15 END	21.72	1.78	8.20	$4.83 \cdot 10^{-13}$	671.4
MCL_QUE_30 END	21.84	0.92	4.23			NCL_QUE_30 END	26.84	2.51	9.35		
MCL_RUT_15 BEG	36.98	5.23	14.15	$1.09 \cdot 10^{-5}$	34.3	NCL_RUT_15 BEG	18.62	2.30	12.35	$1.13 \cdot 10^{-15}$	1853.0
MCL_RUT_30 BEG	50.82	4.54	8.94			NCL_RUT_30 BEG	35.98	1.48	4.12		
MCL_RUT_15 END	32.48	4.15	12.77	$7.09 \cdot 10^{-7}$	57.5	NCL_RUT_15 END	16.06	2.09	13.03	$1.41 \cdot 10^{-14}$	1214.8
MCL_RUT_30 END	49.40	4.28	8.67			NCL_RUT_30 END	34.06	1.58	4.65		
MCL_NAG_15 BEG	61.40	4.42	7.20	$4.93 \cdot 10^{-7}$	61.5	NCL_NAG_15 BEG	68.50	3.40	4.97	$9.20 \cdot 10^{-5}$	22.3
MCL_NAG_30 BEG	78.84	4.43	5.62			NCL_NAG_30 BEG	83.92	6.49	7.74		
MCL_NAG_15 END	46.28	6.47	13.98	$6.79 \cdot 10^{-3}$	7.8	NCL_NAG_15 END	62.52	3.76	6.01	$1.00 \cdot 10^{-5}$	34.5
MCL_NAG_30 END	49.40	7.25	14.68			NCL_NAG_30 END	80.66	5.55	6.88		
MCL_NRG_15 BEG	61.14	5.94	9.72	$9.21 \cdot 10^{-8}$	83.3	NCL_NRG_15 BEG	73.08	1.59	2.18	$1.15 \cdot 10^{-8}$	120.3
MCL_NRG_30 BEG	78.06	1.40	1.80			NCL_NRG_30 BEG	65.86	2.57	3.90		
MCL_NRG_15 END	48.08	2.61	5.43	$3.38 \cdot 10^{-4}$	16.7	NCL_NRG_15 END	70.48	2.28	3.24	$1.00 \cdot 10^{-6}$	54.5
MCL_NRG_30 END	54.86	2.59	4.72			NCL_NRG_30 END	64.78	3.13	4.83		

Table SM2.: Water vapor permeability ($\text{g}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$) of MCL- and NCL-based composites with liposomal form of flavonoids: quercetin (QUE), rutin (RUT), naringenin (NAG), and naringin (NRG) at two concentrations (15 and 30 mg). The presented values include mean WVP, standard deviation (SD), relative standard deviation (%RSD), F-statistic, and p-value for time-dependent changes defined for group. Variations between concentration groups were statistically evaluated using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test (Statistica 14.1, StatSoft Inc. USA).

SAMPLE	WVP	SD	%RSD	p	F
MCL	1.59E-10	5.56E-13	0.4	0.106974	2.89
MCL_QUE_15	1.53E-10	2.66E-11	17.4		
MCL_QUE_30	1.31E-10	7.32E-12	5.6		
MCL	1.59E-10	5.56E-13	0.4	6.07E-05	34.43
MCL_RUT_15	1.39E-10	1.23E-11	8.9		
MCL_RUT_30	2.14E-10	1.67E-11	7.8		
MCL	1.59E-10	5.56E-13	0.4	0.120987	2.70
MCL_NAG_15	1.39E-10	2.46E-12	1.8		
MCL_NAG_30	1.38E-10	2.2E-11	15.9		
MCL	1.59E-10	5.56E-13	0.4	0.179815	2.09
MCL_NRG_15	1.39E-10	5.78E-12	4.2		
MCL_NRG_30	1.4E-10	2.4E-11	17.1		
NCL	1.39E-10	6.21E-12	4.5	0.002306	12.85
NCL_QUE_15	1.26E-10	3.09E-12	2.5		
NCL_QUE_30	1.47E-10	7.59E-12	5.2		
NCL	1.39E-10	6.21E-12	4.5	0.014962	6.95
NCL_RUT_15	1.3E-10	5.94E-12	4.6		
NCL_RUT_30	1.17E-10	1.15E-11	9.8		
NCL	1.39E-10	6.21E-12	4.5	7.32E-05	32.84
NCL_NAG_15	1.16E-10	8.63E-12	7.4		
NCL_NAG_30	1.04E-10	1.85E-12	1.8		
NCL	1.39E-10	6.21E-12	4.5	0.018627	6.41
NCL_NRG_15	1.15E-10	9.24E-12	8.1		
NCL_NRG_30	1.18E-10	1.43E-11	12.1		

Table SM3. Antioxidant capacity reported as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) for MCL- and NCL-based composites containing liposomal forms of flavonoids: quercetin (QUE), rutin (RUT), naringenin (NAG), and naringin (NRG), at two concentrations (15 and 30 mg). Significant differences between time points (0, 24, and 48 hours) for each composite type were statistically evaluated using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. The presented values include mean TEAC, standard deviation (SD), relative standard deviation (%RSD), F-statistic, and p-value for time-dependent changes) (Statistica 14.1, StatSoft Inc. USA).

		mg TE/ cm ²	SD	%RSD	p	F			mg TE/ cm ²	SD	%RSD	p	F
MCL	0H	831.4	75.8	9.1	0.000079	67.0	NCL	0H	823.0	102.3	12.4	0.000032	91.7
	24H	420.6	63.3	15.0				24H	262.7	29.0	11.1		
	48H	227.9	55.0	24.1				48H	153.9	36.7	23.8		
MCL_QUE_15	0H	21003.3	742.1	3.5	2.6*10 ⁻⁰⁷	469.3	NCL_QUE_15	0H	19455.6	59.3	0.3	5.3*10 ⁻⁰⁹	1719.2
	24H	13419.1	361.7	2.7				24H	22297.5	133.8	0.6		
	48H	6825.6	532.6	7.8				48H	9626.5	458.3	4.8		
MCL_QUE_30	0H	19100.4	182.0	1.0	1.4*10 ⁻¹¹	12542.1	NCL_QUE_30	0H	11052.5	608.1	5.5	0.001199	25.2
	24H	22420.2	37.2	0.2				24H	10407.4	611.6	5.9		
	48H	7250.2	105.5	1.5				48H	13828.5	659.0	4.8		
MCL_RUT_15	0H	5029.3	224.2	4.5	0.011342	10.4	NCL_RUT_15	0H	3250.9	347.4	10.7	0.040773	5.7
	24H	3706.6	532.7	14.4				24H	2612.0	306.2	11.7		
	48H	3863.2	346.4	9.0				48H	2580.3	104.6	4.1		
MCL_RUT_30	0H	3577.2	141.5	4.0	0.000072	68.9	NCL_RUT_30	0H	6479.5	10.1	0.2	0.041239	5.7
	24H	2445.3	153.6	6.3				24H	5674.7	376.6	6.6		
	48H	2749.2	34.5	1.3				48H	6160.4	343.7	5.6		
MCL_NAG_15	0H	4352.2	78.8	1.8	0.954519	0.0	NCL_NAG_15	0H	3442.4	515.0	15.0	0.000016	115.0
	24H	4776.1	434.7	9.1				24H	5431.5	324.7	6.0		
	48H	4412.2	500.9	11.4				48H	3266.6	511.7	15.7		
MCL_NAG_30	0H	2765.1	211.1	7.6	0.000006	166.4	NCL_NAG_30	0H	5123.2	332.3	6.5	0.000082	66.0
	24H	1885.2	392.6	20.8				24H	3051.2	70.7	2.3		
	48H	1659.5	169.0	10.2				48H	4922.5	79.1	1.6		
MCL_NRG_15	0H	1292.6	254.0	19.7	0.403087	1.1	NCL_NRG_15	0H	2225.4	125.0	5.6	0.002062	20.6
	24H	1301.0	284.0	21.8				24H	1600.2	22.3	1.4		
	48H	1246.5	142.4	11.4				48H	1338.5	10.6	0.8		
MCL_NRG_30	0H	1723.7	131.7	7.6	0.005992	13.5	NCL_NRG_30	0H	1810.5	243.1	13.4	0.000027	96.6
	24H	555.4	30.4	5.5				24H	585.1	81.9	14.0		
	48H	507.3	86.1	17.0				48H	580.9	51.7	8.9		

Apple skin tests:

SM Methodology:

SM 1.1. Apple skin preparation

The apple skin was peeled from wild-growing domestic apple fruits *Malus x domestica* (Lublin, Poland). The skin was washed, rinsed with distilled water, and dried on a microscope slide at room temperature, in the dark. A section of the skin, free of pulp, measuring 2×2 cm, was used. Subsequently, approximately 50 mg of four different substances were applied to the surface by airbrush spraying: distilled water, a nanofibrillar cellulose with lecithin dispersion (as in point 2.1.2), and the NCL_QUE_30 composite (as described in 2.1.7), with the modification that the quercetin emulsion was mixed with the nanocellulose dispersion for 2 minutes using an Ultraturrax.

SM 1.2. Depth Profile of Skin-Composite Interaction

On the prepared apple skin (SM 1.1.), 80 μ L of selected composite dispersions (H_2O ; NCL, or NCL_QUE_30) was applied in spots using a pipette. Raman microscopy was used to analyze the depth profile. The methodology described in point 2.2.2 was employed, with the integration time adjusted to 1 second and the depth profile measured to a length of 50 μ m. Specific Raman bands were used to evaluate the presence of layers on the surface: 1611 cm^{-1} (characteristic of quercetin), 1120 cm^{-1} (for nanofibrillated cellulose), 1432 cm^{-1} (C-H asymmetric bending of CH_2 and CH_3 in cell wall polysaccharides), and 2900 cm^{-1} (stretching vibrations of CH_2 and CH_3 in lipids, including waxes on the skin surface) (Beć, 2020).

SM. 1.3. Contact angle

The methodology outlined in point 2.2.6 was used, with specific parameter adjustments. Specifically, 10 μ L of the selected composite (NCL, or NCL_QUE_30) was applied to the surface of the apple skin on microscope slides using an automatic pipette. Measurements were performed immediately, with 60-second intervals between each measurement. A total of 10 measurements were taken.

SM 1.4. UV-Vis light barrier property

The light-blocking performance of the composite was evaluated by scanning three samples of each type on using a UV-Vis spectrophotometer (Cary 60 UV-Vis, Agilent) over a wavelength range of 200 to 1000 nm. The results were averaged, and the percentage transmittance was calculated (point 2.2.6.).

SM Results:

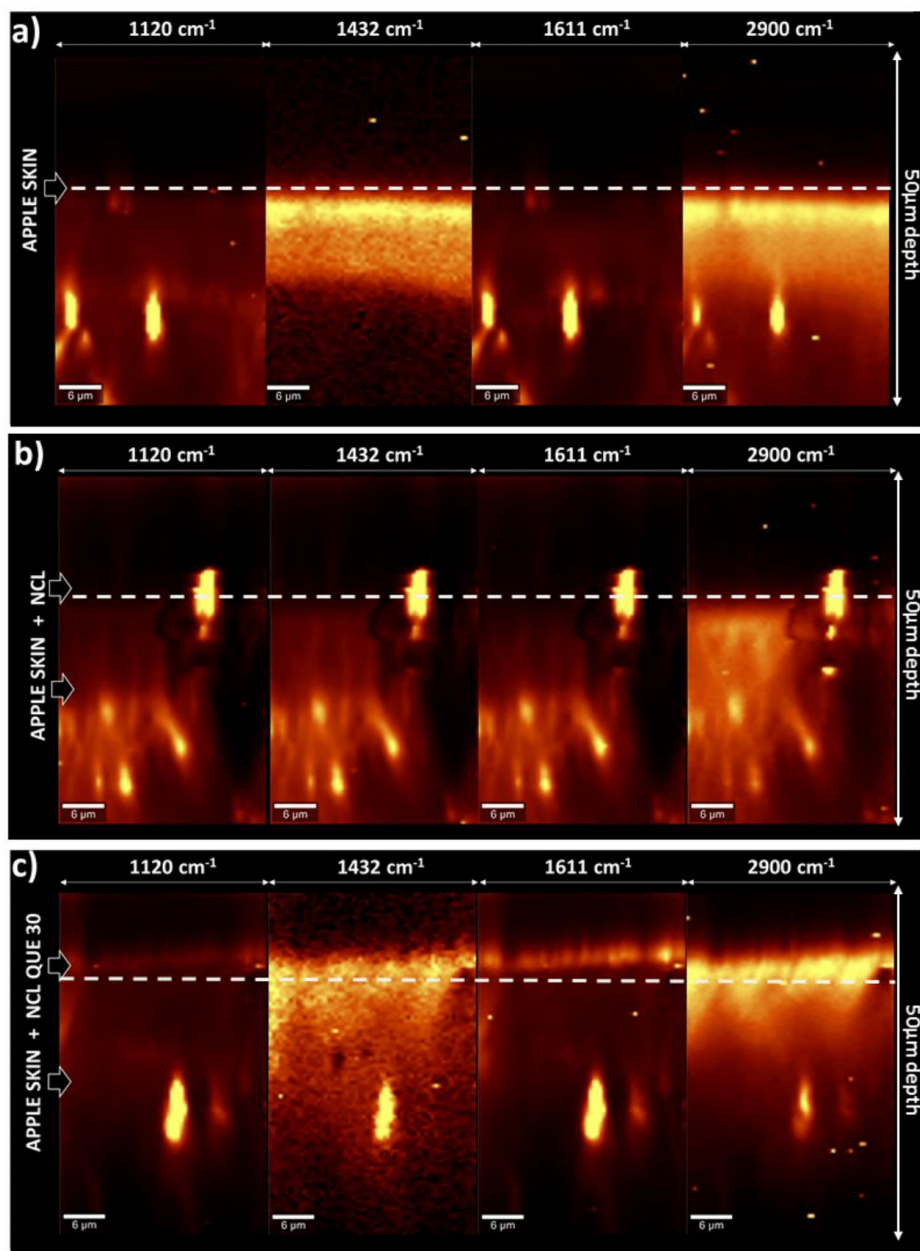


Fig. SM3: Raman micrographs of depth profiles of the apple skin surface without and with coating by three types of substance: nanofibrillar cellulose with lecithin (NCL) and nanofibrillar cellulose with lecithin and 30mg of liposomal form of quercetin (NCL_QUE_30). Specific Raman bands were used to evaluate the presence of layers on the surface: 1611 cm^{-1} (characteristic of quercetin), 1120 cm^{-1} (for nanofibrillated cellulose), 1432 cm^{-1} (C-H asymmetric bending of CH_2 and CH_3

in cell wall polysaccharides), and 2900 cm^{-1} (stretching vibrations of CH_2 and CH_3 in lipids, including waxes on the skin surface). The white dashed line indicates the approximate level of the apple skin.

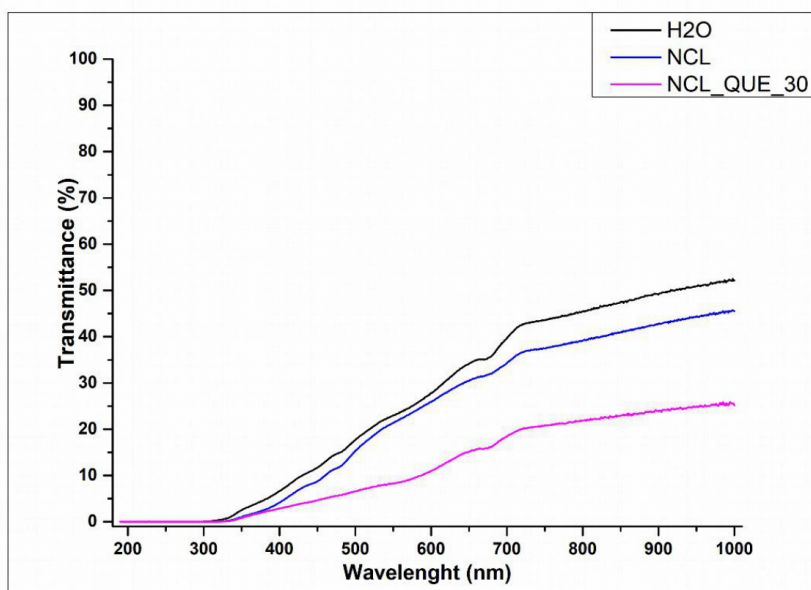


Fig. SM4. UV-Vis light barrier properties for apple skin covered with: water (H_2O), nanofibrillar cellulose with lecithin (NCL) or nanofibrillar cellulose with lecithin and 30mg of liposomal form of quercetin (NCL_QUE_30) applied to the surface by airbrush spraying (about 50mg).

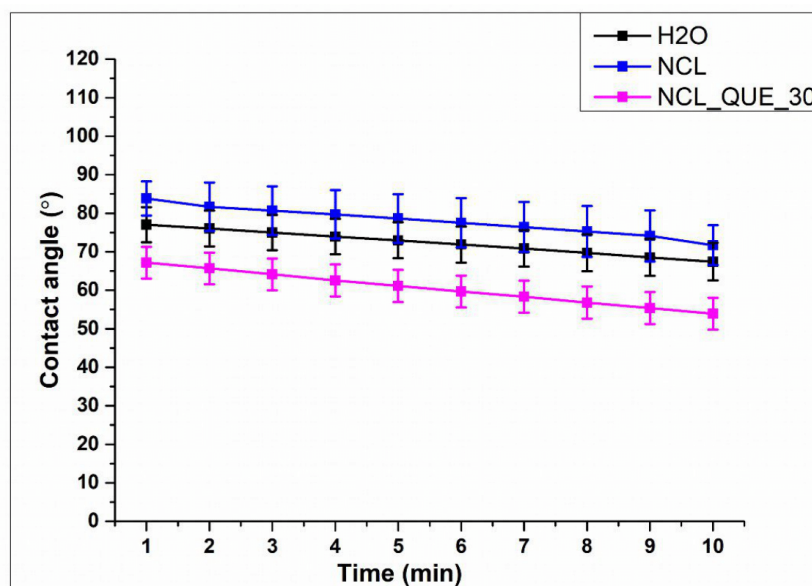


Fig. SM5. Determination of the surface wettability of composites. Contact angles of distilled water (H_2O), nanofibrillar cellulose with lecithin (NCL) or nanofibrillar cellulose with lecithin, and 30mg of liposomal form of quercetin (NCL_QUE_30) on the surface of apple skin.

8. Bibliografia

- Abdelhamid, H. N. (2024). Nanocellulose-based materials for water pollutant removal: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15), 8529. <https://doi.org/10.3390/ijms25158529>
- Almeida, T. (2023). Biobased ternary films of thermoplastic starch, bacterial nanocellulose and gallic acid for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 144, 108934. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108934>
- Al-Khayri, J. M., Rashmi, R., Toppo, V., Chole, P. B., Banadka, A., Sudheer, W. N., Nagella, P., Shehata, W. F., Al-Mssallem, M. Q., Alessa, F. M., Almaghasla, M. I., i Rezk, A. A.-S. (2023). Plant secondary metabolites: The weapons for biotic stress management. *Metabolites*, 13(6), 716. <https://doi.org/10.3390/metabo13060716>
- Alseekh, S., Perez de Souza, L., Benina, M., i Fernie, A. R. (2020). The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. *Phytochemistry*, 174, 112347. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112347>
- Aziz, T., Farid, A., Haq, F., Kiran, M., Ullah, A., Zhang, K., Li, C., Ghazanfar, S., Sun, H., Ullah, R., Ali, A., Muzammal, M., Shah, M., Akhtar, N., Selim, S., Hagagy, N., Samy, M., i Al Jaouni, S. K. (2022). A review on the modification of cellulose and its applications. *Polymers*, 14(15), 3206. <https://doi.org/10.3390/polym14153206>
- Bassyouni, M., Zoromba, M. S., Abdel-Aziz, M. H., i Mosly, I. (2022). Extraction of nanocellulose for eco-friendly biocomposite adsorbent for wastewater treatment. *Polymers*, 14(9), 1852. <https://doi.org/10.3390/polym14091852>
- Bhosale, P. B., Ha, S. E., Vetrivel, P., Kim, H. H., Kim, S. M., i Kim, G. S. (2020). Functions of polyphenols and its anticancer properties in biomedical research: A narrative review. *Translational Cancer Research*, 9(12), 7619–7631. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-2359>
- Baria, B., Panjagari, N. R., Arora, S., Minz, P. S., Singh, R. R. B., i Rao, P. S. (2021). Colouring properties and stability of black carrot anthocyanins in yoghurt during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 58(10), 3953–3962. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04858-9>
- Casalini, S., Baschetti, M. G., Cappelletti, M., Guerreiro, A. C., Gago, C. M., Nici, S., i Antunes, M. D. (2023). Antimicrobial activity of different nanocellulose films embedded with thyme, cinnamon, and oregano essential oils for active packaging application on raspberries. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, Article 1190979. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1190979>
- Cazón, P., Morales-Sanchez, E., Velazquez, G., i Vázquez, M. (2022). Measurement of the Water Vapor Permeability of Chitosan Films: A Laboratory Experiment on Food Packaging Materials. *Journal of Chemical Education*, 99(6), 2403–2408. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.2C00449>

Célino, A., Fréour, S., Jacquemin, F., i Casari, P. (2014). The hygroscopic behavior of plant fibers: A review. *Frontiers in Chemistry*, 1, 43. <https://doi.org/10.3389/fchem.2013.00043>

Chambre, D. R., i Dochia, M. (2021). FT-IR characterization of cellulose crystallinity from raw bast fibers. *Scientific and Technical Bulletin - Chemistry Food Science Engineering*, 18(XIX), 10–17.

Chen, J., Yang, J., Ma, L., Ma, L., Song, N., Kong, K. K., i You, J. (2020). Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*, 10, 2611. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59451-z>

Chen, G., Wang, K., Chen, P., Cai, D., Shao, Y., Xia, R., Li, C., Wang, H., Ren, F., Cheng, X., i Yu, Y. (2024). Fully biodegradable packaging films for fresh food storage based on oil-infused bacterial cellulose. *Advanced Science*, 11(23), 2400826. <https://doi.org/10.1002/advs.202400826>

Chen, Y., Cao, X., Chen, Q., Ye, X., Zeng, Q., Yuan, Y., Dong, L., Huang, F., i Su, D. (2022). Hydrogel with the network structure fabricated by anthocyanin–gelatin crosslinking and improved mineral encapsulation ability. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(11), 7143–7155. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16057>

Costa, S. M., Ferreira, D. P., Teixeira, P., Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., i Figueiro, R. (2021). Active natural-based films for food packaging applications: The combined effect of chitosan and nanocellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.105>

Dai, J., i Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

Dai, L., Luo, D., Li, C., i Chen, Y. (2025). Recent advances in the application technologies of surface coatings for fruits. *Foods*, 14(14), 2471. <https://doi.org/10.3390/foods14142471>

De France, K., Zeng, Z., Wu, T., i Nyström, G. (2020). Functional materials from nanocellulose: Utilizing structure–property relationships in bottom-up fabrication. *Advanced Materials*, 32(17), 2000657. <https://doi.org/10.1002/adma.202000657>

Dominguez-López, I., Pérez, M., i Lamuela-Raventós, R. M. (2023). Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(28), 10048–10054. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2220031>

Du, L., Yu, H., Zhang, B., Tang, R., Zhang, Y., Qi, C., Wolcott, M. P., Yu, Z., i Wang, J. (2021). Transparent oxygen barrier nanocellulose composite films with a sandwich structure. *Carbohydrate Polymers*, 268, 118206. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118206>

Elfawal, G. F., Opálková Šišková, A., i Eckstein Andicsová, A. (2025). Ecological packaging and creating sustainable solutions for biodegradable cellulose derivatives: A review.

International Journal of Biological Macromolecules, 309(Pt 2), 142348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.142348>

Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A., i Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants*, 10(12), 1967. <https://doi.org/10.3390/antiox10121967>

Erdal, N. B., i Hakkarainen, M. (2022). Degradation of cellulose derivatives in laboratory, man-made, and natural environments. *Biomacromolecules*, 23(7), 2713–2729. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00336>

Erna, K. H., Felicia, W. X. L., Vonnice, J. M., Rovina, K., Yin, K. W., i Nur'Aqilah, M. N. (2022). Synthesis and physicochemical characterization of polymer film-based anthocyanin and starch. *Biosensors*, 12(4), 211. <https://doi.org/10.3390/bios12040211>

Falcão, L., i Araújo, M. E. M. (2018). Vegetable tannins used in the manufacture of historic leathers. *Molecules*, 23(5), 1081. <https://doi.org/10.3390/molecules23051081>

Fenoradosoa, A., Ali, G., Delattre, C., Michaud, P., et al. (2009). Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow. *Journal of Applied Phycology*, 22(2), 131–137. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9432-y>

Fernandes, A., Brás, N. F., Mateus, N., i de Freitas, V. (2014). Understanding the molecular mechanism of anthocyanin binding to pectin. *Langmuir*, 30(28), 8516–8527. <https://doi.org/10.1021/la501879w>

Galanakis, C. M. (2018). Polyphenols: Properties, recovery, and applications. Woodhead Publishing. <https://books.google.pl/books?id=Nm89DwAAQBAJ>

Gao, J., Zhao, Y., Ni, F., Gao, M., Wu, L., Yu, Z., Chen, Y., i Wang, Y. (2024a). Polyphenol metabolomics reveals the applications and effects of woody plant polyphenols in textile dyeing. *Forestry Research*, 4, e038. <https://doi.org/10.48130/forres-0024-0035>

Gao, N., Shu, C., Wang, Y., Tian, J., Lang, Y., Jin, C., Cui, X., Jiang, H., Liu, S., Li, Z., Chen, W., Xu, H., i Li, B. (2024b). Polyphenol components in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as clinically proven diseases control factors—an overview. *Food Science and Human Wellness*, 13(3), 1152–1167. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250096>

Gangadharan, G., Gupta, S., Kudipady, M. L., i Puttaiahgowda, Y. M. (2024). Gallic acid based polymers for food preservation: A review. *ACS Omega*, 9(36), 37530–37547. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c05642>

Grzybek, P., Dudek, G., i van der Bruggen, B. (2024). Cellulose-based films and membranes: A comprehensive review on preparation and applications. *Chemical Engineering Journal*, 495, 153500. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.153500>

- Guivier, M., Chevigny, C., Domenek, S., Casalinho, J., Perré, P., i Almeida, G. (2024). Water vapor transport properties of bio-based multilayer materials determined by original and complementary methods. *Scientific Reports*, 14, 50. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50298-8>
- Hafid, H. S., Omar, F. N., Bahrin, E. K., i Wakisaka, M. (2023). Extraction and surface modification of cellulose fibers and its reinforcement in starch-based film for packaging composites. *Bioresources and Bioprocessing*, 10(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40643-023-00631-w>
- Hindarto, C. K., Surini, S., Permana, A. H., Redjeki, S., i Irawan, C. (2017). Effect of mole ratio on physicochemical properties of luteolin-loaded phytosome. *The Pharma Innovation Journal*, 6(12), 96–101.
- Hoo, D. Y., Low, Z. L., Low, D. Y. S., Tang, S. Y., Manickam, S., Tan, K. W., i Ban, Z. H. (2022). Ultrasonic cavitation: An effective cleaner and greener intensification technology in the extraction and surface modification of nanocellulose. *Ultrasonics Sonochemistry*, 90, 106176. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106176>
- Iorizzo, M., Curaba, J., Pottorff, M., Ferruzzi, M. G., Simon, P., i Cavagnaro, P. F. (2020). Carrot anthocyanins genetics and genomics: Status and perspectives to improve its application for the food colorant industry. *Genes*, 11(8), 906. <https://doi.org/10.3390/genes11080906>
- Jaekel, E. E., Kluge, S., Tröger-Müller, S., Tutuş, M., i Filonenko, S. (2022). Tunable gas permeation behavior in self-standing cellulose nanocrystal-based membranes. *ACS Sustainable Chemistry i Engineering*, 10(38), 12895–12905. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c04806>
- Jafarinia, M., Hosseini, M. S., Kasiri, N., Fazel, N., Fathi, F., Ganjalikhani Hakemi, M., i Eskandari, N. (2020). Quercetin with the potential effect on allergic diseases. *Allergy, Asthma i Clinical Immunology*, 16, Article 36. <https://doi.org/10.1186/s13223-020-00434-0>
- Ji, Y., Zhao, S., Yang, Z., Chen, Q., Wang, X., i Yang, J. (2025). Intelligent film based on mulberry anthocyanin, sodium alginate, and gellan gum for monitoring pork freshness. *LWT*, 231, 118318. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118318>
- Kamal, T., Ul-Islam, M., Fatima, A., Ullah, M. W., i Manan, S. (2022). Cost-effective synthesis of bacterial cellulose and its applications in the food and environmental sectors. *Gels*, 8(9), 552. <https://doi.org/10.3390/gels8090552>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., i Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food i Nutrition Research*, 61(1), 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Koss-Mikołajczyk, I., i Bartoszek, A. (2023). Relationship between chemical structure and biological activity evaluated in vitro for six anthocyanidins most commonly occurring in edible plants. *Molecules*, 28(16), 6156. <https://doi.org/10.3390/molecules28166156>

- Kringel, D. H., Dias, A. R. G., Zavareze, E. da R., i Gandra, E. A. (2019). Fruit wastes as promising sources of starch: Extraction, properties, and applications. *Starch – Stärke*, 72(1), 1900200. <https://doi.org/10.1002/star.201900200>
- Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., i Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, 133430. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133430>
- Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., i Zdunek, A. (2025a). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, 120349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>
- Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., i Zdunek, A. (2025b). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids–quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form. *Food Research International*, 221(Part 2), 117335. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>
- Kwak, H., Kim, J., Lee, E. J., i Hyun, J. (2024). Enhanced preservation of climacteric fruit with a cellulose nanofiber-based film coating. *ACS Omega*, 9(1), 1069–1076. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07273>
- Larijani, G., Lotfi, A., Barati, S., Janzadeh, A., Abediankenari, S., Faghihi, F., i Amini, N. (2025). The effect of chitosan/alginate hydrogel loaded quercetin on wound healing in diabetic rat model. *Journal of Molecular Histology*, 56, Article 225. <https://doi.org/10.1007/s10735-025-10508-1>
- Li, L., i Li, Q. (2025). Advancements in chitosan-anthocyanin composite films: Sustainable food preservation with biodegradable packaging. *Foods*, 14(10), 1721. <https://doi.org/10.3390/foods14101721>
- Lupidi, G., Pastore, G., Marcantoni, E., i Gabrielli, S. (2023). Recent developments in chemical derivatization of microcrystalline cellulose (MCC): Pre-treatments, functionalization, and applications. *Molecules*, 28(5), 2009. <https://doi.org/10.3390/molecules28052009>
- Lv, Y., Li, Q., Yang, W., Zhang, Z., i Li, Y. (2025). Recent advances in functional design of nanocellulose and their intelligent application. *International Journal of Smart and Nano Materials*, 16(2), 245–283. <https://doi.org/10.1080/19475411.2025.2483819>
- Ma, Y.-B., Zhang, J.-X., Zhou, X.-Q., Jiang, W.-D., Wu, P., Liu, Y., Kuang, S.-Y., Tang, L., i Feng, L. (2021). Effect of tea polyphenols on flavour, healthcare components, physicochemical properties, and mechanisms of collagen synthesis in growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) muscle. *Aquaculture*, 534, 736237. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736237>
- Mayrhofer, A., Kopacic, S., i Bauer, W. (2023). Extensive characterization of alginate, chitosan and microfibrillated cellulose cast films to assess their suitability as barrier coating for paper and board. *Polymers*, 15(16), 3336. <https://doi.org/10.3390/polym15163336>

- Martínez-Sanz, M., Lopez-Rubio, A., i Lagaron, J. M. (2013). High-barrier coated bacterial cellulose nanowhiskers films with reduced moisture sensitivity. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1072–1082. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.020>
- Matebie, B. Y., Tizazu, B. Z., Kadhém, A. A., i Prabhu, S. V. (2021). Synthesis of cellulose nanocrystals (CNCs) from brewer's spent grain using acid hydrolysis: Characterization and optimization. *Journal of Nanomaterials*, 2021(1), 7133154, <https://doi.org/10.1155/2021/7133154>
- Matloob, A., Ayub, H., Mohsin, M., Ambreen, S., Khan, F. A., Oranab, S., Rahim, M. A., Khalid, W., Nayik, G. A., Ramniwas, S., i Ercisli, S. (2023). A review on edible coatings and films: Advances, composition, production methods, and safety concerns. *ACS Omega*, 8(32), 28932–28944. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03459>
- McNamara, J. T., Morgan, J. L. W., i Zimmer, J. (2015). A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 895–921. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033930>
- Metha, C., Pawar, S., i Suvarna, V. (2024). Recent advancements in alginate-based films for active food packaging applications. *Sustainable Food Technology*, 2, 1246–1265. <https://doi.org/10.1039/D3FB00216K>
- Moradi, M., Tajik, H., Almasi, H., Forough, M., i Ezati, P. (2019). A novel pH-sensing indicator based on bacterial cellulose nanofibers and black carrot anthocyanins for monitoring fish freshness. *Carbohydrate Polymers*, 222, 115030. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115030>
- Nalini, T., Khaleel Basha, S., Mohamed Sadiq, A., i Sugantha Kumari, V. (2022). Fabrication and evaluation of nanoencapsulated quercetin for wound healing application. *Polymer Bulletin*, 80, 515–540. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04094-5>
- Naz, R., Saqib, F., Awadallah, S., Wahid, M., Latif, M. F., Iqbal, I., i Mubarak, M. S. (2023). Food polyphenols and type II diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Molecules*, 28(10), 3996. <https://doi.org/10.3390/molecules28103996>
- Núñez, S. S., Ortuño, N., Fernández-Durán, S., Moltó, J., i Conesa, J. A. (2024). Analysis and removal of bisphenols in recycled plastics using polyethylene glycol. *Scientific Reports*, 14, Article 12824. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63800-7>
- Nayak, M., Kumar, V., Banerjee, D., Pradhan, L., Kamath, P., i Mukherjee, S. (2025). Quercetin nanocrystal-loaded alginate hydrogel patch for wound healing applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 13(5), 1690–1703. <https://doi.org/10.1039/d4tb01699h>
- Othman, S. H., Wane, B. M., Nordin, N., Noor Hasnan, N. Z., Talib, R. A., i Karyadi, J. N. W. (2021). Physical, mechanical, and water vapor barrier properties of starch/cellulose nanofiber/thymol bionanocomposite films. *Polymers*, 13(23), 4060. <https://doi.org/10.3390/polym13234060>

- Park, C. H., Kang, Y. K., i Im, S. S. (2004). Biodegradability of cellulose fabrics. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(5), 2358–2366. <https://doi.org/10.1002/app.20879>
- Phanthong, P., Reubroycharoen, P., Hao, X., Xu, G., Abudula, A., i Guan, G. (2018). Nanocellulose: Extraction and application. *Carbon Resources Conversion*, 1(1), 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.05.004>
- Popoola, O., Finny, A., Dong, I., i Andreescu, S. (2024). Smart and sustainable 3D-printed nanocellulose-based sensors for food freshness monitoring. *ACS Applied Materials i Interfaces*, 16(44), 60920–60932. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c10304>
- Pornbencha, K., Sringam, S., Piyanirund, S., Seubsai, A., Prapainainar, P., Niumnuy, C., Roddech, S., i Dittanet, P. (2023). Functionalization of cellulose nanocrystals extracted from pineapple leaves as a UV-absorbing agent in poly(lactic acid). *RSC Advances*, 13(22), 15311–15321. <https://doi.org/10.1039/d3ra02693k>
- Pradhan, S. H., Mulen, M. R., Steele, L. R., Gibb, M., Ede, J. D., Ong, K. J., Shatkin, J. A., i Sayes, C. M. (2020). Physical, chemical, and toxicological characterization of fibrillated forms of cellulose using an in vitro gastrointestinal digestion and co-culture model. *Toxicology Research*, 9(3), 290–301. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa026>
- Qiao, A., Cui, M., Huang, R., Ding, G., Qi, W., He, Z., Klemes, J. J., i Su, R. (2021). Advances in nanocellulose-based materials as adsorbents of heavy metals and dyes. *Carbohydrate Polymers*, 272, 118471. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118471>
- Rustagi, N., Pradhan, S. K., i Singh, R. (2011). Public health impact of plastics: An overview. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 15(3), 100–103. <https://doi.org/10.4103/0019-5278.93198>
- Sachin, K. S., Jayakrishnan, J. P., Rao, D. R., Koshy, J. T., Sangeetha, D., Vinod, A. R., Reshmy, R., i Dalvi, Y. B. (2025). Unlocking the potential of cellulose and its derivatives from biomass as active packaging solutions for meat products: Recent advancements, applications and shelf-life assessment. *Results in Engineering*, 28, 107544. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2025.107544>
- Salvage, R., Cannon, T., Kingsmill, P., Liu, F., i Fleming, C. C. (2024). A complex biostimulant based on plant flavonoids enhances potato growth and commercial yields. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8, Article 1368423. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1368423>
- Sana, Aftab, T., Naeem, M., Jha, P. K., i Prasad, P. V. V. (2025). Production of secondary metabolites under challenging environments: Understanding functions and mechanisms of signalling molecules. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1569014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1569014>
- Saxena, M., Saxena, J., i Pradhan, A. (2012). Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16(2), 130–134. ISSN 0976–044X

Sganzerla, W. G., Ribeiro, C. P. P., Uliana, N. R., Rodrigues, M. B. C., da Rosa, C. G., Ferrareze, J. P., de Lima Veeck, A. P., i Nunes, M. R. (2021). Bioactive and pH-sensitive films based on carboxymethyl cellulose and blackberry (*Morus nigra* L.) anthocyanin-rich extract: A perspective coating material to improve the shelf life of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101989. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101989>

Sharma, A., Thakur, M., Bhattacharya, M., Mandal, T., i Goswami, S. (2019). Commercial application of cellulose nano-composites – A review. *Biotechnology Reports*, 21, e00316. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316>

Schmid, P. J., Maitz, S., Plank, N., Knaipp, E., Pölzl, S., i Kittinger, C. (2023). Fiber-based food packaging materials in view of bacterial growth and survival capacities. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1099906. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1099906>

Shen, R., Xue, S., Xu, Y., Liu, Q., Feng, Z., Ren, H., Zhai, H., i Kong, F. (2020). Research progress and development demand of nanocellulose reinforced polymer composites. *Polymers*, 12(9), 2113. <https://doi.org/10.3390/polym12092113>

Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., i Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(54), 81112–81129. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6>

Slimestad, R., i Solheim, H. (2002). Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3228–3231. <https://doi.org/10.1021/jf011581u>

Spence, K. L., Venditti, R. A., Habibi, Y., Rojas, O. J., i Pawlak, J. J. (2010). The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: Mechanical processing and physical properties. *Bioresource Technology*, 101(15), 5961–5968. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.104>

Sun, J., Yang, X., Bai, Y., Fang, Z., Zhang, S., Wang, X., Yang, Y., i Guo, Y. (2024). Recent advances in cellulose nanofiber modification and characterization and cellulose nanofiber-based films for eco-friendly active food packaging. *Foods*, 13(24), 3999. <https://doi.org/10.3390/foods13243999>

Szpilyk, M., Lubczak, R., i Lubczak, J. (2021). The biodegradable cellulose-derived polyol and polyurethane foam. *Polymer Testing*, 100, 107250. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107250>

- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Gdula, K., Kozioł, A., i Zdunek, A. (2017). Isolation and characterization of cellulose from different fruit and vegetable pomaces. *Polymers*, 9(10), 495. <https://doi.org/10.3390/polym9100495>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., i Zdunek, A. (2019). Tailored nanocellulose structure depending on the origin. Example of apple parenchyma and carrot root celluloses. *Carbohydrate Polymers*, 210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.070>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., Walkiewicz, A., Pertile, G., Frac, M., Cieślak, K. J., i Zdunek, A. (2020). Evaluation of nanocomposite made of polylactic acid and nanocellulose from carrot pomace modified with silver nanoparticles. *Polymers*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/POLYM12040812>
- Tang, H. R., Covington, A. D., i Hancock, R. A. (2003). Structure–activity relationships in the hydrophobic interactions of polyphenols with cellulose and collagen. *Biopolymers*, 70(4), 403–413. <https://doi.org/10.1002/bip.10499>
- Wu, Y., i Li, C. (2022). A smart film incorporating anthocyanins and tea polyphenols into sodium carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol for application in mirror carp. *International Journal of Biological Macromolecules*, 223(Pt A), 404–417. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.282>
- Van de Sande, Bisseling T. (1997). Signalling in symbiotic root nodule formation. (van de Sande, K., i Bisseling, T.). *Essays in Biochemistry*, 32, 127–142. PMID: 9493016
- Xu, H., i Song, H.-Y. (2025a). A systematic review of tea dyeing in the textile industry: Research trends, dyeing performance, functional characteristics, and application potential. *SAGE Open*, 15(1), Article 24723444251314916. <https://doi.org/10.1177/24723444251314916>
- Xu, Z., Yu, X., Liu, W., Cheng, J., i Xiong, G. (2025b). pH-responsive indicator films contained composite anthocyanins for monitoring meat freshness. *Food Chemistry X*, 27, 102487. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102487>
- Yadav, M., Behera, K., Chang, Y.-H., i Chiu, F.-C. (2020). Cellulose nanocrystal reinforced chitosan based UV barrier composite films for sustainable packaging. *Polymers*, 12(1), 202. <https://doi.org/10.3390/polym12010202>
- Yadav, S., Malik, K., Moore, J. M., Kamboj, B. R., Malik, S., Malik, V. K., Arya, S., Singh, K., Mahanta, S., i Bishnoi, D. K. (2024). Valorisation of agri-food waste for bioactive compounds: Recent trends and future sustainable challenges. *Molecules*, 29(9), 2055. <https://doi.org/10.3390/molecules29092055>
- Yan, M., Huang, S., Li, X., Wang, Y., Zhong, S., Ban, J., i Zhang, S. (2025). Gallic acid nanocrystal hydrogel: A novel strategy for promoting wound healing and inhibiting scar formation. *International Journal of Nanomedicine*, 20, 4607–4626. <https://doi.org/10.2147/IJN.S514961>

Yang, J., Kwon, G.-J., Hwang, K., i Kim, D.-Y. (2018). Cellulose–chitosan antibacterial composite films prepared from LiBr solution. *Polymers*, 10(10), 1058. <https://doi.org/10.3390/polym10101058>

Yue, C., Huang, Y., Kong, B., i Wang, G. (2022). Effect of anthocyanin indicator addition on cellulose nanocrystals/gellan gum-based intelligent packaging films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 47(1), e17246. <https://doi.org/10.1111/jfpp.17246>

Zero Waste Europe. (stan na 5 listopada 2025). Europe missing out on the potential of food waste, with almost 75% ending up in landfills or incinerated. <https://zerowasteurope.eu/press-release/europe-missing-out-on-the-potential-of-food-waste-with-almost-75-ending-up-in-landfills-or-incinerated/>

Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., i Zhang, Y. (2022). A brief review of phenolic compounds identified from plants: Their extraction, analysis, and biological activity. *Natural Product Communications*, 17(1), Article 1934578X211069721. <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>

Zhao, L., Liu, Y., Zhao, L., i Wang, Y. (2022). Anthocyanin-based pH-sensitive smart packaging films for monitoring food freshness. *Journal of Agriculture and Food Research*, 9, 100340. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100340>

Zillich, O. V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., i Kersch, M. (2015). Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(2), 1–20. <https://doi.org/10.1111/ics.12218>

9. Oświadczenia współautorów:



Lublin, 20.08.2025 r.

Mgr Martyna Urszula Krysa
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym:

P1: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, 133430.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133430>

P2: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, 120349.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>

P3: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids – quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form. *Food Research International*, 117335
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>

Mój wkład w powyższe prace obejmował:

- Analiza danych literaturowych
- współudział w opracowaniu koncepcji, metodyki i zakresu badań,
- przeprowadzenie badań laboratoryjnych
- analiza i interpretacja wyników badań,
- wiodący udział w procesie przygotowania, edycji i korekcie wymienionych manuskryptów,
- statystyczne i graficzne opracowanie danych

Podpis

.....
Martyna Krysa

Lublin, 20.08.2025 r.

Dr hab. Monika Szymańska-Chargot prof. IA PAN
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Martyny Urszuli Krysy:

P1: Krysa, M., **Szymańska-Chargot, M.**, Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, 133430.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133430>

P2: Krysa, M., **Szymańska-Chargot, M.**, Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, 120349.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>

P3: Krysa, M., **Szymańska-Chargot, M.**, Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids – quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form. *Food Research International*, 117335

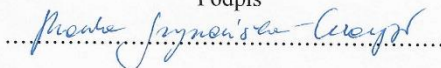
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>

Mój wkład w powyższe prace obejmował:

- pełnienie funkcji kierownika projektu, w ramach którego realizowano badania,
- współdział w opracowaniu koncepcji, metodyki i zakresu badań,
- udział w analizie i interpretacji wyników badań,
- nadzorowanie i współdział w procesie przygotowania, edycji i korekcie wymienionych manuskryptów,
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższe publikacje zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Martyny Urszuli Krysy.

Podpis



Lublin, 20.08.2025 r.

Dr hab. inż. Piotr M. Pieczywek
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniżej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Martyny Urszuli Krysy:

P2: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., **Pieczywek, P. M.**, Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, 120349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>

Mój wkład w poniższe prace obejmował:

- współudziale w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- wykonaniu badań mechanicznych kompozytów,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Martyny Urszuli Krysy.

Podpis
Elektronicznie
podpisany przez
Piotr Pieczywek
Data: 2025.08.20
12:56:26 +02'00'



Lublin, 20.08.2025 r.

Prof. dr hab. Magdalena Frąć
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Martyny Urszuli Krysy:

P2: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., **Frąć, M.**, Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, 120349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>

P3: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Adamczuk, A., Pertile, G., **Frąć, M.**, Zdunek, A. (2025). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids – quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form. *Food Research International*, 117335. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>

Mój wkład w powyższe prace obejmował:

- współudział w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- udział w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycję i korektę manuskryptu,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższe publikacje zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Martyny Urszuli Krysy.

Podpis

.....
Magdalena Frąć



Lublin, 20.08.2025 r.

dr Giorgia Pertile
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Martyny Urszuli Krysy:

P2: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., **Pertile, G.**, Frąc, M., Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, 120349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>

P3: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Adamczuk, A., **Pertile, G.**, Frąc, M., Zdunek, A. (2025). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids – quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form. *Food Research International*, 117335. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>

Mój wkład w poniższe prace obejmował:

- współudział w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- wykonanie badań mikrobiologicznych
- udział w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycje i korektę manuskryptów,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższe publikacje zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Martyny Urszuli Krysy.

Podpis

Pertile Giorgia



Lublin, 20.08.2025 r.

Prof. dr hab. Artur Zdunek
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Martyny Urszuli Krysy:

P1: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., **Zdunek, A.** (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, 133430.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133430>

P2: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., **Zdunek, A.** (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, 120349.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>

P3: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., **Zdunek, A.** (2025). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids – quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form. *Food Research International*, 117335

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>

Mój wkład w powyższe prace obejmował:

- współudział w omówieniu wyników badań,
- współudział w procesie przygotowania i edycji wymienionych manuskryptów,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższe publikacje zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Martyny Urszuli Krysy.

Podpis

.....



Lublin, 20.08.2025 r.

dr Adamczuk Agnieszka
Zakład Fizykochemii Materiałów Porowatych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniżej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Martyny Urszuli Krysy:

P2: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., **Adamczuk, A.**, Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose- and nanocellulose-based films. *Industrial Crops and Products*, 224, 120349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>

P3: Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., **Adamczuk, A.**, Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids – quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form. *Food Research International*, 117335. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>

Mój wkład w poniższe prace obejmował:

- współudziale w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- wykonaniu obrazów z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycji i korekcie manuskryptu,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Martyny Urszuli Krysy.

Agnieszka Adamczuk

10. Aneks – życiorys naukowy

WYKSZTAŁCENIE:

2020 - 2025 – Szkoła doktorska w Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej Nauk Rolniczych, Instytut Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk, Lublin:

- Temat pracy doktorskiej: Wpływ dodatku związków biologicznie czynnych na strukturę i właściwości kompozytów na bazie celulozy mikrofibrylarnej i nanoceluloza
- Promotor pracy doktorskiej: dr hab. Monika Szymańska-Chargot, Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów

2017 - 2019 – Studia magisterskie na kierunku Biologia, specjalność Biochemia, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Lublin:

- Temat pracy magisterskiej: Wpływ stresu biotycznego na zawartość metabolitów wtórnych w liściach *Aesculus hippocastanum L.*
- Promotor pracy magisterskiej: prof. dr hab. Sławomir Dresler, Zakład Fizjologii Roślin, obecnie Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki UMCS

2014 - 2017 – Studia licencjackie na kierunku Biologia, specjalność Biologia medyczna, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Lublin:

- Temat pracy licencjackiej: Alkaloidy indolowe i ich działanie na podstawie wybranych grup związków
- Promotor pracy licencjackiej: dr Renata Bancerz, Zakład Biochemii, obecnie Katedra Biochemii i Biotechnologii UMCS

DOŚWIADCZENIE ZAWODOWE:

- 6-miesięczny staż naukowy w Instytucie Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk – Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Opieka naukowa: dr hab. Monika Szymańska-Chargot prof. IA PAN
- 3-miesięczna praca na stanowisku technika laboratoryjnego w Instytucie Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk – Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Opieka: dr hab. Monika Szymańska-Chargot prof. IA PAN

PROJEKTY BADAWCZE (1):

Członek zespołu projektowego na stanowisku **Stypendysta** projektu badawczego sfinansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu OPUS15 pt. „Badania in vitro oddziaływań polisacharydów w celu zrewidowania istniejących modeli budowy roślinnej ściany komórkowej” (nr projektu UMO-2018/29/B/NZ9/00141)

AKTYWNOŚĆ PUBLIKACJNA (3):

- **Krysa M.**, Szymańska-Chargot M., Adamczuk A., Pertile G., Frąc M., Zdunek A. (2025). Properties of composites based on microfibrillar and nanofibrillar cellulose from apple pomace and two pairs of flavonoids – quercetin/rutin and naringin/naringenin in liposomal form. *Food Research International*, 221, 117335
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117335>
- **Krysa, M.**, Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., Adamczuk, A., Pertile, G., Frąc, M., Zdunek, A. (2025). The effect of surface adsorption of caffeic, chlorogenic, and gallic acids on the properties of cellulose-and nanocellulose-based films, *Industrial Crops and Products*, 224, art. No. 120349
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120349>
- **Krysa, M.**, Szymańska-Chargot, M., i Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, 133430.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133430>

POZOSTAŁE PUBLIKACJE (1):

Dresler, S., Hawrylak-Nowak, B., Kováčik, J., **Pochwatka, M.**, Hanaka, A., Strzemiński, M., Sowa, I., i Wójciak-Kosior, M. (2019). Allantoin attenuates cadmium-induced toxicity in cucumber plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **170**, 120–126.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.119>

UDZIAŁ W KONFERENCJACH NAUKOWYCH (9):

WYSTĄPIENIA USTNE KRAJOWE (4):

- Krysa Martyna, Szymańska-Chargot Monika, Adamczuk Agnieszka, Pertile Giorgia, Frąć Magdalena, Zdunek Artur, A. 2024, „Adsorpcja liposomalnych struktur flawonoidowych na mikrofibrylarne i nanofibrylarnej celulozie”, VII Konferencja Doktorantów pt.: „Cztery Żywioły – Współczesne Problemy w Naukach o Życiu”, Warszawa-Lublin str. 8
- Krysa Martyna, Szymańska-Chargot Monika, Zdunek Artur, 2023, Wpływ adsorpcji wybranych flawonoidów na strukturę i właściwości biokompozytów na bazie mikrofibrylarnej celulozy i nanocelulozy, VI Konferencja Doktorantów pt.: „Cztery Żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu”, Warszawa-Lublin, online, 14.12.2023 r., 37-38
- Krysa Martyna, Szymańska-Chargot Monika, Zdunek Artur, 2021, Wpływ dodatku kwasów fenolowych na strukturę i właściwości kompozytów na bazie mikrofibrylarnej celulozy oraz nanocelulozy, Warsztaty Dla Młodych Badaczy, 25 października, Lublin, Polska, str. 14
- Krysa Martyna, Szymańska-Chargot Monika, 2020, Wykorzystanie spektroskopii wibracyjnej do badania związków fenolowych, III Konferencja Doktorantów "Cztery Żywioły - współczesne problemy w naukach o życiu", Warszawa, 18.12.2020, str. 10

WYSTĄPIENIA USTNE MIĘDZYNARODOWE (3):

- Krysa Martyna, Szymańska-Chargot Monika, Zdunek Artur, 2024, Smart food packaging – pH responsive biocomposites, 23rd International Workshop for Young Scientists „BioPhys Spring 2024”; Lublin, Poland, str. 77-78

- Krysa Martyna, Szymańska-Chargot Monika, Pertile Giorgia, Frąc Magdalena, Zdunek Artur, 2022, influence of the flavonoids addition on the structure and properties of microfibrillar cellulose and nanocellulose-based composites, 21th International Workshop for Young Scientists „BioPhys Spring 2022” Nitra, Slovakia, str. 56-57
- Krysa Martyna, Szymańska-Chargot Monika, 2021, Influence of the phenolic acids addition on the structure and properties of microfibrillar cellulose and nanocellulose-based composites, 20th International Workshop for Young Scientists „BioPhys Spring 2021”, Lublin., Poland str. 62

POSTERY (1):

- Krysa Martyna, Szymańska-Chargot Monika, Zdunek Artur, 2021, Influence of the phenolic acids addition on the structure and properties of microfibrillar cellulose and nanocellulose-based composites, 13th International Conference on Agrophysics: Agriculture in changing climate 15-16 November 2021, Lublin, Poland, str. 137

WYRÓŻNIENIA (2):

- 2024r. - Wyróżnienie przyznane przez komitet naukowy za wystąpienie ustne na VII Konferencji Doktorantów: “Cztery Żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu” za wystąpienie pt.: “Adsorpcja liposomalnych struktur flawonoidowych na mikrofibrylarnej i nanofibrylarnej celulozie”
- 2020r. - Wyróżnienie przyznane przez komitet naukowy za wystąpienie ustne na III Konferencji Doktorantów: “Cztery Żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu” za wystąpienie pt.: „Wykorzystanie spektroskopii wibracyjnej do badania polifenoli”

STAŻ ZAGRANICZNY (1):

Department of Materials and Enviromental Chemistry, Stockholm University, 2-19th June, 2022, Supervisor: Prof. Leopold Luna Ilag

AKTYWNOŚĆ ORGANIZACYJNA (6):

- Reprezentantka II Wydziału PAN - Sekretarz Rady Samorządu Doktorantów Polskiej Akademii Nauk (2021-2022)
- Przewodnicząca w Radzie Samorządu Doktorantów Instytutu Agrofizyki PAN (2021-2022)
- Sekretarz Rady Samorządu Doktorantów Instytutu Agrofizyki PAN (2020-2021)
- Członek Rady Wydziału Instytutu Biologii i Biochemii UMCS w Lublinie (2017-2019)
- Wiceprzewodnicząca Rady Wydziałowej Samorządu Studentów Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS (2017-2019)
- Współzałożyciel i Przewodnicząca Studenckiego Koła Naukowego Fitochemików UMCS (2015 – 2019)

AKTYWNOŚĆ REDAKCYJNA (1):

Książka abstraktów, IV. Konferencja Doktorantów "Cztery Żywioły - współczesne problemy w naukach o życiu" : Lublin, 14 grudnia 2021 r., redakcja: **Martyna Krysa**, Karolina Okoń, ISBN : 9788389969736

AKTYWNOŚĆ POPULARYZATORSKA (4):

- Lubelski Festiwal Nauki (18-24 września 2021) udział w dwóch projektach: „Wybrane właściwości optyczne roztworów, koloidów i zawiesin” oraz „Kolorowe czary mary”
- Organizacja IV. Konferencji Doktorantów "Cztery Żywioły - współczesne problemy w naukach o życiu": Lublin, 14 grudnia 2021 r.
- Organizowanie i udział w Drzwiach Otwartych UMCS (2015 – 2019)
- Organizowanie i udział w Nocy Biologów UMCS (2015 – 2019)