

Gradu Amaierako Lana  
Kimikako Gradua

# Erabilera biomedikoetarako bakterioen aurkako materialak

Egilea:  
Ainara Valverde de Mingo  
Zuzendaria:  
Leyre Pérez Álvarez



# **GRADU AMAIERAKO LANA KIMIKAKO GRADUA**

## **ERABILERA BIOMEDIKOETARAKO BAKTERIOEN AURKAKO MATERIALAK**

**AINARA VALVERDE DE MINGO-K AURKEZTUTAKO MEMORIA**

MATRIKULAZIO ETA DEFENTSA DATA: 2017-ko ekaina eta uztaila

ZUZENDARIA: Leyre Pérez Álvarez

SAILA: Kimika Fisikoa



## **AURKIBIDEA**

<b>1. SARRERA.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PROZEDURA ESPERIMENTALA.....</b>	<b>9</b>
2.1. MATERIALAK.....	9
2.2. SUBSTRATUEN PRESTAKETA.....	10
2.3. FITC-CHI DISOLUZIOAREN PRESTAKETA.....	10
2.4. MULTIGERUZEN ERAIKETA.....	11
2.5. TOPOGRAFIA.....	11
2.6. EZAUGARRITZEKO TEKNIKAK.....	12
2.6.1. X-izpiko espektroskopia fotoelektronikoa (XPS).....	12
2.6.2. Konfokal mikroskopia fluoreszentea.....	12
2.6.3. Kontaktu angelua.....	13
2.6.4. Ekorketazko mikroskopia elektronikoa (SEM).....	14
<b>3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA.....</b>	<b>14</b>
3.1. SUBSTRATUEN AKTIBAZIOA.....	14
3.2. MULTIGERUZEN ERAIKETA.....	16
3.2.1. Fluoreszentzia.....	16
3.2.2. Modifikatutako gainazalen ezaugarriak.....	19
3.3. TOPOGRAFIA.....	21
3.3.1. Titanio laginak.....	22
3.3.2. PET laginak.....	24
<b>4. ONDORIOAK.....</b>	<b>26</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>28</b>

## 1. SARRERA

Bizi kalitatea hobetzeko materialen erabilpena hainbat mendetan zehar aztertua izan da. Ezagunak dira, esaterako, hainbat urtetan erabili izan diren urrezko edo platinozko inplante ez-organikoak. Gaur egun, esparru honetan erabiltzen diren metalen artean titanioa da nagusi, eta ez soilik hortz-inplanteetan, artikulazioen protesietan ere bere biobateragarritasun eta korrosioarekiko erresistentzia altuari esker<sup>1</sup>, alergia sortzen ez dituelako eta modu honetan errefuseko probabilitatea txikitzen duelako.<sup>2</sup>

Azken urteotan polimeroek biomaterialen esparruan arreta handia bereganatu dute, haien moldakortasun paregabeari esker material metaliko edota zeramikoekin alderatuta. Polimeroek ekarpen handia egin dute materialen propietate fisiko, mekaniko eta kimikoei dagokienez, propietate espektro zabala egotea ahalbidetuz. Honek, material hauen garapena eta ikerketa biomaterial moduan suposatu du azken hamarkadetan. Hauen erabilera biomedikuntzan ugaria da, hala nola poliuretanoa bihotz artifizialean<sup>3</sup>, poliakrilonitrilozko dialisirako mintzak<sup>4</sup> edo polimetil metakrilatozko ukipen lenteak<sup>5</sup> besteak beste.

Polimeroen artean polietilen tereftalatoak (PET) arreta handia jaso du biomaterial moduan bere propietate fisiko-kimiko onei esker: propietate mekaniko eta garraio-propietate onak, egonkortasun termikoa eta gardentasun optikoa, eta baita biobateragarritasun moderatua<sup>6</sup> ere. Propietate hauek PET-aren erabilera zabaltzea lortu dute kateter eta inplante baskularrak, gernu-kateterrak, bihotz balbulak etb. egiteko.

Hala ere, polimeroek eta material ez-organikoek, biobateragarritasun arazoak sortzen dituzte giza gorputzean, errefusetan amaitzen dutenak. Nahiz eta hau gertatzeko arrazoi ugari egon, jatorri nagusia bakterioen pilatzeagatik sortzen den biofilma da. Biofilm bat mikrobio-komunitate bat da, matrize polimeriko organiko batean txertatuta, eta gainazal batera itsasten dena.<sup>7</sup> Biofilm hauek material sintetikoetako inplanteetan eratu ohi dira (kateterretan, aldaka artifizialean, hezur

inplanteetan, ukipen-lenteetan...)<sup>8</sup>, ehun zelularrak itsasi baino lehen<sup>9</sup> eta behin erata daudenean zaila da antibiotikoekin konpontzea, biofilm hauek bakterioak babesten dituztelako antibiotiko eta toxinetatik, hauek neutralizatu egiten dituztelako edota ezin direlako biofilmean barrena sartu.<sup>8</sup>

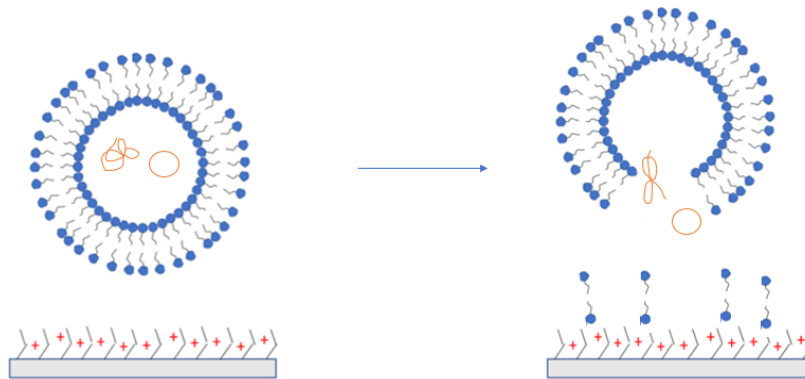
Zorionez, soilik lehenengo 24 orduak inplantearen ezarpenaren ondoren dira erabakigarriak biofilmaren sorrerako, bakterioen adhesioa ekiditen baldin bada denbora honetan ehun zelularrak integratu egiten direlako.<sup>10</sup>

Horregatik, bai material ez-organiko eta bai polimerikoen biobateragarritasuna handitzeko eta bakterioen aurkako ezaugarriak lortzeko modua, gainazalaren eraldaketa izan daiteke. Eraldaketa hauek bi talde nagusitan sailkatu ahal ditugu: alde batetik gainazala kimikoki eraldatzen dutenak, eta bestetik materialaren gainazalean mikro/nano-egiturak sortzen dituztenak.<sup>8</sup>

Eraldaketa kimikoei erreparatuz, hiru estrategia nagusi daude bakterioen pilotzea saihesteko eta hortaz biofilmen sorrera ekiditeko. Lehenengo aukera bakterioen adhesioa murriztea da, horretarako materiala hidrofiliagoa bihurtzea da bide ohikoena. Izan ere, frogatua izan da gainazal energia txikiko materialak (hidrofiliakoak) bakterioen adhesioarekiko erresistenteagoak direla gainazal hidrofoboak baino.<sup>11,12</sup>

Beste estrategia bakterioak kontaktuan hiltzen dituen gainazala lortzea da, oso ikertua izan den "*contact-killing*" deiturikoa.<sup>13</sup> Polimero batzuek propietate hau erakusten dute, esaterako kitosanoak, zeinak bere karga dentsitate positibo altuari esker, mikrobioen negatiboki kargatutako mintz zelularren disrupzioa eragiten duen<sup>14,15</sup> (1.irudia).

Azkenik, antibiotiko edo bioziden askapena gauzatu dezakeen material bat lortzea da. Horretarako, gainazalaren degradazioa edo aukeratutako biozidaren difusioa gertatu behar da.



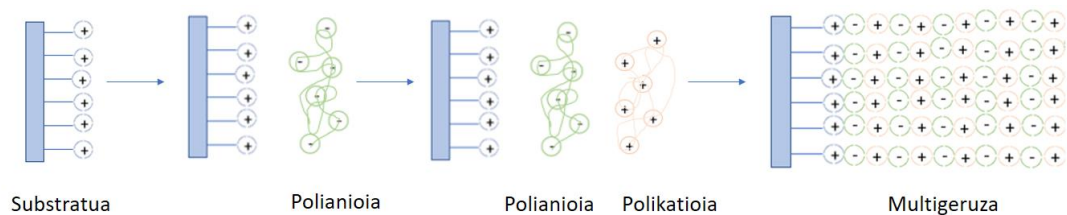
**1. Irudia.** Bakterio mintzen disrupzioa kontaktu bidezko hilketadun gainazalaren ondorioz

Hala ere, bakterioen erresistentziaren ondorioz, batzuetan aipatutako metodoak ez dira nahikoak errefusak ekiditeko, eta aipatutako aukeraz gainera, biobateragarritasunari lagundu diezaioketen beste batzuk bilatu behar dira, esate baterako, protesien integrazioa azkartzeko zelula endoteliarrei itsasteko gaitasuna hobetzen duten materialak<sup>16</sup>, edo tronbosia ekiditzen duten materialak.<sup>17</sup>

Geruz-geruzeko, edo ingelesez *“layer-by-layer”* (LbL) deituriko metodologiak metodo anitz hauek bateratzeko aukera ematen du, horregatik arreta handia jaso du material ezberdinen gainazalen eraldaketa gauzatzeko metodo eraginkor gisa.<sup>18</sup> Metodologia honi esker multigeruzak erraz eraiki daitezke material baten gainazalean, substratuaren gainean geruza desberdinen deposizioa eratuz geruzen artean hainbat indar eratu izatearen ondorioz, hala nola hidrogeno loturak<sup>10,19</sup> edota interakzio elektrostatiakoak.<sup>20</sup>

Polielektrolitodun multigeruzak, (ingelesez PEM deiturikoak: *“polyelectrolyte multilayer”*), elkarren segidako polikatioien eta polianioien adsortzioaren ondorioz eraikitzen dira gainazal solido batean elkarrekintza elektrostatiako bitartez<sup>20</sup> (2. irudia). Lortzen diren multigeruzak egonkortasun handia izan dezakete, geruzen arteko gurutzamendua lortzen delako.<sup>21</sup> Gurutzamendu hau maximoa izateko pHa kontuan izateko parametroa da. Izan ere, pH-aren arabera polikatioien eta polianioien kargak kontrolatu daitezke, polielektrolitoen arteko erakarpena areagotzeko, modu honetan geruzen arteko gurutzamendua handituz.





## 2. Irudia. Polielektrolitodun multigeruzen eraiketaren errepresentazio eskematikoa

Polikatioien eta polianioien naturaren arabera, multigeruzak propietate ezberdinak izango ditu, ez soilik bakterioen aurkako propietateak ahalbidetuz, baizik eta materialaren biobateragarritasuna handituz ere. Esaterako, Qinggang *et al.*-ek<sup>17</sup> polietilenimina/heparina multigeruzak eraiki zituzten altzairu herdoilgaitzean eta tronbosiaren aurkako materiala lortu zuten heparinaren ezaugarrietaz baliotuz.

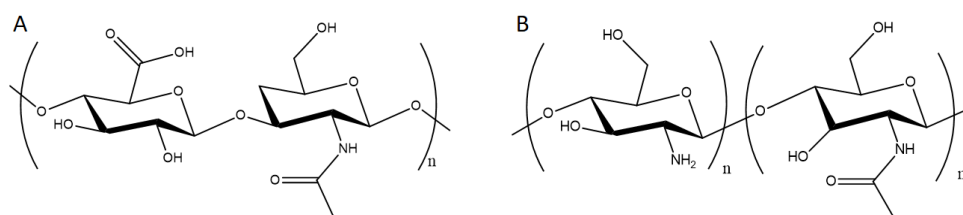
Aipatutako polianioi eta polikatioi bezala, zenbait polisakaridok arreta handia bereganatu dute azken urteetan haien biobateragarritasun eta biodegradagarritasunari esker, haien artean, azido hialuroniko eta kitosano biopolimeroek.

Azido hialuronikoa (HA) (3A irudia) glukosaminoglikano lineal bat da, azido  $\beta$ -(1,4)-*d*-glukuronido eta  $\beta$ -(1,3)-*N*-azetil-*d*-glukosamina disakaridoen unitate errepikatuekin osatuta dagoena.<sup>22</sup> HA konposatu oso hidrofilikoa da, biobateragarria eta biodegradagarria<sup>22</sup>, beraz oso aproposa biomaterial moduan. Bestalde, azido karboxilikoak ditu eta bere pKa 3-4 bitartekoa denez, pH zabal batean negatiboki kargatuta dago<sup>23</sup>, polianioi moduan erabili daitekeelarik polielektrolitodun multigeruzetan. Horretaz gainera, bakterioen itsaspena ekiditu dezake bere hidratazio konstanteari esker, eta baita lortzen den gainazal energia baxuari esker.<sup>11</sup> Sei Kwang *et al.*-ek<sup>24</sup>, azido hialuronikoak gainazalaren hidrofilitatea handitzen zuela bermatu zuten HA/poli-L-lisina multigeruzak eraikiz beiran.

Kitosanoa (CHI) (3B irudia) (1→4) lotutako *N*-azetil- $\beta$ -*D*-glukosamina eta  $\beta$ -*D*-glukosamina monomerodun ausazko kopolimeroa da<sup>25</sup>, eta arreta handia bereganatu du hainbat esparrutan (janari-esparruan, kosmetikoetan, esparru farmazeutikoan...) bere biodegradagarritasunari, biobateragarritasunari eta ez-

toxikotasunari esker.<sup>26</sup> Gainera, lehen aipatutako *kontaktu bidezko hilketa* propietateari esker oso aztertua izan da bakterioen aurkako materialak eraikitzeko.

Hala ere, kitosanoa ezin da definitu biomaterial apropos moduan fibroblastoen *in vitro* kultibatzerako, fibroblastoen murrizketa lortzen duelako.<sup>27</sup> Horregatik, kitosanoa beste konposatu batzuekin erabili ohi da. Beste batzuen artean, Jinhong *et al.*-ek<sup>28</sup> kitosano eta heparina multigeruzak eraiki zituzten polietilen tereftalatoan, eta modu eraginkorren bakterioak kontaktuan hiltzen zituen materiala lortu zuten. Hongbin *et al.*-ek<sup>20</sup> berriz, kitosano/alginato multigeruzak eraiki zituzten titanio substratuetan, bakterioen aurkako propietate oso onak zituen materiala lortuz, eta Jou *et al.*-ek<sup>27</sup> HA/CHI multigeruzak eraikitzean behatu zuten bakterioen pilatzea ekiditeaz gainera, fibroblastoen ugaritzea lortzen zela.



### 3. Irudia. A) Azido hialuroniko eta B) Kitosanoaren egitura molekularren errepresentazio eskematikoak

HA/CHI multigeruzak gainazal ugarien gainean eraiki daitezke frogatu da, propietate oso interesgarriak lortuz. Richert *et al.*-ek<sup>29</sup> behatu zuten HA/CHI PEM-ak *Esterichia coli* bakterioaren adhesioa %80-ean murrizten zutela, eta Jeroen *et al.*-ek<sup>30</sup> CHI/HA multigeruzak eraiki zituztenean PDMS gainazaletan, HA-ren hidrofilitate altuari esker proteinen adsortzioa ekiditzen zela ere ikusi zuten. Bestalde, Adam *et al.*-ek<sup>31</sup> HA/CHI PEM-ak eraiki zituzten polipropilenoan, eta multigeruzak arrakasta handiarekin eraiki ahal zirela gainazal hidrofobikoetan ikusi zuten gurutzamendu altuko geruzak lortuz. Honetaz gainera, ikusi da HA/CHI multigeruzak egonkorrak direla pH tarte handi batean. Kujawa *et al.*-ek<sup>32</sup> behatu zuten bi polielektrolito hauen arteko indar elektrostatikoak egonkorrak zirela pH 3.5-9.0 tartean.

Bakterioen adhesioan eragina duen beste faktore bat gainazalaren topografia da. Topografiaren aldaketak eragin desberdina izan dezake substratu batean, alde batetik hidrofobizitatea aldatzen duelako baina bestetik topografiaren tamainaren arabera bakterioen adhesioa ekiditu edo areagotu dezakeelako.<sup>8</sup>

Hasteko, aipatu behar da topografia eta bakterioen aurkako propietateen arteko erlazioa kontraesankorra izan dela hainbat ikerketetan.<sup>8</sup> Zenbait ikerlariren arabera, ez dago erlazio zuzen bat topografiaren eta bakterioen adhesioaren artean.<sup>33,34</sup> Beste ikerlari askok berriz, gainazalaren zimurdurak bakterioen erretentzioa areagotzen duela ziurtatzen dute. Whitehead *et al.*-en<sup>35</sup> arabera, kontraesan hauek eraikitako topografiaren dimentsioengatik izan daitezke, eta haien ikerketan adierazi zuten mikroorganismoak baino dimentsio askoz handiagoak dituzten topografiek ez dutela eragin handirik izango adhesioan.<sup>36</sup> Gaur egun agertu diren teknologia berriei esker, posiblea da mikro eta nanotopografiadun gainazalak sortzea, bakterioen adhesioa murriztu dezaketenak, adhesinak kokatzea ekiditen dutelako edota haien 3D konfigurazioa apurtzen dutelako.

Izan ere, naturan, haien nanotopografiari esker bakterioen edota adhesioaren aurkako ezaugarriak dituzten gainazal ugari aurki ditzakegu, eta hauetan oinarritutako materialek arreta handia erakarri dute azken urteotan, hala nola lotus hostoa, zeinak bere superhidrofobizitate eta topografiari esker *auto-garbiketa* gauzatzen duen gainazala lortzen duen (ingelesez *self-cleaning* deiturikoa).<sup>8,37,38</sup> Prozesu honetan, gainazalean pilatu diren partikulak kendu egiten dira ura edota beste jariakin bati esker, eta behatu da nola prozesu hau faboratu egiten den topografiadun gainazal superhidrofobikoetan<sup>37</sup>, bakterioek ez daukatelako adhesinak kokatzeko gainazal egokirik, eta hortaz erraz askatu daitezkelako likidoren bat pasaraztean.

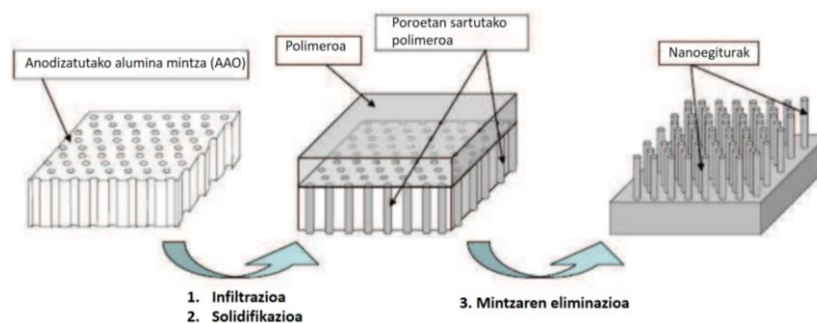
Hala ere, ikusi egin da gainazal superhidrofiliko naturalek ere *auto-garbiketa* pairatu dezaketela, marrazoen kasuan gertatzen den bezala, zeinak bakterioen aurkako propietate oso onak erakutsi dituen.<sup>38-40</sup> Izan ere, gainazalaren energia baxuari esker, bakterioen adhesioa txikia da, eta urarekin dagoen kontaktu angelu txikiaren

eraginez gainazala oso erraz garbitu daiteke.<sup>41</sup> May *et al.*-ek<sup>40</sup> fenomeno hau ikertu zuten, eta marrazoan azalean oinarritutako mikrotopografia (2  $\mu\text{m}$ -ko motiboak, 3  $\mu\text{m}$ -ko altuerarekin) eman ziotenean prentsa hidrauliko bati esker poliuretanozko kateterrei, bakterioen pilatzea murrizten zela ikusi zuten.

Gainazal biomimetikoetatik gainera, espero da mikro edo nanotopografia daukaten beste hainbat materialek bakterioen adhesioa murriztea, frogatu egin delako proteinen 3D konfigurazioa apurtzen dutela, eta espero da efektu berdina izatea bakterioen adhesinetan.<sup>8</sup>

Hala ere, guzti hau oraindik dago ikerketapean, eta zehaztear dago hainbat parametroek daukaten garrantzia, hala nola topografiaren forma (pilareak, esferak, etb.), sakabanatze modua (ausazkoa edo ordenatua), eta baita ere motiboen tamaina eta gainazalaren erantzuna. Horregatik azken hamarkadan asko handitu dira gai honi buruzko ikerketak, topografia ezberdina sortzeko hainbat metodo ikertuz.

Horietako batzuk ohiko litografia metodoak dira, hala nola fotolitografia (UM-ikuskorreko fotoiak igorritzen dira errexina batera, hau gogortzeko edo biguntzeko asmoarekin patroi bat sortzen delarik), elektro-sorten bidezko litografia (elektroi sorta bat askatzen da laginean loturak apurtu eta eratzen dituen, lagina gogortuz edo bigunduz, modu honetan patroi bat sortuz) edo laserraren bidezkoa (materiala marratzen da laser bat erabiliz). Metodologia hauek haien koste altuagatik<sup>42</sup>, ekipo bereziengatik eta substratuek pairatzen dituzten tenperatura eta erradiazio dosi altuengatik ezaugarritzen dira. Arazo hauengatik, azken hamarkadetan material hauskorragoentzat teknika litografiko aproposagoak garatu dira, haien artean mintz nanoporotsuen bidezko nanoestruturazioa. Metodo honetan, polimero edo erretxina likido batean kokatzen dira mintzak presioa egiten, konposatua poroetatik sartzean topografia eratzen delarik (4. irudia). Mintz hauek anodizatutako aluminazko mintzak izan ohi dira (AAO), zeinek poroen diametro eta luzera ezberdinen espektro zabala ahalbidetzen duten, eta horretaz gainera, haien kostua nahiko baxua da eta poroak modu ordenatuan daude kokatuak.<sup>43</sup>



#### 4. *Irudia.* AAO mintzak erabiliz topografiaren eraketa<sup>43</sup>

Gainazalen diseinuaren, multigeruzen eta topografiaren potentziala kontuan izanik, lan honek HA/CHI multigeruzak eraikitzea du helburu bi substratu desberdinen gainean, LbL teknikaren moldagarritasuna frogatzeko. Alde batetik titanioa erabiliko da substratu ez-organiko moduan, eta bestetik polietilen tereftalatoa substratu polimeriko gisa. Honetaz gainera, gainazalaren topografiaren eragina aztertuko da, gainazalaren eraldaketa kimikoa multigeruzen eraiketaren bitartez eta gainazalaren nanostrukturazioa konbinatuz. Titanio laginetan laser baten bidez eraturako mikrotopografiaren gainean eraikiko dira multigeruzak, eta PET laginen kasuan, behin geruzak eraikita egon, AAO iragazien bidez nanotopografia emango zaie estanzazioaren bidez. Substratuen gainazalaren eraldaketa honen bidez haien biobateragarritasuna handitzea espero da, errefusak eta infekzioak sortzen dituzten biofilmak ekidi ditzaketen biomaterialak lortzeko modu erraz eta merke bat posiblea dela egiaztatuz.

## 2. PROZEDURA

### 2.1. MATERIALAK

PET filmak (75  $\mu\text{m}$ ) *HIFI film industria*-tik lortu ziren. Filmen garbiketarako etanola (*Panreac*) erabili zen, eta aminolisirako metanola eta etilendiamina (*Panreac*, %99,5 eta %99-ko purutasunarekin hurrenez hurren) erabili ziren. Azido klorhidrikoa *Panreac* etxekoa izan zen ere, %37-ko purutasunarekin. Topografia emateko erabili ziren alumina anodizatuko mintzak *Whatman* etxekoak izan ziren, iragazien diametroa 13 mm-koa, lodiera 60  $\mu\text{m}$ -koa, eta poroen diametroa 0.2  $\mu\text{m}$ -koa zirelarik.

Titanio laginak Ti-6Al-4V aleaziokoak izan ziren, CIDETEK hornitzailearenak. Gainazal lauko laginak mekanikoki izan ziren leunduak, eta topografiadunak 100 µm-ko lodieradun eta 80 µm-ko sakoneradun marrak zituen, laser baten bidez lortutakoak (350 mm/s, 30 kHz). Laginen hidroxilaziorako, azido sulfurikoa (*Panreac*, %96) eta hidrogeno peroxidoa (*Foret*, %30) erabili ziren. Silanizaziorako erabili zen 3-aminopropiltriethoxisilanoa *Acros Organics* etxekoa izan zen %99-eko purutasunarekin.

Multigeruzen eraiketarako azido hialuronikoa (*Sigma Aldrich*, 0,1-0,6 MDa) eta kitosanoa (*Sigma Aldrich*, Medium Weight) erabili ziren. Kitosano disoluzioa %1 azido azetiko (*Sigma Aldrich*, >%99) disoluzioan prestatu zen, eta pH=5,5-ra doitu zen NaOH (*Panreac*, %99) erabiliz. Kitosanoa fluoreszenteki markatzeko isotiozianato fluoreszeina (*Sigma Aldrich*, >%90) erabili zen, eta bere garbiketa egiteko dialisirako mintzak erabili ziren (*Medicell Membranes Ltd*, 7000 Dalton). Soberako polielektrolitoak kentzeko azetiko/azetato tanpoi disoluzioa erabili zen (pH=5), azido azetiko (*Sigma Aldrich*, >%99) eta NaOH (*Panreac*, %99) erabiliz prestatu zena.

## **2.2. SUBSTRATUEN PRESTAKETA**

Hasteko 4x2 cm-ko PET laginak garbitu ziren etanolean eta uretan, 20 minutuz sonikatuz (3 aldiz). Gainazala guztiz lehortuta izatean aminolisia gauzatu zen. Horretarako etilendiamina/metanol (40/60) (v/v) disoluzio batean murgildu ziren 90 minutuz lagin bakoitza isolatuz, 50 °C eta 200 rpm-tan irabiatuz. Ondoren, laginak HCl 0,1 M zen disoluzio batean 3 orduz eta inguru tenperaturan irabiatuz aktibatu ziren, tratamendu ostean lehertzeko huts ponpa erabiliz.

Titanio laginak 15 minutuz garbitu ziren disolbatzaile organikoetan (azetona eta etanola) eta uretan aldizka sonikatuz, eta N<sub>2</sub> gasa erabiliz lehortu ziren.

Titaniozko laginak H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (%96): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30) (3:1) nahaste batean sartuz hidroxilatu ziren eta irabiatzen ordu batez mantendu ziren. Ondoren, laginak %2 (v/v) zen 3-aminopropiltriethoxisilano disoluzioan sartu eta irabiatu ziren beste ordu batez.

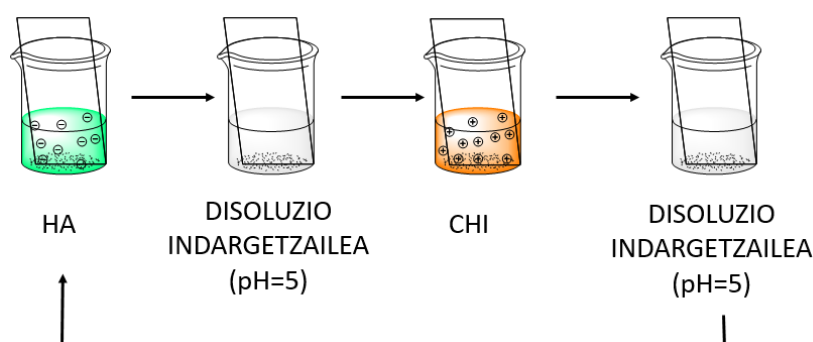
Tratamendu honen ostean laginak uraz (3 aldiz) eta azetonaz (5 aldiz) garbitu ziren, ondoren N<sub>2</sub> gasa erabiliz lehortuz.

### 2.3. FITC-CHI DISOLUZIOAREN PRESTAKETA

FITC-rekin markatutako kitosanoa lortzeko, pH=6,8-ko CHI disoluzio bat (1g/L-koa, %1 azido azetikotan) prestatu zen NaOH disoluzio kontzentratu batez doituaz. Disoluzio hori (100mL) 2g/L (metanoletan) zen FITC disoluzio batekin (50mL) nahastu ondoren, 20 orduz ilunpean eta irabiaketa konstantepean mantendu zen. Amaitzeko, disoluzioa dializatu egin zen hainbat aldiz metanol:ura (70:30) nahastean fluoreszentzia desagertu arte.

### 2.4. MULTIGERUZEN ERAIKETA

10 geruza eraiki ziren, hau da, 5 HA/CHI bigeruza. Hasteko, amino-funtzionalizatutako PET eta titanio laginak, murgildu ziren 1g/L zen azido hialuroniko disoluzio batean 15 minutuz eta segidan pH=5 zuen disoluzio indargetzailean garbitu ziren. Ondoren, 1g/L-ko kontzentrazioa zuen CHI disoluzio batean 15 minutuz murgildu ziren eta pH=5-ko disoluzio indargetzailean ere garbitu ziren. Bi disoluzio hauetan murgiltze prozesua errepikatu zen nahi ziren geruza kopurua lortu arte. Bukatzean, laginak ur destilatuan garbitu ziren gatz arrastoak kentzeko. Murgiltze prozeduraren eskema 5. irudian laburtzen da.



#### 5. Irudia. Multigeruzak eraikitzeko jarraitutako urratsak

Fluoreszentziadun multigeruzak eraikitzeko jarraitutako urratsak aurrekoen berdinak izan ziren, baina kitosanoa erabili ordez, FITC-rekin markaturiko

kitosanodun disoluzioa erabili zen, 1g/L-koa. 20 geruza eraiki ziren (10 bigeruza), fluoreszentiaren hazkuntza konfokal mikroskopioan behatuz.

## **2.5. TOPOGRAFIA**

PET laginei topografia eman zitzaien AAO mintzak erabiliz. Lehenengo saiakeran laginak bi orduz hidratatu ziren azetato tanpoian (pH= 5), eta ondoren 1 kg-ko pisua erabili zen 0,14 bar-eko presioa ezartzeko 90 minutuz. Bigarren saiakeran berriz 17 orduz eduki ziren laginak hidratatzen eta ondoren prentsa erabili zen 20 minutuz presio ezberdinak emateko: 10 eta 32 bar. Aluminak laginetatik banatzeko, lehortzen utzi ziren eta ondoren lagina tolestuz kendu ziren.

## **2.6. EZAUGARRITZEKO TEKNIKAK**

### **2.6.1. X-izpiko espektroskopia fotoelektronikoa (XPS)**

Teknika honetan  $h\nu$  energiako fotoi batek eraso egiten die gainazalean kokatutako atomoei, eta efektu fotoelektrikoaren ondorioz fotoelektroien igorpena gertatzen da, hurrengo energiarekin:

$$EB = h\nu - EK - W$$

non  $h\nu$  fotoien energia den, EK ekoiztutako fotoelektroiaren energia zinetikoa, W espektrofotometroaren lan funtzioa eta EB lotura energia (elektroia modu espezifikoan identifikatzen duen parametroa).

Beraz, funtsean, x izpiekin erasotzen da gainazala eta aldi berean bai energia zinetikoa eta bai ihes egiten duten elektroikopurua neurtzen dira.

Substratuen gainazaleko konposizioa aztertu zen Phoibos 150 1D-DLD tresnaz baliatuz, iturri gisa Focus 500 erradiazio monokromatikoa erabiliz, Al/Ag anodo dualarekin.

### **2.6.2. Konfokal mikroskopia fluoreszentea**

Mikroskopia konfokalean argi iturria laser bat da, lagina argitzen duena altuera ezberdinetan, sekzio optikoak sortuz. Honi esker, hiru dimentsioko irudiak lortu daitezke, plano ezberdineko irudiak biltzearen ondorioz. Igorritako laserra ispilu



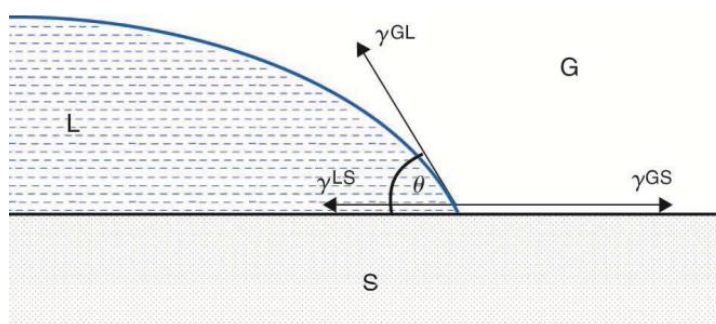
dikroiko batean islatzen da, eta lagina eskaneatzen du fokoaren planoan, modu honetan fluorokromoaren fluoreszentzia eraginez, fotoiak igorri plano fokal berean. Fotoi hauek ispilu dikroikoa zeharkatzen dute eta fotodetektagailura heltzen dira *pinhole*-a (fotodetektagailura baino lehen dagoen zirrikitua) zeharkatuz. Beste plano batzuetako fluoreszentzia emisioak ez dira detektagailuaren pinholarekiko konfokalak, eta hortaz honek blokeatu egiten ditu. Detektagailura heldutako argia fotomultiplikatzailer batera heltzen da, seinale elektriko bilakatuko duena. Z fokuko irudia lortzeko, laserrak gainazala eskaneatzen du x-y planoan, eta ondoren berdina egiten du beste foku batean, modu honetan laginaren hainbat planoetako irudiak lortuz.

FITC-rekin markaturiko kitosanodun multigeruzen gainazala aztertu egin zen Olympus FluoView-FV500 konfokal mikroskopioaz baliatuz.

### 2.6.3. Kontaktu angelua

Kontaktu angelua likido batek solido batekin kontaktuan jartzean eratzen den angeluari deritzo. Gainazal solido baten eta tanta likido baten arteko kontaktu angelua hiru fasearte tentsioen araberakoa da (6. irudia), Young ekuazioan (1) adierazten den bezala, non  $\gamma_{GS}$ ,  $\gamma_{LS}$  eta  $\gamma_{GL}$  gas-solido, likido-solido eta gas-likido fasearten gainazal tentsioak diren.

$$\gamma_{GS} = \gamma_{LS} + \gamma_{GL} \cos \theta \quad (1)$$



### 6. Irudia. Ur tanta baten kontaktu angelua

Kontaktu angelua  $90^\circ$  baino txikiagoa denean esaten da materiala hidrofilikoa dela, eta  $90^\circ$  baino handiagoa denean berriz, hidrofobikoa. Beraz teknika simple honi

esker material baten hidrofilitate edo hidrofobizitatea aztertu daiteke modu erraz batean.

Gainazalen kontaktu angeluaren neurketak Neurtek Dataphysics OCA 15EC Instruments sistema optikoarekin egin ziren, 2  $\mu$ L-ko ur destilatu tantak erabiliz neurketa bakoitzean.

#### **2.6.4. Ekorketazko mikroskopia elektronikoa (SEM)**

Ekorketazko mikroskopia elektronikoan elektroio sorta bat askatzen da eremu elektrikoak erabiliz, laginaren gainazalaren kontra talka eginez. Hau gertatzean, interakzioak gertatzen dira elektroio erasotzaileen eta laginaren beraren elektroien artean. Detektagailu batek interakzio horien emaitzak jasotzen ditu, eta laginaren gainazalaren hiru dimentsioko irudi bat lortu daiteke. 3 eta 20 nanometro bitarteko bereizmena du, eta horri esker materialen bereizmen handiko irudiak lor daitezke. Lagina metalikoa ez denean, metalezko geruza mehe matez estaltzen da, normalean urrezkoa.

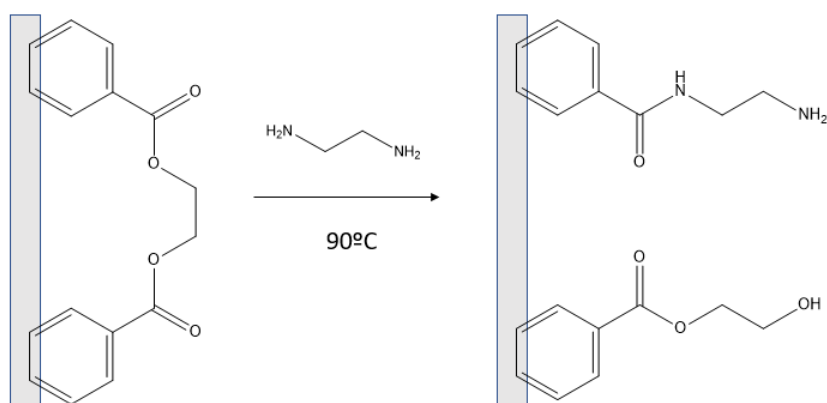
Filmen gainazala eta perfila aztertu ziren mikroskopia elektronikoaren bidez HITACHI S-4800 mikroskopia erabiliz. Filmen perfilen irudiak lortzeko laginak krioapurketaren bidez prestatu ziren N<sub>2</sub> likidoarekin hoztuz. Azkenik laginak urrezko geruza mehe batekin estali ziren.

### **3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA**

#### **3.1. SUBSTRATUEN AKTIBAZIOA**

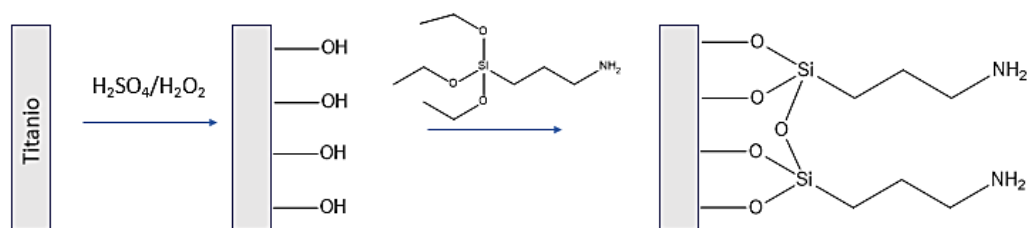
Hasierako PET eta titanio (mekanikoki leundutakoa eta laserrarekin marratutakoa) substratuek arazo berdina aurkezten dute: substratu geldoak dira. Beraz, polisakaridoen atxikimendua ahalbidetzeko, gainazalaren aktibazioa gauzatu behar da lehendabizi, bai plasma erabiliz edota kimikoki. Kimikoki egiten bada hainbat erreakzio posible aurkitzen ditugu funtzio talde ezberdinak sartzeko. Pérez *et al.*-ek<sup>22</sup> polietilen tereftalatoaren hidrolisia gauzatu zuten gainazala aktibatuz. Chua *et al.*-ek<sup>44</sup> berriz, titanioaren gainazala aktibatu beharrean funtzio talde bat sartuz, PEI geruza aitzindari bat kokatu zuten ondorengo geruzen atxikimendua

bermatzeko, eta Benjamin *et al.*-ek<sup>45</sup> gauza bera egin zuten Ni-Ti materialetan. Lan honetan bi substratuen gainazala funtzionalizatu da amino taldeekin, karga positiboak ezartzeko eta horrela polianioia modu egonkorrago batean atxikitua geratu ahal izateko. Polietilen tereftalatoaren kasuan, aminolisi bat gauzatu da etilendiamina erabiliz, non diaminek eraso nukleofilikoa egiten dute ester loturetan<sup>46</sup> (7. irudia).



**7. Irudia.** PET-aren etilendiaminaren bidezko aminolisiaren errepresentazio eskematikoa

Titanioaren kasuan berriz, amino-funtzionalizatutako gainazala lortzeko, lehenengo hidroxilazioa gauzatzen da eta ondoren aminopropiltrietoxisilanoaren bidezko silanizazio baten bidez lortu daitezke amino taldeak, Lv *et al.*<sup>20</sup> proposatu zuten metodoa jarraituz (8. irudia).



**8. Irudia.** Titanioaren amina taldeak ezartzeko errepresentazio eskematikoa

Gainazala amino-funtzionalizatu egin dela bermatzeko XPS bidez aztertu da, gainazalaren konposizioa ikasiz. 1. taulan ikusten den moduan, bai PET laginetan eta bai titanioan, N-ren presentziaren handipena behatu zen  $-NH_2$  taldeen

txertaketaren ondorioz, funtzionalizazio erreakzioak modu arrakastatsu batean gertatu zirela frogatuz.

**1. Taula.** *Substratuen XPS analisia amino-funtzionalizatu baino lehen eta ondoren.*

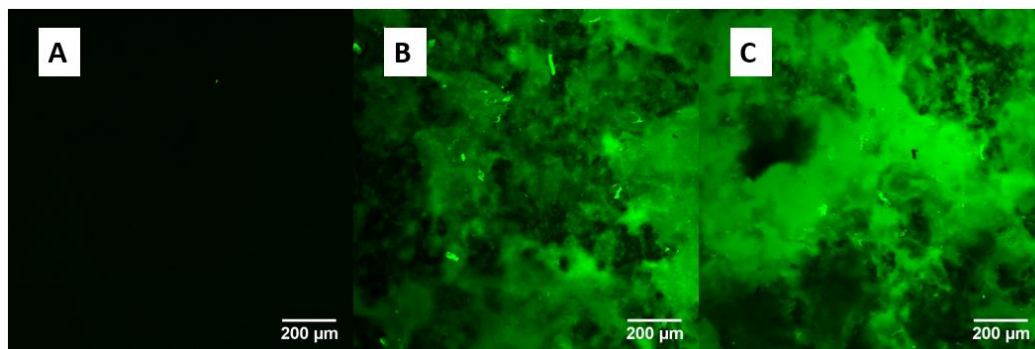
	<b>PET garbia</b>	<b>Amino-funtzionalizatutako PET</b>
<b>%C</b>	73,5	70,9
<b>%O</b>	26,5	27,5
<b>%N</b>	0	1,6
	<b>Leundutako Ti garbia</b>	<b>Amino-funtzionalizatutako Ti (leundutakoa)</b>
<b>%C</b>	46	32,7
<b>%O</b>	40,7	45,9
<b>%Ti</b>	12,7	14,2
<b>%N</b>	0,6	2,6
	<b>Topografiadun Ti garbia</b>	<b>Amino-funtzionalizatutako Ti (topografiaduna)</b>
<b>%C</b>	47,7	52,5
<b>%O</b>	34,8	34,5
<b>%Ti</b>	7,6	7,9
<b>%N</b>	1,6	5,2

### 3.2. MULTIGERUZEN ERAIKETA

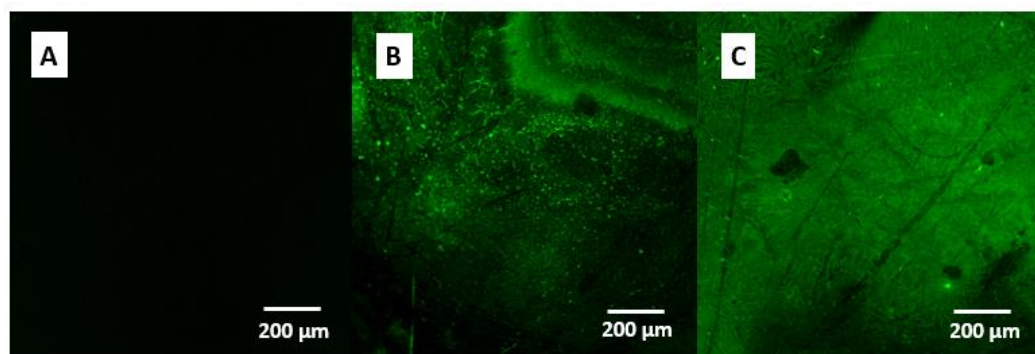
#### 3.2.1. Fluoreszentzia

Substratuen bakterioen aurkako propietateak eta biobateragarritasuna handitzeko, HA/CHI multigeruzak eraiki dira LbL teknikaz baliatuz. Multigeruzen hazkuntzaren bermatzea FITC-rekin markaturiko kitosanoa erabiliz oso ikasia izan da, LbL prozesuari jarraitzeko oso erabilgarria dela ikusi delako. Liu *et al.*-ek<sup>16</sup> LbL metaketa aztertu zuten korindroin sulfato eta FITC-CHI multigeruzadun PET filmetan, eta ultramore-ikuskorreko espektroskopiari esker geruzen hazkundera bermatu zuten. Fu *et al.*-ek<sup>28</sup> metodo hau erabili zuten heparina eta FITC-CHI multigeruzak eraikitzean PET-ean, eta Richert *et al.*-ek<sup>29</sup> berriz, FITC-rekin markatutako kitosanoari esker geruzen arteko difusioa behatu zuten.

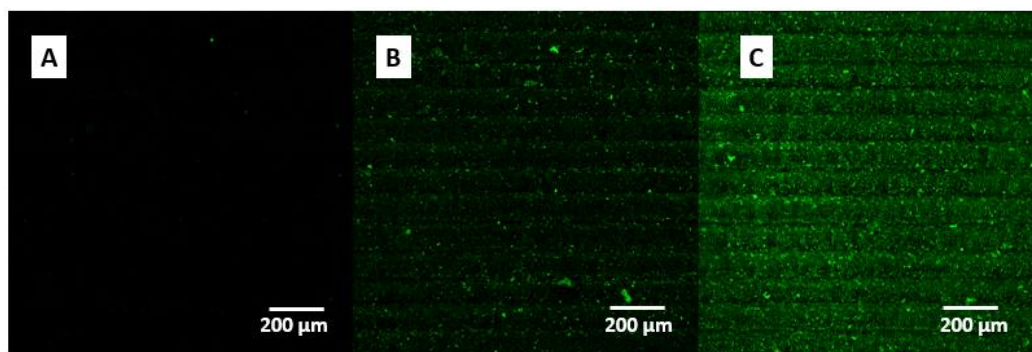
Horregatik, HA/FITC-CHI multigeruzak eraiki ziren bai PET-ean eta bai titanioan, eta konfokal mikroskopioko irudien bidez behatu zen multigeruza eraketa fluoreszentiaren hazkundearen bitartez. 9. irudian PET laginean eraikitako HA/FITC-CHI multigeruzen ondorioz areagotzen den fluoreszentzia beha daiteke, eta 10. eta 11. irudietan berdina titanioaren kasuan (mekanikoki leundutako laginetan eta laserraren bidez modifikatutako laginetan hurrenez hurren).



**9. Irudia.** Polietilen tereftalatoan eraikitako HA/CHI-FITC multigeruzen irudiak konfokal mikroskopiaan (375V-tan lortutakoak): A) Geruzarik gabe, B) 5 HA/CHI-FITC bigeruzekin eta C) 10 HA/CHI-FITC bigeruzekin.



**10. Irudia.** Mekanikoki leundutako titanioan eraikitako HA/CHI-FITC multigeruzen irudiak konfokal mikroskopiaan (520V-tan lortutakoak): A) Geruzarik gabe, B) 5 HA/CHI-FITC bigeruzekin eta C) 10 HA/CHI-FITC bigeruzekin.



**11. Irudia.** Laserrarekin modifikatutako titanioan eraikitako HA/CHI-FITC multigeruzen irudiak konfokal mikroskopioan (363V-tan lortutakoak): A) Geruzarik gabe, B) 5 HA/CHI-FITC bigeruzekin eta C) 10 HA/CHI-FITC bigeruzekin.

Ikus daitekeen moduan, lagin guztietan fluoreszentiaren handipena behatzen da geruza kopurua handitzean. Honetaz gainera multigeruzen kokapenari buruzko informazioa ere lortu daiteke. 9. eta 10. irudietan: nahiz eta gainazala leuna izan, ikus daiteke nola kitosanoa ez den homogeneoki kokatzen gainazal osoan. Emaitza hau espero zen bi arrazoiengatik: hasteko materialetan gauzatzen dugun amino-funtzionalizazioa ez da homogeneoa, hau da, gainazalaren puntu batzuetan amino talde gehiago aurkituko ditugu beste batzuetan baino. Ondorioz, gainazalaren atal horretan polielektrolito gehiago egongo dira gainazalera itsatsita. Bestetik, multigeruzen arteko gurutzamendu eta difusioaren norabidea ausazkoa da, eta horregatik ezin da espero gainazal osoan kitosano edo azido hialuroniko kantitate bera egotea.

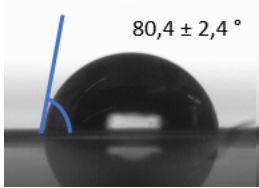


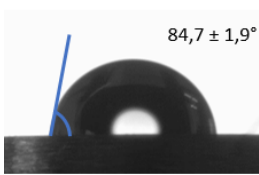
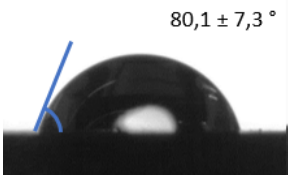
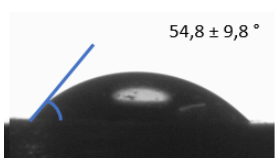
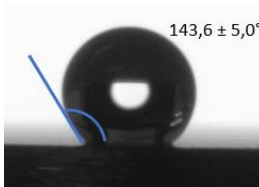
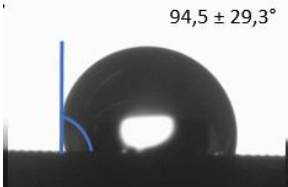
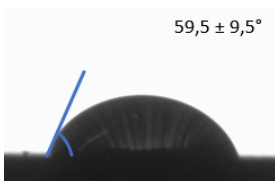
Horretaz gainera aipatu behar da laserrarekin modifikatutako laginen kasuan multigeruzak gainazalaren bai goialdean eta bai hutsunetan atxikitzen diren, eta ez soilik hori, baizik eta modu egonkorrago batean geratzen dira itsatsita mekanikoki leundutako laginarekin konparatuz. Izan ere, laserrarekin modifikatutako laginen fluoreszentzia behatzeko laserraren potentzia baxuagoa erabili zen, mekanikoki leundutako laginen baldintza berdinak erabiltzean mikroskopioa saturatu egiten zelako.

Lampin *et al.*-ek<sup>47</sup> PMMA substratuen zimurtasuna eta zelulen adhesioaren arteko erlazioa aztertu zuten, eta proteinen adhesioaren handipena ikusi zuten, ehun zelularren adhesioa eta proliferazioa handitu zuena. Richard *et al.*-ek<sup>48</sup> topografiadun silika gel baten adhesioa aztertu zuten tontor eta haranetan, eta ikusi zuten partikulen adhesioa haranetan handiagoa zela. Beraz, posiblea da polisakaridoak gehiago itsastea topografiadun titanioan haran horiei esker. Dena den, honek eduki ditzakeen eraginak aurrerago eztabaidatuko dira.

### 3.2.2. Modifikatutako gainazalen ezaugarriak

Aztertutako bi substratuak hidrofobikoak dira, beraz, gainazalaren eraldaketa gertatu dela frogatu daiteke, beraien gainazaleko ezaugarriak aldatzen direlako, hala nola hidrofilia. Hau kontaktu angeluaren bidez kuantifikatu daiteke. Lortutako kontaktu angeluak 2. taulan ikus daitezke.

**2. Taula.** Substratu ezberdinen gainean lortutako kontaktu angeluak

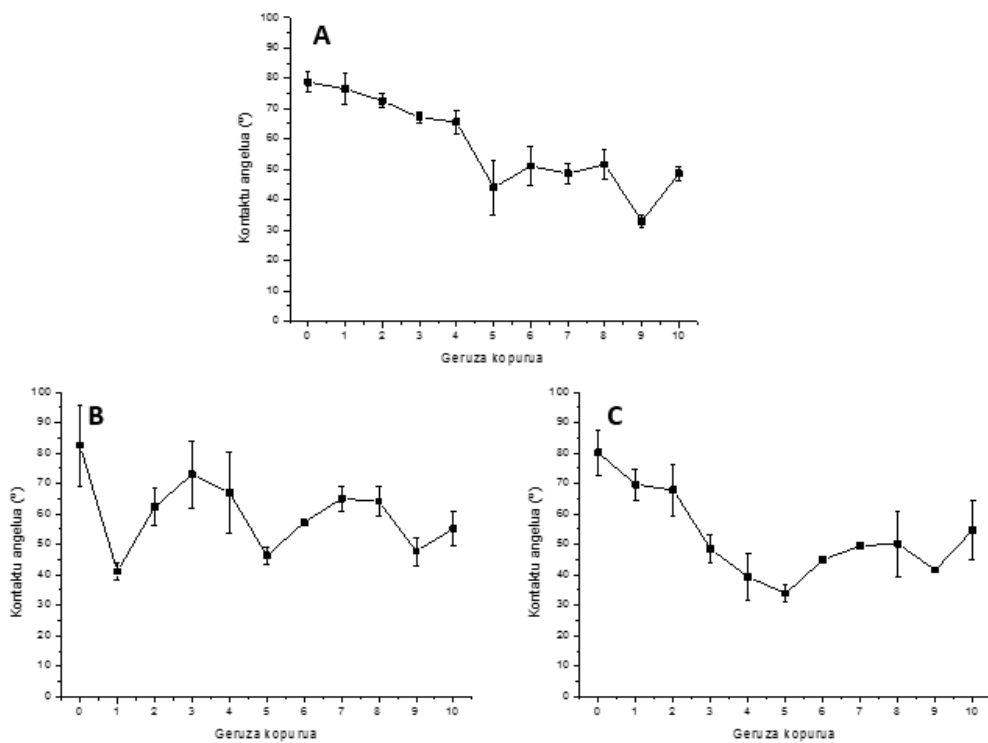
	Garbiak	Amino-funtzionalizatuak	5 HA/CHI bigeruzekin
PET	 $80,4 \pm 2,4^\circ$	 $78,8 \pm 10,6^\circ$	 $48,6 \pm 2,3^\circ$
Mekanikoki leundutako titanioa	 $84,7 \pm 1,9^\circ$	 $80,1 \pm 7,3^\circ$	 $54,8 \pm 9,8^\circ$
Laserrarekin modifikatutako titanioa	 $143,6 \pm 5,0^\circ$	 $94,5 \pm 29,3^\circ$	 $59,5 \pm 9,5^\circ$

Ikusten den moduan, hasierako substratuek hidrofilitate baxua dute tratamendurik jaso ez dutenean, beraien kontaktu angeluak  $\sim 80^\circ$ -koak baitira gainazal lauen kasuan, eta  $\sim 140^\circ$ -koak topografiadun titanioaren kasuan. Gainazala amino-funtzionalizatu ondoren, kontaktu angelua murriztu egiten da, talde hidrofiliiko hauek ezartzeari esker. Avadanei *et al.*-ek<sup>46</sup> PET gainazalen aminolisia ikasi zuten substratu ezberdinekin, eta kontaktu angeluaren murriztea gainazalaren hidrofilitatearen hazkuntzarekin lotu zuten, amino taldeen kontzentrazioari esker lortzen zena.

Multigeruzak ezartzean, gure substratuak oraindik ere hidrofiliikoagoak bihurtzen dira,  $50-60^\circ$ -ko angeluak lortuz. Titanio laginei erreparatzen badiegu, ohartzekoa da nahiz eta topografiadun lagina askoz hidrofobikoagoa izan hasieran, prozesu guztia amaitzean eta multigeruzak ezarrita daudenean, bai titanio laua eta bai topografiaduna antzeko kontaktu angeluak dituzten. Beraz posiblea da topografia eta hidrofilitatea bateratzen dituen substratua lortzea, bakterioen adhesioaren ekiditzean aurreratze handia izan daitekeena.

Horretaz gainera, HA naturako molekula hidrofiliikoenetariko bat da<sup>49</sup>, eta kitosanoa berriz ez dauka hain hidrofilitate altua, egia esan soilik baldintza azidoetan, disolbatu daitekeen polimeroa da. Horregatik kontaktu angelua neurtu da geruza bakoitza ezarri ondoren. Nahiz eta espero zena hidrofilitatearen gorakada eta beherakada zen hialuronikoa eta kitosanoa hurrenez hurren ezartzen diren heinean, lortutako datuak ez dira horrelakoak izan (12. irudia).





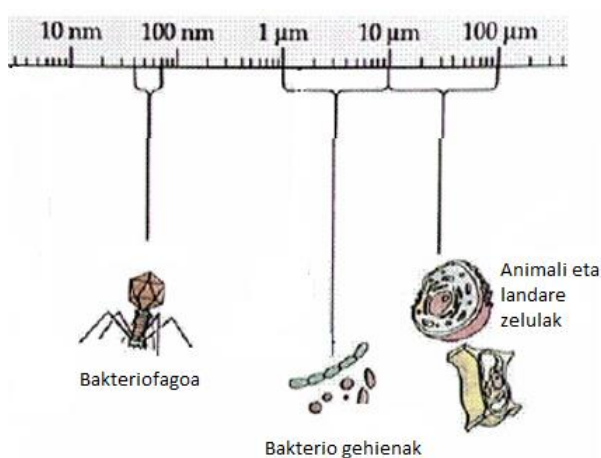
**12. Irudia.** A) PET, B) topografiadun titanioa eta C) gainazal leuneko titanioaren kontaktu angeluak geruza kopuru ezberdinekin (geruza bikoitiak kitosanozkoak dira eta bakoitiak hialuronikozkoak).

Emaiza hauen arrazoa geruzen arteko elkargurutzaketa izan daiteke. Schlenoff *et al.*-ek<sup>50</sup> polielektrolitodun multigeruzen hazkundera ikertu zuten, eta geruzak ezartzean haien arteko gurutzamendua beti gertatzen zela adierazi zuten (neurri handiago edo txikiago batean). Hala ere lagin guztietan behatzen dugu kontaktu angeluaren beherakada multigeruzak ezartzen hastean, eta zenbait kasutan bai betetzen da kontaktu angeluaren igoera kitosano geruza ezartzean.

### 3.3. TOPOGRAFIA

Gainazalaren topografia eta bakterioen adhesioa eta hilketaren arteko erlazioaren inguruan ikerketa asko daude, hala ere, ez dira nahikoak askotan kontraesankorrak direlako.<sup>8</sup> Garrantzitsua da kontuan izatea tamaina ugariako bakterioak daudela, gehienak 1  $\mu\text{m}$  eta 10  $\mu\text{m}$ -ko tartean (13. irudia), eta eraikitako topografia bakterioen

tamaina baino handiagoa bada, biofilmaren eraketa areagotu egiten da, itsatsitako bakterioek zizailadurarekiko babesa aurkitzen dutelako hutsune horietan.<sup>51</sup> Beraz, kontuan izan behar da nahiz eta topografia bat egokia izan bakterio mota baten itsaspena ekiditeko, baliteke beste batzuen areagotzea. Horregatik topografiaren eta eraldaketa kimikoaren konbinazioa irtenbide oso aproposa izan daiteke, modu honetan topografiari esker bakterio batzuen adhesioa ekiditu daitekelako, eta topografiaren hutsuneetan sartu daitezkenak haien tamaina txikiari esker, itsasteko zailtasunak eta baita haien mintzen disrupzioa aurkituko dute HA/CHI multigeruzekin topatzean.

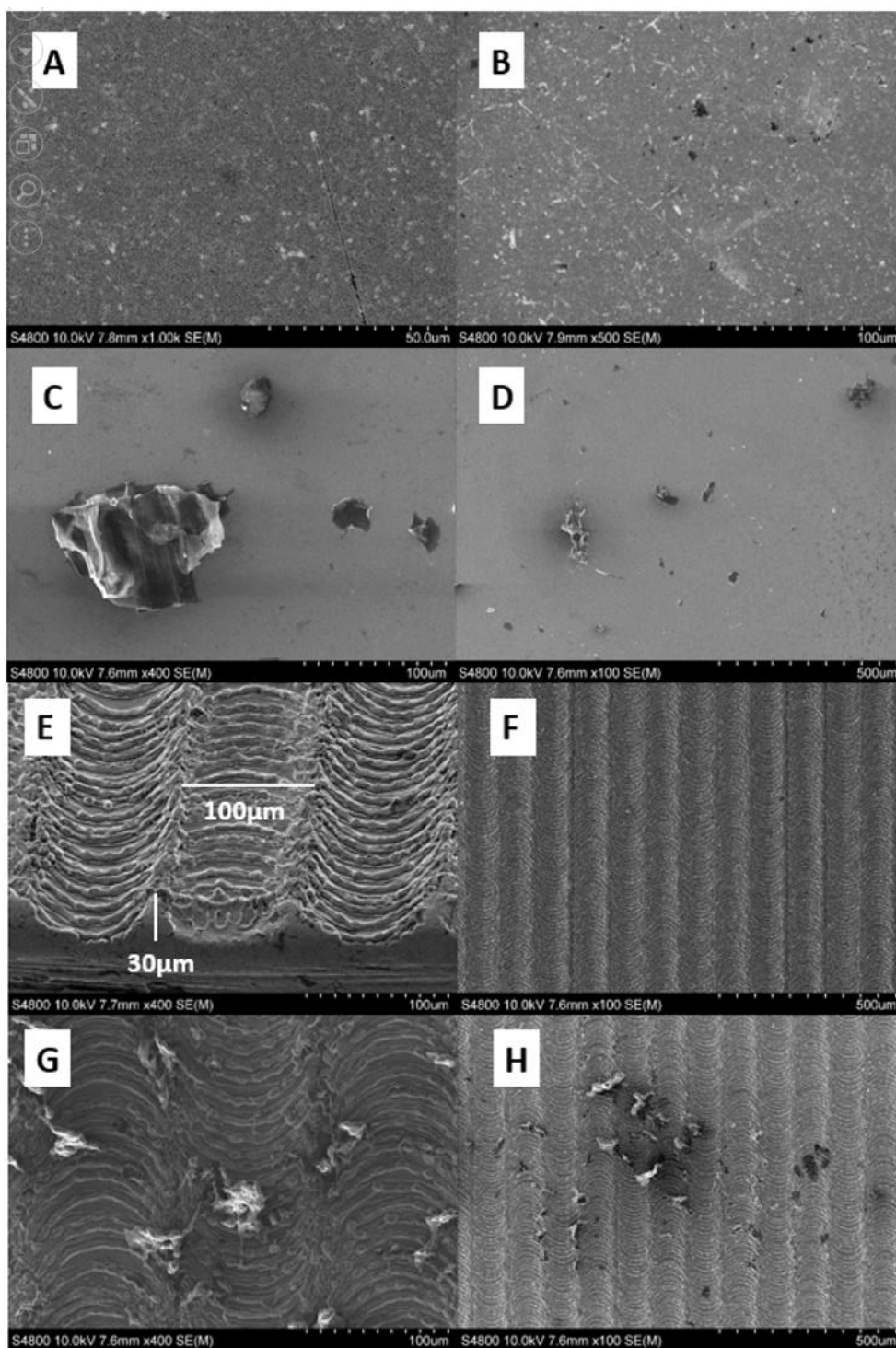


### **13. Irudia.** Mikroorganismo desberdinen neurriak.

Horregatik garrantzitsua da arlo honetan gehiago sakontzea, topografia emateko metodoak aztertuz, gainazalaren eraldaketa kimikoekin bateratuz eta bakterioen mota diferenteen elkarrekintzak aztertuz. Geruz-geruzeko metodologia moldakorrari esker, posiblea da topografiadun lagin batean multigeruzak ezartzea, eta hau da lan honetan titanio laginetan egindakoa. Beste aukera bat polisakaridoen natura leunari esker, eratutako estalduran topografia eraldatzea da, PET multigeruzan eginikoaren moduan.

#### **3.3.1. Titanio laginak**

Gainazal lauko eta mikrotopografiadun laginekin lan egin da, eta horien gainean HA/CHI multigeruzak eraiki dira (14.irudia).



**14. Irudia.** *Titanio laginen SEM irudiak. A) eta B): mekanikoki leundutako gainazal aminofuntzionalizatua; C) eta D) mekanikoki leundutako gainazala 5 HA/CHI bigeruzekin; E) eta F) laserrarekin modifikatutako gainazal aminofuntzionalizatua eta G) eta H) laserrarekin modifikatutako gainazala 5 HA/CHI bigeruzekin.*

SEM irudietan ikusten den moduan, laginek topografia mantentzen dute geruzak ezarri ondoren. Nahiz eta zonalde batzuetan polisakaridoen pilaketa bat behatzen den, badakigu gainontzeko gainazalean multigeruza dagoela ere, topografiaren gune guztietatik sartutakoa, fluoreszentiako irudietan (10 eta 11) ikusten zen moduan. Del Hoyo *et al.*<sup>52</sup> multigeruza hauen lodiera aztertu zuten, eta 5 HA/CHI bigeruzen lodiera 50 nm-koa zela adierazi zuten.

Beraz, frogatu egin da posiblea dela topografiadun material batean multigeruza polimerikoak eraikitzea honen topografia aldatu gabe, biofilmen eraketaren sahespenean arrakasta ugari izatea espero dena.

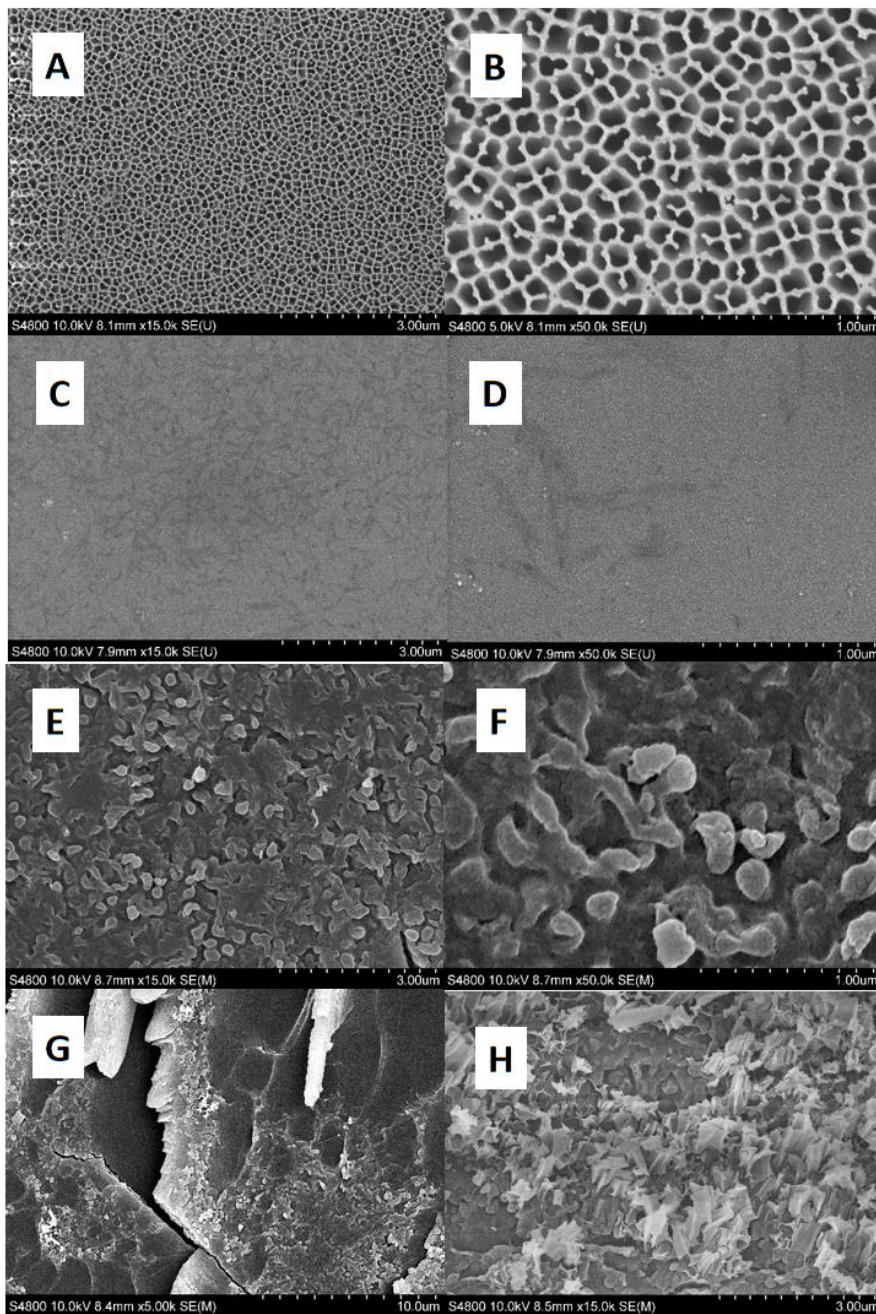
### **3.3.2. PET laginak**

PET gainazala hainbat ikerketetan izan da modifikatua topografia lortzeko asmoarekin. Beste askoren artean, Mirzadeh *et al.*-ek<sup>53</sup> CO<sub>2</sub> laserra erabiliz eman zioten topografia PET laginei, eta Csete *et al.*-ek<sup>54</sup> ArF laserra erabili zuten. Nahiz eta laserrak metodo eraginkorrak izan topografia eraikitzeko PET laginetan, nahiko garestiak dira. Horregatik lan honetan askoz merkeagoa den beste aukera bat ikertu da: AAO mintzen bidezko nanoestruturazioa.

Metodo hau erabiltzean gehienetan urtutako polimero edo erretxina bat erabiltzen da. Choi *et al.*-ek<sup>55</sup> UM argiarekin kuratzen zen poliuretano akrilatoa erabili zuten substratu gisa, AAO mintzaren nanoporoetatik sartzean argi ultramorea irradiatuz eta modu horretan nanopilareak lortuz. Lee *et al.*-ek<sup>56</sup> berriz, poliestirenoa erabili zuten, presioa egiten eta berotuz bere beira trantsizio tenperatura baino tenperatura altuagotara, polimeroaren kateak ondo mugitu ahal izateko, eta AAO nanoporoetan sartu ondoren pixkanaka hoztuz.

Lan honetan eratutako multigeruzetaz baliatuz polietilen tereftalatoari topografia emango zaio. Izan ere, multigeruza hauek mugikortasun bat izan dezakete hidratatzen badira, eta presioa aplikatuz nanoporoetatik sartzea lortu dezakegu.

Metodo hau oraindik ia ikertu ez denez, presio ezberdinak frogatu ziren, guztiak giro temperaturan aplikatuz. 15. irudian AAO mintzen SEM irudiak ikus daitezke, eta baita 0.14, 10 eta 32 bar hurrenez hurren aplikatzerakoan lortu diren PET laginen SEM irudiak.



**15. Irudia.** A) eta B): AAO mintzen SEM irudiak; eta PET laginen SEM irudiak C) eta D) 0.14, E) eta F) 10 bar eta G) eta H) 32 bar-eko presioa jasan ondoren.

Ikusten den moduan, 0.14 bar aplikatu zirenean ez zen topografiarik transferitzea lortu (15C eta 15D irudiak). Aipatu beharrekoa da, aplikaturiko presioa nahikoa ez izateaz gainera, beharbada laginak hidratatzen egon ziren 90 minutuak ez zirela nahikoak izan multigeruzak hidratatzeko, eta ez zuten mobilitatea lortu aluminaren poroetatik murgildu ahal izateko. Horregatik, hurrengo saiakuntzetan (10 eta 32 bar) laginak 17 orduz eduki ziren hidratatzen.

10 bar aplikatzerakoan topografia irregular bat behatu daiteke (15E eta 15F irudiak), alumina mintzen hutsuneak baino pixka bat handiagoak direnak, ziur aski haien arteko aglomerazioaren ondorioz. Izan ere, nanopilareak eraikitzeke ingurune heze bat erabiltzen bada, indar kapilarrek nanoegitura hauen agregazioa ekar ditzakete.<sup>57</sup> Honi indar elektrostatikoen eragina gehitu behar diogu, ezin dugulako ahaztu gure nanoegiturak eraikitzeke polielektrolitodun multigeruzak erabili ditugula, eta horregatik hauek heze egotean haien artean erakarpen indarrak agertu daitezke agregazioari lagunduz.

Azkenik, 32 bar-eko presioa aplikatu denean, ikus daiteke nola PET gainazala apurtu egiten den, eta ez da lortzen nahi zen topografia (15G eta 15H irudiak).

Frogatu egin da posiblea dela PET-aren gainazala eraldatzea laserrak baino merkeagoak diren metodoak erabiliz, hala ere beharrezkoa da gehiago ikertzea arlo honetan, beharbada eraginkorragoa izan daitekelako topografia ematea multigeruzak aplikatu baino lehen, polietilen tereftalatoa urtuz aluminetatik sartzeko, eta behin topografia emanda multigeruzak ematea, titanioarekin egin den moduan, oso emaitza onak lortu baitira topografia horren gaineko multigeruzen eraiketan.

#### **4. ONDORIOAK**

HA/CHI multigeruzak ezarri dira polietilen tereftalatoan eta titanioan, LbL metodologiak baliatuz. Substratuak aktibatu ziren gainazala amino-funtzionalizatuz eta amino taldeen presentzia bermatu zen XPS erabiliz.

Multigeruzen eraiketa FITC-rekin markaturiko kitosanoa erabiliz bermatu zen, fluoreszentiaren hazkundera ikusiz mikroskopia konfokalean. Geruzen atxikimendua heterogenoa zela behatu zen substratu lauetan, eta atxikimendu handiena laserrarekin modifikaturiko titanioan ikusi zen. kontaktu angeluaren aldaketa ere neurtu zen, hasierako substratuak hidrofilitate baxukoak zirela ikusiz (lauak  $\sim 80^\circ$  eta topografiadunak  $\sim 140^\circ$ ). Gainazala amino-funtzionalizatzean kontaktu angelua gutxitu zen, eta geruzak aplikatzean gainazal hidrofilikoa lortu genuen. Hala ere ez zen behatu kontaktu angeluaren gorakada eta beherakada kitosanoa eta hialuronikoa ezartzean hurrenez hurren, beraz gurutzamendu altuko geruzak dira, gainazal heterogeneoekin.

Topografiaren inguruan ere ikertu zen, titanio laginen kasuan topografiadun substratuen gainean HA/CHI multigeruzak eraiki ziren, eta bi ondorio positibo lortu ziren: multigeruzak hobeto atxikitzen dira topografiadun laginetan, eta nahiz eta geruzen ezarketa egin topografia mantendu egiten da. PET laginetan topografia eman zen multigeruzak ezarri ondoren, hauek hidratatuz polisakaridoen mugikortasuna lortzeko, eta ondoren AAO mintzen bidezko nanoestruturazioa eginez, presio ezberdinak frogatuz. Lehenengo kasuan ez zen topografiarik lortu, bigarrenetan nanopilare antzeko batzuk lortu ziren, eta azken kasuan berriz, gehiegizko presioaren ondorioz PET filmen mikro-apurketak behatu ziren. Beraz multigeruzadun PET filmetan topografia emateko alternatiba merke eta sinple bat aurkitu da. Hala ere, gehiago ikertu behar da honen inguruan, metodo gehiago frogatuz.

Hau guztia ikusita, ondorioztatu dezakegu LbL metodoa eraginkorra dela bai material ez-organiko eta bai polimerikoen gainazalen eraldaketa egiteko materialen biobateragarritasuna handitzeko helburuarekin, hidrofilitate altuko materiala lortuz eta bakterioen biofilmak ekidin ditzakeena, modu honetan gaur egun inplante artifizialek daukaten arazo nagusiari irtenbidea aurkituz modu erreza eta merke batekin.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Neoh, K. G.; Hu, X.; Zheng, D.; Kang, E. T. *Biomaterials* **2012**, *33* (10), 2813–2822.
- (2) Pohler, O. E. M. *Injury* **2000**, *31*, S-D7-13.
- (3) Bernacca, G. M.; Mackay, T. G.; Wilkinson, R.; Wheatley, D. J. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *34* (3), 371–379.
- (4) Lavaud, S.; Canivet, E.; Wuillai, A.; Maheut, H.; Randoux, C.; Bonnet, J. M.; Renaux, J. L.; Chanard, J. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2003**, *18* (10), 2097–2104.
- (5) A. Holden, B. *Optom. Vis. Sci.* **1989**, *66* (11), 717–733.
- (6) Carneiro-da-Cunha, M. G.; Cerqueira, M. A.; Souza, B. W. S.; Carvalho, S.; Quintas, M. A. C.; Teixeira, J. A.; Vicente, A. A. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (1), 153–159.
- (7) Carpentier, B.; Cerf, O. *J. Appl. Bacteriol.* **1993**, *75* (6), 499–511.
- (8) Rodríguez-Hernández, J. *Polymers against Microorganisms*; 2017.
- (9) Hetrick, E. M.; Schoenfisch, M. H. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (9), 780.
- (10) Wang, B. L.; Ren, K. F.; Chang, H.; Wang, J. L.; Ji, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5* (10), 4136–4143.
- (11) Junter, G. A.; Thébault, P.; Lebrun, L. *Acta Biomater.* **2016**, *30*, 13–25.
- (12) Ludwicka, A.; Jansen, B.; Wadström, T.; Pulverer, G. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, 1. Abteilung, Originale, Medizinische Mikrobiologie, Infektologie und Parasitologie*. **1984**, *256* (4), 479–489.
- (13) Tiller, J. C.; Lee, S. B.; Lewis, K.; Klivanov, A. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *79* (4),



465–471.

- (14) Gour, N.; Ngo, K. X.; Vebert-Nardin, C. *Macromol. Mater. Eng.* **2014**, *299* (6), 648–668.
- (15) Rabea, E. I.; E.-T. Badawy, M.; V. Stevens, C.; Smaghe, G.; Steurbaut, W. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1457–1465.
- (16) Liu, Y.; He, T.; Gao, C. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2005**, *46* (2), 117–126.
- (17) Tan, Q.; Ji, J.; Barbosa, M. A.; Fonseca, C.; Shen, J. *Biomaterials* **2003**, *24* (25), 4699–4705.
- (18) Yang, Y.; He, Q.; Duan, L.; Cui, Y.; Li, J. *Biomaterials* **2007**, *28* (20), 3083–3090.
- (19) Stockton, W. B.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **1997**, *30*, 2717–2725.
- (20) Lv, H.; Chen, Z.; Yang, X.; Cen, L.; Zhang, X.; Gao, P. *J. Dent.* **2014**, *42* (11), 1464–1472.
- (21) Lichter, J. A.; Van Vlietpa, K. J.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **2009**, *42* (22), 8573–8586.
- (22) Pérez-Álvarez, L.; Lizundia, E.; del Hoyo, S.; Sagasti, A.; Rubio, L. R.; Vilas, J. L. *Polym. Int.* **2016**, *65* (8), 915–920.
- (23) Mero, A.; Campisi, M. *Polymers (Basel)*. **2014**, *6* (1), 346–369.
- (24) Hahn, S. K.; S.Hoffman, A. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2004**, *9*, 179–183.
- (25) Kujawa, P.; Moraille, P.; Sanchez, J.; Badia, A.; Winnik, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (25), 9224–9234.
- (26) Xia, W.; Liu, P.; Zhang, J.; Chen, J. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25* (2), 170–179.

- (27) Jou, C.-H.; Yuan, L.; Lin, S.-M.; Hwang, M.-C.; Chou, W.-L.; Yu, D.-G.; Yang, M.-C. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *104* (1), 220–225.
- (28) Fu, J.; Ji, J.; Yuan, W.; Shen, J. *Biomaterials* **2005**, *26* (33), 6684–6692.
- (29) Richert, L.; Lavallo, P.; Payan, E.; Shu, X. Z.; Prestwich, G. D.; Stoltz, J. F.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C. *Langmuir* **2004**, *20* (2), 448–458.
- (30) Bongaerts, J. H. H.; Cooper-White, J. J.; Stokes, J. R. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (5), 1287–1294.
- (31) Larkin, A. L.; Davis, R. M.; Rajagopalan, P. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (10), 2788–2796.
- (32) Kujawa, P.; Sanchez, J.; Badia, A.; Winnik, F. M. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6* (6), 1565–1574.
- (33) Flint, S.; Hartley, N. *Int. Dairy J.* **1996**, *6* (2), 223–230.
- (34) Vanhaecke, E.; Remon, J.; Moors, M.; Raes, F.; Rudder, D. D. E.; Peteghem, A. V. *Appl. Environmental Microbiol.* **1990**, *56* (3), 788–795.
- (35) Whitehead, K. A.; Colligon, J.; Verran, J. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2005**, *41*, 129–138.
- (36) Verran, J.; Rowe, D. L.; Boyd, R. D. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2003**, *51* (3), 221–228.
- (37) Barthlott, W.; Neinhuis, C. *Planta* **1997**, *202* (1), 1–8.
- (38) Bixler, G. D.; Bhushan, B. *Soft Matter* **2012**, *8* (44), 11271.
- (39) Chung, K. K.; Schumacher, J. F.; Sampson, E. M.; Burne, R. A.; Antonelli, P. J.; Brennan, A. B. *Biointerphases* **2007**, *2* (2), 89–94.

- (40) May, R. M.; Magin, C. M.; Mann, E. E.; Drinker, M. C.; Fraser, J. C.; Siedlecki, C. A.; Brennan, A. B.; Reddy, S. T. *Clin. Transl. Med.* **2015**, *4* (1), 9.
- (41) Xu, Q.; Zhang, W.; Dong, C.; Xia, Z. *Interface* **2016**, *13* (122).
- (42) Wang, C.; Mao, Y.; Wang, D.; Qu, Q.; Yang, G.; Hu, X. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18* (6), 683.
- (43) Martín, J.; Maiz, J.; Sacristan, J.; Mijangos, C. *Polymer (Guildf)*. **2012**, *53* (6), 1149–1166.
- (44) Chua, P. H.; Neoh, K. G.; Kang, E. T.; Wang, W. *Biomaterials* **2008**, *29* (10), 1412–1421.
- (45) Thierry, B.; Winnik, F. M.; Merhi, Y.; Silver, J.; Tabrizian, M. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1564–1571.
- (46) Avadanei, M.; Drobeta, M.; Stoica, I.; Rusu, E.; Barboiu, V. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2010**, *48* (23), 5456–5467.
- (47) Lampin, M.; Warocquier-Clérout, R.; Legris, C.; Degrange, M.; Sigot-Luizard, M. F. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *36* (1), 99–108.
- (48) Richard Bowen, W.; Doneva, T. A. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *229* (2), 544–549.
- (49) Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. *Vet. Med. (Praha)*. **2008**, *53* (8), 397–411.
- (50) Schlenoff, J. B.; Dubas, S. T. *Macromolecules* **2001**, *34* (3), 592–598.
- (51) An, Y. H.; Friedman, R. J. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *43* (3), 338–348.
- (52) Del Hoyo-Gallego, S.; Pérez-Álvarez, L.; Gómez-Galván, F.; Lizundia, E.; Kuritka, I.; Sedlarik, V.; Laza, J. M.; Vila-Vilela, J. L. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *143*, 35–43.

- (53) Mirzadeh, H.; Dadsetan, M. *Radiat. Phys. Chem.* **2003**, *67* (3–4), 381–385.
- (54) Csete, M.; Bor, Z. *Appl. Surf. Sci.* **1998**, *133*, 5–16.
- (55) Choi, M. K.; Yoon, H.; Lee, K.; Shin, K. *Langmuir* **2011**, *27* (6), 2132–2137.
- (56) Lee, Y.; Lee, W.; Lee, J. K. *Thin Solid Films* **2008**, *516* (10), 3431–3435.
- (57) De Volder, M.; Hart, A. J. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (9), 2412–2425.