



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Nobel Saridun Klik erreakzioaren
baliagarritasuna konposatu
biologikoak eransteko polimero
gainazalean**

*Julia Sánchez Bodón, Ane Garcia,
Maria Diaz Galbarriatu,
Ana Catarina Lopes,
Isabel Moreno Benítez eta
Jose Luis Vilas Vilela*

401-407 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.51>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Nobel Saridun Klik erreakzioaren baliagarritasuna konposatu biologikoak eransteko polimero gainazalean

Julia Sánchez Bodón¹ Ane García García,¹ Maria Diaz Galbarriatu,¹ Ana Catarina Lopes,^{1,2} Isabel Moreno,³ José Luis Vilas Vilela^{1,4}

¹Kimika Makromolekularreko Laborategia, Kimika Fisikoa Saila, ZTF/FCT, UPV/EHU, ²IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Leioa, ³Kimika Makromolekularreko Laborategia, Kimika Organikoa eta Inorganikoa Saila, ZTF/FCT, UPV/EHU, ⁴Basque Center for Materials, Applications and Nanostructures, Bizkaiko Zientzia eta Teknologia Parkea
julia.sanchez@ehu.eus

Laburpena

Azken urteetan, hezur edo artikulazio akastunen funtzioa berrezartzeko inplante kirurgikoak erabiliak izan ohi dira. Halaber, azken urteetan inplanteen osteointegratio ona bermatzen duten materialak lortzea erronka zientifikoa bihurtu da. Izan ere, biomaterialaren gainazalaren propietate fisiko kimikoek pazientearen erantzuna modulatzeko dute. Hori dela eta, funtsezkoa da aktibitate antiinflamatorioa eta bakterioen aurkako propietateak dituzten inplanteak diseinatzea. Azken hamarkadan Klik kimika aukera interesgarria bilakatu da biomolekula konplexuak material desberdinen gainazalera kobalentez lotzeko. Lan honetan biomedikuntzan interesa duen molekula organiko baten immobilizazio kobalentea deskribatzen da poliazido L-laktikoa (PLLA) polimeroa gainestaldura gisa erabiliz. Proposatutako metodologiaren berrespena Ultramore-ikuskor (UM-Ikus), mikroskopia fluoreszentea, X izpien espektroskopia fotoelektronikoa (XPS) eta angelu kontaktua bidez balidatu da.

Hitz gakoak: polimeroa, gainestaldura, klik erreakzioa

Abstract

Surgical implants are usually employed to restore the function of affected joints or bones. In recent years, obtaining materials that guarantee good implant osseointegration has become a scientific challenge. In fact, the physico-chemical properties of the surface of the biomaterial play a key role in patient response. Therefore, it is essential to design implants with anti-inflammatory activity and antibacterial properties. In the last decade, click chemistry has emerged as the method of choice in order to bind covalently complex biomolecules to the surface of diverse materials. This work describes the covalent immobilization of an organic molecule with interest in biomedicine using Poly-L-Lactic acid (PLLA) polymer as a coating. The validation of the proposed methodology has been assured with different techniques: UV-Vis, fluorescence microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and water contact angle.

Keywords: polymer, coating, click reaction

1. Sarrera eta motibazioa

Urtero milioi aldaka- eta 250,000 belaun-ordezkapen baino gehiago ematen dira mundu osoan zehar. Izan ere, ospitalizatutako gaixoen artean % 30 kateter baskular bat edo gehiago izaten dute (Arciolla eta Campoccia, 2018). Inplante kirurgiko baten ezarpenak erantzun tisular desberdinak eragiten ditu. Esaterako, inplanteak odolarekin kontaktuan jartzerakoan erantzun negatiboa sortarazi dezake, proteinen adhesioa eta odol-koagulazioa areagotuz. Inplantazioarekin batera hantura akutua sortzen da, kasu honetan neutrofiloak eta monozitoak, globulu zuri bezala ezagutzen direnak, hantura eman den lekuan adsorbatzen dira (Chandorkar, 2019). Ehunaren berrezarpena ematea posiblea ez den kasuetan, hasierako hantura prozesu akutua kronikoa bihurtu daiteke, kasu honetan ehunaren enkapsulazioa eman daiteke, inplante akastuna lortuz.

Mikroorganismo, zelula eta proteinen adsortzioa gainazalak azaltzen dituen propietateen araberakoa da, adsortzioa kontrolaezina denean infekzioa sor daiteke, zeina hantura eta odol-koagulazioak eragiten dituen. Osasun arazo hauek saihesteko helburuarekin propietate antiinflamatorio eta bakterioen aurkako aktibitateak dituen inplanteak diseinatzea ezinbestekoa da. Horretarako, gainestaldurak eta gainazal eraldaketak bai fisikoak, hala nola, topografia edo

bapore-deposizioa, eta bai kimikoak, esaterako, plasma tratamendua edota erreakzio kimikoak, ezinbestekoak bilakatu dira (Rana, 2017; Sánchez-Bodón, 2020).

Gainestalduren artean, material polimerikoetan oinarritutako gainestaldurak gero eta interes handiagoa pizten ari dira arlo desberdinetan. Izan ere, haien erabilera biomaterial moduan izugarri zabala da industriatik paketatze aktiborako medikuntzara arte (Andrade-del Olmo, 2017). Polimero biodegradarriak, eta horien artean, poli-(azido *L*-laktikoa)-z (PLLA) estandar baliogarritzat har daiteke ingeniari-tza birsortzaile ortopedikorako aplikazio askotarako, fabrikazioan duten aldakortasunagatik eta biomolekula eta zelulekiko duen bateragarritasun eta biodegradagarritasunagatik. Azido polilaktikoa etorkizun handiko polimero biodegradagarria da, lehengai naturaletatik eskuratzen baita, artoa, azukrea, arropa edo patata esaterako. Biodegradagarritasun eta biobateragarritasun bikainari esker, PLLAk gaitasun handia erakusten du aplikazio biomedikoetan, besteak beste, jostura kirurgikoetan, gainestaldura bezala edota farmakoak modu kontrolatuan askatzeko sistemetan.

Bestalde, eraldaketa kimikoei dagokienez, 2022an Kimikako Nobela irabazi duen klik kimika oso erabilgarria bilakatu da biomolekula konplexuak gainazal desberdinetara kobalentez lotzeko aukera aurkeztuz duelako. Klik kimikaren barnean, kobrez katalizaturiko azida eta alkinoaren arteko erreakzioa ezagunena eta bereizgarriena da (Sharpless, 2001). Izan ere, erreakzio hau inguru tenperaturan gerta daiteke etekin kuantitatiboak lortuz eta konposatuaren aktibitate biologikoa bermatuz. Gaur egun, kimika mota hau eremu askotan erabiltzen da, ikerketa-laborategitik industriara arte; esate baterako, materialei ezaugarri jakinak emateko, hala nola, bakterioak hiltzea, elektrizitatea eroatea, eguzki-argia xurgatzea, etab., edo substantzia farmazeutiko berriak sortzeko. Izan ere, klik kimikaren oinarriak gero eta ate gehiago zabaltzen ditu. Hori dela eta, lan honetan molekula fluoreszentea den immobilizazio kobalentea deskribatzen da poliazido *L*-laktikoa (PLLA) gainestaldura gisa erabiliz eta azida eta alkinoaren arteko klik erreakzioa konbinatuz.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburua azida eta alkinoaren arteko klik erreakzioaren eraginkortasuna aztertzea da, PLLA gainazalean biologikoki aktiboak diren konposatuen immobilizazioa suertatuz. Horretarako, PLLAren gainean eraldaketa kimiko desberdinak pairatuko dira: hidrolisia, amidazioa eta klik erreakzioa, hurrenez hurren. Ondoren, immobilizatutako konposatua aztertuko da zenbait teknika desberdin erabiliz: UM-ikuskor, mikroskopia fluoreszentea, XPS eta kontaktu angelua. Azkenik, proposatutako metodologiaren berrespena eztabaidatuko da.

3. Ikerketaren muina

Lehenengo, PLLAren sintesia aurkeztuko da. Ondoren, PLLAren gainean ematen diren erreakzioen, hidrolisia eta amidazio erreakzioa, prozedurak deskribatuko dira. Jarraian, proposatutako konposatuaren atxikipena burutuko da bi bide desberdin jarraituz. Azkenik, azterketa horietan lortutako emaitzak aztertu ondoren, prestatutako filmak biomedikuntza aplikazioetan egokiak diren edo ez zehaztuko da.

3.1 PLLA filmen prestaketa

Lehenik eta behin, granuluetan dagoen PLLA (1 g) kloroformotan (50 mL) disolbatzen da eta irabiatzen uzten da 2 h-z. Ondoren, nahasketa metanol destilatu hotzean hauspeatzen da. Lortzen den hauspeakin zuria hutsean lehortzen da 40 °C-tan. Behin lehor, filmak lortzeko asmoz, materiala bero dagoen prentsa hidrauliko batean sartzen da eta konpresioaren bidez filmak prestatzen dira. Bertan, laginak 10 minutuz 200 °C-tan mantentzen dira 0 bar presioarekin. Ondoren, 50, 100 eta 150 bar-tan uzten dira, minutu bakoitzeko. Azkenik, filmak zuzenean ur bainu baten hozten dira. Lortutako filmak 2x1 cm-tan moztzen dira eta hurrengo funtzionalizaziorako prestatzen dira.

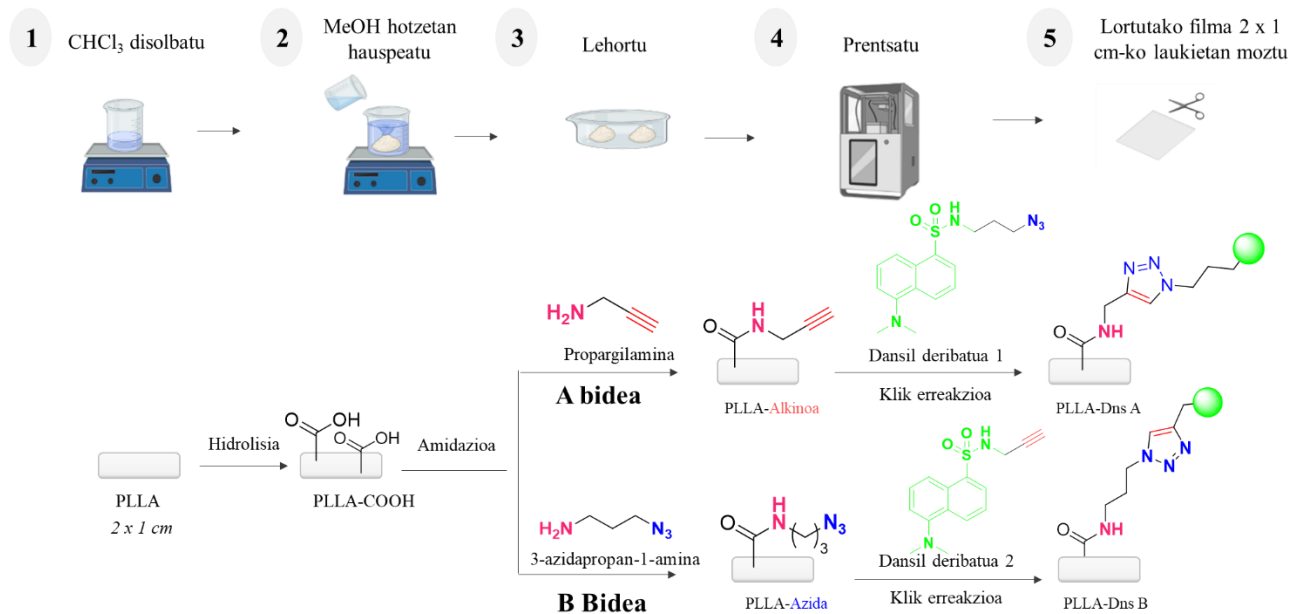
3.2 PLLA filmen gaineko eraldaketak

Filmak prestatu ondoren bi prozesu desberdin ematen dira: hidrolisia eta amidazio erreakzioa. Moz-tutako PLLA filmak metanol/ur 1:1 nahasketa batean garbitzen dira 3 aldiz sonikatuz ultrasoinuan. Behin ondo garbituta, lehortzen uzten dira 50 °C-tan. Ondoren, filmak NaOH (0,25 M) disoluzio batean murgiltzen dira 50 °C-tara 30 min-tan zehar 300 rpm irabiaketa konstantepean. Azkenik, ultrasoinuan, filmak HCl (% 10) disoluzioarekin garbitzen eta lehortzen dira hutsean 40 °C –tan.

Alkino edo azida taldea sartu baino lehen, amidazio erreakzioaren bidez, filmen aurre-aktibazioa burutu behar da. Horretarako, EDC·HCl (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarboimida hidrokloruroa, 0,025 g) -eta NHS (N-hidroxisukzinimida, 0,015 g) pH=5,5 disoluzio tanpoian disolbatzen dira. Akti-batzaileak disolbatu ondoren, filmak disoluzioan murgiltzen sartzen dira eta irabiatzen uzten dira 4 h inguru tenperaturan. 4 h pasa ostean, bial berri batean murgiltzen dira EDC·HCl-rekin (0,028 g) berriro pH=5 duen tanpoi disoluzioarekin 2 h-z irabiatzen da 40 °C-tan. 2 orduz irabiatzen egon eta gero, 24 orduz ingurune tenperaturan irabiatzen uzten da. Azkenik, urarekin garbitzen dira eta huts sistemara sartu dira 3 orduz, funtzionalizatutako filmak guztiz sikatzeko. Behin lehor, lehen amidazio erreakzioa gauzatzeko, filmak propargilaminan edo 3-azidapropan-1-aminan (2 bal.) disoluzioan murgiltzen dira inguru tenperaturan 24 h-z. Azkenik, urarekin garbitzen dira eta lehortzen uzten dira 24 h-z.

Azkenik, gainazala behin aktibatuta, dansil deribatuaren immobilizazioa burutzen da. Konposatu or-ganiko honek, biomedikuntza arloan markatzaile zelular oso erabilia, fluoreszentzia mikroskopiaren bi-dezko erreakzioaren jarraipena egiteko aukera ematen du. Azida eta alkinoaren arteko erreakzioa buru-tzeko, dansil deribaturia eraldatu egin behar da aurretiaz, hori dela eta beharrezkoa den talde funtzioarekin (azida edo alkino taldea) erreakzionarazten da. Behin dansil deribaturia lortuta, kobrez katalizaturiko klik erreakzioa aurrera eramaten da.

1. Irudia. PLLA filmen sintesia deskribatzen duen metodologia eta PLLA filmen gaineko eraldaketak.



3.3 Emaitzak

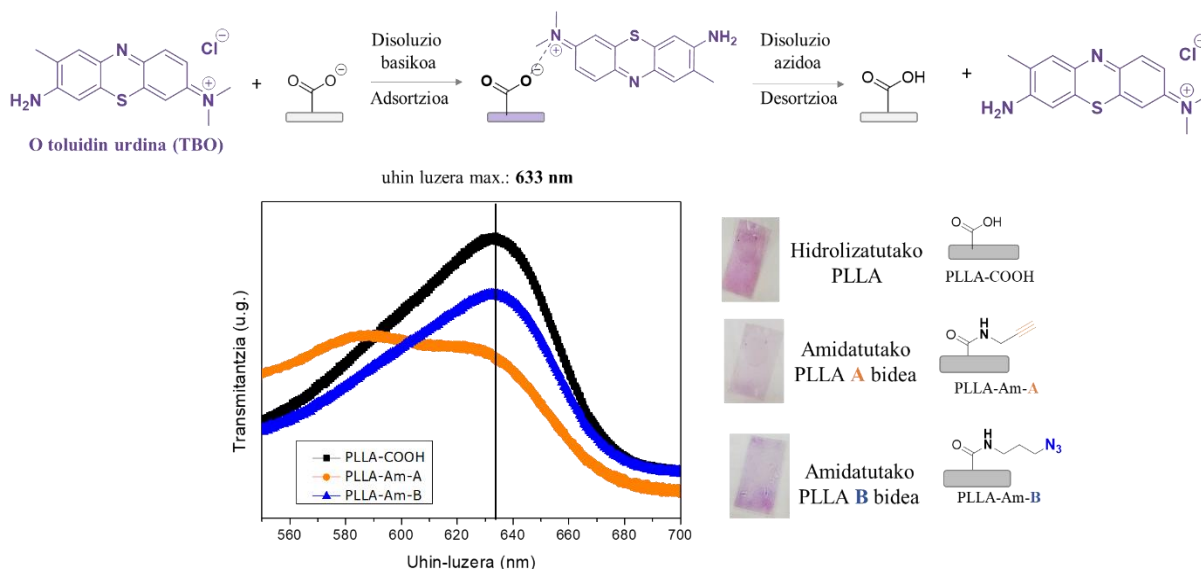
Klik erreakziorako beharrezkoa den alkino edo azida talde funtzionala PLLA gainazalera erantsi ahal izateko, aldeztu behar da PLLA azido karboxilikoekin aktibatu behar da. Horretarako, PLLA filmen hidrolisia burutu behar da lehenik eta behin. Gainazalean eratzten diren azido karboxilikoaren kantitatea kolorimetria metodoaren bidez kuantifikatu egin dira, amidazio erreakzioa gauzatu baino lehen eta amidazio erreakzioaren ostean aztertuta egin baita azido

karboxilikoaren kantitatea. Izan ere, modu honetan, erreakzionatutako azido karboxilikoaren kopurua determina daiteke.

Kobrez katalizaturiko klik erreakzioan bi funtzio talde dira nagusi, amaierako alkinoa (karbono-karbono lotura hirokoitza) eta azida (hiru nitrogenodun molekula) taldea. Hori dela eta, bi amidazio bide alternatibo proposatu dira, gainazalean lortzen den amaierako talde funtzionalaren araberakoa izango dena, 1 irudian ikus daitekeen moduan.

PLLaren gainazalean sortu diren azido karboxilikoak karboxilato ioi moduan aurkituko dira pH basikoan TBOrekin nahasterakoan. Hori dela eta, TBO molekularen amonio ioiak karboxilato ioiekin elkar egingo du indar elektrostatikoen bidez, PLLA filma larrosa bihurtuz (2.irudia). Filmak disoluzio azido batean murgiltzerakoan, TBO askatu egiten da eta azido karboxilikoak berreskuratzen dira. Askatutako TBO UM-ikuskorraren bidez neurtzen da eta emandako absorbantzia aztertzen da. Horrela, aurretiaz garatutako kalibratuaz baliatuz, gainazalean adsorbatutako TBO kantitatea neurtuko da. Suposatuz TBOren mol bat azido karboxilikoaren mol batekin erreakzionatzen duela, gainazalean dauden azido karboxilikoaren kopurua determinatzen da.

2. Irudia. Azido karboxilikoaren eta TBOren arteko elkarrekintza eta disoluzio bakoitzaren UM-ikuskorraren espektroa.

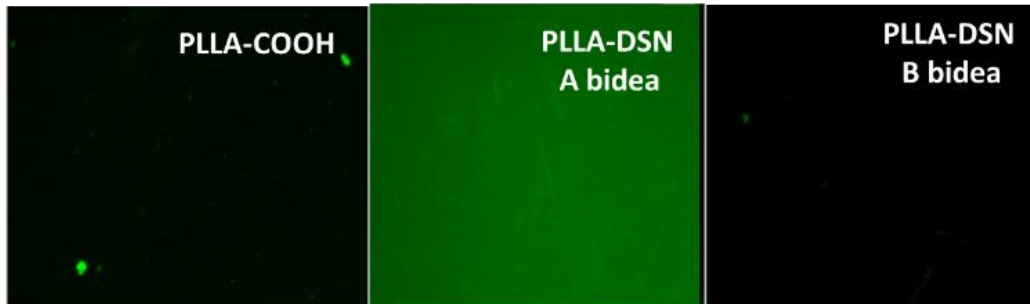


Hidrolizatutako PLLAn, 633nm-tan lortutako absorbantziak, filmaren gainazalean eratutako azido karboxilikoaren kantitatearekin zuzenki proportzionala da. Zenbat eta absorbantzia handiagoa izan, orduan eta azido karboxiliko gehiago eratu direla gainazalean adierazten du. Behin azido karboxilikoak eratuta, gainazalaren amidazio prozesua eman da. Kolorimetriaren bidez, erreakzionatu gabe gelditu diren azido karboxilikoak determinatu dira berriz ere. Horrela, amidatutako azido karboxilikoaren portzentaia determinatu egin da. Propargilamina erabiliz, hots, A bidea jarraituz, non gainazalean gelditzen den talde funtzionala amaierako alkinoa den, adsorbatutako TBO kantitatea txikiagoa da; beraz, amidatu gabe gelditu diren azido karboxiliko kantitatea txikiagoa da. Kasu honetan, A bidea jarraituz, azido karboxilikoaren % 15 amidatu da. Aldiz, B bidea jarraituz, 3-azido-propan-1-amina erabiltzen denean, soilik % 7 amidazioa lortzen da

Amidazioa burutu ondoren, konposatu organikoaren immobilizazioa burutu da. Molekula organiko hau, dansil kloruroa, aurretiaz eraldatu egin behar da, klik erreakzioan parte hartzen duen taldea bere egituraren barnean izan dezan. Hori dela eta, bi dansil deribatu lortzen dira. Dansil deribatu hauek dagokien polimero gainazalarekin erreakzionarazi dira. Konposatu hau fluoreszentea denez, mikroskopia fluoreszentearen bidez behatu egin da dansil deribatuen atxikipena. 3. irudian ikus daitekeen moduan, hidrolizatutako PLLAk ez du fluoreszentiarik igortzen irradiatutako gunean. Aldiz, energia bera erabiltzen denean, A bidea jarraitutako

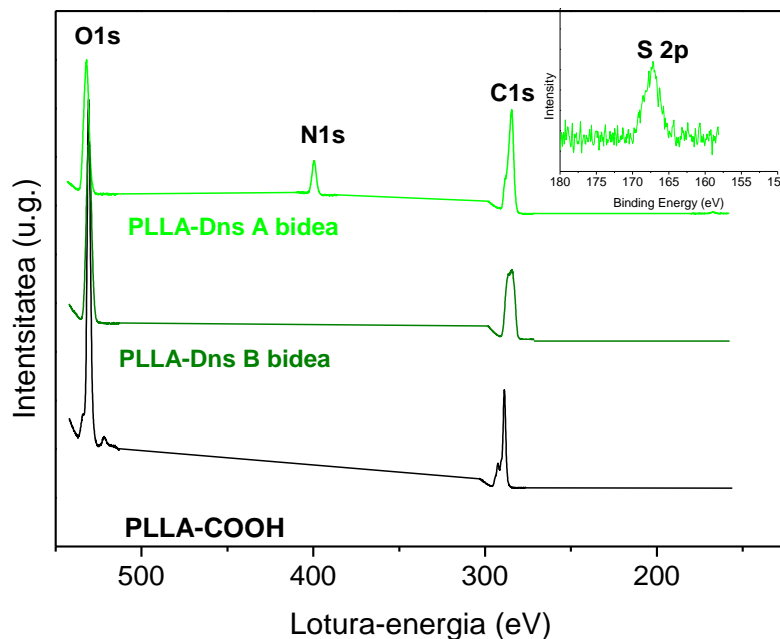
estrategian kolore berdeko fluoreszentzia behatzen da, eraldatutako fluoroforoari dagokiona. Bestaldetik, B bidean immobilizatutako dansil deribatuak ez du fluoreszentziarik igorri, energia kantitate bera erabili arren.

3. Irudia. PLLAren gaineko eraldaketak egin ondoren, mikroskopia fluoreszentearen bidez aztertutako fluoreszentzia.



Lortutako emaitza hauek XPSren bidez berretsi dira, eraldatutako film bakoitzaren gainazalaren analisi elementala behatuz. Hau da, gainazal bakoitzean dauden elementu desberdinak behatu egin dira. 4. irudian ikus daiteke hidrolizatutako PLLAk soilik bi banda nagusi aurkezten dituela, 285 eV eta 533 eV energian, karbono (C1s) eta oxigeno (O1s) elementuei dagozkiena, hurrenez hurren. Klik erreakzioaren ostean, A bidea jarraitutako eraldaketan, PLLA-Dns A dugu, eta film gainazal honetan karbono eta oxigenoaz gain, beste bi seinale hautematen dira, nitrogenoa (N1s) 395 eV-tan eta sufrea (S2p) 167 eV-tan. Bi seinale berri hauek gainazalean biokonjugatutako dansil konposatuari dagozkio. Ostera, B bidean erreakzionarazitako dansil konposatuak ez du seinale eraginkorrik erakutsi nitrogeno edo sufreaki dagozkien lotura-energian. Beraz, mikroskopioarekin eta XPS-rekin lortutako emaitzen arabera, edonolako konposatua PLLA gainazalera biokonjugatzeko metodorik aproposena A bidea dela esan daiteke.

4. Irudia. Eraldatutako PLLA gainazal desberdin XPSren espektroa.



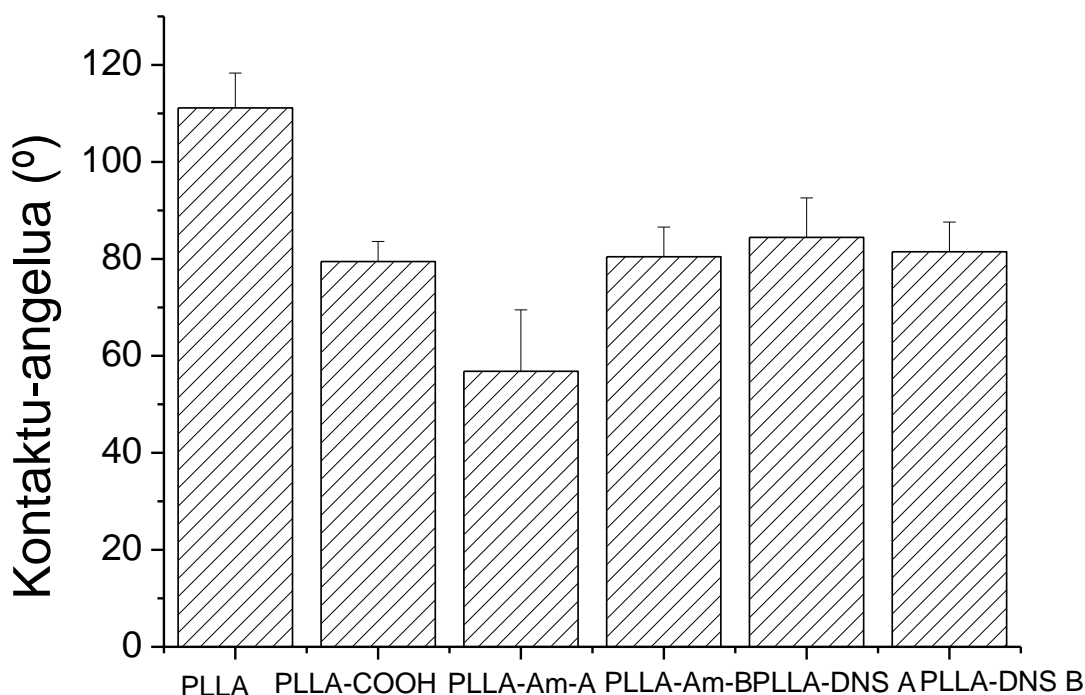
Bestaldetik, erreakzio bakoitzaren ostean, PLLA gainazalak pairatu dituen hidrofilia aldaketak behatu dira kontaktu angeluaren bidez. Hidrofilia gainazalak urarekin duen afinitatea definitzen du.

Gainazalaren hidrofilia faktore garrantzitsua da proteinen edota bakterioen atxikimendurako. Izan ere, gainazal hidrofiloago batek makrofagoen, bakterioen edota proteinen gehiegizko adsortzioa saihas dezake. Gainazala hidrofiliako bezala definitzeko gainazala eta ur tantaren arteko angelua 90° baino txikiagoa izan behar da. 90° baino handiagoa bada, gainazala hidrofoboa dela esan daiteke.

5. irudian ikus daitekeen moduan, eraldatu gabeko PLLAk 110° -ko angelua erakusten du, nahiko hidrofoboa izanik. Oro har, PLLaren gainazalak talde funtzional polar gutxi aurkezten ditu eta oso zaila da edonolako konposaturik gainazalean itsastea, hori dela eta, PLLaren funtzionalizazioa beharrezkoa da. Hidrolisi prozesuaren ostean, angelua 78° -ra jaisten da gainazala hidrofiloagoa izanik, azido karboxilikoaren (-COOH) talde funtzional polarren presentziaren ondorioz. Proposatutako bi amidazio bideren ondoren lortutako gainazalen angeluak nahiko desberdinak dira. A bidearen ondoren, angelua 48° -tara txikiagotzen da, nahiz eta lortutako talde funtzionalen polartasuna (alkinoa) txikiagoa izan. Balio hauek gainazalak duen zimurtasunarekin erlazionatzen dira. Izan ere, Wenzel teoriaren arabera, jadanik hidrofiloa den gainazala hidrofiloagoa bilakatzen da zenbat eta zimurragoa izan.

Bestetik, espero den bezala, ez da aldaketa esanguratsurik behatu B bidea jarraitu ondoren lortutako gainazalaren kontaktu angeluan, PLLA hidrolizatuaren azalerarekin konparatuz. Azkenik, dansil deribatutako PLLA gainazalera konjugatu ondoren lortutako angeluak nahiko antzekoak izan dira haien artean, 80 - 90° hain zuzen ere. Izan ere, A bidea jarraitzen duen estrategian, lortutako PLLA gainazalaren kontaktu angelua 48° -tik 80 - 90° -ra igotzen da gainazalaren hidrofilitatea txikituz, hau 1,2,3-triazolaren eta immobilizatutako konposatu aromatikoaren eragina izan da. Aldaketa nabarmen honek ziurtatzen du beste teknikek adierazi dutena, hau da, klik erreakzioa gauzatzeko bide egokiena A dela.

5. Irudia. PLLAren gaineko eraldaketak egin ondorengo ur kontaktu angeluen balioak.



4. Ondorioak

Lan honetan azida eta alkinoaren arteko klik erreakzioaren baliogarritasuna frogatu egin da medikuntza interesa duen molekula organikoa immobilizatuz polimero baten gainazalean. Lehenik, erreakzioaren eraginkortasuna frogatu da fluoroforo batekin, non filmen gainazalaren amidazio erreakzioa burutu den eta ondorengo klik erreakzioa. Amidazio erreakzioaren eragikortasuna UM-Ikuskorraren bidez frogatu egin da. Ondoren, fluoroforoa erantsi da bi metodo desberdin jarraituz eta erreakzioaren jarrapeina eta eraginkortasuna fluoreszentzia eta analisi elementalaren bidez aztertu da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Polimeroen gainazalak eraldatzeak abantaila handiak ekar ditzake medikuntza munduan, hala nola, farmako ezberdinen biokonjugazioa PLLA bezalako polimeroaren gainazalean. Horretaz gain, konprobatu egin da azida eta alkinoaren arteko klik erreakzioa molekula konplexuak biokonjugatzen dituela modu sinple eta erraz batean. Hala ere, erreakzio honek zenbait desabantaila erakusten baititu, esaterako azida eta alkinoaren arteko erreakzio tradizionalen kobrea erabiltzen da katalizatzaile gisa. Kobreak zitetoxizitatea erakusten du, zitetoxizitate honek zelulen heriotza sortarazten du. Ondorioz, metal baten beharrak bere erabilera mugatzen du biomedikuntza arloan. Hori dela eta, kobrerik gabeko klik erreakzioaren erabilerak gero eta interes handiagoa izaten ari da arlo desberdineko zientzietan. Azken bi urte hauetatik aurrera, alkinoan oinarritutako hainbat aktibazio erreakzio proposatu dira (Kim, 2022).

6. Erreferentziak

- Andrade-del Olmo, J., Pérez-Álvarez, L. (2018), Elikagaien paketatze aktiborako polimeroen gainazalaren aldaketa.. *Ekaia. Zientzia eta teknologia aldizkaria*, 33, 129-148. 10.1387/ekaia.17861
- Arciola, C., Campoccia, D. (2018). Implant infection: adhesión, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 397-409. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y>
- Chandorkar, Y., Ravikumar, K., Basu, B. (2019). The foreign body response demystified. *American Chemical Society, Biomaterials Science Engineering*, 5, 19-44. 10.1021/acsbiomaterials.8b00252
- Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B. (2001), Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 2004-2021
- Rana, D., Ramasamy, K., Leen, M., Pasricha, R., Manivasagam, G., Ramalingan, M. *Biology and Engineering of Stem Cell Niches. Surface functionalization of Biomaterials*, A. Vishkarma, J. M. Karp (Ed), Academic Press, Cambridge, Massachusetts (2017).
- Sánchez-Bodón, J., Moreno-Benítez, I., Pérez-Álvarez, L., Ruiz-Rubio, L., Vilas-Vilela, J.L. (2020), Click erreakzioa erabiliz aktibitate biologikoa erakusten duten Sistema polimerikoen garapena. *Ekaia. Zientzia eta teknologia aldizkaria*, 37, 103-116. <https://doi.org/10.1387/ekaia.20847>
- Yoon, H.Y., Lee, D., Lim, D.K., Koo, H., Kim, K. (2022), Copper Free Click Chemistry: Applications in Drug Delivery, Cell Tracking, and Tissue Engineering. *Advance Materials*, 34. <https://doi.org/10.1002/adma.202107192>

7. Eskerrak eta oharrak

Egileek erakundeek (SGIker eta GV/EJ) emandako laguntza (ELKARTEK programa, IDEAI, AVANSITE, μ 4IoT) gizatiarra eskertzen dute.