



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Kitosano deribatuen
nanopartikulak tratamendu
oftalmologikoetarako ektoinaren
askapen kontrolatuko sistema
gisa**

*Nekane Martin-Mendia, Virginia
Saez-Martinez, Jose Luis Pedraz
eta Oihane Gartziandia*

177-184 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.21>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Kitosano deribatuen nanopartikulak tratamendu oftalmologikoetarako ektoinaren askapen kontrolatuko sistema gisa

Nekane Martin-Mendia^{1,2}, Virginia Saez-Martinez¹, Jose Luis Pedraz²,
Oihane Gartzandia¹

I+Med S.Coop. Vitoria-Gasteiz, Espainia (1), NanoBiocel taldea, Farmazia eta Elikagaien Saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU/ UPV) Vitoria-Gasteiz, Espainia (2)
nmartin@imasmed.com

Laburpena

Nanopartikulen erabilera askapen kontrolatuko plataforma gisa interes handiko ikerketa eremu bat da. Lan honetan kitosanoaren funtzionalizazio gradua kontrolatuz lortutako deribatu amonio kuaternarioekin nanopartikula desberdinen sintesia optimizatzen da. Partikula hauek ezaugarri bereizgarriak dituzte, ehun biologikoetako mukiekiko erante gaitasun handiagoa besteak beste. 100-300nm-ko nanopartikulak lortzen dira, hutsak zein printzipio aktiboz kargatuak kitosano eta bere deribatuak erabiliz. Bereiziki partikula hauek begi gaixotasunen tratamenduetan izan dezaketen potentziala aztertzen da, ektoina aktiboaren askapena ikertuz kasu honetan.

Hitz gakoak: nanopartikula, kitosano, askapen kontrolatua, oftalmologia.

Abstract

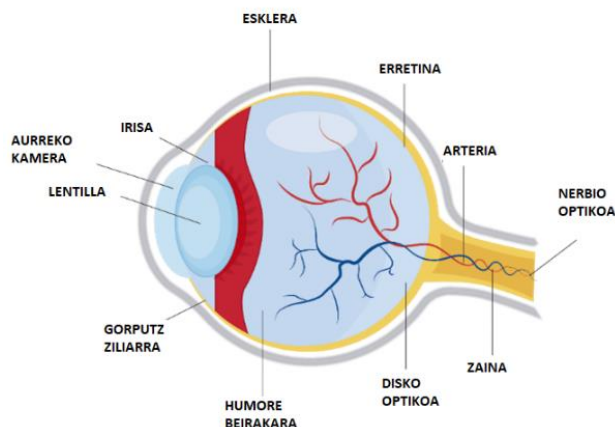
The use of nanoparticles as a controlled release platform is a field of research of great interest. This work optimizes the synthesis of different nanoparticles with quaternary ammonium derivatives obtained by controlling the functionalization degree of chitosan. These particles have improved properties, including a greater mucoadhesion to biological tissues. Nanoparticles of 100-300nm are obtained, both empty and loaded with active ingredients using chitosan and its derivatives. In particular, the potential of these nanoparticles in the treatment of eye diseases is analyzed by investigating the encapsulated ectoine release profile.

Keywords: nanoparticle, chitosan, controlled-release, ophthalmology.

1. Sarrera eta motibazioa

Begietako gaixotasun eta patologiek inpaktu sozioekonomiko esanguratsua dute. Munduan zehar gutxienez 43.3 milioi pertsona itsu daude, prebalentzia altuenak emakume (%55) eta 50 urtez gorako pertsonen taldeetan izanik (Bourne et al., 2021). Eragile ohikoenak kataratak eta errefrakzio arazoak dira. Honek mundu mailako gastu handi bat dakar, osasun publikoko gastu zuzen bezala zein produktibitatearen murrizketa gisa, 244.000 eta 25.400 milioi dolarretako gastuak kalkulatzeko baitzaizkie, hurrenez hurren, miopia eta presbisia arazoei (Bourne et al., 2021). Aipatutako bi eragile nagusiei jarraiki, glaukoma, erretinopatia diabetikoa, adinarekin zerikusia duten aldarapenak, hanturak (ubeitisa kasu) eta begi barneko tumoreak ere ohikoak dira. Gizartearen zahartze orokortua kontuan izanik, begietako arazo hauen prebalentziaren gorakada bat aurreikusten da, hauen prebentzio eta

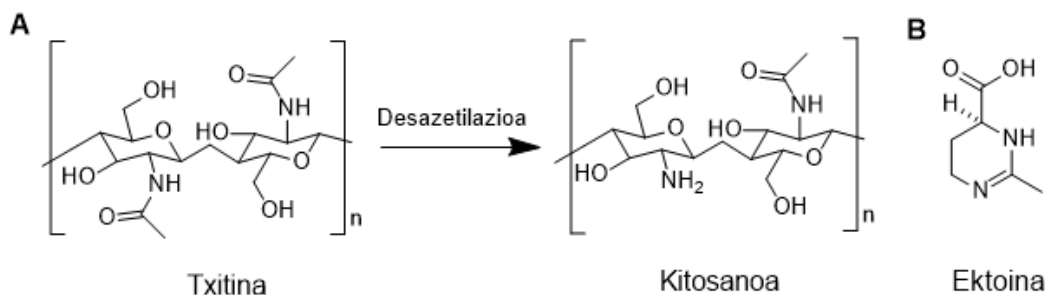
tratamenduetan lan egitea premiazkoa izanik.



1. Irudia. Begi-globoaren atal nagusiak (Martin-Mendia et al., 2025).

Begietako aplikazio topikoko tantak dira eremu terapeutiko honetako dosifikazio sistemarik ohikoenak, pazientearentzako erosoenak, ez-inbaditzaileak, merkeak eta uneko ekintzakoak direlako. Zuzenean begi-globoan instalatzen direnez (1.irudia) (Martin-Mendia et al., 2025) kornea zein konjuntibako ehunen bitartez lehenengo mailako absortzioa dute. Nolanahi ere, garbiketa eta sekrezio nasolakrimalak kontuan izanik oso azkar ezabatzen dira. Horrenbestez, printzipio aktiboen beharrezko kontzentrazioak lortzeko aplikazio ugari behar izaten dira (Edelhauser et al., 2008).

Testuinguru honetan oftalmologiako tratamenduetarako sistema berritzaileen garapena ezinbestekoa da. Askapen kontrolatuko sistemak bereziki interesgarriak dira aplikazio errepikatuak, beharrezko printzipio aktibo kopuruak eta ondoriozko eragin desiragaitzak murrizteko. Horretarako, aurreko ikerketetan oinarriturik (Kumari et al., 2010), nanopartikula polimerikoen gisako garraiatzaileen erabilera potentzial handiko bide bat da. Kitosanoa biopolimero natural bat da, txitinaren desazetilaziazioz lortzen dena (2. irudia). Polimero biodegradagarri bat denez biomedikuntza arloko erabileretarako oso aproposa da giza gorputzeko berezko entzimek degradatu dezaketelako (Victor et al., 2020). Aitzitik, pH fisiologikoetan disolbagarria ez izatea muga handi bat da. Honi aurre egiteko zein beste hainbat propietate hobetze aldera, hainbat funtzionalizazio aplika dakizkioke: metilazioa (Sajomsang et al., 2008), karboxilazioa (Islam et al., 2023), tiolazioa (Kafedjiiski et al., 2005), sulfonazioa (Kazachenko et al., 2021), etab. Amino kuaternariodun talde funtzional berri baten adizioa aukeratu da kasu honetan, bereziki karga positibo hauek polimeroak duen mukiekiko eranste gaitasuna handitzen duelako bere disolbagarritasun gaitasunak ere hobetuz.



2. Irudia: A) Txitinaren eta kitosanoaren formula kimikoak, non desazetilaziazioz kitosanoak amina talde primario bat irabazten duen. B) Ektoina formula kimikoa.

Azkenik, ektoina ur molekulei lotzeko gaitasuna duen solutu natural bat da (2. irudia), duen osmoprotekzio gaitasuna dela eta zelulen babeserako erabili izan dena, batez ere aplikazio topikoetan (Li et al., 2024). Hainbat aplikazioaren artean begiko tratamenduetarako erabili izan da (Bilstein et al.,

2021) (Salapatek et al., 2021). Sistema polimeriko honen bitartez bere askapen profilaren kontrola bilatzen da ektoinadun produktu zein tratamenduak hobetze aldera.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Azken urteetan kitosano biopolimeroarekin ikerketa lan ugari egin dira, baita nanopartikulen teknologiaren garapen arloan ere. Bide honetan hainbat dira kitosano nanopartikulen sintesian zein funtzionalizazio prozesu ezberdinetan eta hauen optimizazioan egin diren ikerketak (Vllasaliu et al., 2010) (Wen et al., 2014).

Ikerketa-lan honek bi helburu nagusi ditu: alde batetik, kitosano deribatuen nanopartikulen sintesi prozesuaren optimizazioa eta bestetik aplikazio oftalmikorako liberazio kontrolatuko sistema gisa izan dezaketen potentzialaren ikerketa. Lehen helbururako estatistikan oinarritutako lan sistema bat aplikatuko da, lan esperimentalaren alde aurreko diseinua burutu eta lorturiko emaitzetatik sistemari buruzko ahalik eta informazio gehien lortzeko. Bigarren helbururako aldiz, begi-aplikazio topikoa simulatuko duen metodologia bat erabiliko da nanopartikula kargatuak printzipio aktiboen askapenean eta hauen barneratzean eduki dezaketen eragina aztertzeko. Ektoinaren eredu bat erabiliko da proba hauetarako.

3. Ikerketaren muina

a. Prozedura esperimentalak

Kitosanoaren funtzionalizazio prozesurako H.Song et al.-ek proposatutako protokolo bat jarraitu da (Song et al., 2018), non kitosano molekularen amina taldea amino kuaternario talde funtzional berri batengatik ordezkatzeko den. Horretarako bi kitosano gramo disoluzio basiko batean disolbatzen dira (litio hidroxidoa, potasio hidroxidoa eta urea erabiliz) eta behin disoluzio homogeneoa lortutakoan izoztu egingo da. Irabiaketa bitartez desioztutakoa disoluzio honetara CHPTAC erreaktiboa (3-kloro-2-hidroxipropil) trimetilamomio kloruroa) gehitzen da poliki-poliki. Erreaktibo kantitatea neurtuz funtzionalizazio gradua kontrolatu daiteke (24-40mL bitarte). Erreakzioak 40-45 orduko iraupena izango du giro tenperaturan. Amaierako produktua lortzeko dialisiz garbituko da pH neutroak lortu arte eta liofilizazioz produktu solidoa lortuko da. Karakterizaziorako ¹H-NMR teknika erabiliko da. Talde funtzional berriko protoiei dagozkien seinaleen integralak hasierako kitosano molekularen seinaleei dagokienekin erlazionatuz funtzionalizazio graduak kalkulatzeko dira, “bajua” eta “altua” bezala multzokatu direnak.

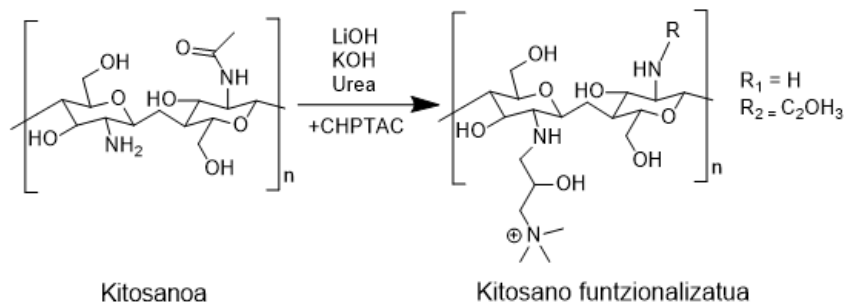
Nanopartikulen sintesirako jarraian adierazitako errezeta jarraitzen da, aurretiaz deskribatutako hainbat ikerketetan oinarrituz definitua (Bernkop-Schnürch & Dünnhaupt, 2012). Laburki, kitosano funtzionalizatua 5.8 pH-dun buffer batetan disolbatzen da. Disoluzio honi agitazioa aplikatzen zaio. Bitartean, tripolfosfato (TPP) disoluzio baten kantitate zehatz bat gehitzen zaio tantaka (CS:TPP 2:1 erlazioa mantenduz). Agitazio prozesua bost minutuz luzatzen da. Nanopartikula hauek ektoinaz kargatuak lortzeko, prozedura errepikatu behar da eta prozesuan ektoina kantitate ezagunak gehitu dakizkioke TPP disoluzioari. Karakterizazioa kasu honetan DLS (“Dynamic Light Scattering”) teknika bitartez burutzen da, partikulen tamaina zein polidispersitate (PDI) datuak ezagutzeko eta SEM irudi bitartez partikulen morfologia ezagutzeko.

Partikula kargatu hauen barneratze profila aztertzeko *Franz Cell* sistema bat erabili da. Zelula hauek mintz batez banaturiko bi ganbara dituzte: emaila eta hartzailea. Mintz gisa kasu honetan hidrogel moduko lentillak erabili dira, ingurune oftalmikoa simulatze aldera. Ganbara emailan partikula kargatuak 7.2-7.6 pH-dun buffer oftalmiko batean jarriko dira (“Phosphate-buffered saline” edo PBS), eta ganbara hartzailea berriz PBS hutsez beteko da. Sistemak bederatzi ganbara berdin ditu, esperimentuen erreproduktiborako (kasu honetan lau erabili dira). Ganbara guztiek agitazio magnetikorako gaitasuna dute. Esperimentuak dirauen bitartean denbora zehatzetan ganbera hartzailetik laginak jasotzen dira, berriro ere buffer bolumen berarekin betez (10min, 30min,

1h, 2h, 4h, 8h, 21h eta 24h). Lagin hauek aztertzeko HPLC teknika erabili da (“High Performance Liquid Chromatography”). Kuantifikazioa akumulazioz kalkulatu da.

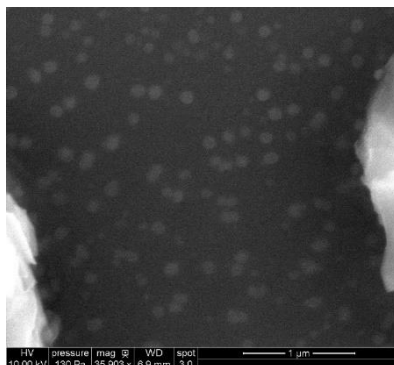
b. Emaizak

Lehenik eta behin, kitosanoari bere propietateak hobetzeko funtzionalizazio prozesu bat burutzen zaio: amina talde primarioaren ordezkatzeari amino kuaternario talde funtzional berri batekin (3. Irudia). Lan honetan bi funtzionalizazio graduekin egin da lan, “bajua” eta “altua” bezala izendatuak.



3. Irudia. Kitosano funtzionalizatua lortzeko erreakzioa eta lortutako produktuaren formula kimikoa.

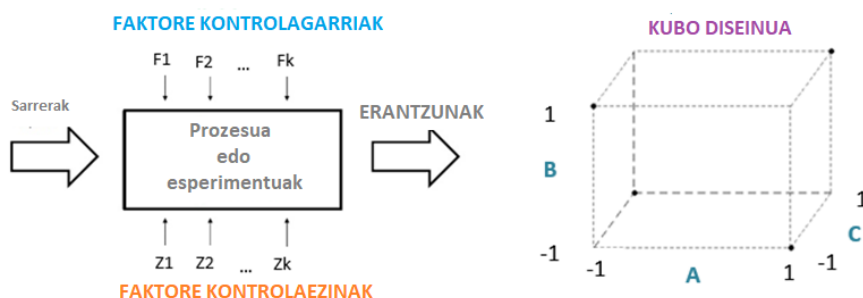
Behin kitosano funtzionalizatua izanik, bere kateen gurutzaketa ioniko prozesu baten bitartez polimero honen nanopartikulak sintetizatu dira. Partikula hauek DLS eta SEM bitartez aztertu dira (4. irudia).



4. Irudia: Scanning Electron Microscopy (SEM) teknika bidez ordezkatzeko maila zein pisu molekular altuko funtzionalizatutako nanopartikula hutsen irudiak. Irudian nanopartikulen morfologia esferikoa ikus daiteke.

Lan honen bereizgarritzat, partikularen tamaina eta polidispersitatean (PDI) prozesuko hainbat faktorek izan dezaketen eragina aztertu da “Design of Experiments” (DOE) sistema erabiliz, estatistikan oinarrituz gutxienezko esperimendu kopuruarekin sistemari buruzko ahalik eta informazio gehien lortzeko. Metodologia honekin, lehenik prozesu esperimentalaren analisi bat egiten da, ikertu nahi diren produktuaren ezaugarriak definitzeko (erantzunak izango direnak) eta jarraian parametro horietan eragina izan dezaketela uste den faktoreak identifikatu dira (5. irudia). Faktore hauen artean, kontrolaezinak identifikatu eta estatiko mantenduko dira eta faktore kontrolagarrietatik kasu bakoitzean analisisian aztertuko direnak aukeratu dira: eragin potentziala izan dezaketenak aurreko ikerketetan (de la Fuente et al., 2010) zein norberaren esperientzian oinarrituz. Faktore bakoitza maila kopuru desberdinetan aztertu daiteke.

ESPERIMENTUEN DISEINU SISTEMA (DOE):

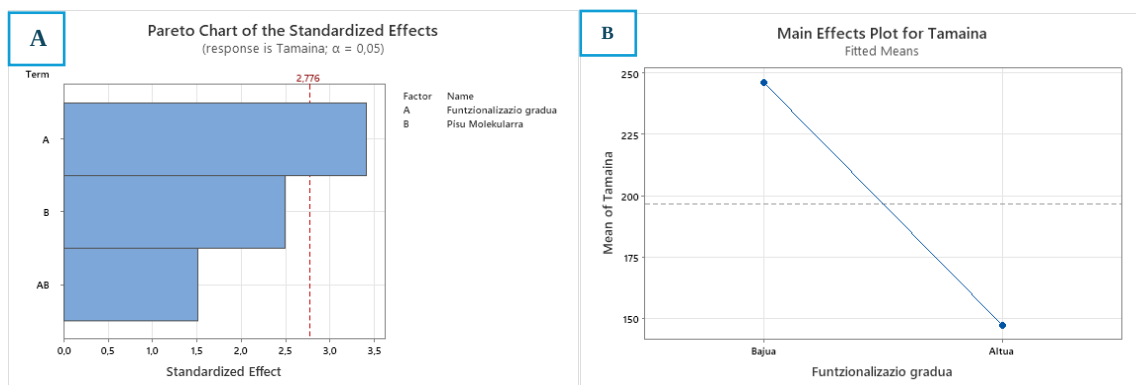


5. irudia: esperimentuen diseinu prozedura. Goran-ekzerraldean lehengo pausua: prozesuaren analisia. Goran -eskuinean lortu daitezkeen diseinu posibleak kubo eran (bi mailatako (1 edo -1) hiru faktoreko (A,B,C) eredua kasu).

1. Taula: burututako esperimentuak, faktoreen konbinazio posibleak bi errepikapenekin. Bi mailatako bi faktoreko eredua bi errepikapenekin.

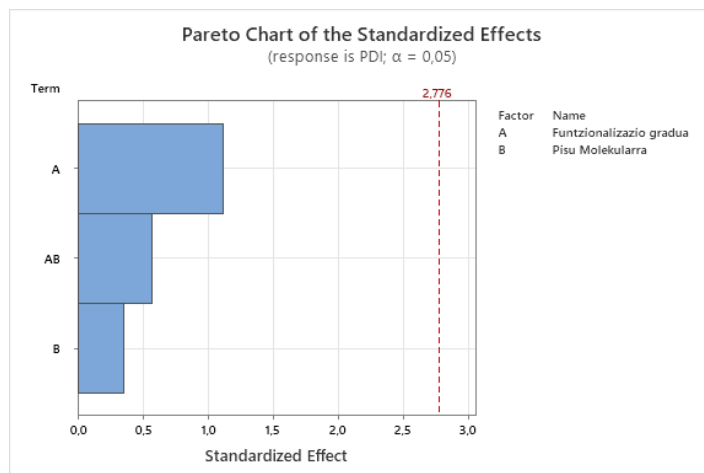
ESP. ZK.	Funtzionalizazio gradua	PM
1	Bajua	Bajua
2	Altua	Bajua
3	Bajua	Altua
4	Altua	Altua
5	Bajua	Bajua
6	Altua	Bajua
7	Bajua	Altua
8	Altua	Altua

Aurretiko erreferentzietan zein esperientzian oinarrituz, honako faktore hauek aztertu dira: kitosanoaren pisu molekularra (PM) eta funtzionalizazio gradua (1. taula). Kontuan izan diren erantzunak hurrengoak dira: partikula tamaina eta polidispersitate (PDI). Analisi estatistikoko emaitzek (6.irudia) erakusten dute amino kuaternario taldearen funtzionalizazio mailak eragin esanguratsua duela lorturiko nanopartikulen tamainan. Beraz, 150nm inguruko partikulekin lan egin nahi bada, funtzionalizazio maila altuko kitosanoa erabili beharko da, eta aldiz, nanopartikula handiagoak helburu diren lanetan, ordezkatzeko maila baxuko kitosanoak izango dira erabilgarriak.



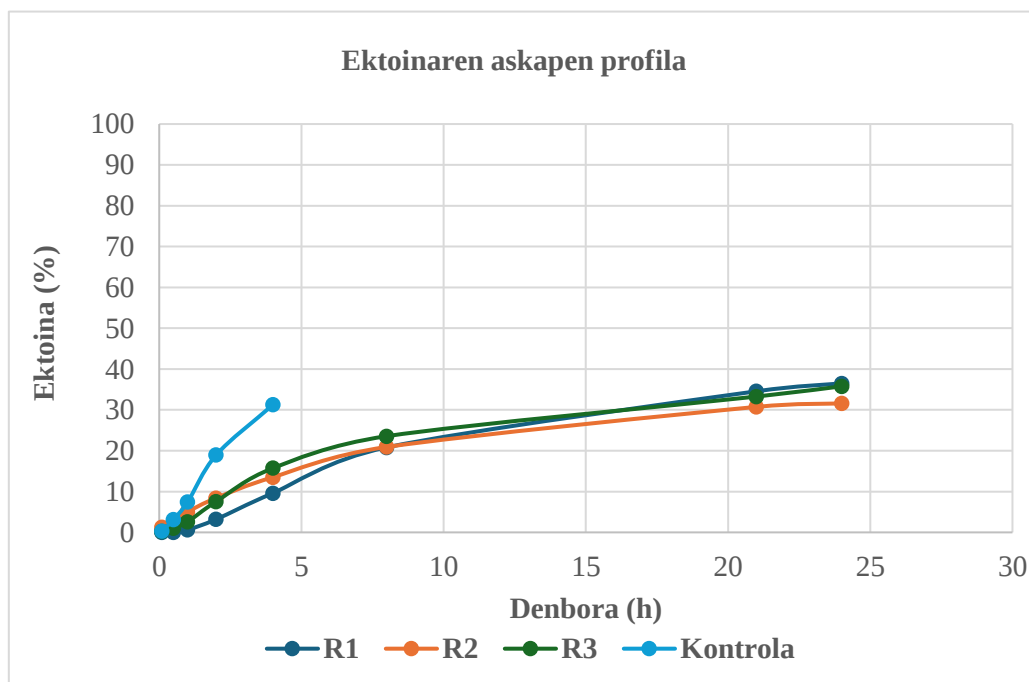
6. Irudia. A) Estandarizatutako efektuetarako Pareto grafika, kontuan harturiko erantzuna partikulen tamaina izanik. “Funtzionalizazio gradua” faktoreak du efektu esanguratsua. B) “Funtzionalizazio gradua” faktorearen efektua partikulen tamainan.

Bestalde, azterturiko bi faktore hauetako batek ere ez du eragin esanguratsurik polidispersitate mailan (7. irudia), kasu guztietan 0.2 inguruko balio onargarriak lortu baitira. Beraz, parametro hau ez da mugagarria aurretik aipatutako aldaketak burutzeko.



7. Irudia. Estandarizatutako efektuetarako Pareto grafika, kontuan harturiko erantzuna partikulen polidispersitatea (PDI) izanik. Ez dago efektu esanguratsua duen faktorerik.

Nanopartikula hauek ektoinarekin kargatu dira, polimero:ektoina erlazio ezberdinetan. Kasu honetan 1:10 erlazioan egin da lan. Kapsulazio-eraginkortasun alturik lortu ez bada ere (%8), polimero gramo bakoitzeko kargaturiko ektoina gramo kantitatea %76koa da, hau da, kitosano gramo bakoitzeko 0.76 gramo ektoina kapsulatu daitezke. Ektoinarekin askapen eta penetrazio profila aztertu da aurrez adierazitako *Franz-Cell* sistema erabiliz.



8. Irudia: Ektoinarekin askapen profila denboran zehar formulazio ezberdinekin. R1, R2, eta R3 pisu molekular zein funtzionalizazio maila altuko kitosanoa erabiliz lortutako ektoinak kargaturiko nanopartikulak PBS-an, formulazio beraren hiru erreplika. "Kontrola" kitosano partikularik gabeko ektoina formulazioa PBS-an. Azterturiko denborak: 10min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 21h eta 24h. Ektoinarekin kuantifikazioa HPLC bitartez egin da..

Grafika honetan ikus daiteke (8. irudia) nola nanopartikula funtzionalizatuek 21 orduz kontrolatzen duten garraiatzailerik gabeko ektoinarekin 4 orduko liberazio berdina. Honenbestez, nanopartikula hauen enkapsulazio bitartez printzipio aktiboaren kantitate beraren barneratzea

denboran 5.25 bider luzatzea lortzen da. Kontuan hartu behar da, halaber, ez dela lortu kargaturiko ektoinaren %40tik gorako kuantifikaziorik, beraz, hurrengo pausu gisa liberazio honen profila denbora luzeagoetan zehar aztertzea komeniko litzateke. Era berean, lentilla bera mugatzaile bat da ektoinaren penetrazio prozesuan, bestela printzipio aktibo askearen kuantifikazioak berebizikoagoa beharko lukeelako sistemako ganbara hartzailean.

4. Ondorioak

Lan honetan kitosano deribatuaren sintesi gaitasuna erakusten da amina taldearen ordezkatzeko gradua kontrolatuz. Gainera, kitosano zein bere deribatuen nanopartikulen propietateetan eragina duten sintesi prozesuko faktore esanguratsuak identifikatu dira analisi estatistikoan oinarrituz. 200nm-tik beherako nanopartikulak lortzen dira kitosano mota jakin bat erabiliz, begiko aplikazio topikorako erabilgarriak izan daitezkeenak. Azkenik, nanopartikula hauek printzipio aktiboen garraiatzaileak izan daitezkeela frogatu da, ektoinaz kargatzeko gaitasuna baitute. Gainera, partikula hauek liberazio kontrolatuko plataformak izateko potentziala dute printzipio aktibo honekiko, barneratze denbora 5.25 bider luzatuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Orain arte jasotako emaitzak kontuan izanik ikerketa osatzeko garrantzitsua izango da aurretik adierazi bezala liberazio profilak denboran zehar luzatu eta ezaugarri eta konposaketa desberdinetako lentillak erabiliz osatzea. Horrela, nanopartikula funtzionalizatu hauek oftalmologia alorrean dituzten gaitasunak osotasunean ezagutu ahal izango dira. Bide berean, printzipio aktibo berriekin ere errepikatuko da lan lerro hau, molekula ezberdinek bateragarritasun desberdinak izan ditzaketelako partikula hauekiko. Aplikazio terapeutiko berriak ere aztertuko dira nanopartikula hauen muki-erante gaitasuna ehun desberdinetako aplikazioetarako interesgarria izan daitekeelako. Aplikazio berri hauek proba espezifiko berriak beharko dituzte. Azkenik, nanopartikula hauek eramaile desberdinetan kargatuko dira, amaierako formulazio osoak sortuz teknologia hau merkatuko produktu baterantz zuzentzeko asmoz.

6. Erreferentziak

- Bernkop-Schnürch, A., & Dünhaupt, S. (2012). Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(3), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.04.007>
- Bilstein, A., Heinrich, A., Rybachuk, A., & Mösges, R. (2021). Ectoine in the Treatment of Irritations and Inflammations of the Eye Surface. *BioMed Research International*, 2021, 8–10. <https://doi.org/10.1155/2021/8885032>
- Bourne, R. R. A., Steinmetz, J. D., Flaxman, S., Briant, P. S., Taylor, H. R., Resnikoff, S., Casson, R. J., Abdoli, A., Abu-Gharbieh, E., Afshin, A., Ahmadi, H., Akalu, Y., Alamneh, A. A., Alemayehu, W., Alfar, A. S., Alipour, V., Anbesu, E. W., Androudi, S., Arabloo, J., ... Vos, T. (2021). Trends in prevalence of blindness and distance and near vision impairment over 30 years: An analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*, 9(2), e130–e143. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30425-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30425-3)
- Bourne, R. R. A., Steinmetz, J. D., Saylan, M., Mersha, A. M., Weldemariam, A. H., Wondmeneh, T. G., Sreeramareddy, C. T., Pinheiro, M., Yaseri, M., Yu, C., Zastrozhin, M. S., Zastrozhina, A., Zhang, Z. J., Zimsen, S. R. M., Yonemoto, N., Tsegaye, G. W., Vu, G. T., Vongpradith, A., Renzaho, A. M. N., ... Vos, T. (2021). Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The Right to Sight: An analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*, 9(2), e144–e160. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30489-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30489-7)
- de la Fuente, M., Raviña, M., Paolicelli, P., Sanchez, A., Seijo, B., & Alonso, M. J. (2010). Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 100–117. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.026>
- Edelhauser, H. F., Boatright, J. H., Nickerson, J. M., Edelhauser, H. F., Abrams, G., Adamis, A., Aguirre, G. D., Ambati, J., Becerra, P., Behar-Cohen, F., Berglin, L., Bernstein, S., Boatright, J., Crouch, R., Freeman, W., Friedlander, M., Geroski, D., Grossniklaus, H., Heckenlively, J., ... Yorio, T. (2008). Drug delivery to posterior intraocular tissues: Third annual ARVO/Pfizer ophthalmics research institute conference.

- Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(11), 4712–4720. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1904>
- Islam, M. M., Islam, R., Mahmudul Hassan, S. M., Karim, M. R., Rahman, M. M., Rahman, S., Nur Hossain, M., Islam, D., Aftab Ali Shaikh, M., & Georghiou, P. E. (2023). Carboxymethyl chitin and chitosan derivatives: Synthesis, characterization and antibacterial activity. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 5(January), 100283. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100283>
- Kafedjiiski, K., Krauland, A. H., Hoffer, M. H., & Bernkop-Schnürch, A. (2005). Synthesis and in vitro evaluation of a novel thiolated chitosan. *Biomaterials*, 26(7), 819–826. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.03.011>
- Kazachenko, A. S., Akman, F., Malyar, Y. N., ISSAOUI, N., Vasilieva, N. Y., & Karacharov, A. A. (2021). Synthesis optimization, DFT and physicochemical study of chitosan sulfates. *Journal of Molecular Structure*, 1245, 131083. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131083>
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
- Li, J. M., Lin, N., Zhang, Y., Chen, X., Liu, Z., Lu, R., Bian, F., Liu, H., Pflugfelder, S. C., & Li, D. Q. (2024). Ectoine protects corneal epithelial survival and barrier from hyperosmotic stress by promoting anti-inflammatory cytokine IL-37. *Ocular Surface*, 32(October 2023), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2024.03.002>
- Martin-Mendia N., Sáez-Martínez V., Pérez-González R., Gartzandia O., Pedraz J.L. (2025). Hybrid polymeric systems for potential applications in ocular drug delivery. In B. A. A. Emmanuel Rotimi Sadiku (Ed.), *Hybrid Polymeric Systems for Biomedical Applications* (pp. 265–313). <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15564-2.00008-1>.
- Sajomsang, W., Tantayanon, S., Tangpasuthadol, V., & Daly, W. H. (2008). Synthesis of methylated chitosan containing aromatic moieties: Chemoselectivity and effect on molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 72(4), 740–750. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.10.023>
- Salapatek, A. M., Werkhäuser, N., Ismail, B., Mösges, R., Raskopf, E., & Bilstein, A. (2021). Effects of ectoine containing nasal spray and eye drops on symptoms of seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Clinical and Translational Allergy*, 11(1). <https://doi.org/10.1002/ctt2.12006>
- Song, H., Wu, H., Li, S. J., Tian, H., Li, Y. R., & Wang, J. G. (2018). Homogeneous synthesis of cationic chitosan via new avenue. *Molecules*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23081921>
- Victor, R. de S., Santos, A. M. da C., de Sousa, B. V., Neves, G. de A., Santana, L. N. de L., & Menezes, R. R. (2020). A review on Chitosan's uses as biomaterial: Tissue engineering, drug delivery systems and cancer treatment. In *Materials* (Vol. 13, Issue 21, pp. 1–71). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma13214995>
- Vllasaliu, D., Exposito-Harris, R., Heras, A., Casettari, L., Garnett, M., Illum, L., & Stolnik, S. (2010). Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 400(1–2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.020>
- Wen, Y., Zhang, X. Y., Sheng, L., & Lian, X. J. (2014). Preparation and in vitro release study of quaternized chitosan nanoparticles. *Advanced Materials Research*, 1053, 466–472. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1053.466>

7. Eskerrak eta oharrak

Lan honek jarraian adierazitako laguntzak jaso ditu:

- I+Med S.Coop.-en bitartez Bikaintek 2022 beka, 011-B2/2022 espediente zenbakiarekin.
- “European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme” Marie Skłodowska-Curie No 871650 akordioaren barnean, Medipol proiektua. Proiektu hau Birminghameko “Aston Univesity” unibertsitatearekin elkarlanean burutu da.