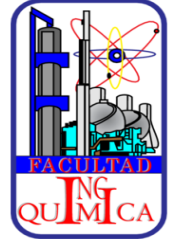




BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN ANTIFÚNGICA DE
QUITOSANO ANTE EL HONGO CAUSANTE DE LA
ONICOMICOSIS”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN MATERIALES

PRESENTA

MARLENE LÓPEZ MORENO

DIRECTORES DE TESIS

DR. HERIBERTO HERNÁNDEZ COCOLETZI

CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. EVA ÁGUILA ALMANZA

PUEBLA, PUE. OCTUBRE 2024



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/093/2024
Asunto: Registro de Tema de Tesis.

C. MARLENE LÓPEZ MORENO
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
INGENIERÍA EN MATERIALES
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería en Materiales cuyo título es el siguiente:

“EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN ANTIFÚNGICA DE QUITOSANO ANTE EL HONGO CAUSANTE DE LA ONICOMICOSIS”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Director de Tesis: Dr. Heriberto Hernández Cocoletzi
Co-Directora: Dra. Eva Águila Almanza.

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **UNICAMENTE POR UN AÑO**.

Atentamente
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 7 de Mayo de 2024

Dra. Valeria Jordana González Coronel
Secretaria Académica

C.c.p. Director de Tesis: Dr. Heriberto Hernández Cocoletzi
C.c.p. Co-Directora: Dra. Eva Águila Almanza
C.c.p. Archivo.

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251

ÍNDICE

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	12
1.1 Onicomycosis	12
1.1.1 Área estudiada.....	12
1.1.2 Predisposición y presentación clínica	12
1.1.3 Etiología.....	14
1.1.4 Modelo de interacción fúngico-huésped.....	14
1.1.5 Control de la enfermedad.....	15
1.2 <i>P. chrysogenum</i>	16
1.2.1 Taxonomía.....	16
1.2.2 Características morfológicas.....	16
1.3 Quitosano	17
1.3.1 Propiedades	18
1.4 Estado del arte	20
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	22
2.1 Obtención de quitosano	23
2.1.1 Obtención de materia prima.....	23
2.1.2 Desmineralización.....	23
2.1.3 Desproteización	23
2.1.4 Desacetilación	24
2.2 Caracterización del quitosano	25
2.2.1 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)	25
2.2.2 Grado de desacetilación.....	25
2.2.3 Peso molecular	25
2.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	26
2.3.1 Obtención de la muestra	26
2.3.2 Cultivo de la lesión	27
2.3.3 Microscopía óptica	27
2.3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	29
2.4 Evaluación <i>in vitro</i>	29
2.4.1 Preparación de las soluciones de quitosano	29
2.4.2 Inoculación del hongo	31

2.4.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	32
2.4.4	Pruebas de inhibición	32
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		34
3.1	Quitosano	34
3.2.1	Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)	34
3.2.2	Grado de desacetilación	36
3.2.3	Peso Molecular	37
3.2.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	38
3.3	Identificación del hongo patógeno	40
3.3.1	Cultivo de la lesión	40
3.3.2	Microscopía óptica	41
3.3.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	42
3.4	Evaluación <i>in vitro</i>	43
3.4.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	45
3.4.2	Crecimiento micelial radial	49
3.4.3	Velocidad de crecimiento del hongo	55
3.4.4	Análisis estadístico	61
CONCLUSIONES		71
RECOMENDACIONES		72
REFERENCIAS		73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presentación clínica de la onicomicosis: a) Distolateral. b) Proximal. c) Superficial. d) Endonyx. e y f) Distrófica Total. Fuente: Zahara et al. (2018).	14
Figura 2. Reacción de desacetilación de la quitina.	18
Figura 3. Diagrama general de la metodología.	22
Figura 4. Molino utilizado para la pulverización del esqueleto de camarón.	23
Figura 5. Proceso de desmineralización.	23
Figura 6. Baño ultrasónico.	24
Figura 7. Desacetilación de la quitina.	24
Figura 8. Lavado en centrífuga.	24
Figura 9. Medición de viscosidad específica del quitosano.	26
Figura 10. Microscopio electrónico de barrido utilizado.	26
Figura 11. Toma de muestra. (a) Zona ungueal afectada del hallux, (b) Muestra depositada en la caja petri.	27
Figura 12. Aislamiento y purificación en medio de cultivo SDA con gentamicina y cloranfenicol (100 µg/mL). (a) Inoculación de material ungueal, (b) Purificación del hongo.	27
Figura 13. Microscopio óptico.	28
Figura 14. Portaobjetos con muestra directa de la zona ungueal afectada en la solución de KOH/azul lactofenol, relación 2:1.	28
Figura 15. Portaobjetos con muestra del hongo aislado.	28
Figura 16. Microscopio electrónico de barrido.	29
Figura 17. Soluciones QS/SDA.	30
Figura 18. Esterilización de las	31
Figura 19. Llenado de las cajas petri.	31
Figura 20. Discos de <i>Penicillium</i>	31
Figura 21. Discos de micelio en los tratamientos.	31
Figura 22. Pulverizador catódico.	32
Figura 23. FTIR de las muestras de quitosano a 40, 50, 60, 70 y 80 min de sonicación.	35
Figura 24. Grado de desacetilación del Qs en función del tiempo de sonicación.	37
Figura 25. Imágenes SEM de muestras de Qs a: (a) 40, (b) 50, (c) 60, (d) 70 y (e) 80 minutos de sonicación.	39
Figura 26. Tamaño de partícula en función del tiempo de sonicación de las muestras de quitosano.	40
Figura 27. Morfología de <i>Penicillium chrysogenum</i> (a) anverso y (b) reverso. Al día 21 de crecimiento en medio SDA a 28°C.	41
Figura 28. Morfología de la colonia de <i>P. chrysogenum</i> con aumento de 40x: (a) Muestra del hallux. (b) Hongo aislado en SDA.	41
Figura 29. Micrográficas SEM de <i>P. chrysogenum</i> . (a) 500x de aumento. (b) 1000x de aumento. (c) 3000x de aumento, vista de conidios.	42
Figura 30. Actividad antifúngica de los tratamientos en comparación con el control, en el día 2 de incubación.	44
Figura 31. Actividad antifúngica de los tratamientos en comparación con el control, en el día 6 de incubación.	44

Figura 32. Actividad antifúngica de los tratamientos en comparación con el control, en el día 14 de incubación.	45
Figura 33. Micrografías SEM de <i>P. chrysogenum</i> a 1000x en tratamiento. (a) Control. (b)1A: 0.2% Qs-40 min /SDA. (c)1D: 1% Qs-40 min /SDA. (d) 2C: 1% Qs-50 min /SDA. (e) 3C: 1% Qs-60 min /SDA. y (f) 4A: 0.2 Qs-70 min /SDA.	47
Figura 34. Micrografías SEM de <i>P. chrysogenum</i> a 1000x en tratamiento. (g) 5A: 0.2% Qs-80 min /SDA. y (h) 5C: 1% Qs-80 min /SDA.	48
Figura 35. Actividad antifúngica de Qs-40 min en <i>P. chrysogenum</i> , durante 14 días de incubación.	51
Figura 36. Actividad antifúngica de Qs-50 min en <i>P. chrysogenum</i> , durante 14 días de incubación.	52
Figura 37. Actividad antifúngica de Qs-60 min en <i>P. chrysogenum</i> , durante 14 días de incubación.	52
Figura 38. Actividad antifúngica de Qs-70 min en <i>P. chrysogenum</i> , durante 14 días de incubación.	53
Figura 39. Actividad antifúngica de Qs-80 min en <i>P. chrysogenum</i> , durante 14 días de incubación.	53
Figura 40. Cinética de crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-40 min y el control.	59
Figura 41. Cinética de crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-50 min y el control.	59
Figura 42. Cinética de crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-60 min y el control.	60
Figura 43. Cinética de crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-70 min y el control.	60
Figura 44. Cinética de crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-80 min y el control.	61
Figura 45. Prueba de Tukey para los tratamientos durante 14 días.	62
Figura 46. Continuación de la Figura 57 de la prueba de Tukey.	63
Figura 47. Continuación de la Figura 58 de la prueba de Tukey.	64
Figura 48. Gráfica de caja del efecto inhibitorio de Qs (40, 50, 60, 70 y 80 min) durante los 14 días de incubación.	65
Figura 49. Prueba de Tukey para los tratamientos durante 14 días.	66
Figura 50. Continuación de la Figura 63 de la prueba de Tukey.	67
Figura 51. Continuación de la Figura 64 de la prueba de Tukey.	68
Figura 52. Gráfica de caja de la velocidad de crecimiento de Qs durante 14 días de incubación.	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>P. chrysogenum</i>	16
Tabla 2. Etiquetado de las soluciones preparadas.	30
Tabla 3. Asignación de las bandas de absorción características de las muestras de quitosano en los espectros IR.	36
Tabla 4. Grado de desacetilación de las muestras de quitosano obtenidas mediante distintos tiempos de sonicación.	37
Tabla 5. Peso molecular promedio viscoso del quitosano.	38
Tabla 6. Tamaño promedio de fiálides y conidios en los tratamientos con mayor porcentaje de inhibición con diferente quitosano.	48
Tabla 7. Efecto de los tratamientos de Qs sobre el crecimiento micelial de <i>Penicillium chrysogenum</i>	49
Tabla 8. Características de los tratamientos con mayor porcentaje de inhibición al día 14 para cada tratamiento con distinto quitosano.	54
Tabla 9. Velocidad de crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> en los tratamientos con distintos Qs (40, 50, 60, 70 y 80 min) cada 2 días (48 horas).	56

RESUMEN

La onicomicosis es una enfermedad causada por hongos que afecta a personas en todo el mundo. El objetivo principal de esta tesis es evaluar la actividad antifúngica del quitosano frente al hongo causante de la onicomicosis. El quitosano se obtuvo mediante un método químico asistido por ultrasonido, variando el tiempo de sonicación durante la etapa de desproteínización, lo que permitió obtener quitosano con diferentes características fisicoquímicas. Conforme aumentó el tiempo de sonicación, de 40 a 80 minutos, el grado de desacetilación disminuyó de 86.7 a 67%. El peso molecular varió entre 1612 y 590 kDa, mientras que el tamaño de partícula se situó en el intervalo 32.4 – 14.2 μm .

Con el quitosano obtenido, se prepararon soluciones de diversas concentraciones (0.2%, 0.5%, 1% y 2%). La mayor actividad antifúngica contra *P. Chrysogenum*, se observó en las muestras de quitosano obtenidas con 70 y 80 minutos de sonicación a una concentración de 0.2% logrando inhibiciones del 48.14% y 47.34%, respectivamente. La velocidad de crecimiento micelial del patógeno en los tratamientos fue de 0.0048 y 0.0049 cm/h, respectivamente.

En conclusión, el quitosano demostró actividad antifúngica, donde su funcionalidad está estrechamente relacionada con el grado de desacetilación, el peso molecular, el tamaño de partícula y la concentración, los cuales desempeñan un papel crucial en la interacción del quitosano con la superficie celular del patógeno.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La onicomicosis es una enfermedad que afecta aproximadamente al 5.5% de la población mundial; en personas de la tercera edad, la afección es hasta del 35% (Marín, 2021). En América del Norte, la ocurrencia en niños es del 0.4%, mientras que en México se calcula que entre el 2 y el 8% de las personas la padece (Marín, 2021; Secretaria de Salud, 2016). Se trata de una de las enfermedades infecciosas y contagiosas más comunes, causada por hongos y afecta principalmente las uñas de los pies y las manos (Nazar, Gerosa y Díaz, 2012). La zona ungueal de los pies es la más afectada, con una prevalencia del 80% mayor que en las manos (del Cid, 2019). Además de ser un problema de salud pública, también representa una preocupación estética.

Hasta la fecha, los tratamientos disponibles requieren largos periodos de aplicación. Entre los medicamentos sistémicos más usados están la terbinafina y el itraconazol (Bouchara, Nenoff, Gupta y Chaturvedi, 2021; del Cid, 2019), con una duración de tratamiento que puede extenderse de 6 a 12 meses. La terbinafina, aunque efectiva, puede causar efectos secundarios como dolor de cabeza, síntomas gastrointestinales, sarpullido, y en casos menos frecuentes, anomalías en las enzimas hepáticas y alteraciones del gusto (Bouchara et al., 2021). Los tratamientos tópicos actuales, aunque menos propensos a generar efectos secundarios, también requieren varios meses para curar la enfermedad. Debido a los resultados limitados ante diversos agentes causantes de la onicomicosis, a menudo se combinan tratamientos sistémicos y tópicos (del Cid, 2019). Uno de los principales problemas de los tratamientos actuales es que pueden causar hepatotoxicidad y a la persistencia de la enfermedad (Tejedor, González y Mayordomo, 2021). Esto resalta la necesidad de desarrollar tratamientos más efectivos y con menos efectos adversos para mejorar el control de la onicomicosis.

JUSTIFICACIÓN

La onicomicosis se ha vuelto un problema de salud pública, a pesar de las mejoras en la calidad de la vida y las medidas de higiene personal. Actualmente no existe un tratamiento ideal para combatirla y los fármacos actuales presentan tiempos prolongados de curación, algunos pueden ocasionar efectos secundarios. Esto ha conducido a la búsqueda de productos menos nocivos a la salud, que presenten actividad antifúngica ante el hongo causante de esta infección.

Entre los materiales que se han propuesto utilizar contra hongos patógenos humanos, se encuentra el quitosano. Este material es un polímero lineal de origen natural derivado de la quitina, la cual puede encontrarse en crustáceos como en las conchas de cangrejo o en las cáscaras de camarón e incluso en hongos; además, puede emplearse de manera oral o tópica, como ya se ha visto por ejemplo en la liberación controlada de fármacos o en la cicatrización de heridas (Guo et al., 2024). El quitosano es un material no tóxico, biodegradable, biocompatible, con una amplia actividad antibacteriana y antifúngica, que se ha empleado como fungicida sobre varios patógenos fúngicos en plantas y humanos (Ke, Deng, Chuang y Lin, 2021; Mania et al., 2023). En el caso de humanos, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y otras especies de *Candida* presentan susceptibilidad al quitosano a concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), lo cual está asociado a su grado de desacetilación y a su peso molecular (Ke et al., 2021).

Es importante encontrar un material antifúngico menos nocivo y que sea eficaz para tratar la onicomicosis; por eso, el presente trabajo se enfocará en obtener quitosano de diferente grado de desacetilación y peso molecular, para evaluar su funcionalidad antifúngica ante el hongo patógeno causante de la onicomicosis en la zona ungueal del pie. El quitosano proporciona ventajas al ser un material natural de fácil obtención y de bajo costo; además, puede ser utilizado de forma oral o tópica; es biocompatible, biodegradable, no tóxico y con actividad antifúngica probada en hongos patógenos, por lo que es una opción viable.

HIPÓTESIS

El quitosano presenta actividad antifúngica ante el hongo causante de la onicomicosis.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica del quitosano ante el hongo de la onicomicosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener quitosano modificando las condiciones químicas del proceso.
- Caracterizar el quitosano para determinar sus propiedades fisicoquímicas.
- Recolectar una muestra clínica de un paciente diagnosticado con onicomicosis en la zona ungueal del pie.
- Identificar el hongo patógeno responsable de la onicomicosis mediante un examen microscópico y cultivo microbiológico.
- Aislar el hongo causante de la infección para su posterior análisis.
- Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio del quitosano sobre el hongo aislado, determinando su eficiencia antimicótica.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Onicomycosis

1.1.1 Área estudiada

La onicomycosis es una enfermedad de la zona ungueal de manos y pies causada por hongos patógenos que supone el 50% de las onicopatías a nivel mundial (Pérez et al., 2018). A nivel mundial la padece el 5.5% de la población y su prevalencia va en aumento del 2,1% al 9,1%; afecta hasta al 35% de las personas de la tercera edad (Marín, 2021; Pérez et al., 2018). La prevalencia media de la enfermedad en Europa y América del Norte es del 4.3% según estudios poblacionales, siendo causada principalmente por dermatofitos; en América del Norte, el 0.4% de los niños la padece (Bouchara, et al., 2021; Marín, 2021). En México se calcula que entre el 2 y el 8% de las personas tiene esta enfermedad (Secretaria de Salud, 2016). En Ciudad de México en el año 2008 se hizo un análisis retrospectivo en el que se identificó con mayor frecuencia en las uñas de los pies (94%), respecto de las manos (del Cid, 2019); en otro estudio realizado en México a 7250 personas (del año 2010 al 2019) se halló que el 58.9% padecía onicomycosis, identificando del 55% las formas clínicas (subungueal distal 17.5% y distrófica total 16.3%, son las más frecuentes), siendo *Tricophyton Rubrum* el agente causal con mayor prevalencia en este y otro estudio realizado (del año 1995 al 2015) a 78,239 personas (Fonseca, Urbano y Zanguña, 2022; Marín, 2021). Pakshir et al. (2021) reportó 50 mohos no dermatofitos aislados causantes de onicomycosis, los cuales fueron algunas especies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. sydowii* y *A. terreus*) *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. glabrum*) y *Fusarium* (*F. solani* y *F. thapsinum*).

1.1.2 Predisposición y presentación clínica

Las personas pueden contagiarse fácilmente por el uso de calzado cerrado, el contacto con zonas húmedas en áreas públicas, manicura o pedicura y pueden estar más predispuestos al contagio si tienen enfermedades como diabetes, psoriasis e inmunosupresión (Bouchara et al., 2021; Pérez, et al., 2018). Además, se puede ver predispuesto por factores genéticos y socioeconómicos y ambientales (Martínez, Peres, Bitencourt, Martins y Rossi, 2021).

La onicomicosis es una infección causada por hongos en la zona ungueal de manos y pies que presentan con mayor ocurrencia adultos respecto de niños, en la cual las manifestaciones clínicas se observan en el engrosamiento de las uñas y/o en la piel de bajo de éstas, su cambio de color, onicólisis, división y destrucción de la placa ungueal (Cañete y Wiederhold, 2023).

Su presentación clínica depende de la forma en que el hongo entra a la zona ungueal (Figura 1), por lo que de acuerdo con Fonseca et al. (2022) y Zahara, Dehavay y Richert (2024) puede clasificar en onicomicosis:

- Subungueal distolateral (85% de los casos): el hongo penetra la parte inferior de la punta distolateral de la zona ungueal extendiéndose proximalmente. La uña puede presentar coloración blanca amarillenta, separación del lecho ungueal, hiperqueratosis en la parte inferior del hiponiquio y el lecho ungueal.
- Subungueal proximal: el hongo invade la zona de la cutícula y penetra por la parte de abajo del pliegue proximal a la uña y se extiende distalmente. Se presenta como una leuconiquia proximal (con manchas blancas o líneas transversales) o leuconiquia longitudinal proximodistal. Se relaciona con pacientes que presentan inmunosupresión.
- Superficial: el hongo ingresa mediante la capa superficial de la lámina ungueal. Se presentan pequeñas manchas calcáreas blancas con verdes afilados en la zona ungueal de los pies.
- Endonyx: el grosor de la placa ungueal se ve afectado por el hongo desde el borde libre, dejando intacto el lecho ungueal y la superficie. Se presenta una lesión opaca de color blanco lechoso sin onicólisis, hiperqueratosis subungueal o alteración superficial.
- Distrófica total: se presenta cuando ya ha progresado durante varios años, por lo que es la etapa final de la enfermedad. La zona ungueal presenta un gran grosor, es hiperqueratósica o totalmente atrófica, con restos de queratina en el lecho ungueal.



Figura 1. Presentación clínica de la onicomicosis: a) Distolateral. b) Proximal. c) Superficial. d) Endonyx. e y f) Distrófica Total. Fuente: Zahara et al. (2018).

1.1.3 Etiología

Los hongos que pueden causar onicomicosis de acuerdo con del Cid (2019) se clasifican en:

- Dermatofitos: los géneros implicados son *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*. El *Trichophyton rubrum* es el más frecuente en onicomicosis a nivel mundial.
- Levaduras: se encuentran especies de *Cándida* como *Cándida albicans* (más frecuente), *C. parasilopsis*, *C. tropicalis*. Representan del 5 al 20% de la onicomicosis.
- Mohos no dermatofitos: los mohos hiliaños y los mohos demitiáceos pueden ser asociados también como especies invasoras secundarias. *Aspergillus* y *Fusarium* se presentan con mayor frecuencia, entre 1 y el 5% a nivel mundial. *Penicillium chrysogenum*, *P. commune* y *P. glabrum* también han sido identificado como causante de onicomicosis (Pakshir et al., 2021).

1.1.4 Modelo de interacción fúngico-huésped

En la onicomicosis de acuerdo con Martínez et al. (2021) refieren que los hongos detectan y se adaptan a la zona ungueal, donde las células fúngicas mediante reordenamiento mecánico y bioquímico colonizan la estructura queratinizada, en la que la unión de las

células fúngicas a los tejidos del huésped depende de las adhesinas específicas de carbohidratos ubicadas en la superficie de los conidios y proyecciones de fibrillas que conectan las artrosporas adyacentes con la piel. Los hongos deben buscar y recolectar nutrientes para asegurar la permanencia de la infección, mientras que los conidios o las artrosporas liberan enzimas, producen lipasas, ceramidas e invaden la queratina superficial siendo los causantes de la infección en el aparato ungueal (Fonseca et al., 2022; Martínez et al., 2021). Como una estrategia de supervivencia fúngica, los conidios pueden permanecer en un estado de reposo, ya que en algunos hay ARN y proteínas involucradas en el mantenimiento, latencia y germinación de los conidios, como en el caso de *T. rubrum* (Martínez et al., 2021).

1.1.5 Control de la enfermedad

Inicialmente se requiere llevar a cabo la identificación de la enfermedad y el patógeno que la causa. La identificación de onicomycosis se puede llevar a cabo mediante muestreo micológico, dermatoscopia, tomografía de coherencia óptica y microscopía de reflectancia confocal (Zahara et al., 2024).

En el tratamiento de la onicomycosis se han utilizado medicamentos tópicos y sistémicos y terapias combinadas con ambos. Los medicamentos sistémicos utilizados son el fluconazol, la terbinafina, el itraconazol, el lanocanazol, entre otros; únicamente los últimos tres están autorizados por la FDA (Bouchara et al., 2021; del Cid, 2019); la terbinafina puede ocasionar efectos secundarios tales como dolor de cabeza, síntomas gastrointestinales, sarpullido, anomalías de las enzimas hepáticas y alteraciones del gusto (Bouchara, et al., 2021). Entre los tratamientos tópicos se ha utilizado bifonazol al 1%, tioconazol al 28% o ciclopirox al 8%; en el tratamiento mediante oclusión o desbridamiento (mecánico, químico o quirúrgico) de la uña, se aumenta la tasa de curación al disminuir la masa fúngica y facilitar la difusión de los agentes antifúngicos (del Cid, 2019; Zahara et al., 2024).

Es difícil tratar la onicomycosis debido a que el hongo penetra y permanece en la lámina ungueal; además, presenta tiempos de curación muy prolongados, desde 6 hasta 12 meses lo que conduce al abandono y muchas veces un mal diagnóstico puede conducir a un mal tratamiento. Hay medicamentos que inclusive pueden ocasionar hepatotoxicidad (Marín, 2021; Tejedor et al., 2021). Aunque existen tratamientos disponibles, hay

información sobre la resistencia y la tolerancia a los antifúngicos; como en el caso del dermatofito *T. rubrum* que es uno de los más predominantes y de los más reportados con resistencia a tratamientos estándar (Martínez et al., 2021).

1.2 *P. chrysogenum*

El hongo *P. chrysogenum* ha sido utilizado como productor de penicilina a nivel industrial, pero que en algunos casos puede actuar sobre la salud como un agente patogénico causante de onicomycosis, queratomicosis, micosis broncopulmonar alérgica y asma (Abastabar et al., 2016).

1.2.1 Taxonomía

La taxonomía de *P. Chrysogenum* de acuerdo con Fernández (2014) se clasifica de la siguiente manera, Tabla 1.

Tabla 1. Taxonomía de *P. chrysogenum*.

Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Sub-phylum	Pezizomycotina
Clase	Eurotiomycetes
Subclase	Eurotiomycetidae
Orden	Eurotiales
Familia	Thricomaceae
Subfamilia	Aspergillaceae
Género	Penicillium
Especie	Penicillium chrysogenum

1.2.2 Características morfológicas

El hongo puede reproducirse asexualmente por la fermentación del micelio o generando conidios los cuales una vez formados y al quedar libres en un medio nutritivo se hinchan y rompen su pared celular y emiten brotes de hifas tabicadas y divididas por septos de pared celular que se nutren del sustrato (no penetran más allá de los 4.5 mm) hasta que forman un micelio de hifas compactas (en las terminales los productos de la hidrólisis

vacuolar se emplean en la producción de energía y en la síntesis de materiales celulares nuevos que sostienen el crecimiento en estas regiones del micelio) donde se producen conidióforos asimétricos bi- o tervicelados que se proyectan sobre la superficie del micelio y en cuyo extremo libre se forman las mètulas ramificadas y sobre estas se asientan las fiálides (no superan las 15 μm y presentan forma de botella) que están llenas de citoplasma rico en reservas y son las encargadas de formar los conidios elípticos (4x3.3 μm) o subglobosos (4x4.5 μm) que después de que finaliza el estrangulamiento de la fiálide estos quedan libres y pueden germinar dando comienzo de nuevo al ciclo (Fernández, 2014; Xia et al., 2018). El hongo microscópicamente presenta la forma característica de pincel.

1.3 Quitosano

El quitosano (Qs) es un polímero catiónico lineal cuyo monómero principal es el 2-amino-2-desoxi- β -D-Glucopiranososa derivado de la quitina (segundo polisacárido más abundante en la naturaleza) la cual puede presentarse en tres formas polimórficas en las que varía la dirección, en capas de cadenas de polisacáridos con diferente dirección en forma antiparalela (α), capas en forma paralela (β) y en cada tercera capa con dirección opuesta a las dos anteriores (γ), siendo posible obtenerla mediante el método químico y biológico (Torres, 2023). La quitina se encuentra en la pared celular de hongos como los ascomicetos, zigomicetos y basidiomicetos (Vallejo, 2019); también en exoesqueletos de artrópodos como el camarón, la langosta, los cangrejos y arácnidos (Guo et al., 2024; Mania et al., 2023).

El quitosano se obtiene al desacetilar parcialmente a la quitina (Figura 2), usando ciertos álcalis, lo cual genera grupos amina cargados positivamente en la estructura confiriéndole un carácter policatiónico (Solis, 2023; Rodríguez et al., 2022). Se puede obtener con diferente grado de desacetilación (GD) en un intervalo de 50 a 90%; si se alcanza el 100% se le denomina quitano (Solis, 2023; Vallejo 2019). También se puede obtener con diferente peso molecular, lo que permite clasificar al quitosano de acuerdo con este parámetro en peso molecular bajo (menor a 150 kDa), peso molecular medio (de 150 a 700 kDa) y peso molecular alto (mayor a 700 kDa) (Arias, Veloza y Sepúlveda, 2020).

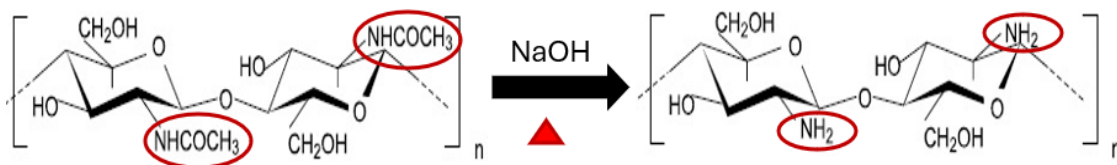


Figura 2. Reacción de desacetilación de la quitina.

1.3.1 Propiedades

Propiedades químicas

Las propiedades que posee el quitosano incluyen: alta hidrofiliidad y cristalinidad, insolubilidad al agua y disolventes inorgánicos, conductividad iónica, agente floculante, propiedades quelantes y complejas, adhesión para el aislamiento de biomoléculas, biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, capacidad de acelerar la cicatrización, propiedad hemostática, antiácida, antiulcerosas y antitumorales (Mania et al., 2023; Vallejo, 2019).

Una de las propiedades más relevantes y de interés para el presente trabajo es su actividad antimicrobiana. En hongos patógenos humanos y fitopatógenos tiene un efecto fungicida y fungistático, el cual se relaciona con su naturaleza policationica, originada por los grupos amina cargados positivamente; estos generan la interacción con la pared o membrana celular cargada negativamente (a mayor contenido de ácidos grasos más carga negativa) dando lugar a la salida de proteínas, afectando el ARN y la función mitocondrial (Ke et al., 2021; Rodríguez, 2022). El quitosano de acuerdo con estudios reportados ha sido útil en el tratamiento de hongos patógenos y fitopatógenos. En hongos suele inhibir la germinación de esporas, el alargamiento del tubo germinal y el micelio (Torres, 2023).

Propiedades fisicoquímicas

La funcionalidad del quitosano está ligada con sus propiedades fisicoquímicas, tales como:

- Solubilidad: el quitosano es soluble en soluciones acidas gracias a los grupos amino protonados (con un valor aproximado de 6.5 pKa) y depende de factores como el peso molecular, el grado de desacetilación, el pH, la temperatura y la cristalinidad del

polímero (Aranaz et al., 2021). El ácido acético al 0.1M se suele emplear para probar la solubilidad del quitosano (Vallejo, 2019).

- Grado de desacetilación (DA): el grado de desacetilación (GD) del quitosano permite diferenciarlo de la quitina por la presencia de grupos amina cargados positivamente. El GD determina la relación de las unidades repetitivas 2-acetilamina-2- desoxi-β-D-(+)-glucosimina entre la 2-amino-2-desoxi-β-D-Glucopiranososa, donde sí esta última representa igual o más del 50% ya se considera quitosano (Solis, 2023; Vallejo, 2019). Uno de los métodos más fáciles y rápidos para determinar el GD es el de correlación desde el espectro infrarrojo, el cual utiliza las bandas de absorción de los grupos funcionales amina III (1320 cm⁻¹) y CH₂ (1420 cm⁻¹) (Ramírez, Delgado y Andrade, 2016); otros métodos empleados son la espectroscopia H-NMR, titulación potenciométrica, espectroscopía-UV, espectroscopía-CD, titulación coloidal y métodos enzimáticos (Solis, 2019).
- Peso molecular: la viscosidad sirve como herramienta para determinar el peso molecular ya que está intrínsecamente ligada a este. Mediante viscosimetría capilar se puede determinar el peso molecular promedio, utilizando la ecuación 1, propuesta por Mark-Houwink-Khun-Sakurada (Tan, Kaya, Tavlek, Sargin y Baran, 2018); de acuerdo con Pastor (2004) refiere que las constantes dependen de los parámetros de temperatura, disolvente y grado de desacetilación (GD) del quitosano.

$$[n] = kM_v^a \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde:

n: viscosidad intrínseca.

M_v: viscosidad promedio.

k y a: son constantes de Mark-Houwink-Khun-Sakurada.

El quitosano ha sido utilizado en un sinnúmero de aplicaciones como en el área de la salud debido a sus diversas propiedades. En forma de andamio, hidrogel, inyectable o película para la administración de medicamentos, cicatrización de heridas, en ingeniería de tejidos óseos, tejidos cartilagosos, tejidos cutáneos y como función terapéutica como posible agente cancerígeno (Gupta, Sharma, Jabin y Jadoun, 2024; Maj et al., 2019). Así como en el tratamiento de infecciones como la causada por *Candida albicans* o *Aspergillus*

fumigatus que causa infección invasiva potencialmente mortal en personas con el sistema inmune debilitado en el que el quitosano funciona como una sustancia antigénica e inhibe la infección (Nasiri-Jahrodi, Shams-Ghahfarokhi, Paskiabi y Razzaghi-Abyaneh, 2024; Zhang et al., 2024)

1.4 Estado del arte

El quitosano es un polímero biocompatible que de acuerdo con estudios reportados ha presentado actividad antifúngica ante diversos hongos como en hongos patógenos de especies del género *Candida* (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, entre otras), *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Ke et al, 2021; Pakshir et al., 2021); y en hongos fitopatógenos se ha usado frente a la especie *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae*, *Collectotrichum gloeosporoides* (Rodríguez, Bautista, Ramírez, Plascencia y Hernández, 2022; Solis, 2023), entre otros.

La actividad antifúngica del quitosano puede afectar el crecimiento micelial, el desarrollo del hongo, su esporulación, su viabilidad y germinación de las esporas (Rodríguez et al., 2022).

Sun et al. (2021) evaluaron la acción antifúngica in vitro del quitosano con peso molecular de 100kDa y 93% de desacetilación a concentración de 0.1% contra *Penicillium expansum* aislada de manzanas en descomposición. Al día 5 de incubación presentó el 28.5% de relación inhibitoria.

Meng et al. (2020) estudiaron la actividad antifúngica del quitosano frente a *Aspergillus ochraceus* el cual puede producir ocratoxina A (OTA) la cual posee posible actividad cancerígena de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. El hongo fue cultivado en PDA con concentración de 0.05% y 0.1% de quitosano (GD=93%) a 25°C durante 7 días de incubación, concluyendo que la concentración de 0.1% fue la que presentó una mayor tasa de inhibición (34.5%).

Thanyasrisung, Satitviboon, Howattanapanich y Matangkasombut (2023) investigaron la eficacia del quitosano contra *Candida* resistente a medicamentos. Los hongos fueron cultivados en placas de agar YPD con quitosano soluble en agua (150-200 kDa) y soluble en ácido (7-9 kDa y 900-1000 kDa) a 30°C durante 48 horas. Los tratamientos con ≤ 40 mg/ml el quitosano de 150-200 kDa y ≤ 6 mg/ml de quitosano de 7-9 kDa y 900-1000 kDa fueron los que eliminaron la mayoría de los aislados de *Candida*.

Ribeiro et al. (2023) evaluaron el potencial antifúngico *in vitro* del quitosano obtenido de especies fúngicas (*Rhizopus stolonifer*, *Mucor pseudolusitanicus* L. y *Cunninghamella elegans*) frente al hongo dermatofito *Microsporium canis* (CFP 00098). El hongo fue cultivado en PDA con quitosano a concentraciones de 600, 1200 y 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ a 28°C durante 72. El quitosano obtenido de la especie *Rhizopus stolonifer* con 85.4% grado de desacetilación y masa molar de 26.23 kDa a concentración de 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ fue el que presento mayor inhibición del crecimiento micelial en *M. canis*, con hasta 62.81%.

Zhang et al. (2024) reportaron la actividad antifúngica del quitosano contra *Fusarium solani*. Utilizaron medios de cultivo de PDA con quitosano a 30, 50, 100, 150 y 200 kDa a concentración de 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g/L, durante 5 días de incubación. El quitosano a 150 kDa presento mejor inhibición del crecimiento micelial de *F. solani*; a la concentración de 0.5 g/L al día 2 y a la concentración de 1g/L al día 4 se inhibió por completo el crecimiento. La morfología del hongo tratado con quitosano a 150 kDa se deforma y colapso, presentando algunos micelios completamente fracturados y perdiendo su forma.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

El trabajo se divide en cuatro etapas, como se observa en el diagrama de la Figura 3.

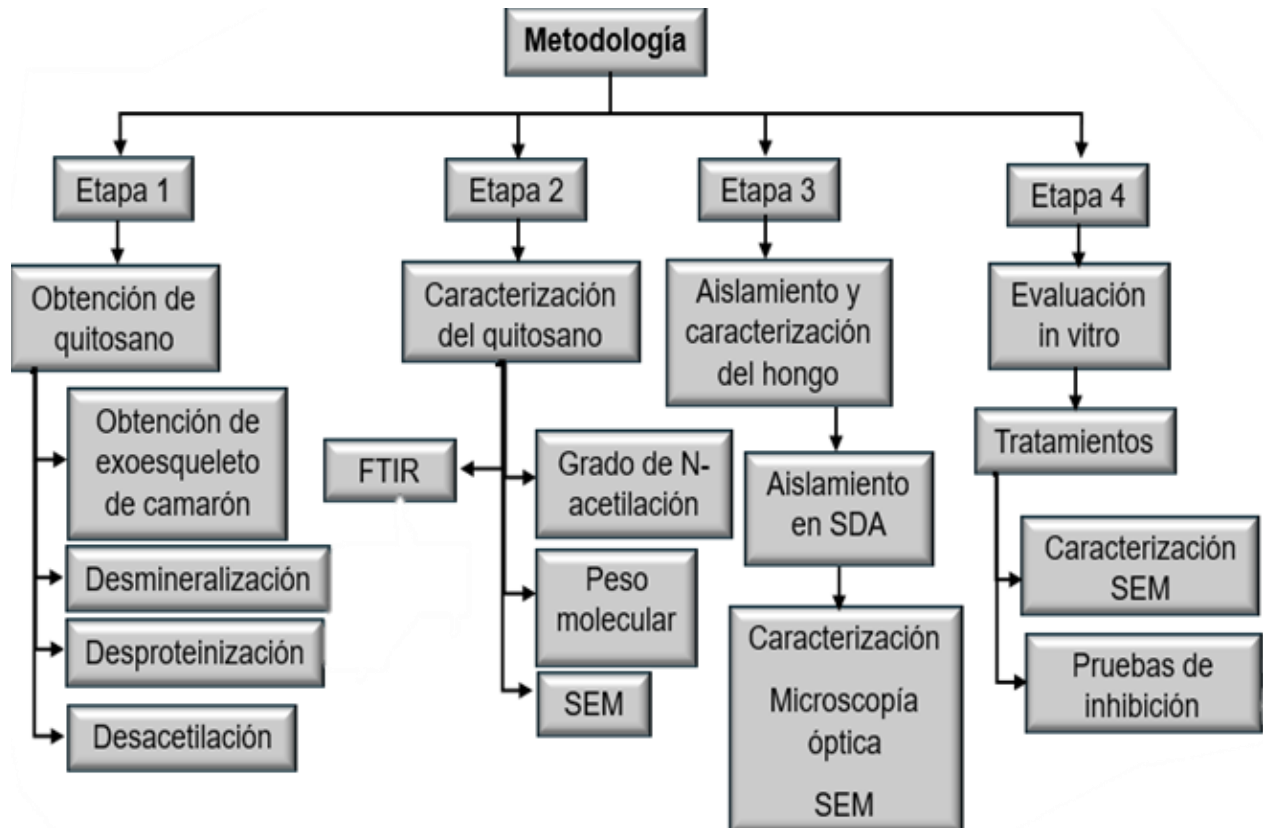


Figura 3. Diagrama general de la metodología.

2.1 Obtención de quitosano

Se utilizó la metodología propuesta por Vallejo (2019) con algunas modificaciones.

2.1.1 Obtención de materia prima

El exoesqueleto de camarón se sumergió en agua durante un día, tras lo cual se lavó repetidamente hasta eliminar completamente los residuos de carne y pigmentos. Luego, las cáscaras de camarón se secaron en una estufa convencional a 110 °C durante 4 horas. Una vez secas, se pulverizaron utilizando un molino de aspas de la marca Biolomix (Figura 4) y el polvo resultante se tamizó con una malla de 250 (0.0025 pulgadas).



Figura 4. Molino utilizado para la pulverización del esqueleto de camarón.

2.1.2 Desmineralización

Se utilizó ácido acético 0.6 M en relación 1:11 (m/v), durante 3 horas a 30 °C con agitación constante a 1200 rpm (Figura 5).



Figura 5. Proceso de desmineralización.

2.1.3 Desproteínización

El material obtenido en la etapa anterior se desproteínizó utilizando un baño ultrasónico de la marca Fisher Scientific (Figura 6) sometiéndolo a tiempos de sonicación de 40, 50,

60, 70 y 80 minutos, a temperatura ambiente. Para el proceso, se emplearon soluciones de quitina de concentración 4% en agua destilada.



Figura 6. Baño ultrasónico.

2.1.4 Desacetilación

Para la obtención del quitosano, se empleó una disolución de NaOH al 50% en una relación 1:4 (m/v). El proceso se llevó a cabo bajo agitación constante a 800 rpm y temperatura de 70 °C. Para obtener el quitosano, se utilizó hidróxido de sodio al 50% en una relación 1:4 (m/v), aplicando agitación constante de 800 rpm a 70 °C durante dos horas, seguido de un tratamiento a 115 °C por dos horas adicionales. Se empleó un sistema refrigerante para condensar los vapores de la disolución de NaOH y favorecer la reacción (Figura 7). En todas las etapas, la muestra se ajustó a pH neutro mediante lavados con agua destilada, utilizando una centrífuga de la marca National Health Laboratories (Figura 8). Posteriormente, se secó en una estufa convencional a 110 °C durante 3 horas, se pulverizó en un mortero y se tamizó utilizando una malla 250 micras (0.0025 pulgadas).



Figura 7. Desacetilación de la quitina.



Figura 8. Lavado en centrífuga.

2.2 Caracterización del quitosano

2.2.1 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Las muestras de quitosano se caracterizaron mediante espectroscopía de infrarrojo (IR), utilizando un espectrofotómetro FTIR- ATR, Perkin Elmer. Aproximadamente 0.05 g de cada muestra fueron analizados, registrando el espectro en la región de IR medio (500 - 4000 cm^{-1}).

2.2.2 Grado de desacetilación

El grado de desacetilación (GD) del quitosano se determinó utilizando la metodología propuesta por Ramírez et al. (2016); en esta se utilizaron las bandas de absorción de los grupos funcionales amina III (1320 cm^{-1}) y CH_2 (1420 cm^{-1}) del espectro infrarrojo. El GD se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.3822 + 0.0313GA \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde:

GA: grado de acetilación.

GD: 100-GA

A_{1320} : Área bajo la curva de la banda de absorción del espectro de infrarrojo en el número de onda 1320 cm^{-1} .

A_{1420} : Área bajo la curva de la banda de absorción del espectro de infrarrojo en el número de onda 1420 cm^{-1} .

2.2.3 Peso molecular

El peso molecular del quitosano se determinó mediante viscosimetría capilar, utilizando un viscosímetro tipo Ubbelohde a 25 °C. Las disoluciones de quitosano se prepararon en un buffer de ácido acético 0.3M/acetato de sodio 0.2M. Para cada muestra, se utilizaron cinco concentraciones: 9.6×10^{-3} , 7.68×10^{-3} , 5.76×10^{-3} , 1.92×10^{-3} y 9.6×10^{-4} g/mL. Posteriormente, se midió el tiempo de caída de las disoluciones (Figura 9), tomando el promedio de cinco mediciones. La viscosidad intrínseca se determinó empleando la ecuación (1).

Las constantes empleadas fueron:

$$\text{Para GD= 67-74\%} \rightarrow k=7.4 \times 10^{-4} \text{ y } a=0.8$$

Para $GD= 86\% \rightarrow k=6.95 \times 10^{-4}$ y $a=0.81$



Figura 9. Medición de viscosidad específica del quitosano.

2.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El tamaño de partícula y la morfología de cada muestra se determinó mediante el uso del microscopio electrónico de barrido modelo Vega TS 5136SB (Figura 10).



Figura 10. Microscopio electrónico de barrido utilizado.

2.3 Aislamiento y caracterización del hongo causante de onicomicosis

2.3.1 Obtención de la muestra

La muestra se obtuvo de la zona ungueal del hallux de un paciente con onicomicosis distrófica total que radica en el estado de Puebla (Figura 11a). La toma de muestra se basó en el método propuesto por Pérez, Casado y Santiago (2017); previo a la toma de muestra, se realizó limpieza de la zona afectada, con una gasa estéril y alcohol de 70° en condiciones de asepsia. Posteriormente, con una hoja de bisturí se raspó, desechando la primera capa para disminuir el riesgo de contaminación. La muestra en polvo fue abundante y se depositó en una caja petri (Figura 11b).

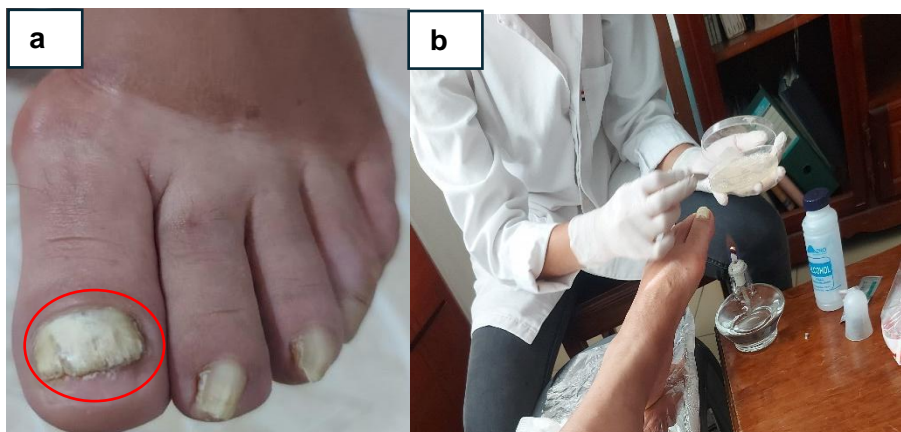


Figura 11. Toma de muestra. (a) Zona ungueal afectada del hallux, (b) Muestra depositada en la caja petri.

2.3.2 Cultivo de la lesión

Se utilizó la metodología propuesta por Nazar et al. (2012). El cultivo de la muestra de la zona ungueal del pie se llevó a cabo en agar dextrosa de Sabouraud (SDA) adicionando gentamicina y cloranfenicol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La inoculación del material ungueal se realizó con una aguja de disección estéril colocando la muestra en 4 cajas petri de 60 x 15 mm con el medio de cultivo agar dextrosa de Sabouraud (Figura 12a). Se incubó a 28 °C durante 3 semanas; posteriormente se identificó y purificó el hongo patógeno causante de la onicomicosis en cajas con el mismo medio de cultivo (Figura 12b).

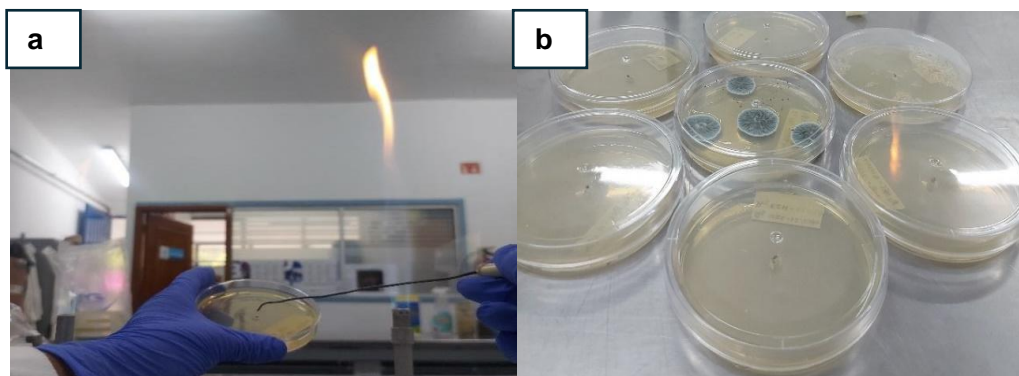


Figura 12. Aislamiento y purificación en medio de cultivo SDA con gentamicina y cloranfenicol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (a) Inoculación de material ungueal, (b) Purificación del hongo.

2.3.3 Microscopía óptica

Las estructuras fúngicas del hongo causante de la onicomicosis se identificaron mediante la observación directa en un microscopio óptico marca Rossbach S.A. Kyowa (Figura 13).

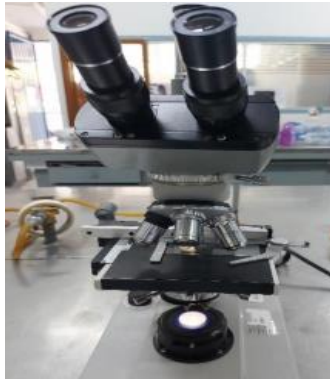


Figura 13. Microscopio óptico.

Examen directo (TED)

Se utilizó la metodología propuesta por Pérez et al. (2017); se preparó una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 30% y se agregó el colorante azul de lactofenol, en una relación de 2 partes de KOH por una de tinta. Se agregó una gota de esta solución a un portaobjetos. Sobre ella se colocó la muestra obtenida de la zona ungueal del pie y se cubrió con un cubreobjetos (Figura 14). Posteriormente se calentó suavemente con un mechero Bunsen, para eliminar la queratina; finalmente se visualizó en un microscopio óptico con aumento de 40x para identificar al hongo.



Figura 14. Portaobjetos con muestra directa de la zona ungueal afectada en la solución de KOH/azul lactofenol, relación 2:1.

Microscopía óptica del hongo aislado

Se colocó una porción de muestra del hongo aislado obtenido del cultivo de la lesión sobre un portaobjetos y se agregó una gota de azul de lactofenol (Figura 15). Posteriormente se colocó un cubreobjetos y se observó en el microscopio óptico a 40 aumentos.

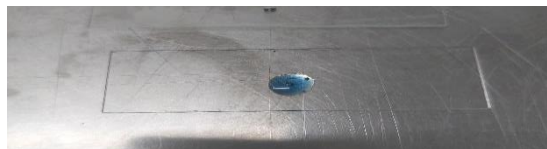


Figura 15. Portaobjetos con muestra del hongo aislado.

2.3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó el microscopio electrónico de barrido modelo JEOL USM-6610LV (Figura 16), para examinar la morfología superficial y el tamaño del hongo aislado. Se cortó 0.6 cm de inóculo previamente incubado durante 3 semanas en SDA. La muestra fue tratada previamente en un desecador durante 20 horas y posteriormente se recubrió con oro en un pulverizador de la marca Denton Vacuum-Desk V.



Figura 16. Microscopio electrónico de barrido.

2.4 Evaluación *in vitro*

Se evaluó *in vitro* el efecto inhibitorio, usando quitosano con 5 diferentes grados de desacetilación y peso molecular (Tabla 5 y 6).

2.4.1 Preparación de las soluciones de quitosano

Se utilizó el método propuesto por El-araby, Janati, Ullah, Uddin y Bari (2024), con algunas modificaciones. Las concentraciones de quitosano propuestas son 0.2%, 0.5%, 1% y 2% (Tabla 2). Se prepararon soluciones de 70 mL del medio de cultivo con quitosano (Figura 17); para esto, se mezclaron 69 mL agua destilada con 4.55 g de agar dextrosa Sabouraud y quitosano en las concentraciones indicadas arriba, adicionando 1 mL de ácido acético glacial al 2%. Una solución de 70 mL con 4.55 g de agar dextrosa de Sabouraud se empleó como medio control.



Figura 17. Soluciones QS/SDA.

Tabla 2. Etiquetado de las soluciones preparadas.

Número - Quitosano	Letra - Concentración
1 – 40 min	a – 0.2%
2 – 50 min	b – 0.5%
3 – 60 min	c – 1%
4 – 70 min	d – 2%
5 – 80 min	

Todas las soluciones se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, a una presión de 15 lb (Figura 18). Posteriormente se colocaron en una campana de flujo laminar y a cada solución se le agregaron 100 µg/mL de gentamicina y cloranfenicol (Nazar, et al., 2012). Finalmente, las soluciones fueron vertidas en cajas petri de 35 x12 mm y se dejaron durante 48 horas en la campana de flujo laminar antes de su uso (Figura 19). Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para cada solución.



Figura 18. Esterilización de las soluciones.



Figura 19. Llenado de las cajas petri.

2.4.2 Inoculación del hongo

Con un asa bacteriológica estéril se cortaron 0.6 cm de diámetro del agar dextrosa Sabouraud con el hongo *Penicillium chrysogenum* en crecimiento (Figura 20). Con una aguja de disección estéril, se sembraron los discos de micelio de 0.6 cm de diámetro en cada caja petri (Figura 21); el grupo control consistió en las cajas petri sin quitosano. Se incubaron a 28 ± 3 °C y se tomaron mediciones cada 48 horas a partir del día 2 hasta el día 14.



Figura 20. Discos de *Penicillium chrysogenum*.

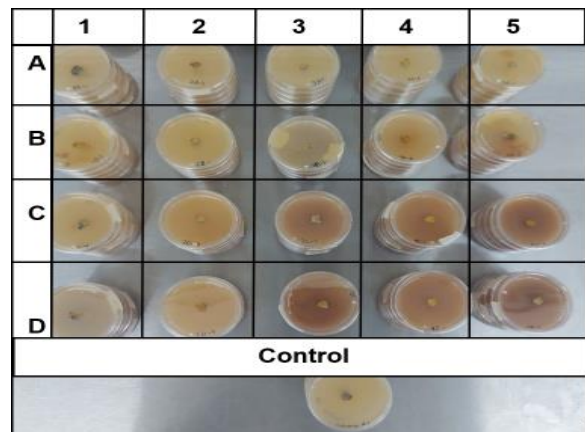


Figura 21. Discos de micelio en los tratamientos.

2.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL USM-6610LV, para examinar la morfología superficial y el tamaño del hongo sujeto a tratamiento; lo mismo se hizo con el control. En cada uno de los tratamientos con quitosano obtenido a distintos tiempos de sonicación (40, 50, 60, 70 y 80 min) se eligió el de la concentración que presentó menor crecimiento micelial y los que presentaron el mismo tamaño de crecimiento al día 14 de incubación. Se cortaron trozos de 0.6 cm del micelio del hongo. Las muestras se colocaron en un desecador durante 20 horas y posteriormente se recubrieron con oro en un pulverizador de la marca Denton Vacuum-Desk V (Figura 22).

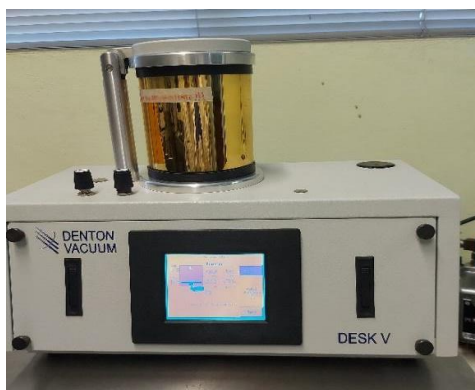


Figura 22. Pulverizador catódico.

2.4.4 Pruebas de inhibición

Crecimiento micelial radial

Se determinó el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento radial del hongo, siguiendo la metodología propuesta por Rodríguez, et al. (2021). La inhibición radial se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición radial (\%)} = \frac{T_c - T_t}{T_c} \cdot 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde:

T_c: radio medio de las colonias en las cajas del grupo control.

T_t: radio medio de las colonias en las cajas de medio con quitosano.

Velocidad de crecimiento del hongo

La velocidad del crecimiento del hongo se determinó en centímetros por hora, mediante la relación directa del crecimiento fúngico relativo sobre el intervalo de tiempo transcurrido (Solis, 2023).

Análisis estadístico

Se siguió la metodología empleada por Solis (2023); se utilizó el software OriginLab para analizar los resultados del crecimiento micelial realizado mediante un diseño completamente aleatorio llevando a cabo un análisis de varianza ANOVA. Mediante un análisis ANOVA simple se analizó la velocidad de crecimiento. Las medias de los datos obtenidos fueron comparadas mediante la prueba Tukey ($p < 0.05$).

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Quitosano

3.2.1 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de infrarrojo de las muestras de quitosano obtenidas se presentan en la Figura 23 y la asignación de las bandas de absorción se detalla en la Tabla 3. Todos los espectros muestran las bandas características del quitosano reportadas en la literatura (Fernandes, Teodosio, Araujo, Lanzi y Oliveira, 2015; Solis, 2023; Vallejo, 2019). En los espectros se observan las bandas de absorción en la región de 3358-3360 cm^{-1} correspondientes al estiramiento O-H y entre 3262-3287 cm^{-1} al estiramiento N-H. Las bandas en 2921-2922 cm^{-1} y 2871-2874 cm^{-1} se atribuyen a los estiramientos CH asimétrico y simétrico, respectivamente. Las bandas características de las amidas incluyen una en 1654-1655 cm^{-1} asociada al estiramiento del C=O (amida I) y otra en 1555-1578 cm^{-1} correspondiente a la flexión NH_2 de la amina primaria. La deformación simétrica CH_3 se confirma con la banda en 1376-1377 cm^{-1} .

Las bandas en 1416-1420 cm^{-1} y 1313-1321 cm^{-1} representan al grupo CH_2 y la presencia residual del grupo N-acetilo, respectivamente; el área bajo la curva de estas bandas está relacionado con el grado de desacetilación y su intensidad se ve afectada por el tiempo de sonicación.

La banda correspondiente al estiramiento asimétrico del puente C-O-C aparece en 1149-1151 cm^{-1} . Además, se identifican las bandas a 1058-1061 cm^{-1} y 1025-1027 cm^{-1} correspondientes al anillo piranósico y al estiramiento C-O, respectivamente. Finalmente, la banda asociada a la flexión C-H fuera del plano del anillo de monosacáridos se encuentra en 893-896 cm^{-1} .

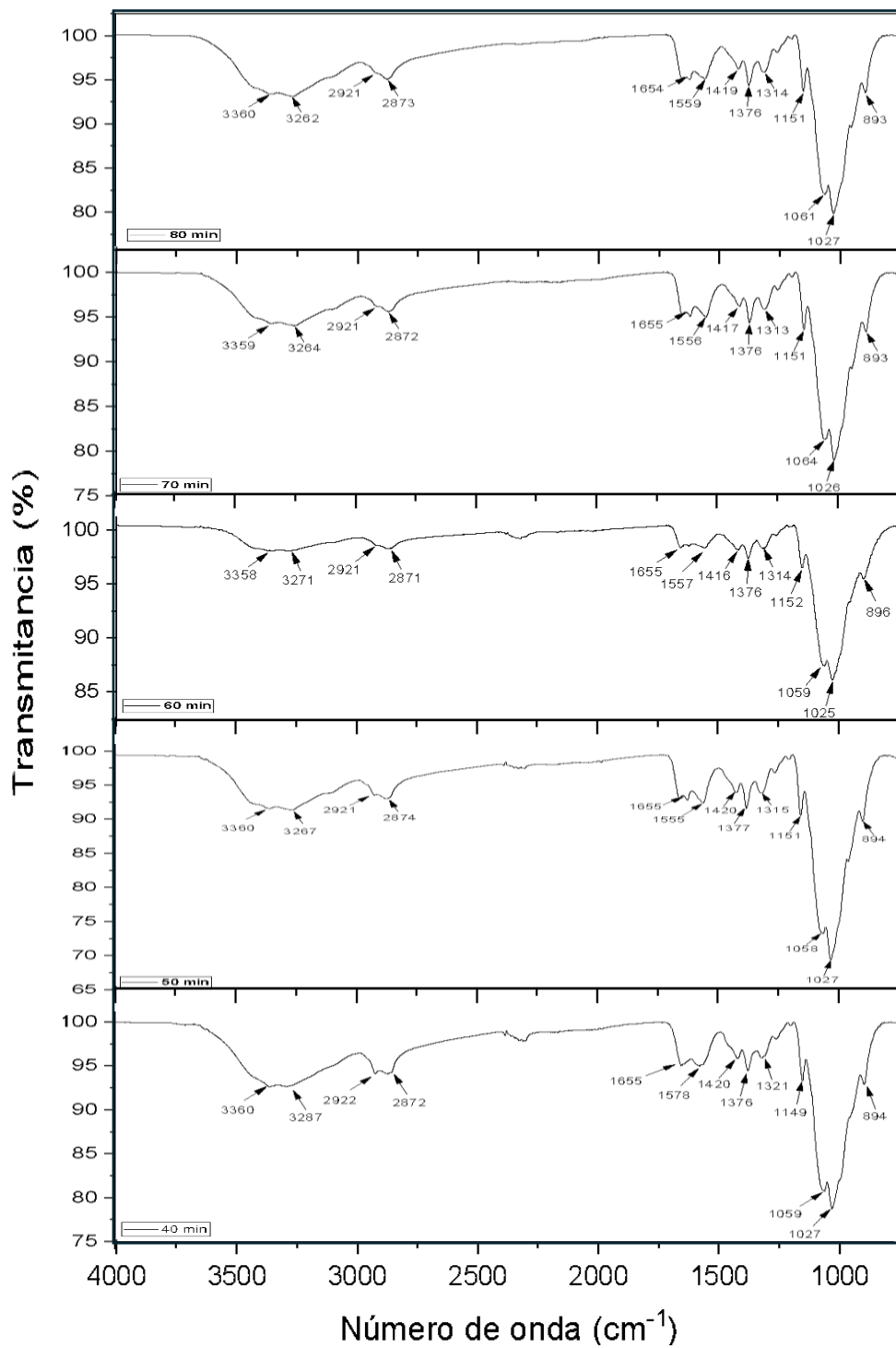


Figura 23. FTIR de las muestras de quitosano a 40, 50, 60, 70 y 80 min de sonicación.

Tabla 3. Asignación de las bandas de absorción características de las muestras de quitosano en los espectros IR.

Grupo funcional	Modo de vibración	Número de onda (cm ⁻¹)				
		40 min	50 min	60 min	70 min	80 min
OH	Estiramiento	3360	3360	3358	3359	3360
NH	Estiramiento	3287	3267	3271	3264	3262
CH	Estiramiento asimétrico	2922	2921	2921	2921	2921
CH	Estiramiento simétrico	2872	2874	2871	2872	2873
C=O	Estiramiento	1655	1655	1655	1655	1654
NH ₂	Flexión	1578	1555	1557	1556	1559
CH ₂ , banda característica	Doblamiento en el plano	1420	1420	1416	1417	1419
CH ₃	Doblamiento	1376	1377	1376	1376	1376
C-N	Estiramiento	1321	1315	1314	1313	1314
C-OC	Estiramiento asimétrico	1149	1151	1152	1151	1151
Anillo piranósico	Estiramiento	1059	1058	1059	1064	1061
C-O con C ₆ -OH	Estiramiento	1027	1027	1025	1026	1027
CH	Flexión fuera del plano	894	894	896	893	893

3.2.2 Grado de desacetilación

En la Tabla 4 se observa que a mayor tiempo de tratamiento de la quitina menor es el grado de desacetilación del quitosano obtenido. La etapa de desproteización afecta en la calidad de la quitina y por lo tanto en su desacetilación, pero no es el único parámetro que puede influir; también depende del origen de la materia prima, la secuencia y condiciones de las etapas de obtención del quitosano (Rasweefali, et al., 2022). De acuerdo con Vallejo (2019) refiere que a mayor grado de desacetilación hay menor contenido de proteína residual.

En la Figura 24, se puede observar que el comportamiento del GD respecto del tiempo de sonicación no es del todo lineal, lo cual se atribuye a las condiciones en la etapa de desproteinización; se presentó menor rendimiento a mayor tiempo de sonicación en esta etapa, influyendo así en el grado de desacetilación final del quitosano.

Tabla 4. Grado de desacetilación de las muestras de quitosano obtenidas mediante distintos tiempos de sonicación.

Tiempo de sonicación [min]	Grado de desacetilación [%]
40	86.79
50	74.27
60	71.13
70	69.76
80	67.05

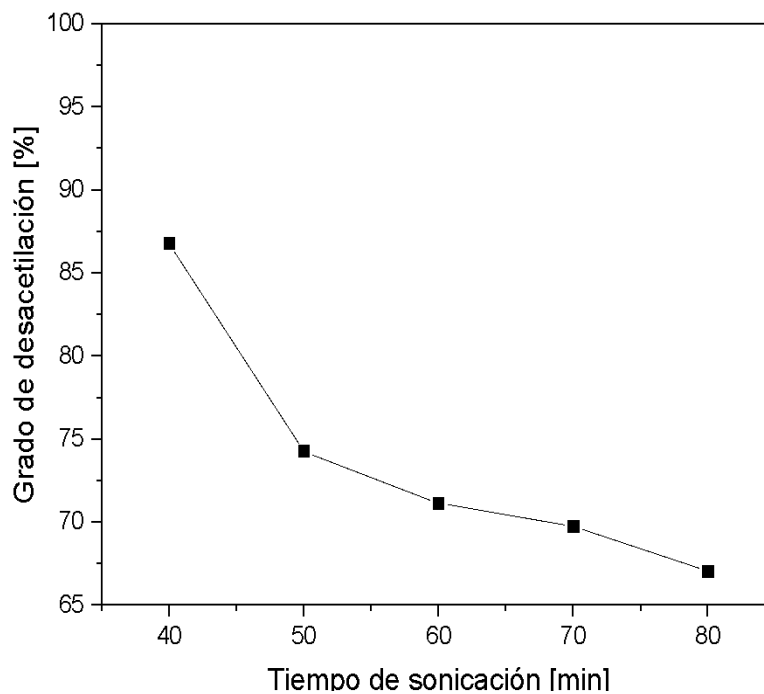


Figura 24. Grado de desacetilación del Qs en función del tiempo de sonicación.

3.2.3 Peso Molecular

Los resultados del peso molecular promedio en viscosidad de las muestras de quitosano se presentan en la Tabla 5. Según la clasificación de Arias (2020), las muestras obtenidas

corresponden a quitosano de peso molecular medio y alto. Zheng et al. (2019) mencionan que el tratamiento con ultrasonido reduce el peso molecular de los polisacáridos. Sin embargo, en este estudio no se observó una relación lineal entre el peso molecular y el tiempo de sonicación, lo que concuerda con lo reportado por Vallejo (2019). Esto podría estar relacionado con la concentración utilizada, ya que el método de ultrasonido resulta más efectivo a bajas concentraciones de quitosano (Pandit, Indurkar, Deshpande, Jain y Dandekar, 2021). Por lo tanto, se sugiere determinar la concentración óptima para mejorar el control durante la etapa de desproteización.

Tabla 5. Peso molecular promedio viscoso del quitosano.

Tiempo de sonicación [min]	Peso molecular promedio [kDa]	Clasificación
40	1612.05	Alto
50	737.39	Alto
60	1388.31	Alto
70	590.96	Medio
80	1488.88	Alto

3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las muestras de quitosano (Qs) se presenta en la Figura 25. Las partículas conservan su característica estructura granular en forma de hojuela, con signos de ligera erosión, lo cual concuerda con lo reportado por Vallejo (2019). En la Figura 26, se muestra la relación entre el tamaño de partícula y el tiempo de sonicación, sin observarse un comportamiento lineal. Este fenómeno se atribuye a las condiciones aplicadas durante las etapas de desproteización y desacetilación. Durante la desacetilación, se observó un aumento en el tamaño de partícula en comparación con las muestras de quitina, lo cual puede estar relacionado con la velocidad de agitación y la acción del solvente. Caro et al. (2019) indican que la velocidad de agitación y la proporción de tensoactivos influyen en el tamaño de partícula. De manera similar, Mirinho, Horiuchi y Pires (2018) afirman que la velocidad de agitación afecta la

distribución del tamaño de partícula y que cada sistema de polimerización tiene una velocidad de agitación óptima.

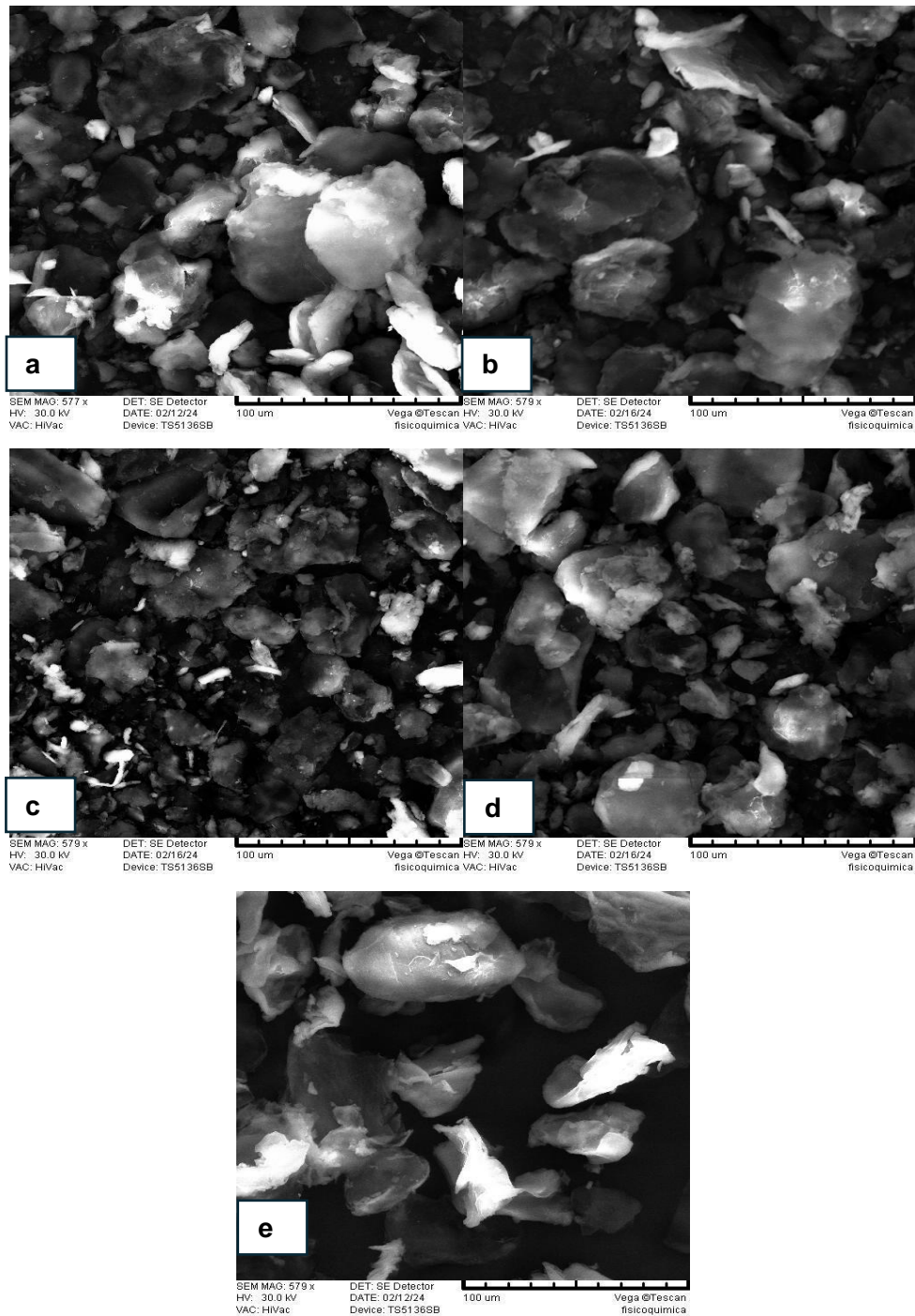


Figura 25. Imágenes SEM de muestras de Qs a: (a) 40, (b) 50, (c) 60, (d) 70 y (e) 80 minutos de sonicación.

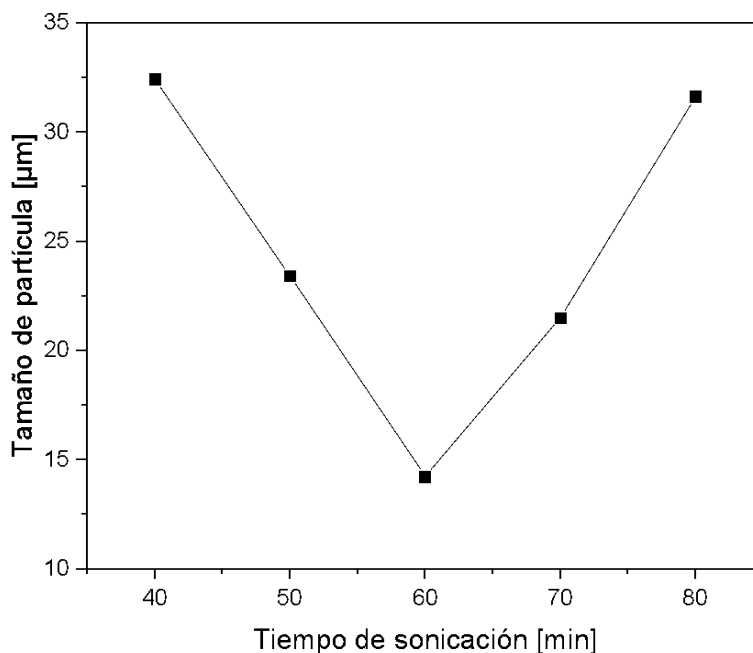


Figura 26. Tamaño de partícula en función del tiempo de sonicación de las muestras de quitosano.

3.3 Identificación del hongo patógeno

El hongo aislado de la muestra obtenida con onicomicosis en la zona ungueal del hallux fue *Penicillium chrysogenum*. Pakshir et al. (2021) lo reportó como uno de los hongos no dermatofitos causantes de onicomicosis y Abastabar et al. (2016) refiere que es un agente de onicomicosis. La especie *Penicillium* se puede identificar mediante características morfológicas como forma y tamaño. En sus características culturales se identifica por el color, textura y diámetro de la colonia, de acuerdo con el medio de cultivo empleado.

3.3.1 Cultivo de la lesión

El hongo aislado del cultivo de la lesión ungueal en el Hallux se identificó como *Penicillium chrysogenum*. Se caracterizó por el crecimiento micelial de las colonias de color azul verdoso con blanco, apariencia aterciopelada, surcada y abundante esporulación, exudado de color amarillo en la superficie y con reverso de color amarillo (Figura 27); estas son características de la especie *Penicillium chrysogenum*, lo que concuerda con lo reportado por Mezher, Mahmood y Ibrahim (2015) y Fernández (2014). De acuerdo con Xia et al. (2018), las colonias de hongos pueden mostrar otras morfologías dependiendo de los factores ambientales; tal es el caso de una muestra aislada de una

región industrial usando el medio de cultivo (SDA), donde se obtuvieron colonias planas y sueltas con micelio mayormente blanco algodonoso y una mancha verde claro. Jameel y Yaseein (2021) obtuvieron colonias de diferente morfología (hongo en SDA a 25°C), de color verde oscuro y con márgenes blancos con textura aterciopelada, del día 5 al 7, en algunos blanco, rosa o rojo, lo cual lo atribuye a que con la edad pierde su color verde.

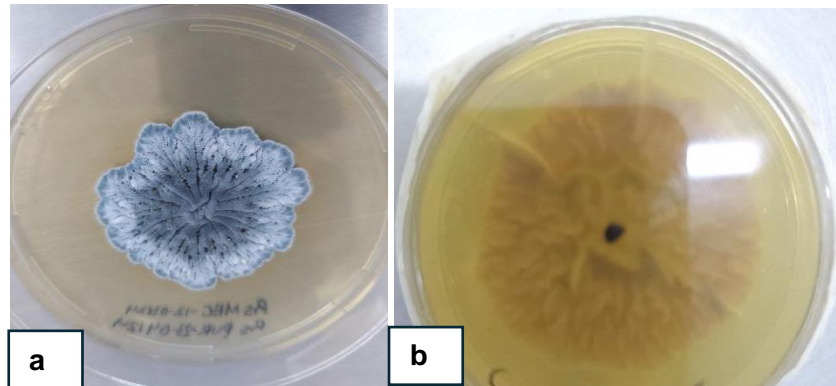


Figura 27. Morfología de *Penicillium chrysogenum* (a) anverso y (b) reverso. Al día 21 de crecimiento en medio SDA a 28°C.

3.3.2 Microscopía óptica

La identificación de la morfología microscópica se observó a 40 aumentos en la muestra obtenida de la zona ungueal del hallux (Figura 28a) y posteriormente a la muestra del hongo aislado en el medio de cultivo SDA (Figura 28b). Se observa la presencia de hifas ramificadas transparentes en forma de cepillo con conidios globosos, característico de la especie *Penicillium chrysogenum*; estos resultados concuerdan con lo reportado por Jameel y Yaseein (2021) y Fernández (2014).

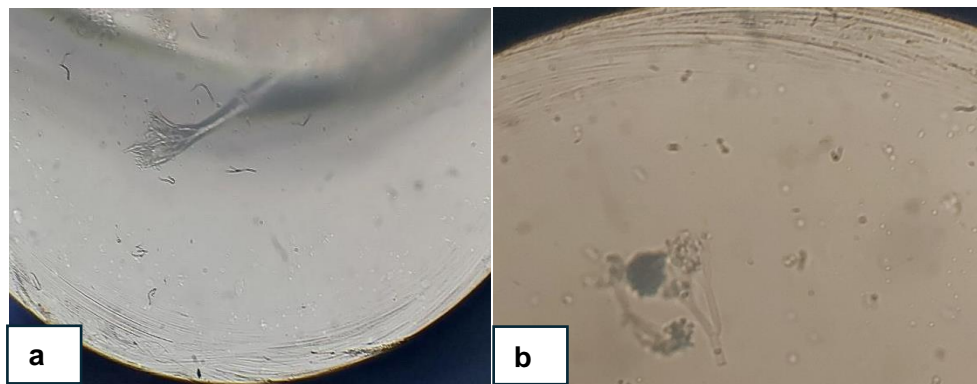


Figura 28. Morfología de la colonia de *P. chrysogenum* con aumento de 40x: (a) Muestra del hallux. (b) Hongo aislado en SDA.

3.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El hongo mostró un micelio de aspecto sano, como se observa en la micrografía de la Figura 29a. En la Figura 29b se aprecia la estructura del hongo con hifas, conidióforos ramificados con menos de cinco métulas por conidióforo, fiálides en forma de botella y conidios, lo que coincide con lo reportado por Liu, Wang, Zhou, Xue y Liu (2024) y Xia et al. (2018) para *P. chrysogenum*. Fernández (2014) señala que las fiálides de este hongo no exceden los 15 μm de longitud, resultado consistente con las observaciones de este estudio, donde se midieron fiálides de 8 μm de longitud. Asimismo, los conidios presentaron forma esférica, superficie lisa y un diámetro promedio de 1.56 μm , como se muestra en la Figura 29c.

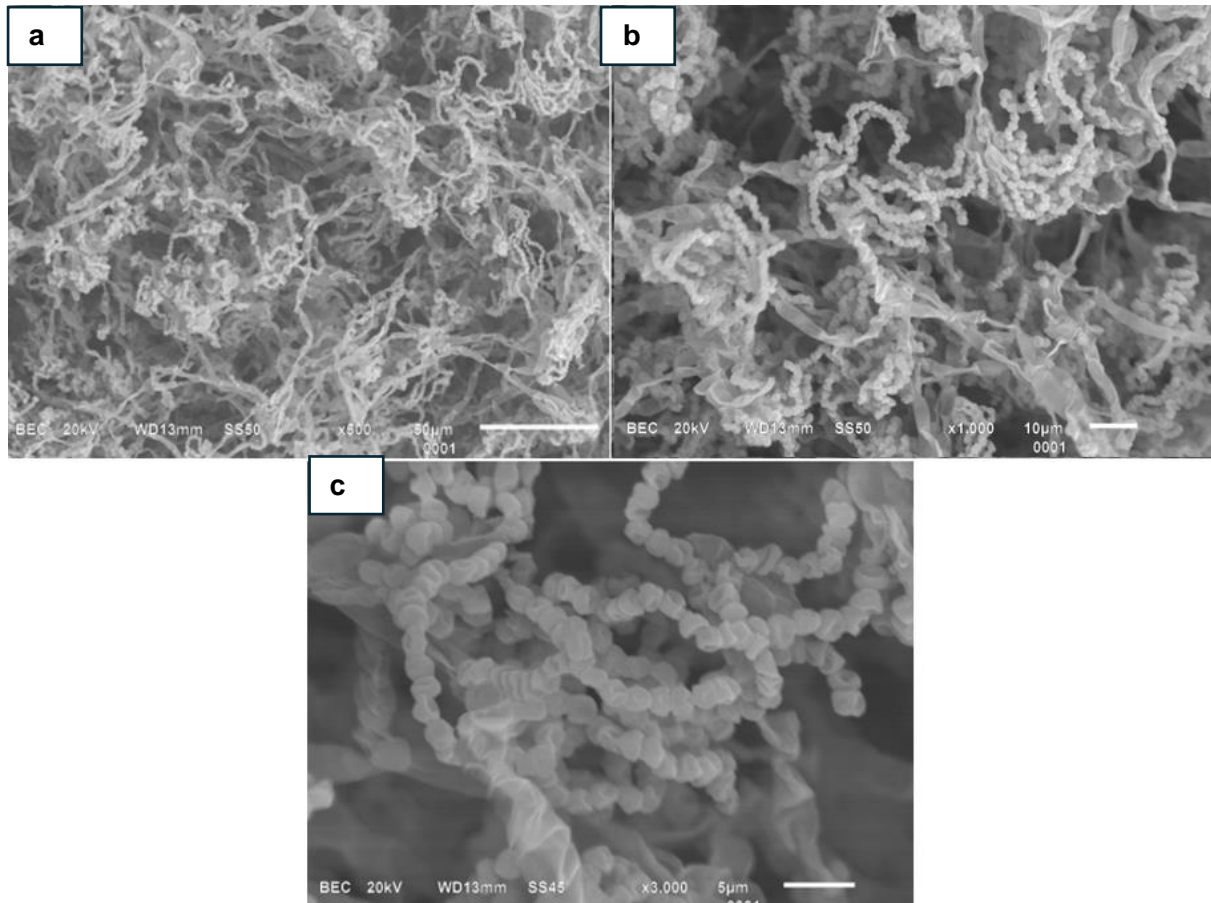


Figura 29. Micrografías SEM de *P. chrysogenum*. (a) 500x de aumento. (b) 1000x de aumento. (c) 3000x de aumento, vista de conidios.

3.4 Evaluación *in vitro*

Se registró la inhibición del hongo *Penicillium chrysogenum* bajo tratamientos con quitosano hasta el día 14 de incubación. Las Figura 30 a 32 muestran el efecto de diferentes concentraciones de quitosano en los días 2, 6 y 14. Todos los tratamientos demostraron inhibición en comparación con el control y, algunos presentaron cambios en la coloración de la colonia de *P. chrysogenum*, lo cual se atribuye tanto al efecto del quitosano como al tiempo de incubación; según Jameel y Yaseein (2021), este hongo puede perder su color verde característico con el envejecimiento. Al día 14 de incubación (Figura 32), los tratamientos 4A y 5A mostraron el mayor impacto sobre *P. chrysogenum*, con un cambio notable en la coloración de las colonias, que pasó de verde a azul claro, y un menor crecimiento micelial en comparación con los demás tratamientos. Esto sugiere que el quitosano afecta el desarrollo del micelio, inhibiendo la producción de esporas viables. En contraste, los tratamientos 1D y 3C mostraron mayor crecimiento que 4A y 5A, lo que indica que, a pesar del cambio de coloración, el micelio tardó más tiempo en verse afectado por el quitosano. Los demás tratamientos mantuvieron el color verde original, aunque con menor tamaño en comparación con el control, lo que sugiere que el quitosano retrasa el crecimiento del hongo; sin embargo, también es posible que el hongo esté desarrollando mecanismos de adaptación, como la producción de esporas viables para germinar posteriormente. Según Martínez et al. (2021), algunos hongos pueden mantener esporas en estado de reposo para asegurar su supervivencia.

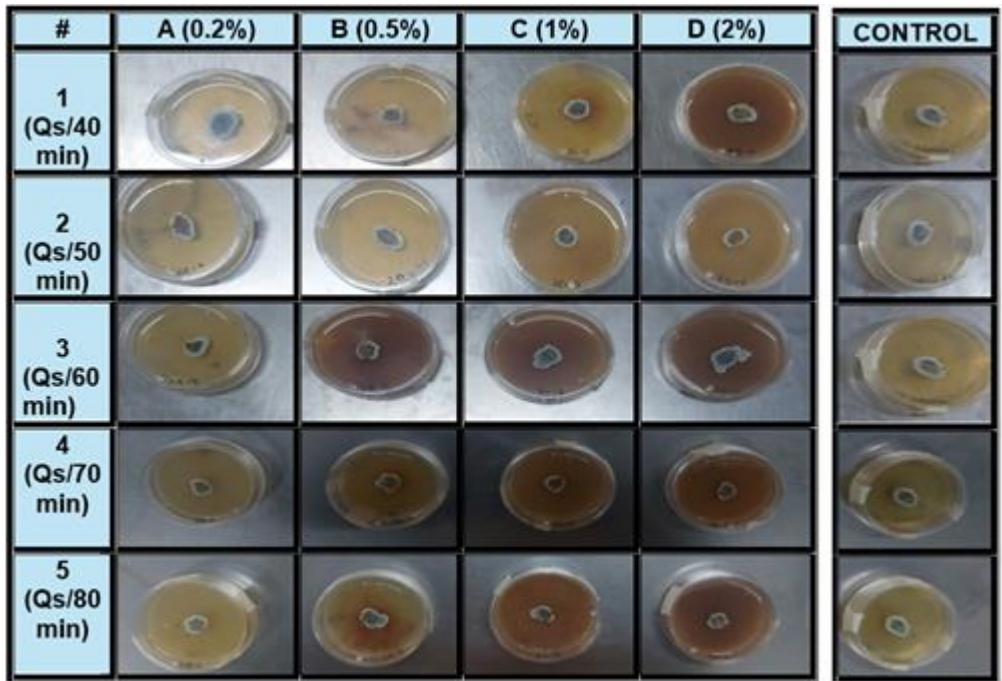


Figura 30. Actividad antifúngica de los tratamientos en comparación con el control, en el día 2 de incubación.

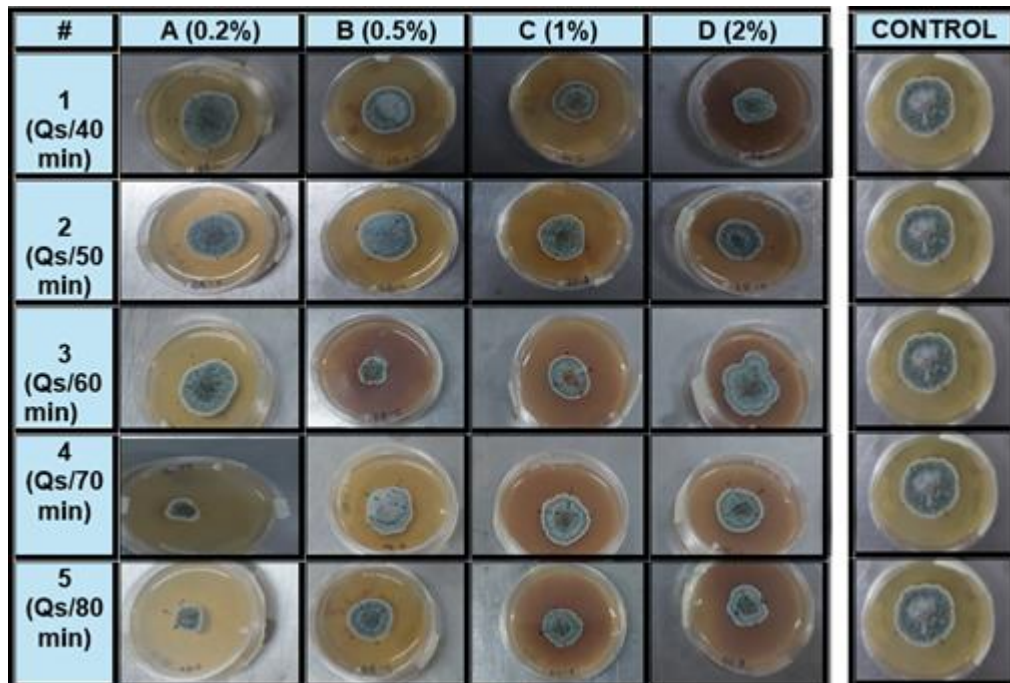


Figura 31. Actividad antifúngica de los tratamientos en comparación con el control, en el día 6 de incubación.

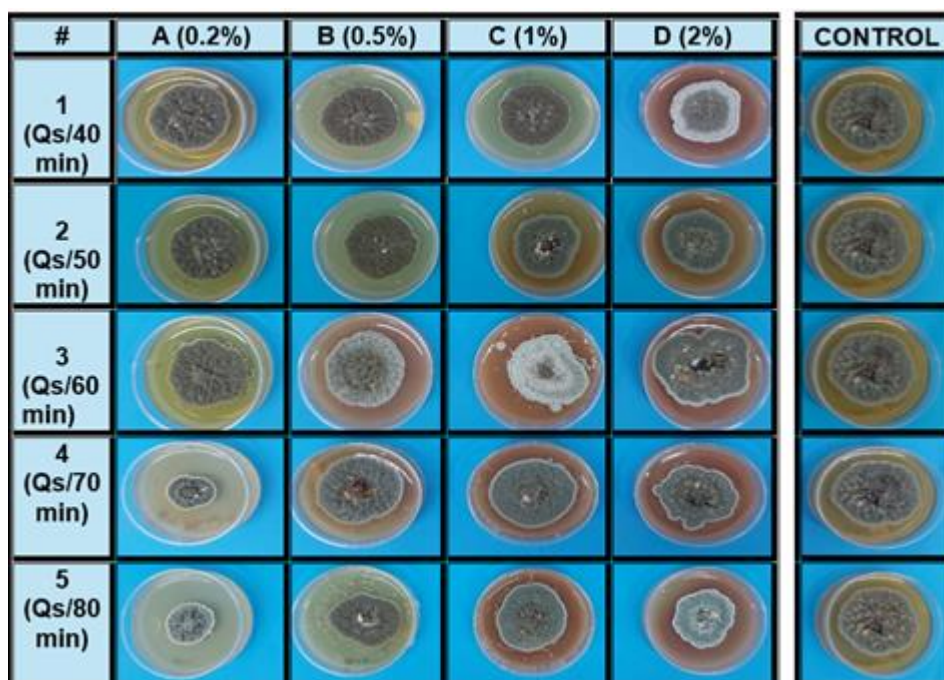


Figura 32. Actividad antifúngica de los tratamientos en comparación con el control, en el día 14 de incubación.

3.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizó un análisis de SEM para los tratamientos con mayor porcentaje de inhibición con distinto quitosano (1A, 2C, 3C, 4A y 5A), así como para aquellos con un porcentaje similar de inhibición (1D, 2C y 5C) y el control, tras 14 días de incubación. Las micrografías de *P. chrysogenum* bajo estos tratamientos se presentan en las Figuras 33 y 34, mientras que los tamaños promedio de métulas y fiálides se detallan en la Tabla 6.

En la micrografía del tratamiento control (Figura 33a), se observa una superficie regular, homogénea y lisa con conidióforos ramificados, métulas ramificadas y una cantidad considerable de conidios sobre las fiálides. En el tratamiento 1A (Figura 33b), la superficie aparece no homogénea, con algunas métulas arrugadas y una menor cantidad de conidios, más separados entre sí, algunos con una apariencia aplanada, mientras que otros forman cadenas más largas. En el tratamiento 1D (Figura 33c), se observan métulas arrugadas y ligeramente retorcidas, así como fiálides arrugadas con menor cantidad de conidios. En el tratamiento 2C (Figura 33d), algunas métulas están arrugadas y adelgazadas, con una abundante cantidad de conidios, aunque algunas fiálides carecen de ellos. En la micrografía del tratamiento 3C (Figura 33e) se observa una significativa

disminución de conidios, con algunas métulas arrugadas y ausencia de conidios en ciertas fiálides. El tratamiento 4A (Figura 33f) muestra métulas y fiálides arrugadas y retorcidas, con una cantidad reducida de conidios de apariencia compacta y deformada. En el tratamiento 5A (Figura 34g), se observan conidióforos y métulas retorcidas y arrugadas, así como fiálides arrugadas con pocos conidios, aunque estos mantienen una apariencia normal. Finalmente, el tratamiento 5C (Figura 34h) presenta numerosos conidióforos y métulas cercanas entre sí, pero con pocos conidios sobre las fiálides, algunas de las cuales carecen completamente de ellos. Las alteraciones morfológicas observadas concuerdan con lo reportado en la literatura. Por ejemplo, en el caso de *Aspergillus ochraceus*, Meng et al. (2020) describen cómo el tratamiento provocó hifas arrugadas y retorcidas, con ramificaciones anormales, e incluso algunas hifas presentaron roturas debido a una mayor contracción. Otros estudios han confirmado alteraciones similares en *A. flavus* y *A. fumigatus* (Ke et al., 2022), *Fusarium solani* (Zhang et al., 2024), y *Penicillium expansum*, donde se observó hinchazón y desorganización micelial (Bautista, Ventura, Correa y Corona, 2017). En cuanto a *P. chrysogenum*, las alteraciones morfológicas inducidas por los tratamientos con quitosano pueden atribuirse a un posible cambio en la permeabilidad celular. Este efecto se debe a la interacción entre los grupos amino cargados positivamente del quitosano y las cargas electronegativas presentes en la membrana externa del hongo, lo que provoca la liberación de material intracelular, como fosfatos, nucleótidos y sustratos de reacciones enzimáticas. Esta fuga afecta procesos esenciales como la respiración fúngica y la fermentación (Bautista et al., 2017). Además, el quitosano tiene la capacidad de aglutinar esporas, lo que conduce a la formación de morfologías anormales (Ke et al., 2022). Otro mecanismo de acción propuesto es que el quitosano puede unirse al ADN, desencadenando la apoptosis. Gong et al. (2024) sugieren que este polímero podría inhibir la replicación del ADN y retrasar el ciclo celular en *P. expansum*, especie del mismo género que *P. chrysogenum*.

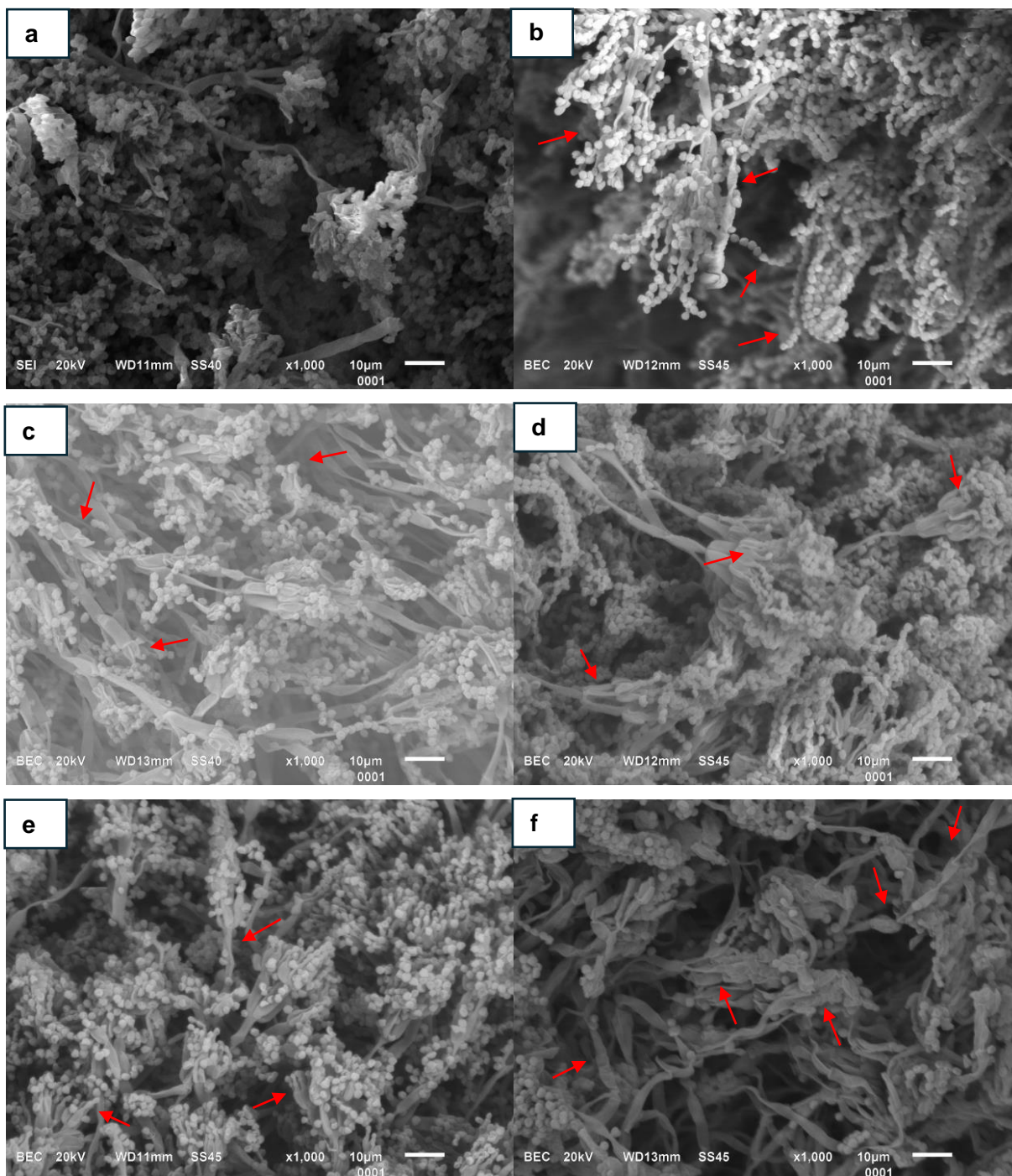


Figura 33. Micrografías SEM de *P. chrysogenum* a 1000x en tratamiento. (a) Control. (b) 1A: 0.2% Qs-40 min /SDA. (c) 1D: 1% Qs-40 min /SDA. (d) 2C: 1% Qs-50 min /SDA. (e) 3C: 1% Qs-60 min /SDA. y (f) 4A: 0.2 Qs-70 min /SDA.

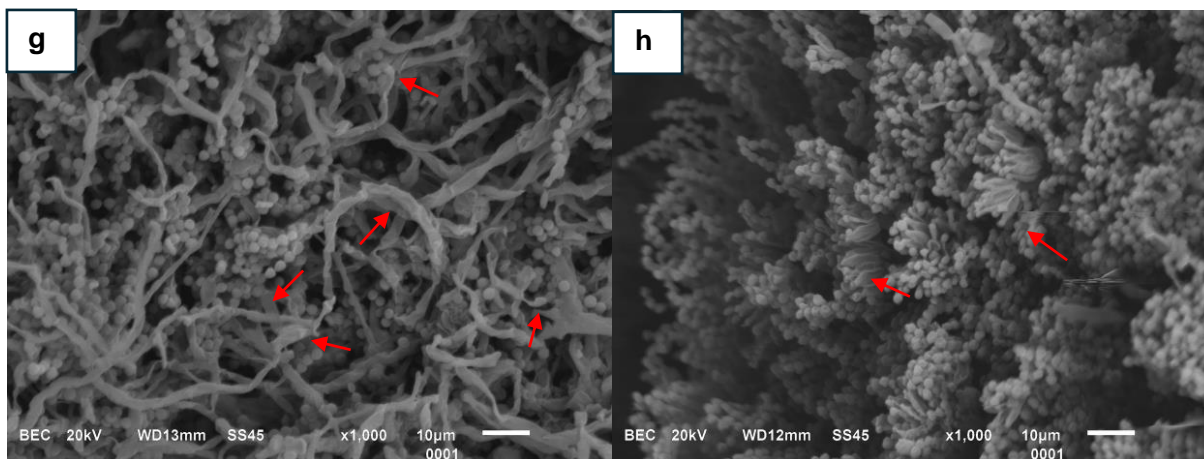


Figura 34. Micrografías SEM de *P. chrysogenum* a 1000x en tratamiento. (g) 5A: 0.2% Qs-80 min /SDA. y (h) 5C: 1% Qs-80 min /SDA.

Se obtuvo menor porcentaje de inhibición con el tratamiento 2C, el cual no mostró una gran afectación en la estructura de *P. chrysogenum*. Sin embargo, aunque los tratamientos 1D y 5C presentaron un porcentaje de inhibición similar, el hongo fue afectado de manera diferente, lo que sugiere que el quitosano con distintas características produce efectos variables en la estructura fúngica. En los tratamientos 4A y 5A, que mostraron los mayores porcentajes de inhibición, se observó una alteración visible en la morfología del hongo, así como un efecto fungicida sobre la producción y germinación de los conidios (Echenique, 2016). Las alteraciones morfológicas detectadas podrían indicar un compromiso de la membrana plasmática (Meng et al., 2020). Además, se observó una diferencia en el tamaño de las fiálides y conidios en comparación con el tratamiento control. El tamaño de los conidios fue mayor que en el control, lo cual podría atribuirse a que estos conidios ya estaban completamente desarrollados, o a que el tratamiento alteró la morfología del hongo, afectando tanto a los conidios como a otras estructuras, como las fiálides, las cuales mostraron variaciones en tamaño debido a la influencia del quitosano.

Tabla 6. Tamaño promedio de fiálides y conidios en los tratamientos con mayor porcentaje de inhibición con diferente quitosano.

Estructura	Tratamiento							
	Control	1A	1D	2C	3C	4A	5A	5C

Fiálide (μm)	8	9	5.5	6.4	6.1	6.3	5.5	7.3
Conidio (μm)	1.56	2	2.1	1.9	1.9	1.9	2.2	2

3.4.2 Crecimiento micelial radial

En cada tratamiento hubo disminución del crecimiento micelial del hongo patógeno con respecto al control (Tabla 7), cual al día 14 de incubación alcanzó un crecimiento de 3.13 cm de diámetro. Las soluciones con 0.2% de Qs obtenido a 70 y 80 min de sonicación (tratamientos 4A y 5A) fueron las que presentaron mayor efecto antifúngico al día 14 con 48.14% y 47.34% de inhibición, respectivamente. Por otra parte, las soluciones de 1% y 2% de Qs obtenido a 60 y 70 min (tratamientos 3D y 4C) fueron las que presentaron menor porcentaje de inhibición con 7.45% y 10.37%, respectivamente.

Tabla 7. Efecto de los tratamientos de Qs sobre el crecimiento micelial de *Penicillium chrysogenum*.

Tratamientos	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial por cada 2 días (c/48 h)							Agrupación (por letras)
	2	4	6	8	10	12	14	
Control	0	0	0	0	0	0	0	
1A 0.2% Qs-40 min/SDA	-17.19	17.61	14.29	10.64	13.75	19.30	26.60	e f
1B 0.5% Qs-40 min/SDA	45.31	42.61	21.01	12.77	16.56	14.91	21.81	b c d e f
1C 1% Qs-40 min/SDA	0	19.32	31.93	25.53	13.13	12.28	20.21	a b c d e
1D 2% Qs-40 min/SDA	6.25	46.59	39.50	29.79	37.81	17.54	18.62	b c d e f
2A 0.2% Qs-50 min/SDA	25.00	22.73	10.92	2.84	8.12	9.06	15.96	e f
2B	-6.25	18.18	7.56	4.61	3.12	6.43	14.89	f

0.5% Qs-50 min/SDA								
2C 1% Qs-50 min/SDA	6.25	29.55	22.69	18.44	8.75	10.53	18.62	d e f
2D 2% Qs-50 min/SDA	31.25	37.50	25.21	19.15	12.38	8.97	14.54	b c d e f
3A 0.2% Qs-60 min/SDA	12.50	17.05	8.40	6.38	5.00	8.19	16.49	e f
3B 0.5% Qs-60 min/SDA	28.13	51.14	63.87	38.30	21.25	10.53	15.43	b c d e
3C 1% Qs-60 min/SDA	43.75	59.09	48.40	40.43	30.63	31.58	21.81	a b c
3D 2% Qs-60 min/SDA	18.75	12.50	10.08	13.48	7.19	3.51	7.45	e f
4A 0.2% Qs-70 min/SDA	62.50	69.32	75.21	59.57	58.75	42.98	48.14	a
4B 0.5% Qs-70 min/SDA	31.25	30.68	20.59	12.77	22.50	14.09	17.55	b c d e f
4C 1% Qs-70 min/SDA	43.75	31.82	22.69	13.12	9.38	6.14	10.37	b c d e f
4D 2% Qs-70 min/SDA	46.88	34.09	23.53	20.92	21.88	16.37	23.94	b c d e f
5A 0.2% Qs-80 min/SDA	6.25	52.27	58.49	37.23	44.38	42.11	47.34	a b
5B 0.5% Qs-80 min/SDA	42.19	43.18	26.47	21.28	18.75	16.67	24.20	b c d e f
5C	50.00	38.64	31.95	29.79	21.25	14.04	18.62	b c d e f

1% Qs-80 min/SDA								
5D	23.13	42.50	44.12	35.11	42.19	35.09	36.97	b c d
2% Qs.80 min/SDA								

Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

A continuación de la Figura 35 a la 39, se muestra la actividad antifúngica promedio de tres repeticiones de cada tratamiento con distinto quitosano (obtenido a 40, 50, 60, 70 y 80 min) después de 14 días de incubación.

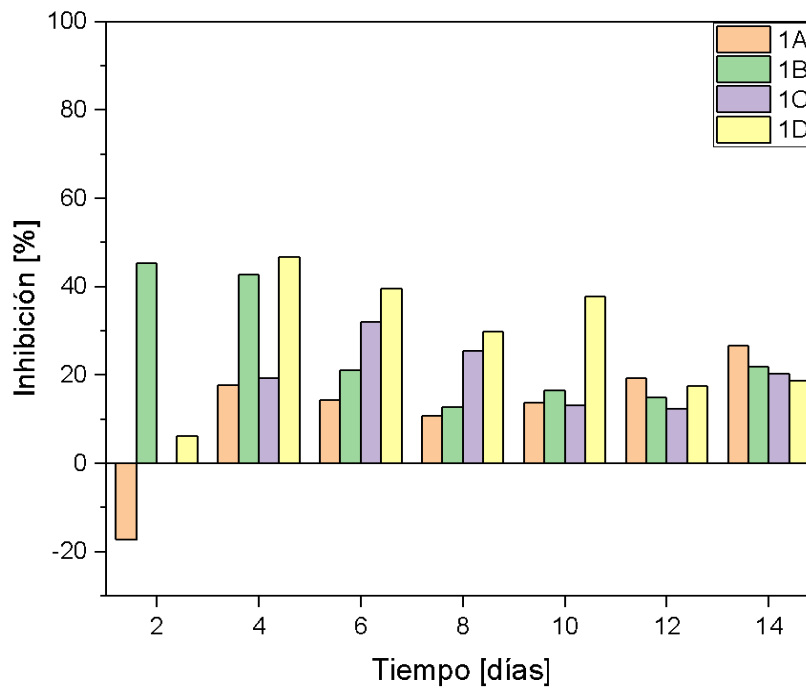


Figura 35. Actividad antifúngica de Qs-40 min en *P. chrysogenum*, durante 14 días de incubación.

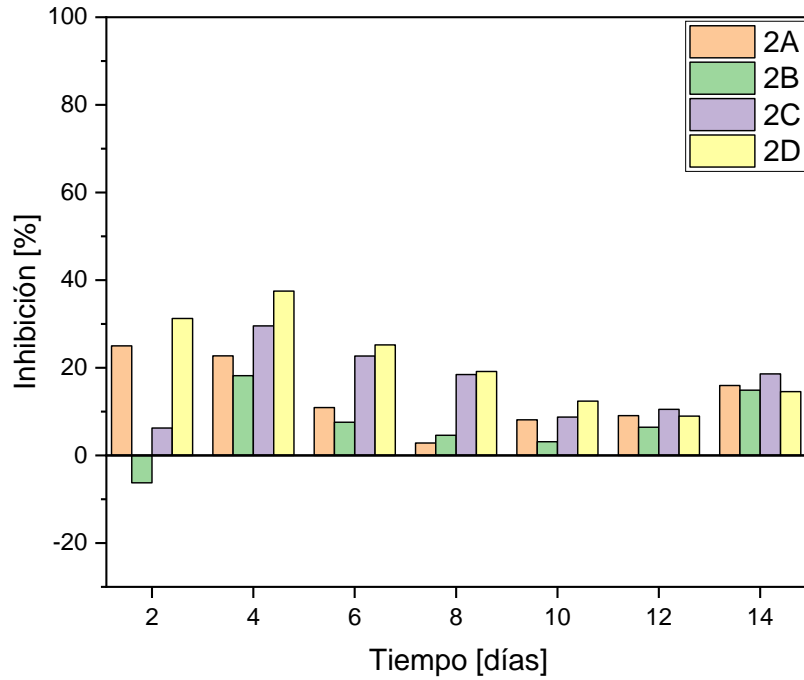


Figura 36. Actividad antifúngica de Qs-50 min en *P. chrysogenum*, durante 14 días de incubación.

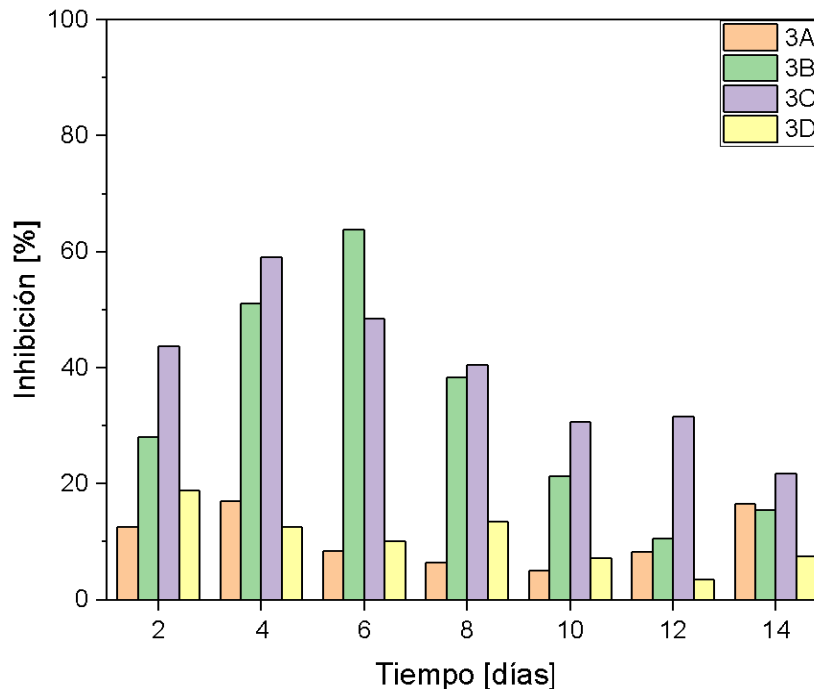


Figura 37. Actividad antifúngica de Qs-60 min en *P. chrysogenum*, durante 14 días de incubación.

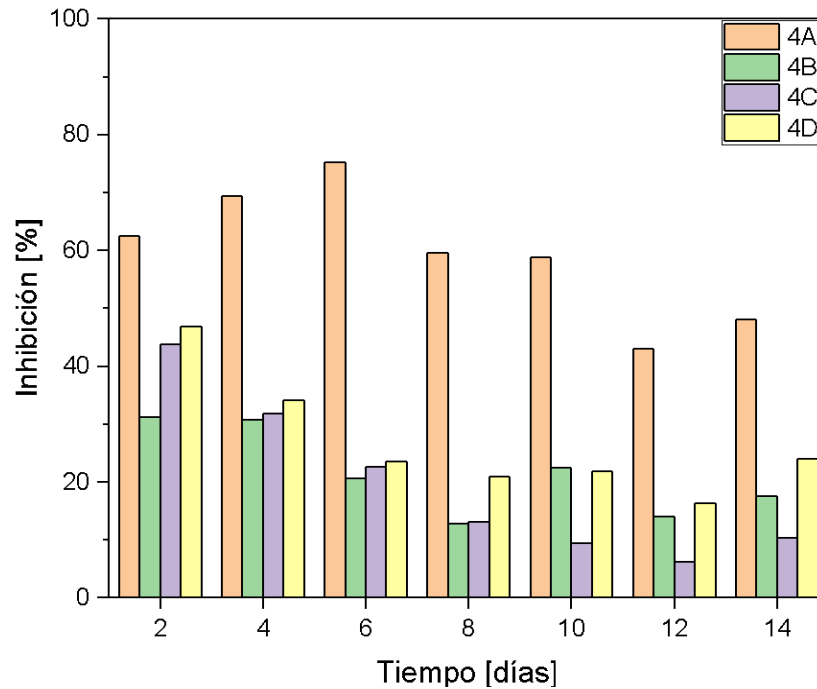


Figura 38. Actividad antifúngica de Qs-70 min en *P. chrysogenum*, durante 14 días de incubación.

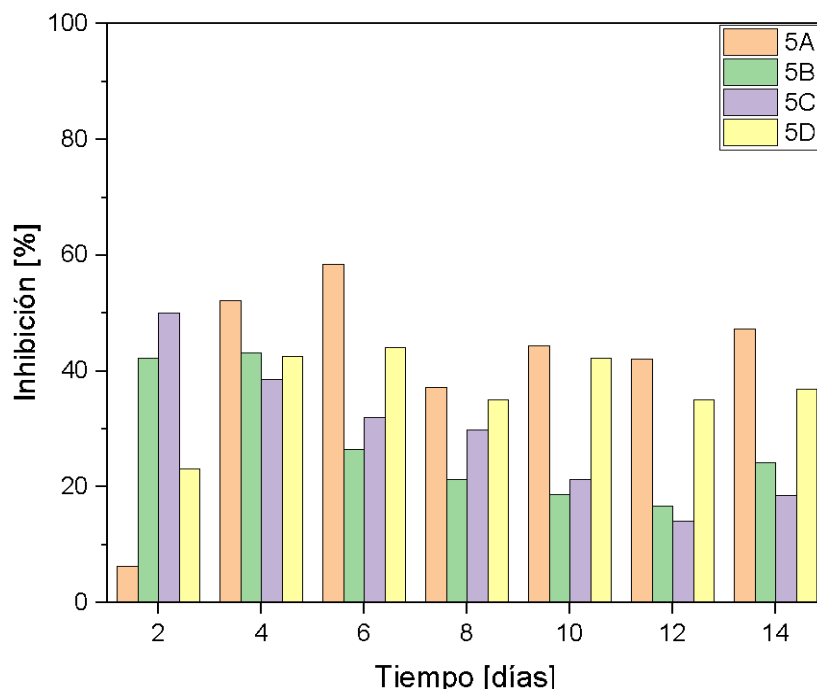


Figura 39. Actividad antifúngica de Qs-80 min en *P. chrysogenum*, durante 14 días de incubación.

Los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de inhibición al día 14 con quitosano a diferente tiempo de sonicación son el 1A, 2C, 3C, 4A y 5A. En la Tabla 8 se observan

las características del quitosano empleado en cada uno de estos tratamientos. El comportamiento que presentaron los tratamientos sobre el hongo *Penicillium chrysogenum* está relacionado con la concentración y las propiedades del material.

Tabla 8. Características de los tratamientos con mayor porcentaje de inhibición al día 14 para cada tratamiento con distinto quitosano.

Tratamiento	Inhibición [%]	Grado de desacetilación [%]	Peso molecular [kDa]	Tamaño de partícula [µm]
1A	26.6	86.79	1612.05	32.4
2C	18.62	74.27	737.39	23.4
3C	21.81	71.13	1388.31	14.2
4A	48.14	69.76	590.96	21.5
5A	47.34	67.05	1488.88	31.6

Se usaron distintos grados de desacetilación (GD) de 67.05% a 86.79%; a menor GD se presentó un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, como se observa con los tratamientos 4A y 5A, lo cual se relaciona con las cargas positivas de los grupos amina (-NH₂), lo que a su vez está relacionado con el GD ya que cuando es mayor hay más grupos amino (Ardean et al.,2021).

El tratamiento 4A que presentó mayor porcentaje de inhibición (48.15%) utilizó quitosano de medio peso molecular, comparando con los tratamientos que usaron Qs de alto peso molecular se presentó una menor inhibición micelial, como en el caso del tratamiento 5A (47.34%). Se determina que el peso molecular no influye significativamente sobre el porcentaje de inhibición del hongo tratado en comparación con el grado de desacetilación. La actividad antifúngica del quitosano relacionado con su peso molecular puede variar dependiendo de la especie del hongo, que de acuerdo con Poznanski, Hameed y Orczyk (2023) el quitosano de bajo PM tiende a presentar inhibición más baja, pero un aumento de PM no siempre se relaciona con una actividad antifúngica mayor.

El tamaño de partícula en conjunto con las otras propiedades permite que haya un mayor porcentaje de inhibición micelial. Como se observa con el tratamiento 4A, donde se utilizó quitosano con el segundo menor GD, PM medio y el segundo menor tamaño de partícula de las muestras de quitosano, dando como resultado un porcentaje de inhibición mayor a los otros tratamientos. En la muestra 5A aumentó el PM y el tamaño de partícula en comparación al de la muestra 4A y el GD no es significativamente diferente, pero los otros factores afectan la actividad antifúngica del material sobre el hongo disminuyendo el porcentaje de inhibición; también con el tratamiento 1A que presenta un mayor GD, PM y tamaño de partícula, da como resultado un porcentaje de inhibición menor en comparación al 5A y 4A. La relación del tamaño de partícula con la actividad antifúngica puede relacionarse con que a menor tamaño hay mayor densidad de carga superficial, mayor área superficial y mejor absorción celular (Poznanski et al., 2023).

La concentración también afecta la actividad inhibitoria, se observa que a menor concentración en los tratamientos con distinto quitosano la mayoría presentaron mayor porcentaje de inhibición a concentraciones de 0.2% (tratamiento 1A, 4A y 5A). En otros tratamientos a concentración de 1% (tratamiento 2C y 3C), comparados con otros tratamientos con distinta concentración y mismo quitosano presentaron mayor inhibición. Lo cual coincide con lo reportado por Ardean et al. (2021); el Qs a concentraciones más bajas puede unirse a la superficie celular cargada negativamente interfiriendo con la permeabilidad de la membrana celular externalizando así los componentes intracelulares propiciando así la muerte celular; mientras que a concentraciones más altas, la presencia de más grupos amino cargados positivamente puede cubrir la superficie celular evitando la salida de los componentes. El desempeño óptimo del quitosano está relacionado con una concentración adecuada, dado que el uso de altas concentraciones podría ser contraproducente, ya que las enzimas fúngicas pueden degradarlo a unidades de glucosamina, que podrían ser utilizadas por el hongo como nutrientes acelerando su crecimiento (Lárez y Rojas, 2020).

3.4.3 Velocidad de crecimiento del hongo

La velocidad de crecimiento micelial de *P. chrysogenum* (Tabla 9) para cada día fue diferente respecto del control y entre los tratamientos; hay tratamientos que son similares

al control y otros que son significativamente diferentes. Se obtuvieron variaciones en la cinética de crecimiento dependientes de las características del quitosano aplicado.

Los tratamientos 1A, 1C, 2A, 2B, 2C, 2D 3A, 3D, 4B y 4C presentaron medias similares a la del control durante los 14 días de incubación. Los otros tratamientos tuvieron medias significativamente diferentes. Los tratamientos 4A y 5A, comparten una letra por lo que son significativamente similares entre sí y lograron reducir la velocidad de crecimiento micelial de *P. chrysogenum* casi a la mitad (0.0048 y 0.0049 cm/h, respectivamente) comparado con el control (0.0093 cm/h), por lo que cualquiera de estos dos tratamientos puede ser viable para emplear contra este hongo.

Tabla 9. Velocidad de crecimiento de *P. chrysogenum* en los tratamientos con distintos Qs (40, 50, 60, 70 y 80 min) cada 2 días (48 horas).

Tratamientos	Velocidad de crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> (cm/h)							Agrupación (por letras)
	2	4	6	8	10	12	14	
Control	0.011 1	0.0153	0.013 8	0.012 2	0.011 1	0.009 9	0.009 3	a
1A 0.2% Qs-40 min/SDA	0.013	0.0126	0.011 8	0.010 9	0.009 6	0.008	0.006 8	a b c d
1B 0.5% Qs-40 min/SDA	0.006 1	0.0088	0.010 9	0.010 7	0.009 3	0.008 4	0.007 3	b c d e
1C 1% Qs-40 min/SDA	0.011 1	0.0123	0.009 4	0.009 1	0.009 7	0.008 7	0.007 4	a b c d e
1D 2% Qs-40 min/SDA	0.010 4	0.0082	0.008 3	0.008 6	0.006 9	0.008 2	0.007 6	b c d e
2A	0.008 3	0.0118	0.012 3	0.011 9	0.010 2	0.009	0.007 8	a b c d

0.2% Qs-50 min/SDA								
2B 0.5% Qs-50 min/SDA	0.011 8	0.0125	0.012 7	0.011 7	0.010 8	0.009 3	0.007 9	a b
2C 1% Qs-50 min/SDA	0.010 4	0.0108	0.010 6	0.01	0.010 1	0.008 9	0.007 6	a b c d e
2D 2% Qs-50 min/SDA	0.007 6	0.0095	0.010 3	0.009 9	0.009 7	0.009	0.008	a b c d e
3A 0.2% Qs-60 min/SDA	0.009 7	0.0127	0.012 6	0.011 5	0.010 6	0.009 1	0.007 8	a b c
3B 0.5% Qs-60 min/SDA	0.008	0.0075	0.005	0.007 6	0.008 8	0.008 9	0.007 9	c d e
3C 1% Qs-60 min/SDA	0.006 3	0.0063	0.007 1	0.007 3	0.007 7	0.006 8	0.007 3	e f
3D 2% Qs-60 min/SDA	0.009	0.0134	0.012 4	0.010 6	0.010 3	0.009 5	0.008 6	a b c
4A 0.2% Qs-70 min/SDA	0.004 2	0.0047	0.003 4	0.004 9	0.004 6	0.005 6	0.004 8	f
4B 0.5% Qs-70 min/SDA	0.007 6	0.0106	0.010 9	0.010 7	0.008 6	0.008 5	0.007 7	a b c d e
4C	0.006 3	0.0104	0.010 6	0.010 6	0.010 1	0.009 3	0.008 4	a b c d e

1% Qs-70 min/SDA								
4D 2% Qs-70 min/SDA	0.005 9	0.0100 7	0.010 5	0.009 7	0.008 7	0.008 3	0.007 1	b c d e
5A 0.2% Qs-80 min/SDA	0.010 4	0.0073	0.005 7	0.007 7	0.006 2	0.005 7	0.004 9	e f
5B 0.5% Qs-80 min/SDA	0.006 4	0.0087	0.010 1	0.009 6	0.009	0.008 2	0.007 1	b c d e
5C 1% Qs-80 min/SDA	0.005 6	0.0094	0.009 4	0.008 6	0.008 8	0.008 5	0.007 6	b c d e
5D 2% Qs.80 min/SDA	0.008 5	0.0088	0.007 7	0.007 9	0.006 4	0.006 4	0.005 9	d e f

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En las Figuras 40-44 se muestra el crecimiento micelial de *P. chrysogenum* durante los 14 días de incubación, para el control y los tratamientos con distinto quitosano. Todos los tratamientos afectaron el crecimiento micelial del hongo. A pesar de que las medias de algunos tratamientos fueron similares a las del control se puede observar en las gráficas que algunos tratamientos durante algunos días no presentaron aumento del crecimiento micelial; como en el tratamiento 1A que a pesar de tener la media similar al control durante los últimos 4 días no aumentó su crecimiento. En otros tratamientos como 2B, 2C, 3A, 4A, 4D, 5A y 5B también se detuvo el crecimiento micelial en los últimos días, lo que significa que la velocidad de crecimiento comenzó a disminuir respecto al control. En algunos tratamientos como el 1D y 3B, se observó detención del crecimiento micelial durante 3 días, pero pasado esos días su velocidad de crecimiento micelial aumento, lo que podría atribuirse a que el hongo pudo haberse adaptado.

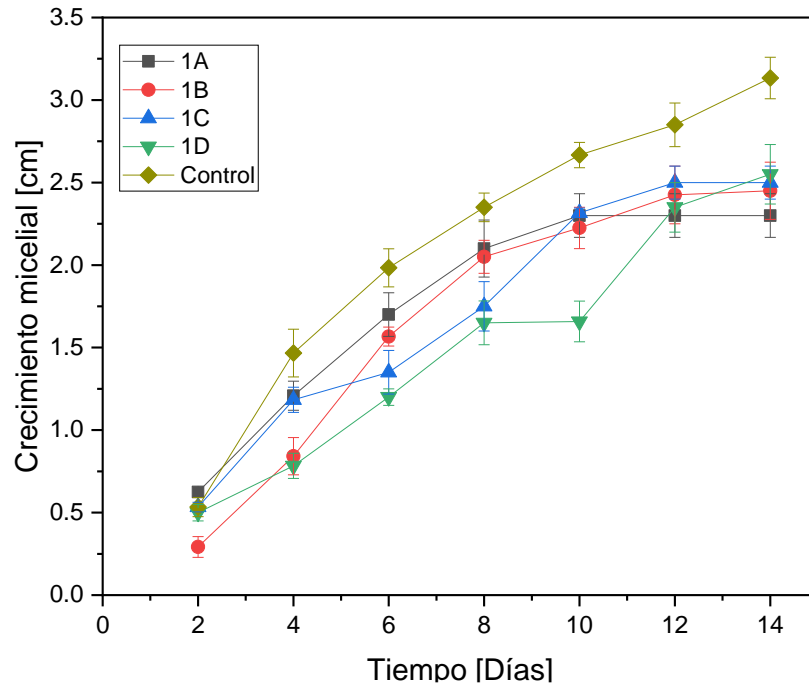


Figura 40. Cinética de crecimiento de *P. chrysogenum* durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-40 min y el control.

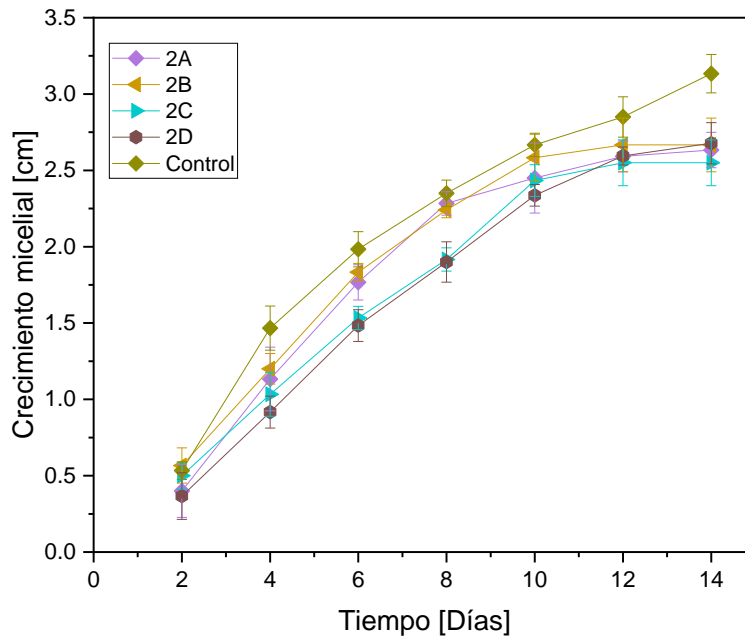


Figura 41. Cinética de crecimiento de *P. chrysogenum* durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-50 min y el control.

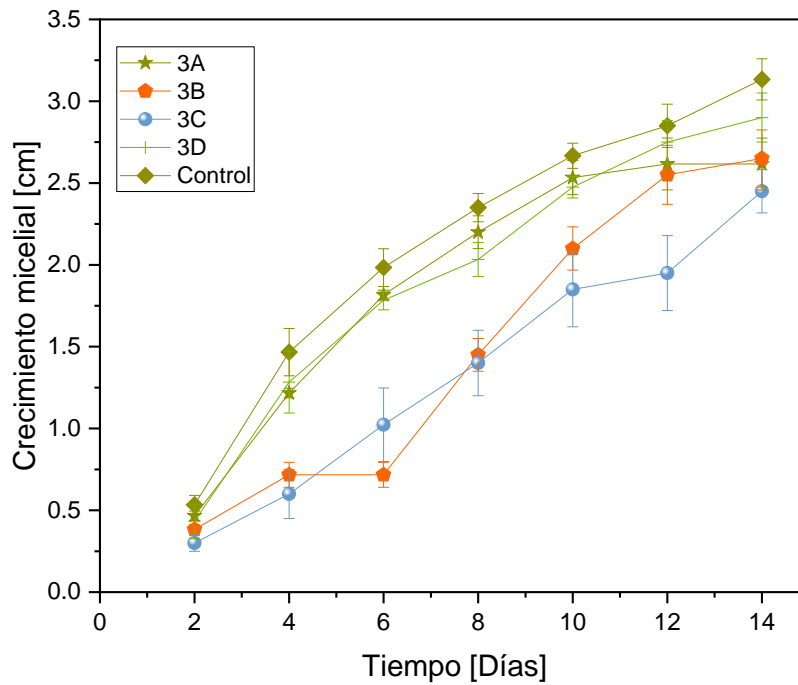


Figura 42. Cinética de crecimiento de *P. chrysogenum* durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-60 min y el control.

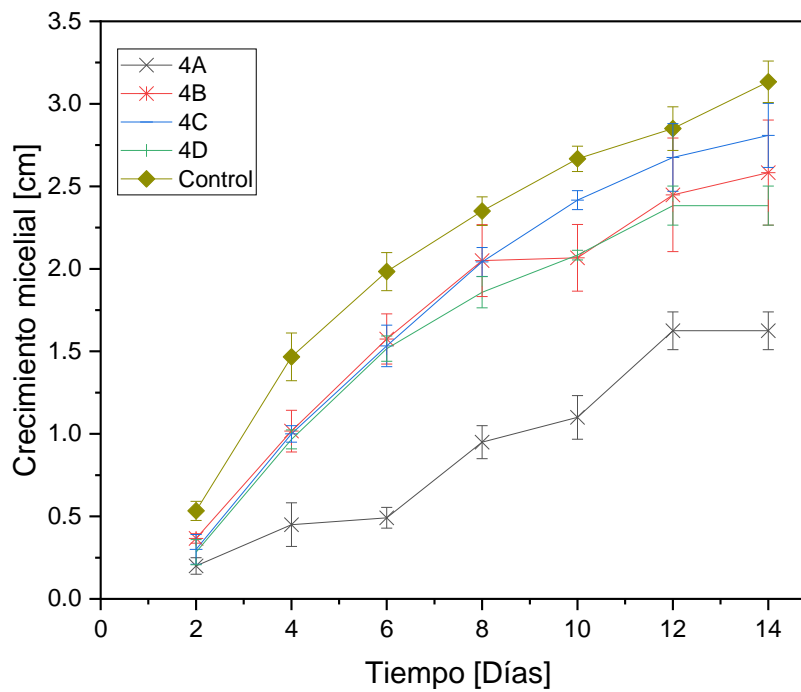


Figura 43. Cinética de crecimiento de *P. chrysogenum* durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-70 min y el control.

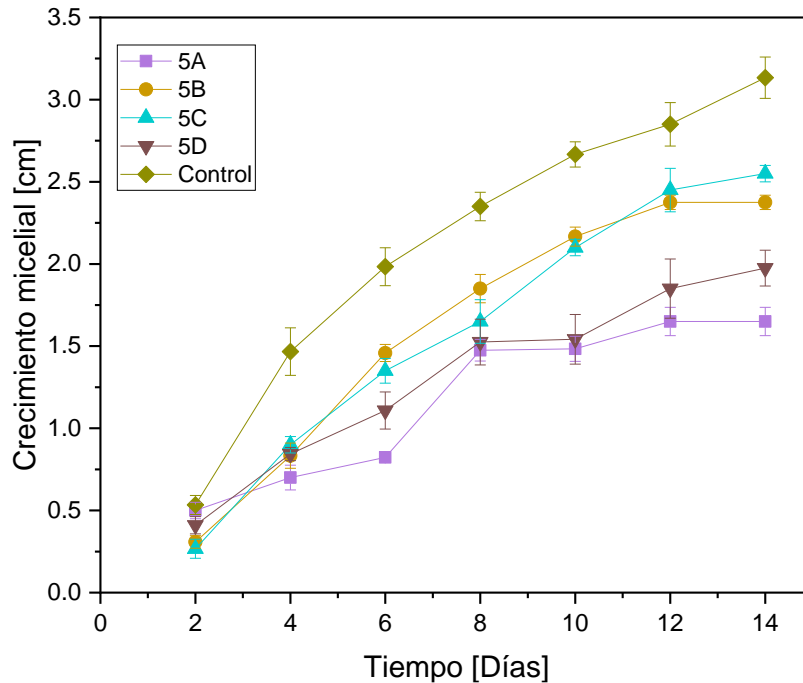


Figura 44. Cinética de crecimiento de *P. chrysogenum* durante 14 días de incubación con los tratamientos de Qs-80 min y el control.

El hongo patógeno *P. chrysogenum* presenta menor velocidad de crecimiento micelial en el tratamiento 4A y 5A respecto del control, además de que el crecimiento se detuvo en los últimos días de incubación; a largo plazo podría presentar menor velocidad de crecimiento ocasionando un mayor porcentaje de inhibición. Estos tratamientos de 0.2% de quitosano con GD= 69.76% y 67.05%, presentaron mayor actividad antifúngica contra *P. chrysogenum*. El quitosano podría estar funcionando como una barrera sobre el hongo, impidiendo su desarrollo, lo cual puede relacionarse con la concentración y las propiedades del quitosano, impidiendo que le lleguen los suficientes nutrientes que necesita para crecer (Solis, 2023). Dado el comportamiento del quitosano ante el hongo este puede estar presentado un efecto fungistático.

3.4.4 Análisis estadístico

Análisis de varianza ANOVA para crecimiento micelial

Inicialmente, se analizó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y varianza constante, como se muestra de la Figura 45 a la 47 de la prueba de Tukey para los tratamientos durante 14 días.

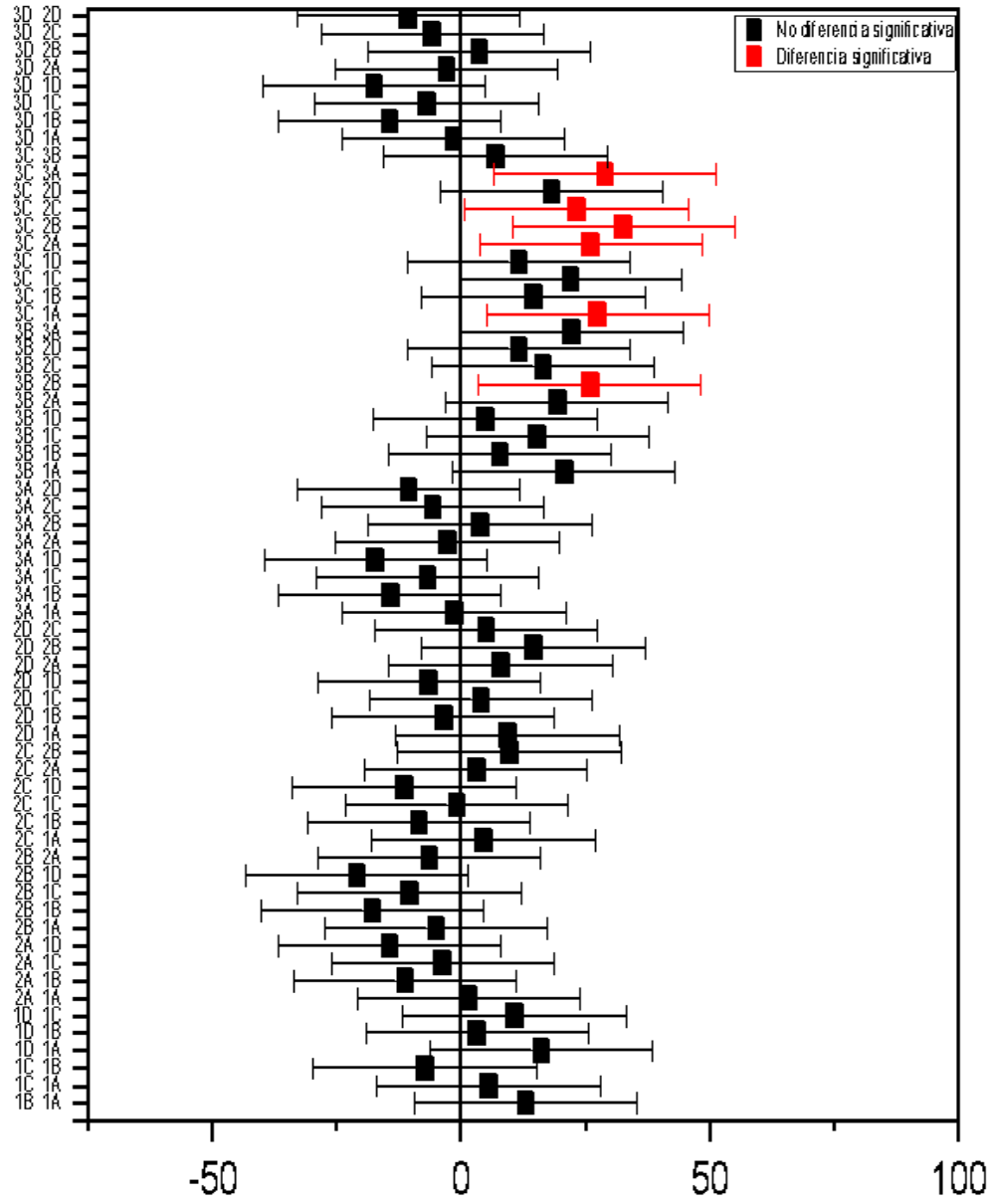


Figura 45. Prueba de Tukey para los tratamientos durante 14 días.

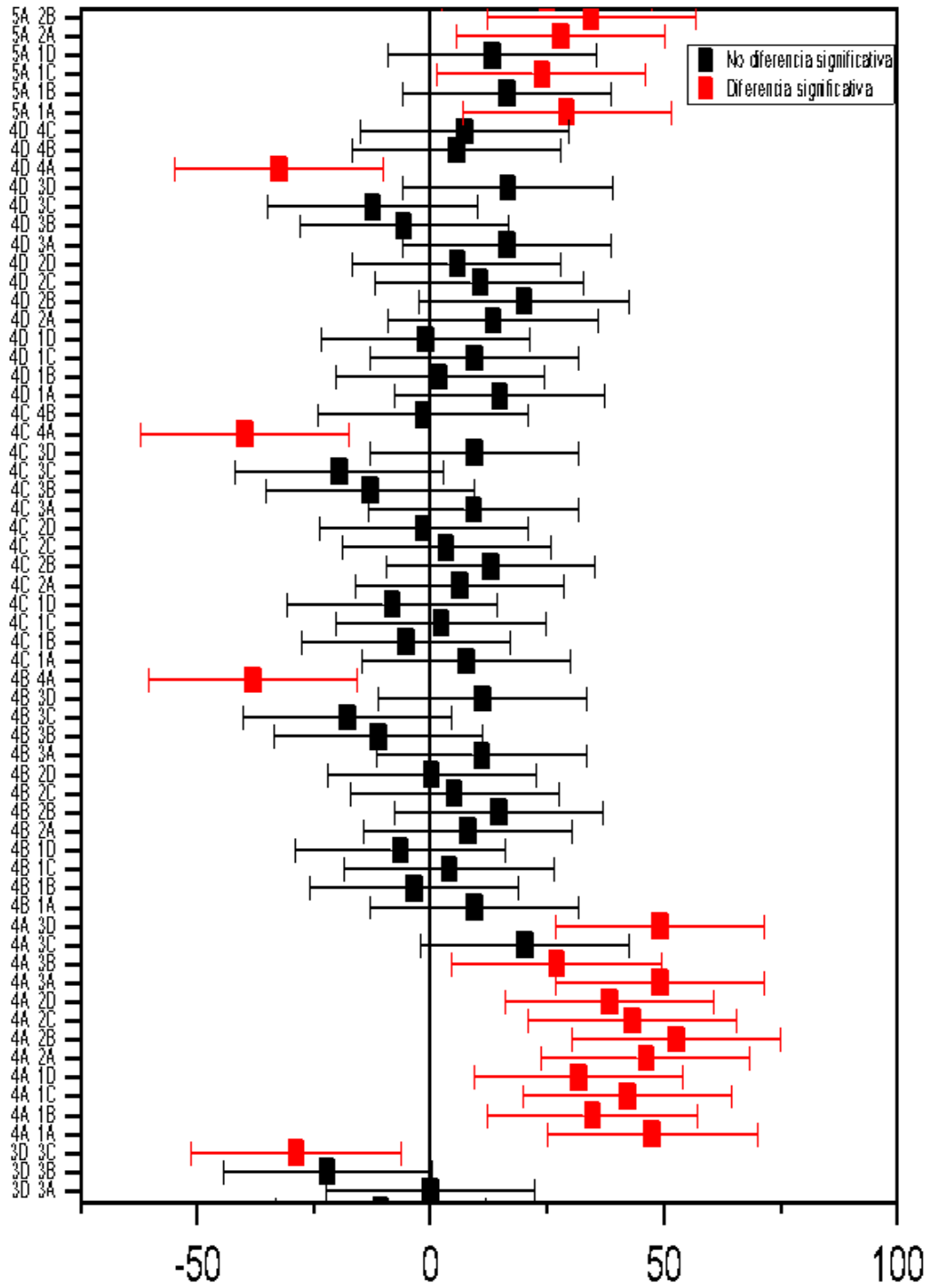


Figura 46. Continuación de la Figura 57 de la prueba de Tukey.

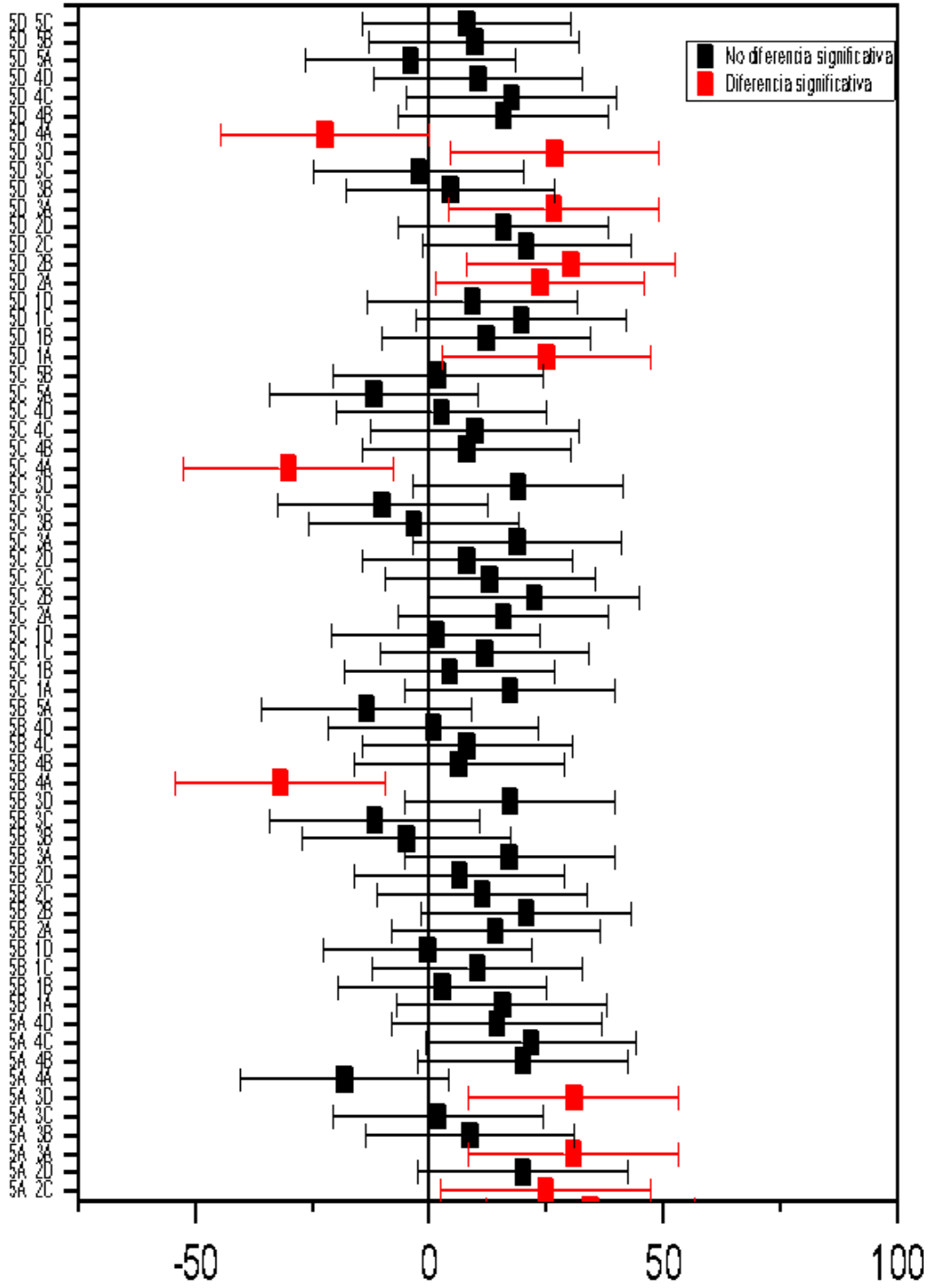


Figura 47. Continuación de la Figura 58 de la prueba de Tukey.

Se analizaron los resultados de la gráfica de caja del efecto inhibitorio (Figura 48) para todos los tratamientos (Tabla 2) durante 14 días.

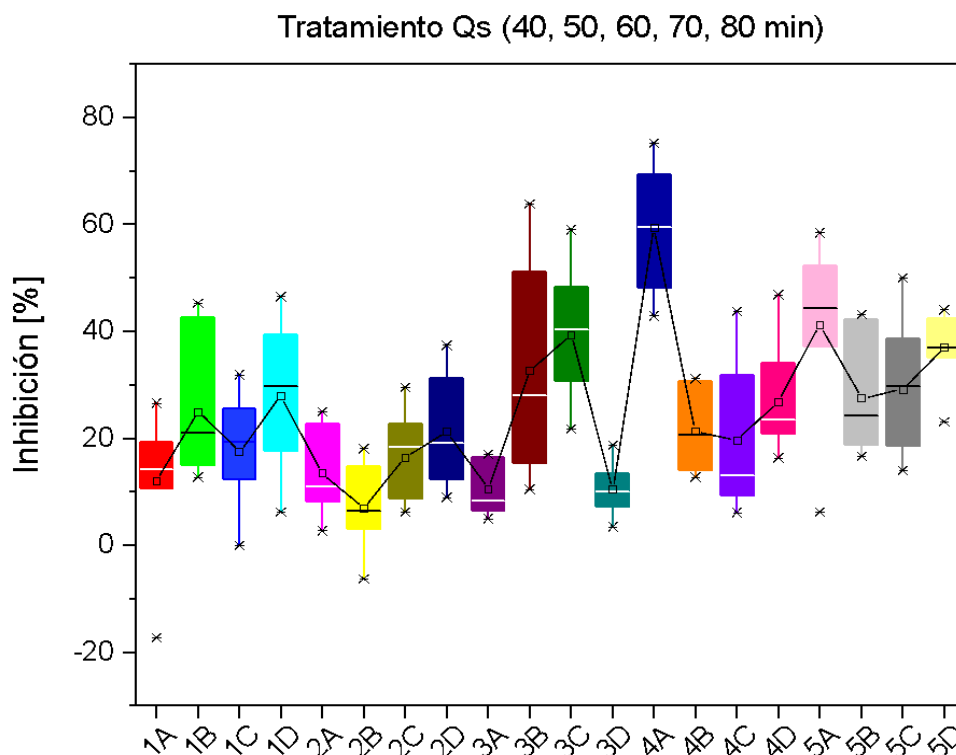


Figura 48. Gráfica de caja del efecto inhibitorio de Qs (40, 50, 60, 70 y 80 min) durante los 14 días de incubación.

De acuerdo con el análisis de la gráfica de caja se determina que el tratamiento que inhibe en mayor porcentaje el crecimiento micelial durante los 14 días es el tratamiento 4A (0.2% Qs-70 min/SDA), seguido del tratamiento 5A (0.2% Qs-80 min/SDA). El tratamiento 3D (2% Qs-60 min/SDA) fue el que presentó menor porcentaje de inhibición, no superó el 20% durante todo el tiempo de incubación, por lo que se determina que este es el menos idóneo para ser utilizado contra el hongo patógeno *P. Chrysogenum*. El análisis de varianza permitió concluir que $p=0.000 < 0.05$, rechazando la hipótesis nula, donde no todas las medias son iguales.

Se evidencia que los tratamientos 4A y 5A (concentración de 0.2% de Qs, 40 y 50 min, respectivamente), son la mejor alternativa para la disminuir del crecimiento micelial de *P. chrysogenum* desde el día 2 hasta el 14 de incubación, ya que fueron significativamente diferentes al control.

ANOVA para la velocidad de crecimiento

En el análisis de varianza ANOVA se corroboraron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de cada tratamiento y el control, (Figura 49-51). Se encontró en el análisis de varianza que $p=0.000 < 0.05$, cumpliendo con la hipótesis alterna. Los tratamientos 1B, 1D, 3B, 3C, 4A, 4D, 5A, 5B, 5C Y 5D son los que presentaron diferencia significativa con el control.

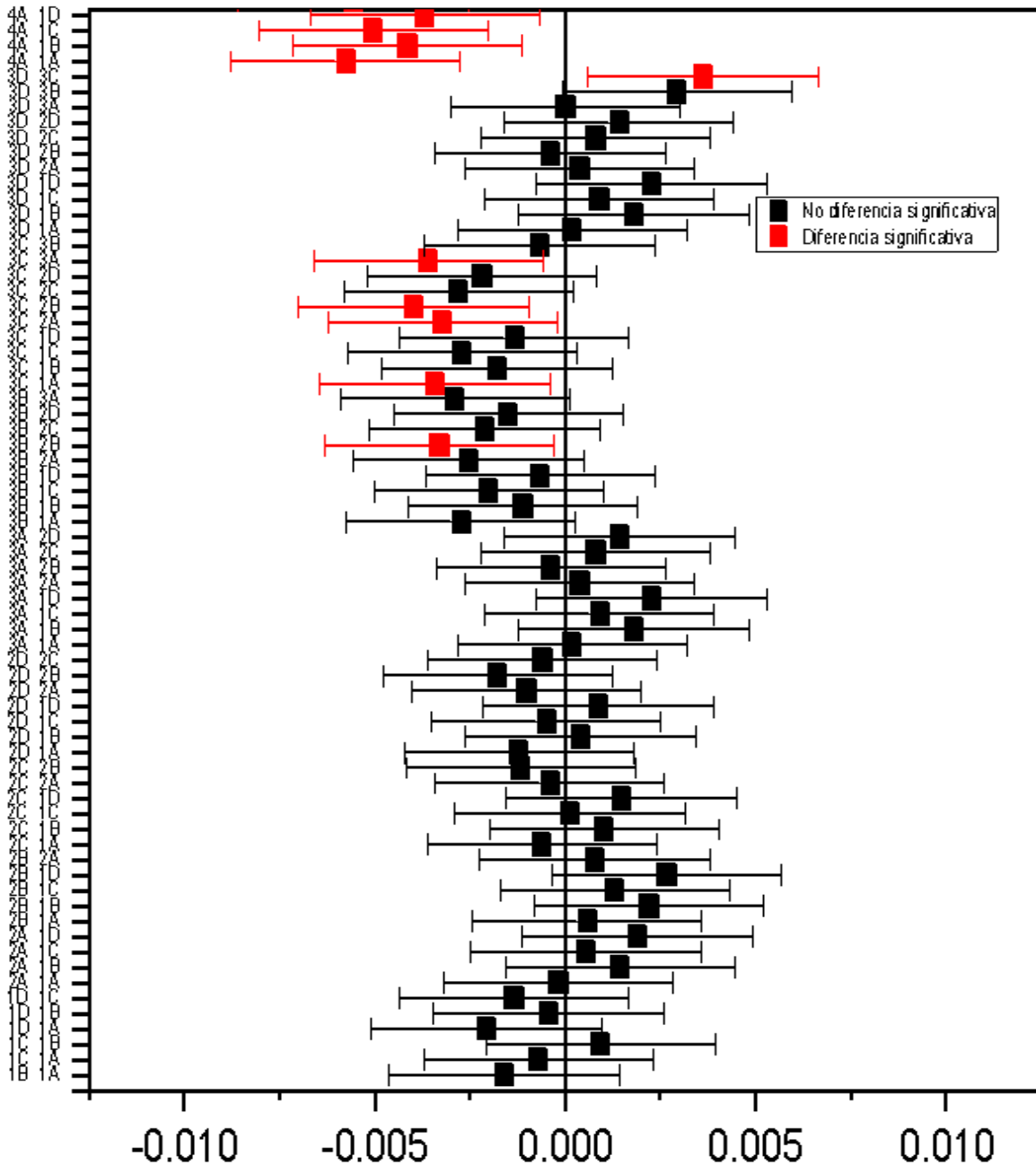


Figura 49. Prueba de Tukey para los tratamientos durante 14 días.

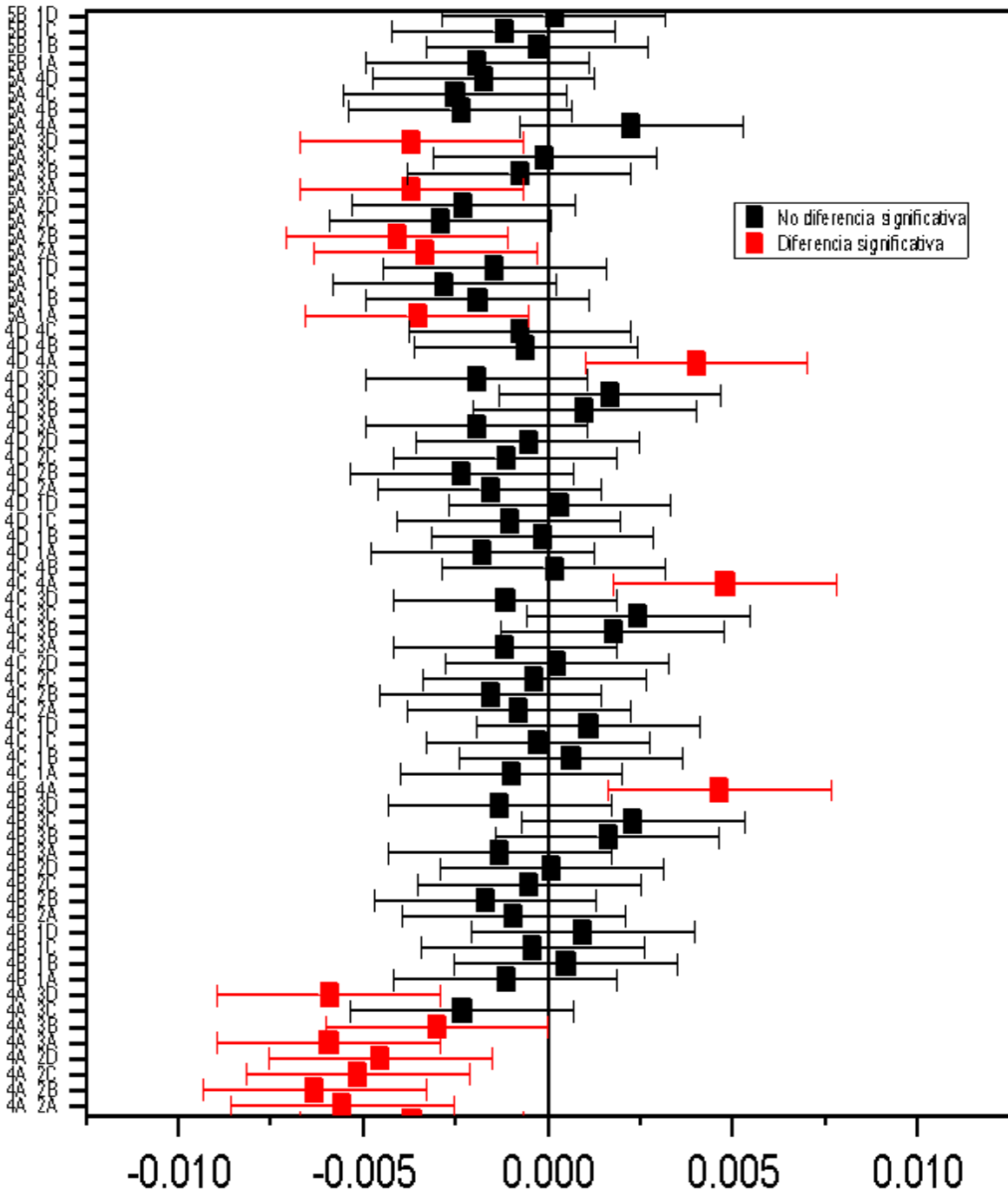


Figura 50. Continuación de la Figura 63 de la prueba de Tukey.

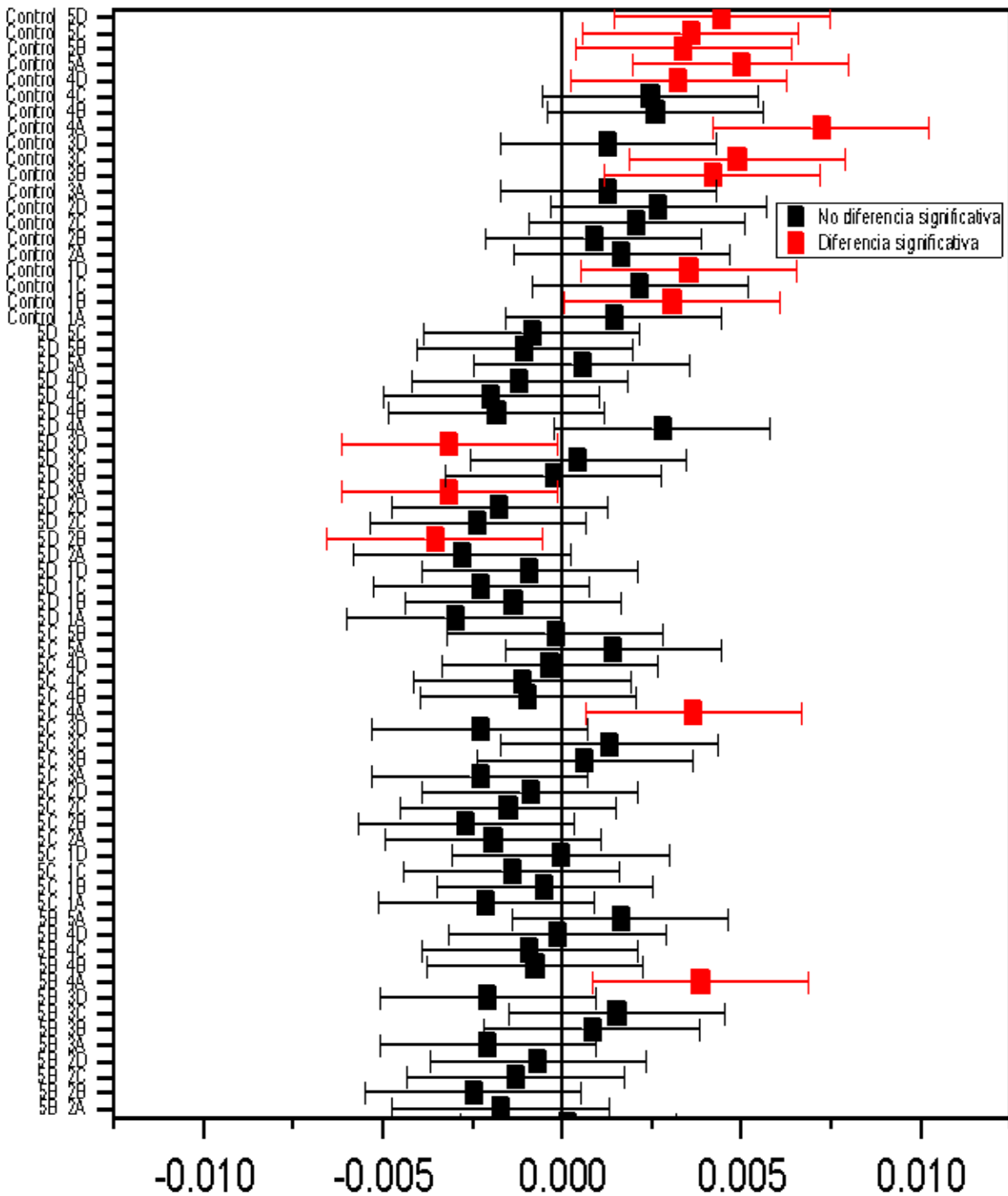


Figura 51. Continuación de la Figura 64 de la prueba de Tukey.

Se analizó la gráfica de caja con datos de cada 2 días (48 horas) hasta el día 14 de incubación de *P. chrysogenum* en los distintos tratamientos (Figura 52). La mediana de todos los tratamientos fue menor a la del control, por lo que se evidencia que presentaron actividad antifúngica, en ningún tratamiento hubo crecimiento micelial mayor a 3 cm. Se demostró que el tratamiento 4A (0.2% Qs-70 min) presentó el menor diámetro micelial (

0.2-1.6 cm) durante los 14 días de incubación, respecto al control, por lo que se considera una opción viable para disminuir la velocidad de crecimiento de *P. chrysogenum*.

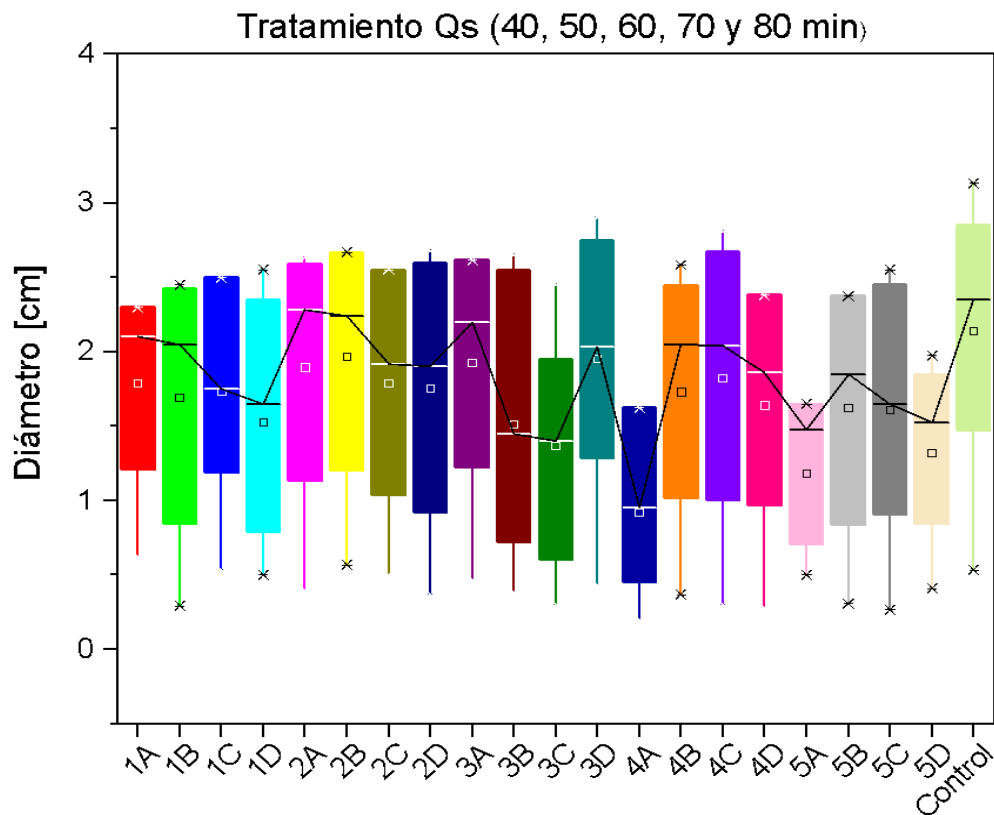


Figura 52. Gráfica de caja de la velocidad de crecimiento de Qs durante 14 días de incubación.

Dado todos los resultados recabados, los tratamientos 4A y 5A son los que presentan mayor porcentaje de inhibición durante los 14 días de incubación; obteniendo su más alto porcentaje de inhibición al día 6 con 75.21% y 58.49%, respectivamente. El porcentaje de inhibición al día 14 de incubación de los tratamientos 4A y 5A (48.1% y 47.3%, respectivamente) siguió siendo más alto en comparación con los otros tratamientos (no superan el 37% de inhibición micelial); por ende, su velocidad de crecimiento micelial también fue menor. Por lo tanto, se puede concluir que estos tratamientos con Qs de GD igual a 69.76% y 67.05%, con PM medio y alto, respectivamente, y concentración de 0.2%, resultaron ser los más idóneos para emplear contra *P. chrysogenum*. Los tratamientos con quitosano de diferentes propiedades que presentaron mayor actividad antifúngica además del tratamiento 4A y 5A, son el 1A, 2C y 3C, estos no superan el 27% de inhibición micelial, por lo que se determina que son de los menos idóneos para

emplear como tratamiento. La actividad antifúngica de los tratamientos se ve afectada por las propiedades del quitosano como el grado de GD, PM, el tamaño de partícula y la concentración empleada (Ardean et al., 2021; Poznanski et al., 2023). Se concluye que el GD influye más sobre el porcentaje de inhibición del hongo *Penicillium chrysogenum* y que está relacionado con el efecto de la concentración de quitosano debido a los grupos amina presentes. Las otras propiedades también se ven involucradas. En conjunto, a menor GD, PM, tamaño de partícula y concentración más baja, hay mayor porcentaje de inhibición y esto se evidenció en el tratamiento 4A (Tabla 8).

En la literatura se reporta el uso efectivo del quitosano en hongos del género *Penicillium*. Bautista et al. (2017) demostró que *Penicillium* puede ser afectado por quitosano, como en el caso de *P. expansum* que presentó hifas anormales, hinchazón y desorganización micelial. de Klerk, Fosso-Kankeu y Waanders (2016) reportaron que quitosano con GD de 75-85% con alto peso molecular a concentración de 0.25%, 0.5% y 1% presentaron un porcentaje de inhibición menor a 20%, 30% y 50%, respectivamente y con Qs de medio PM a esas mismas concentraciones se inhibió aproximadamente el 5%, 10% y 25% respectivamente, contra *P. chrysogenum* evaluado in vitro en SDA. Irkin y Guldás (2014) emplearon quitosano con GD de 85% a concentraciones de 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3% en medio SDA, siendo la concentración de 3% la que tuvo un mayor efecto antifúngico con el 57% de inhibición al día 7 de incubación de *P. chrysogenum*.

CONCLUSIONES

Se obtuvo quitosano con diferentes características ajustando el tiempo de sonicación, lo cual afectó su grado de desacetilación (GD) y peso molecular (PM). A mayor tiempo de sonicación, el GD disminuyó, obteniéndose quitosanos con PM medio y alto. El tamaño de partícula no mostró un comportamiento lineal debido a las condiciones de desproteínización y agitación en la desacetilación.

El hongo aislado de la muestra ungueal con onicomicosis fue identificado como *P. chrysogenum* mediante su morfología característica en cultivo, microscopía óptica y SEM. La evaluación in vitro reveló que los tratamientos 4A y 5A, con quitosano al 0.2% (GD de 69.76% y 67.05%, PM medio y alto), mostraron la mayor inhibición del crecimiento micelial (48.14% y 47.34% al día 14 de incubación). Aunque el porcentaje de inhibición y la velocidad de crecimiento no fueron constantes durante todo el experimento, estos tratamientos evidenciaron una acción fungistática eficaz.

Los tratamientos con quitosano produjeron cambios en la morfología macroscópica y microscópica de *P. chrysogenum*, observándose alteraciones significativas en su estructura, como superficies arrugadas, retorcidas, y una disminución en la cantidad de conidios.

En conclusión, los quitosanos con GD de 69.76% y 67.05% demostraron ser una opción prometedora para el tratamiento de onicomicosis causada por *P. chrysogenum*, debido a su capacidad para inhibir el crecimiento fúngico y alterar su morfología.

RECOMENDACIONES

Aunque se obtuvo quitosano de peso molecular medio y alto, no se observó una relación lineal entre el tiempo de sonicación y el tamaño de partícula, por lo que se recomienda ejercer un mayor control sobre la concentración de muestra en la etapa de desproteínización. Además, es necesario estudiar con mayor profundidad el impacto de la sonicación sobre el peso molecular y el tamaño de partícula.

Para estudios futuros, se sugiere realizar más pruebas con *P. chrysogenum* utilizando quitosano con un grado de desacetilación (GD) del 67-70%, pero con un tamaño de partícula más reducido.

Se recomienda emplear el quitosano que mostró el mayor porcentaje de inhibición en este estudio para llevar a cabo ensayos *in vivo*, con el fin de evaluar la viabilidad de *P. chrysogenum* frente a dicho tratamiento.

En investigaciones posteriores, es importante realizar pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* con quitosano en otros hongos patógenos responsables de onicomycosis.

Finalmente, este material, el quitosano, podría desarrollarse en forma de gel o spray en el futuro para ofrecer una mayor comodidad al paciente durante el tratamiento.

REFERENCIAS

- Abastabar, M., Mirhendi, H., Hedayati, M. T., Shokohi, T., Rezaei-Matehkolaei, A., Mohammadi, R.,...Akhtari, J. (2016). Genetic and Morphological Diversity of the Genus *Penicillium* From Mazandaran and Tehran Provinces, Iran. *Jundishapur J Microbiol*, 9(1), 1-7. doi: 0.5812/jjm.28280
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras, A., y Acosta, N. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13(9), 1-27. doi: 10.3390/polym13193256
- Ardean, C., Davidescu, C. M., Nemeş, N. S., Negrea, A., Ciopec, M., Duteanu, N.,... Musta, V. (2021). Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 1-28. doi: 10.3390/ijms22147449
- Arias, Y. V., Veloza, L. A., y Sepúlveda, J. C. (2020). Nanocompositos de Quitosano Aplicados al Campo de la Medicina Regenerativa. Una revisión Sistemática. *Scientia et Technica*, 25(5), 604-615. doi: 10.22517/23447214.23411
- Bautista, S., Ventura, R. I., Correa, Z., y Corona, M. L. (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(2), 103-121. doi: <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030>
- Bouchara, P. J., Nenoff, P., Gupta, A. K., y Chaturvedi, V. (2021). *Dermatophytes and Dermatophytoses*. doi: 10.1007/978-3-030-67421-2
- Cañete, C., y Wiederhold, N. P. (2023). Mycology of Onychomycosis. *Clinical Microbiology Newsletter*, 45(2), 11-17. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2023.01.002
- Caro, F. J., López, L. M., Lizardi, J., Argülles, W., Goycoolea, F.M., Carvajal, E., y López, Y. L. (2019). Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano: una revisión. *Biocencia*, 21(3), 13-25. doi: 10.18633/biotech.v21i3.1007
- de Klerk, C., Fosso-Kankeu, E., y Waanders, F. (2016). *Antifungal Activities of Chitosan and Nanoparticle Derivatives under Various pH Conditions*. Parys, South Africa: ResearchGate. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/311517164>

del Cid, K. (2019). *Caracterización sociodemográfica, clínica y micológica de pacientes con onicomicosis* (tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala.

Echenique, A. A. (2016). *CAPSAICINA, Larrea tridentata y QUITOSANO PARA EL CONTROL DE Colletotrichum musae* (tesis de maestría). Centro de Investigación y Desarrollo, A. C, Sonora, México.

El-araby, A., Janati, W., Ullah, R., Uddin, N., y Bari, A. (2024). Antifungal efficacy of chitosan extracted from shrimp shell on strawberry (*Fragaria x ananassa*) postharvest spoilage fungi. *Heliyon*, 10(7), 1-12. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e29286

Fernandes, M., Teodosio, K., Araujo, D., Lanzi, G., y Oliveira, H. (2015). Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?. *Marine drugs*, 13, 141-158. doi: 10.3390/md13010141

Fernández, M. (2014). *Caracterización de transportadores necesarios para la compartimentación de la biosíntesis de penicilina en Penicillium chrysogenum* (tesis de doctorado). Universidad de León, León, España.

Fonseca, A. J., Urbano, E. X., y Zanguña, L. F. (2022). Tinea pedis y onicomicosis: prevalencia en futbolistas. *Dermatol Rev Mex*, 66(5), 505-514. doi: 10.24245/dermatolrevmex.v66i5.8130

Gong, W., Sun, Y., Tu, T., Huang, J., Zhu, C., Zhang, J.,...Wang, Y. (2024). Chitosan inhibits *Penicillium expansum* possibly by binding to DNA and triggering apoptosis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 259, 1-9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.129113

Guo, Y., Qiao, D., Zhao, S., Liu, P., y Xie, F. (2024). Biofunctional chitosan-biopolymer composites for biomedical applications. *Materials Science & Engineering R*, 159, 1-61. doi: 10.1016/j.mser.2024.100775

Gupta, P., Sharma, S., Jabin, S., y Jadoun, S. (2024). Chitosan nanocomposite for tissue engineering and regenerative medicine: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 264(1), 1-20. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127660

Irkin, R., y Guldás, M. (2014). Chitosan Coating of Red Table Grapes and Fresh-cut Honey Melons to Inhibit *Fusarium oxysporum* Growth. *Journal of Food and Preservation*, 38(4), 1948-1956. doi: 10.1111/jfpp.12170

- Jameel, F. A., y Yassein, S. N. (2021). Virulence Potential of *Penicillium Chrysogenum* Isolated from Subclinical Bovine Mastitis. *Iraqi Journal of Science*, 62(7), 2131-2142. doi: 10.24996/ijs.2021.62.7.2
- Ke, C. L., Deng, F. S., Chuang, C.Y., y Lin, C. H. (2021). Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. *Polymers*, 13(6), 1-21. doi: 10.3390/polym13060904
- Ke, Y., Ding, B., Zhang, M., Dong, T., Fu, Y., Lv, Q.,...Wang, X. (2022). Study on inhibitory activity and mechanism of chitosan oligosaccharides on *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Fumigatus*. *Carbohydrate Polymers*, 275, 1-8. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118673
- Lárez, C., y Rojas, L. (2020). A Review on the Physicochemical and Biological Aspects of the Chitosan Antifungal Activity in Agricultural Applications. *Journal of Research Updates in Polymer Science*, 9, 70-79. doi: 10.6000/1929-5995.2020.09.07
- Liu, X., Wang, X., Zhou, F., Xue, Y., y Liu, C. (2024). Genomic insights into *Penicillium Chrysogenum* adaptation to subseafloor sedimentary environments. *BMC Genomics*, 25(4), 1-13. doi: 10.1186/s12864-023-09921-1
- Mania, S., Banach, A., Staszczyk, K., Kulesza, J., Augustin, E., y Tylingo, R. (2023). An influence of molecular weight, deacetylation degree of chitosan xerogels on their antimicrobial activity and cytotoxicity. Comparison of chitosan materials obtained using lactic acid and CO₂ saturation. *Carbohydrate Research*, 534, 1-11. doi: 10.1016/j.carres.2023.108973
- Marín, D. (2021). *Onicomycosis en población mexicana: un estudio retrospectivo de 10 años* (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Marinho, R., Horiuchi, L., y Pires, C. A. (2018). Effect of stirring speed on conversion and time to particle stabilization of Poly(Vinyl Chloride) produced by suspension polymerization process at the beginning of reaction. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35(2), 631-640. doi: 10.1590/0104-6632.20180352s20160453
- Martínez, N. M., Peres, N. T., Bitencourt, T. A., Martins M. P., y Rossi, A. (2021). State-of-the-Art Dermatophyte Infections: Epidemiology Aspects, Pathophysiology, and Resistance Mechanisms. *Journal of Fungi*, 3(629), 2-17. doi: <https://doi.org/10.3390/jof7080629>

Maj, M., Tylkowski, B., Konopka, P., Woźniak-Budych, M., Staszak K., Staszak, M.,...Jastrzab, R. (2024). Advancing oral health: Harnessing the potential of chitosan and polyphenols in innovative mouthwash formulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 175, 1-7. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116654

Meng, D., Garba, B., Ren, Y., Yao, M., Xia, X., Li, M., y Wang, Y. (2020). Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1063-1070. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.213

Mezher, M. A., Mahmoud, W., y Ibrahim, K. (2015). Identification study some virulence factors of invasive mold infections isolated from patients undergoing chemotherapy in Tikrit teaching Hospital. *Egypt Academic Journal of Biological Sciences*, 7(1), 1-11. doi: 10.21608/eajbsg.2015.16480

Nasiri-Jahrodi, A., Shams-Ghahfarokhi, M., Paskiabi, F. A., Razzaghi-Abyaneh, M. (2024). Unraveling the mechanism of antifungal action of encapsulated eugenol/chitosan nanoparticles against *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 95, 1-10. doi: 10.1016/j.jddst.2024.105595

Nazar, J. R. Gerosa, P. E., y Díaz, O. A. (2012). Onicomycosis: epidemiología, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio. *Revista argentina de microbiología*, 44(1), 21-25. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412012000100005

Pakshir, K., Kamali, M., Nouraei, H., Zomorodian, K., Motamedi, M., y Mahmoodi, M. (2021). Molecular characterization and antifungal activity against non-dermatophyte molds causing onychomycosis. *Scientific Reports*, 11(20736), 1-8. doi: 10.1038/s41598-021-00104-0

Pandit, A., Indurkar, A., Deshpande, C., Jain, R., y Dandekar, P. (2021). A systematic review of physical techniques for chitosan degradation. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 1-10. doi: 10.1016/j.carpta.2021.100033

Pastor, A. (2004). *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Lima, Perú. Editorial Pontifica Universidad Católica del Perú/Fondo editorial

Pérez, J. J., Casado, I., y Santiago, F. (2017). Técnica de examen directo de la onicomicosis mediante microscopía con hidróxido de potasio. *Revista Española de Podología*, 28(1), 46-52. doi: 10.1016/j.repod.2017.01.001

Pérez, R. M., Rivera, A., Escalante, E. D., Segura, G. O., Antonio, D. C., Flores, F. A., y Roldan, E. C. (2018). Etiologic Diversity of Onychomycosis in Mexican Patients with Chronic-Degenerative Diseases. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(3), 1215-1219. doi: 10.22207/JPAM.12.3.22

Poznanski, P., Hameed, A., y Orczyk, W. (2023). Chitosan and Chitosan Nanoparticles: Parameters Enhancing Antifungal Activity. *Molecules*, 28(7), 1-16. doi: 10.3390/molecules28072996

Ramírez, C. A., Delgado, E., y Andrade, J. A. (2016). Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Journal CIM*, 4(1), 769-776. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/309493340_Determinacion_del_grado_de_desacetilacion_de_quitosana_mediante_titulacion_potenciometrica_FTIR_y_Raman

Rasweefali, M. K., Sabu, S., Muhammed, K. S., Raseel, M. K., Sunooj, K. V., Sasidharan, A., y Anoop, K. K. (2022). *Advances in Biomarker Sciences and Technology*, 4, 12-27. doi: 10.1016/j.abst.2022.03.001

Ribeiro, R., Rocha, N. A., Soares, I. C., Clarindo, L. B., Lavorato, L., Armamar, A., y de Lima, L. G. (2023). Production and physicochemical properties of fungal chitosans with efficacy to inhibit mycelial growth activity of pathogenic fungi. *Carbohydrate Research*, 525, 1-10. doi: 10.1016/j.carres.2023.108762

Rodríguez, A. T., Bautista, S., Ramírez, M. A., Plascencia, M., y Hernández, L. (2022). Quitosano y sus derivados, polímeros naturales con potencial para controlar a *Pyricularia oryzae* (Cav). *Cultivos tropicales*, 43(3), 1-6. Recuperado de <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1684>

Rodríguez, A. T., Plascencia, M., Bautista, S., Ventura, E., Córtes, M. O., y Ramírez, M. A. (2021). Efecto in Vitro de un quitosano de masa molecular media sobre dos cepas de *Bipolaris oryzae* aisladas en México y Cuba. *Bioteología aplicada*, 38(2), 2201-2205. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=106735>

Secretaría de Salud (31 de mayo de 2016). Los molestos hongos en las uñas pueden prevenirse [Mensaje en un blog]. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/es/articulos/los-molestos-hongos-en-las-unas-pueden-prevenirse>

Solis, I. (2023). *Obtención de nanopartículas de quitosano mediante tratamiento ultrasónico y su aplicación antifúngica en Colletotrichum gloeosporioides presente en el mango Ataulfo de Guerrero* (tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Sun, Y., Shang, L., Xia, X., Meng, D., Ren, Y., Zhang, J.,...Wang, Y. (2021). Cellular uptake of chitosan and its role in antifungal action against *Penicillium expansum*. *Carbohydrate Polymers*, 269, 1-8. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118349

Tan, G., Kaya, M., Tavlek, A., Sargin, I., y Baran, T. (2018). Antitumor activity of chitosan from mayfly with comparison to commercially available low, medium and high molecular weight chitosan. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 54, 366-374. doi: 10.1007/s11626-018-0244-8

Tejedor, F. M., González, P., y Mayordomo, R. (2021). Solubilización in vitro del aceite de árbol de té y primeros resultados de efecto antifúngico en onicomiosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 39 (8), 395-398. doi: 10.1016/j.eimc.2020.06.013

Thanyasrisung, P., Satitviboon, W., Howattanapanich, S., y Matangkasombut O. (2023). Antifungal drug resistance in oral *Candida* isolates from HIV-infected and healthy individuals and efficacy of chitosan as an alternative antifungal agent. *Archives of Oral Biology*, 147, 1-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2023.105628

Torres, J. A. (2023). *ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ACTINOMICETOS MARINOS Y QUITOSANO PARA EL CONTROL DE Fusarium solani EN PLANTAS DE TOMATE (Solanum lycopersicum L)* (tesis de doctorado). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Baja California Sur, México.

Vallejo, D. (2019). *Funcionalidad del quitosano en la conservación de carne vacuna* (tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Xia, M. C., Bao, P., Liu, A. J., Zhang, S. S., Peng, T. J., Shen, L.,...Zeng, W. M. (2018). Isolation and identification of *Penicillium chysogenum* strain Y5 and its copper extraction

characterization from waste printed circuit boards. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(1), 78-87. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.001

Zaraa, I., Dehavay, F., y Richert, B. (2024). Onychomycosis. *Hand Surg Rehab*, 11(101638), 1-7. doi: 10.1016/j.hansur.2024.101638

Zhang, L., Yang, Y., Zhu, Y., Hu, H., Jia, Q., Sun, C., Liu, Y. (2024). Antifungal activity and mechanism of chitosan against *Fusarium solani* caused ginger soft rot during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 208, 1-15. doi: 10.1016/j.postharvbio.2023.112680

Zhang, Y., Huang, S., Guo, Y., Xie, X., Chen, G., Cao, G.,...Cheng, S., (2024). Chitosan from the base of *Flammulina velutipes* stipe alleviates oral *Candida albicans* infection via modulating Th-17 cell differentiation and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 274(1), 1-11. doi: 0.1016/j.ijbiomac.2024.132879

Zheng, Q., Li, W., Liang, S., Zhang, H., Yang, H., Li, M., y Zhang, Y. (2019). Effects of ultrasonic treatment on the molecular weight and anti-inflammatory activity of oxidized konjac glucomannan. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 1-10. doi: 10.1080/19476337.2018.1541195