

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Actividad Antifúngica de Hidrogeles de
Quitosano/Poliacrilamida/Zeolita: Efecto Sobre la
Germinación de Esporas, Morfometría y Viabilidad de
Aspergillus y *Fusarium***

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

Yessica Dioselinda Saad Gutiérrez

Hermosillo, Sonora

Abril de 2017

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Yessica Dioselinda Saad Gutiérrez** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de **Químico en Alimentos**.

Dra. Maribel Plascencia Jatomea

Presidente

Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo

Secretario

Dr. José Carmelo Encinas Encinas

Vocal

M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero dar gracias a mis padres por estar siempre conmigo y apoyarme día con día en el transcurso de mi vida, lo que soy y en lo que me he convertido es gracias a ustedes, los amo.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Maribel Plascencia Jatomea por brindarme su apoyo en todo momento durante el servicio social, y sobre todo por verme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis.

A Luis Galindo Vazquéz por ayudarme en todo el desarrollo de este trabajo, por sus regañones y cuestiones raras que me ayudaron demasiado, gracias inmensas, ya soy química por fin no me harás bullying.

A mis sinodales Dra. Abril Graciano, Dr. Carmelo Encinas y MC. Lucía Castellón, gracias por aceptar formar parte de mi comité, por apoyarme en este proyecto brindándome todos sus comentarios que fueron necesarios para concluir con éxito esta investigación.

Gracias a mi casa de estudios Universidad de Sonora y al DIPA área de Microbiología y Micotoxinas por abrirme las puertas desde mi servicio social y ahora bien para realizar este trabajo que me ha hecho crecer como toda una persona profesional.

A mi hermano Vladi, por ayudarme con su apoyo moral, te quiero.

A mis amigos Carmen, July, Carlos, Rigo, Gahel, Diana, Gabby, Yoko por compartir conmigo esos momentos de estrés que pasamos juntos durante todo este tiempo de la carrera para convertirnos en unos grandes, los aprecio y quiero bastante.

A mi familia por creer y confiar en que podría lograrlo ahora si soy toda una profesional, y en especial a mi primo Saúl que me ayudo a elegir mi vocación, ya somos dos químicos en alimentos en la familia.

Gracias Sandra, Zule, Edit, Chayis por darme su apoyo, por presionarme para titularme, por cuidarme y por convertirse en mis mamis en LESP, también esto es por ustedes.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
CONTENIDO	4
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
HIPÓTESIS	10
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	13
Objetivo General	13
Objetivo Específico	13
REVISIÓN LITERARIA	14
Hongos Filamentosos	14
Generalidades y Morfología	14
Estructura Subcelular	14
Pared celular	14
Membrana celular	14
Enfermedades Causadas por Hongos	16
Género <i>Aspergillus spp</i>	17
Patogénesis	18
Aspergilosis	18
Aspergilosis cutánea	18
Aspergilosis invasiva	18
<i>Fusarium verticilloides</i>	19
Patogénesis	20
Enfermedades por <i>Fusarium</i>	20
Onicomycosis	21
Piel.....	21
Métodos de Control de Hongos	21
Quitosano: Generalidades	23
Fuente	23

Estructura Química	24
Propiedades Fisicoquímicas	24
Peso molecular	25
Grado de desacetilación y solubilidad	25
Viscosidad	26
Propiedades Biológicas	26
Actividad antifúngica	27
Materiales Elaborados con Quitosano	28
Envases	28
Materiales Superabsorbentes	29
Hidrogeles	29
Mecanismo de penetración del agua en los hidrogeles	31
Uso de hidrogeles en enfermedades causadas por hongos	32
Geles de Poliacrilamida	34
Polimerización de la Poliacrilamida	34
Formación del Hidrogel de Poliacrilamida	36
Uso de la Zeolita en la Elaboración de Materiales Superabsorbentes	38
MATERIALES Y MÉTODOS	40
Reactivación de Cepas	40
Cultivos Monospóricos	40
Preparación de los Inóculos y Conteo de Esporas	41
Preparación de la Soluciones de Quitosano	41
Elaboración de Hidrogeles	42
Hidrogel de Poliacrilamida (Control) Sin Zeolita	43
Hidrogeles de Poliacrilamida (Control) Con Zeolita	44
Evaluación de la Actividad Antifúngica de los Hidrogeles	44
Acondicionamiento de los hidrogeles	44
Inoculación del hidrogel con las cepas de hongos	44
Análisis morfométrico	45
Análisis de germinación de esporas	45
Análisis de viabilidad por tinción con azul de tripán	45
Conteo de células viables en placa	46
Ensayo 1: hidrogel húmedo	46
Ensayo 2: hidrogel seco y pulverizado	46

Diseño Experimental y Análisis de Datos.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
Elaboración de Hidrogeles	49
Morfometría	50
Germinación de Esporas	51
Análisis de Viabilidad Utilizando Azul de Tripán	53
Conteo de Celúlas Viables en Placa por la NOM-110-SSA1-1994	55
Ensayo1: Hidrogel Húmedo	55
Ensayo 2: Hidrogel Seco y Pulverizado	58
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación de antifúngicos según su estructura.....	22
2. Clasificación de antifúngicos según el sitio de acción.....	22
3. Aplicación de materiales adsorbentes contra enfermedades fúngicas.....	33
4. Formulaciones a utilizar para elaboración de los hidrogeles.....	42
5. Morfometría de esporas de <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i> en un soporte de hidrogel, a 28°C por 24 h.....	50
6. Porcentaje de viabilidad fúngica por gradiente de concentración de quitosano.....	54
7. Promedio de UFC/mL utilizando hidrogeles de quitosano a diferente concentración.....	56
8. Promedio de UFC/mL en placa utilizando el hidrogel 3.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Contenido celular, esquema de una hifa (sección apical).....	16
2. Características morfológicas de las principales especies del género <i>Aspergillus spp.</i>	17
3. Características morfológicas del género <i>Fusarium verticilloides</i>	19
4. Estructura química de la quitina.....	24
5. Estructura química del quitosano.....	25
6. Cambio en la estructura de los hidrogeles en la transición de fase.....	31
7. Representación esquemática de la polimerización de la poliacrilamida.....	35
8. Representación esquemática del hidrogel de poliacrilamida.....	36
9. Ilustración esquemática de la síntesis de semi-IPN superabsorbente.....	37
10. Hidrogel 3 pulverizado y solución de quitosano utilizada.....	47
11. Aspecto físico de los controles respecto a hidrogeles con quitosano.....	47
12. Esporas de <i>Fusarium verticilloides</i> inoculadas en los hidrogeles 1 y 4.....	51
13. Esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>Aspergillus niger</i> inoculadas en los hidrogeles control.....	52
14. Efecto de los hidrogeles sobre la viabilidad de <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Fusarium verticillioides</i> , determinada mediante conteo de viables en placa y reportada como UFC/mL.....	56
15. Desarrollo de las UFC/mL en placa de <i>Fusarium verticilloides</i> en dilución -1 y -2.....	57
16. Desarrollo de las UFC/mL en placa de <i>Aspergillus parasiticus</i> en dilución -1 y -2.....	57
17. Desarrollo de las UFC/mL en placa de <i>Aspergillus niger</i> en dilución -1 y -2.....	58
18. Desarrollo de UFC/mL en placa de tres hongos en la dilución -1 y -2.....	59
19. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en muestra de orina.....	60

RESUMEN

Las infecciones mucocutáneas representan un problema de salud en personas con el sistema inmunológico comprometido y los hidrogeles elaborados a base de quitosano han demostrado tener la capacidad de inhibir su desarrollo. En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de hidrogeles de quitosano/poliacrilamida/zeolita y su efecto sobre la germinación de esporas, morfometría y viabilidad de *Aspergillus* y *Fusarium*. Se prepararon materiales adsorbentes compuestos con quitosano, poliacrilamida y zeolita tamizada, a diferentes concentraciones del biopolímero, utilizando la técnica de copolimerización vía radicales libres de monómeros vinílicos hidrófilos de bajo peso molecular, en presencia de un agente entrecruzante polimerizable. Para evaluar la actividad biológica se prepararon suspensiones de esporas a partir de cultivos monospóricos de *A. parasiticus*, *A. niger* y *Fusarium verticilloides*. Cada una de las especies fue inoculada en contacto directo con el hidrogel y se evaluó el efecto sobre morfometría y germinación de esporas mediante análisis de imágenes, viabilidad de las esporas por microscopía utilizando tinción con azul de tripán y conteo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) viables de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994. Los hidrogeles con quitosano (1.0, 0.75, 0.50 y 0.25 g) mostraron actividad inhibitoria contra las tres especies analizadas, observando un mayor efecto contra *F. verticilloides*. Asimismo, inhibieron el desarrollo de los hongos en las pruebas de viabilidad por tinción con azul de tripán, encontrando un menor número de UFC/mL con respecto al control. Los hidrogeles de quitosano/poliacrilamida/zeolita demostraron poseer actividad antifúngica contra los tres hongos estudiados, lo que representa una opción para el desarrollo de materiales que ayuden a controlar el crecimiento fúngico y prevenir infecciones de este tipo.

HIPÓTESIS

Los hidrogeles de quitosano/poliacrilamida/zeolita presentan actividad antifúngica contra especies de *Aspergillus* y *Fusarium*, afectando la germinación de esporas, morfometría y viabilidad celular.

INTRODUCCIÓN

Los hongos de naturaleza filamentosa han sido considerados como agentes causales de diversas enfermedades tanto en humanos como en animales, principalmente en personas con el sistema inmunológico comprometido, alcanzando una tasa de mortalidad del 70% en esta población. Una característica llamativa es la existencia previa o concomitante de lesiones cutáneas en las extremidades y en la cara, las cuales están presentes en más de las dos terceras partes de los pacientes. Las lesiones se caracterizan por nódulos subcutáneos eritematosos múltiples, máculas y pápulas eritematosas, con necrosis central progresiva (Luque, 2012).

La aspergilosis es una infección causada por *Aspergillus spp*, un tipo de hongo que vive intramuros y al aire libre. Los problemas de salud asociados a este género incluyen reacciones alérgicas, infecciones pulmonares e infecciones en otros órganos, cuyo tratamiento depende del tipo de problema o microorganismo involucrado. Por otro lado, se encuentran las hialohifomicosis causadas por hongos oportunistas que presentan hifas hialinas septadas como *Fusarium verticilloides*, causante de queratitis, endoftalmitis, infecciones cutáneas y en ocasiones infecciones diseminadas (CDC, 2014).

Las micosis invasoras afectan principalmente a pacientes inmunodeprimidos u hospitalizados, con graves enfermedades. La distribución de los agentes causales varía en función de la geografía, condiciones de los pacientes y unidades de hospitalización. *Aspergillus spp.* es la principal causa de micosis invasora por mohos, seguida de *Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.* y zigomicetos (Pemán y Salavert, 2011).

Las enfermedades fúngicas invasoras (EFI) causadas por nuevos mohos y levaduras emergentes distintos de *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* se han incrementado en frecuencia y gravedad en las últimas dos décadas, asociadas a tasas muy elevadas de morbilidad y mortalidad (65-90%) en pacientes inmunodeprimidos. Aunque estas EFI por hongos emergentes son infrecuentes, gran parte de su importancia reside en la virulencia de su comportamiento, en el grado de inmunosupresión del huésped en el que asientan y en las opciones limitadas del tratamiento antifúngico debido a su amplio perfil de resistencia a la mayoría de los fármacos disponibles. Por ello, la combinación de varios antifúngicos y ocasionalmente de otras medidas adyuvantes como la cirugía, son el

tratamiento más apropiado de estas micosis emergentes con elevada letalidad intrínseca (Pemán y Salavert, 2011).

Además de los compuestos antimicóticos comúnmente utilizados, el quitosano ha mostrado tener propiedades antifúngicas sobre diversas clases de hongos. Sin embargo, los estudios que abordan este aspecto son limitados. Se ha estudiado la actividad inhibitoria de hidrogeles de quitosano contra *Candida* el cual ha demostrado ser un vehículo efectivo para el tratamiento de pacientes con candidiasis mucocutánea (Palmeira-deOliveira y col., 2010) y además, podría ser empleado en pacientes con estomatitis subprotésica, asociada también a la presencia de esta levadura (Suárez y col., 2009).

Dado que los principales tipos de afecciones por estos hongos son de tipo mucocutáneo, es conveniente que los compuestos utilizados en los diferentes tratamientos posean las propiedades físicas, químicas y farmacológicas necesarias y suficientes para administrarse por esta vía. En este sentido, se han desarrollado materiales como medio de soporte para el quitosano, tales como hidrogeles de poliacrilamida que, cuyas propiedades mecánicas y de absorción puedan ser mejoradas al ser adicionados con compuestos inertes y absorbentes como la zeolita, proporcionando mayores beneficios ante el riesgo de adquirir una infección por estas micosis (Saber-Samandari y col., 2011).

Los estudios sobre las propiedades antifúngicas que poseen los hidrogeles formulados con quitosano son limitadas, por lo que la presente investigación busca evaluar la capacidad antifúngica de estos materiales contra hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, integrando un soporte de material superabsorbente.

OBJETIVO GENERAL

Elaborar y evaluar la actividad antifúngica de hidrogeles de quitosano/poliacrilamida/zeolita y su efecto sobre la germinación de esporas, morfometría y viabilidad de *Aspergillus* y *Fusarium*.

Objetivos Específicos

1. Obtener hidrogeles a partir de diferentes mezclas de soluciones de quitosano, poliacrilamida y zeolita.
2. Evaluar el efecto de los hidrogeles sobre la morfometría y germinación de esporas de especies de *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium verticilloides*.
3. Evaluar el efecto de los hidrogeles sobre la viabilidad de *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium verticilloides* utilizando tinción con azul de tripán.
4. Evaluar el efecto de los hidrogeles, en forma de gel y como polvo, sobre la viabilidad de las especies fúngicas utilizando la técnica de conteo en placa.

REVISIÓN LITERARIA

Hongos Filamentosos

Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos que se reproducen de manera natural por esporas, ya sea sexual o asexualmente; su característica común es la ausencia de clorofila, por lo que no realizan la fotosíntesis y se nutren por medio de materia orgánica ya elaborada, absorbiendo nutrientes simples y solubles. Si un hongo causa infecciones con regularidad o si tiene algún otro aspecto particularmente distintivo, se le asigna una categoría diferente, un ejemplo sería la aspergilosis producida por el género *Aspergillus* (Luque, 2012).

Generalidades y Morfología

Los hongos son inmóviles y su pared celular se compone principalmente de glucanos (30-80%), quitina y quitosano (1-15%), mananos y/o galactomananos, y glicoproteínas (Aranda y col., 2016). Crecen formando colonias filamentosas multicelulares. El elemento principal de la forma vegetativa o en crecimiento es la hifa, una estructura tubular ramificada de 2 a 10 μm de diámetro, que al ser entrelazadas unas con otras forman un micelio (León, 2003).

El micelio vegetativo está constituido por las hifas superficiales o bien que se encuentran en contacto directo con el sustrato, cuya función es la de nutrición. En tanto, las hifas que sobresalen de la superficie se designan como micelio aéreo y son las responsables de generar las células reproductoras o esporas. Los cuerpos resistentes que forman los hongos en estado latente o en reposo se conocen de manera colectiva como cuerpos fructificantes. Las hifas de varias especies de hongos están divididas por paredes transversales llamadas septas o tabiques; las hifas que no presentan septos se denominan aseptadas o cenocíticas (León, 2003).

Fisiológicamente, las condiciones a las que se adaptan los hongos suelen ser severas ya que son capaces de desarrollarse en sustratos con altas concentraciones de azúcares de hasta un 10%, crecen muy lentamente entre 5 a 7 días a una temperatura

óptima de 28°C y resisten altas condiciones de acidez (rango de pH entre 2-9, con pH óptimo entre 5-6). El mayor nutriente que aprovechan como fuente de carbono es la glucosa, entre otros compuestos de origen orgánico como el almidón y la celulosa. De igual forma, aprovechan fuentes de nitrógeno inorgánico y carbono, como el extracto de levadura y la peptona (Arias y Piñeros, 2008).

Estructura Subcelular

Las células micóticas son más grandes que la mayor parte de las bacterias y son eucariotas. Poseen diferentes tipos de organelos citoplasmáticos con excepción de los cloroplastos (Figura 1). Las estructuras de importancia médica de un hongo son la cápsula, la pared celular y la membrana citoplasmática (León, 2003).

Pared celular. La pared micótica está compuesta por cadenas de polisacáridos (quitina, glucano, manano, celulosa) llamadas microfibrillas y el resto son proteínas y glucoproteínas, que se entrecruzan con las cadenas de polisacáridos. Dentro de un grupo determinado también se encuentran numerosos determinantes antigénicos únicos que resultan de patrones de ramificación diferentes de los polisacáridos, útiles para la clasificación (León, 2003).

Membrana celular. La membrana citoplasmática de los hongos consiste en una membrana bicapa semejante en estructura y composición a las membranas de los eucariotas superiores. La membrana micótica contiene esteroides, los principales son ergosterol y cimosterol (León, 2003).

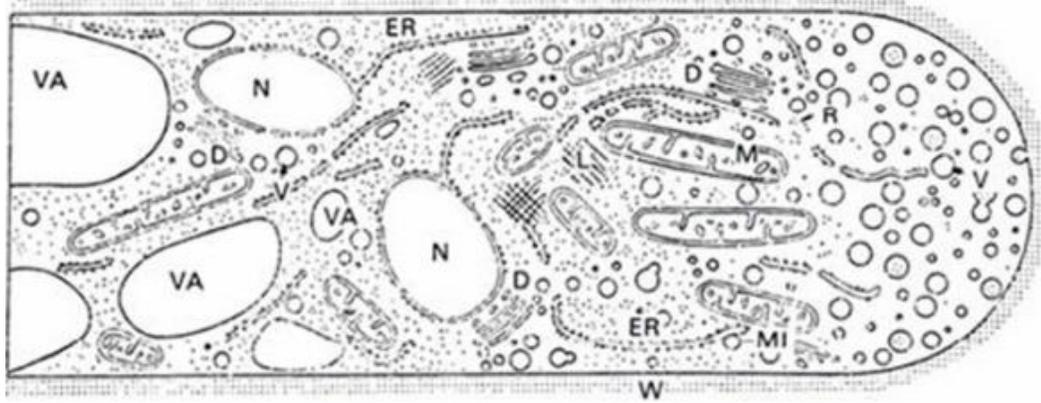


Figura 1. Contenido celular, esquema de una hifa (sección apical). **D**, dictiosoma; **ER**, retículo endoplasmático; **L**, cuerpo lipídico; **M**, mitocondria; **MI**, microcuerpos; **N**, núcleos; **R**, ribosomas; **V**, vesícula citoplasmática; **VA**, vacuola; **W**, pared celular.

Fuente: Biasoli, 2014.

Enfermedades Causadas por Hongos

Los hongos que causan patologías en el hombre se clasifican, de manera general, como patógenos y oportunistas. Por una parte, los patógenos son aquellos que causan una entidad clínica más que una infección, siendo las micosis más comunes la blastomicosis (*Blastomyces dermatitides*) e histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum*). Por otra parte, los hongos oportunistas son aquellos que rara vez causan enfermedades, aunque bajo ciertas circunstancias pueden causar infecciones micóticas generalizadas (*Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Fusarium spp.*) (León, 2003).

La importancia de estudiar los hongos oportunistas, como los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, o también conocidos como hongos filamentosos hialinos, radica esencialmente en la capacidad que presentan para desarrollar infecciones micóticas en poblaciones inmunocomprometidas.

Género *Aspergillus* spp

Se caracteriza por tener micelio vegetativo con hifas septadas, ramificadas, incoloras, estructura conidial desarrollada como pedicelos y cabezuelas de origen de células hifales especializadas (células del pie), de paredes gruesas, las cuales producen conidióforos como ramas aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la células del pie (Arias y Piñeros, 2008).

La clasificación se basa en las características morfológicas del hongo, ya sea por su estructura reproductora, color de sus colonias, tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides, métulas, y en presencia de células de Hülle y de esclerocios (Figura 2) (Alcalá y col., 2008). Son microorganismos aerobios de crecimiento rápido; la colonia inicialmente es plana, blanca que crece haciéndose algodonosa y a medida que envejece y aparece la esporulación; el centro de la colonia se torna de color distinto según la especie (Arias y Piñeros, 2008).

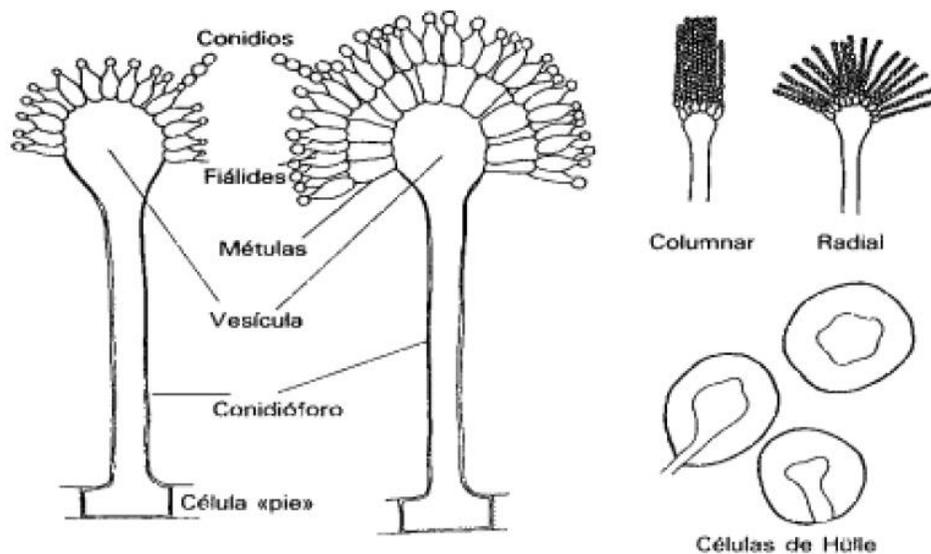


Figura 2. Características morfológicas de las principales especies del género *Aspergillus* spp. Fuente: Alcalá y col., 2008.

Patogénesis

Aspergillus es un ejemplo de lo que se denomina "patógeno oportunista", es decir, que suele afectar a pacientes con mecanismos de defensa comprometidos. Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentra el pequeño tamaño de sus conidias, que permite que sean aspiradas y que pueda causar infección en el pulmón y en los senos paranasales, su capacidad de crecer a 37°C y de adherirse a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales, lo que le hace idóneo para afectar al humano (Alcalá y col., 2008).

Aspergilosis

Es una infección causada por *Aspergillus*, un tipo de hongo que vive intramuros y al aire libre. La mayoría de la gente respira esporas de *Aspergillus* todos los días sin enfermarse. Sin embargo, las personas con sistemas inmunes debilitados o enfermedades pulmonares están en un riesgo mayor de desarrollar problemas de salud debido a la exposición a *Aspergillus* (CDC, 2014).

Aspergilosis cutánea. *Aspergillus* entra en el cuerpo a través de una abertura en la piel (por ejemplo, después de una cirugía o una herida por quemadura) y causa la infección, por lo general en personas que tienen sistemas inmunitarios debilitados (CDC, 2014).

Aspergilosis invasiva. Es una infección grave que afecta a personas que tienen sistemas inmunitarios debilitados, como las personas que han tenido un trasplante de órganos o trasplante de células madre, afectando más comúnmente a los pulmones. La aspergilosis cutánea también puede ocurrir si la aspergilosis invasiva se propaga a la piel de otra parte del cuerpo (CDC, 2014).

Fusarium verticilloides

Es un hongo cosmopolita que crece produciendo un micelio aéreo algodonoso, de color blanco a melocotón o rosa salmón que se tiñe de color azulado o púrpura, que gradualmente se difunde en el medio. El micelio está formado por hifas septadas y los conidióforos presentan racimos de macroconidios (Figura 3) (Monzón y Rodríguez, 2008).

Las microconidias son ovoides o en forma de maza con base truncada y su tamaño es de 7-10 x 2.5-3.2 μm , pudiendo tener uno o dos tabiques. La presencia de abundantes microconidias condiciona el aspecto polvoriento de la colonia. Los conidióforos nacen lateralmente de la hifa y son escasamente ramificados. Las células conidiógenas son monofialides, habitualmente delgadas y largas (Monzón y Rodríguez, 2008).

Las macroconidias no se forman en todas las cepas. Cuando existen son ligeramente fusiformes, casi rectas, con superficies dorsal y ventral casi paralelas, de pared fina y delicada. Muestran dos células: una apical, que es curva, y otra basal, en forma de pie, pueden tener entre tres y siete tabiques y su tamaño es de 31-58 x 2.7-3-6 μm . Este tipo de conidias se producen con estructuras que aparentan racimos denominados esporodoquios. La especie no produce clamidoconidias, aunque con frecuencia las células contenidas en una hifa engrosada son confundidas como tales (Monzón y Rodríguez, 2008).

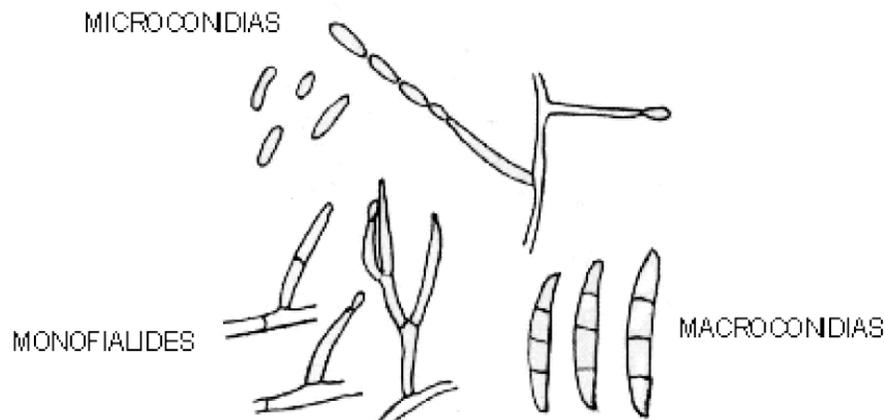


Figura 3. Características morfológicas del género *Fusarium verticilloides*.

Fuente: Monzón y Rodríguez., 2008.

Patogénesis

Las dos vías de adquisición de la infección más probables son la respiratoria y la cutánea. Las conidias se inhalan y, en el paciente predispuesto, causan una infección pulmonar. Por vía cutánea, el paciente puede estar colonizado, tener onicomicosis, celulitis en relación con quemaduras, infección del catéter, etc. (Monzón y Rodríguez, 2008).

La puerta de entrada de las infecciones localizadas son las pequeñas lesiones producidas por traumatismos, mientras que las infecciones sistémicas se pueden producir por la diseminación del microorganismo desde la puerta de entrada. En la mayoría de las ocasiones, esta diseminación está condicionada por el estado inmunológico del huésped (Monzón y Rodríguez, 2008).

Enfermedades por *Fusarium*

En ocasiones el género *Fusarium* causa infecciones en el paciente normal (queratitis, onicomicosis, etc.). Sin embargo, cada vez se describen más infecciones graves en los pacientes inmunodeprimidos, de ahí que su importancia haya crecido exponencialmente. Las infecciones por este género se incluyen dentro de las hialohifomicosis subcutánea, las causadas por hongos oportunistas que presentan hifas hialinas septadas (Monzón y Rodríguez., 2008), entre otros, como queratitis, endoftalmitis, infecciones cutáneas y en ocasiones infecciones diseminadas. Estas infecciones ocurren especialmente en pacientes con alteraciones de la respuesta inmune, diabéticos, quemados, con heridas abiertas y contaminadas con tierra, con trastornos inmunológicos o bien con tratamiento con inmunosupresores (Luque, 2012).

Las infecciones fúngicas pueden afectar a diferentes partes del ojo y una de ellas es la queratitis, una infección de la capa clara, parte anterior del ojo (la córnea). Por otra parte, se encuentra la endoftalmitis, una infección de la parte interior del ojo (el humor vítreo y/o el humor acuoso). Hay dos tipos de endoftalmitis: exógenos y endógenos. La endoftalmitis fúngica exógena se produce cuando las esporas de los hongos entran en el ojo, provenientes de una fuente externa; la endógena se produce cuando una infección del torrente sanguíneo (por ejemplo, candidemia) se extiende a uno o ambos ojos (CDC, 2014).

Onicomycosis. Puede ser subungueal proximal y se caracteriza por manchas blancas en la base de la uña. Se asocia pequeños traumatismos en personas que trabajan con plantas, tierra, etc. En los pacientes inmunodeprimidos puede ser la puerta de entrada de una infección diseminada. (Luque, 2012).

Piel. Se establece por inoculación directa o por diseminación sanguínea. Las lesiones incluyen granulomas, úlceras, necrosis, queratosis con eritema, nódulos subcutáneos indurados con zona de necrosis central y micetomas (Luque, 2012).

Métodos de Control de Hongos

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped. Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción, y su clasificación se realiza según criterios convencionales de acuerdo a su estructura química (Tabla 1) y sitio de acción (Tabla 2) (Gregorí, 2005).

Tabla 1. Clasificación de los antifúngicos según su estructura química.

POLIENOS	Nistatina, natamicina, anfotericina B
AZOLES	Imidazol: miconazol, clotrimazol, ketoconazol. Triazoles: fluconazol, itraconazol, (ketoconazol). Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol.
ALILAMINAS	Terbinafina, naftifina.
LIPOPÉPTIDOS	Papulacandinas. Triterpenos glicosilados. Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina.
PIRIMIDINAS	Flucitosina.
OTROS	Ioduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin.

Fuente: Gregorí, 2005.

Tabla 2. Clasificación de antifúngicos según el sitio de acción.

Membrana citoplasmática	Pared celular	Núcleo
Polienos	Lipopéptidos	Pirimidinas fluoradas
Azoles	Quitosano	Misceláneos
Alilaminas		Quitosano
Tiocarbamatos		
Quitosano		

Fuente: Gregorí, 2005.

La anfotericina B es un antibiótico poliénico y actúa frente a la membrana citoplasmática del hongo, es decir, se une a las membranas celulares provocando la aparición de un poro; para ello, la molécula de anfotericina constituye un canal transmembrana por el que el hongo pierde iones intracelulares y muere (Biasoli, 2014).

En cuanto a las equinocandinas, estas inhiben irreversiblemente la enzima β -1,3-D glucano sintasa, impidiendo la síntesis de glucanos; la pared celular se vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere (Biasoli, 2014).

El quitosano tiene la habilidad para distorsionar la membrana plasmática del hongo, es decir, reducir el desarrollo celular de las hifas y ramificaciones, gracias a su propiedad fungistática. Estos cambios pueden alterar el balance existente entre la biosíntesis y la degradación de componentes de la pared celular (Rodríguez y col., 2009). Con respecto a la penetración del quitosano al interior de la célula fúngica, se ha reportado que es capaz de interactuar con el núcleo del hongo e inhibir la síntesis de ARNm y proteínas (Goy y col., 2009). Este mecanismo generalmente se ha asociado a quitooligómeros o a quitosanos de muy bajo peso molecular, por lo que este biopolímero constituye una alternativa prometedora para el control de hongos.

Quitosano: Generalidades

Fuente

La quitina (Figura 4) es el componente más importante del exoesqueleto de invertebrados y también de formas inferiores como hongos y mohos. Es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa y su fórmula química es similar, excepto por el grupo funcional ubicado en el carbono 2. Mientras la celulosa posee un grupo hidroxilo, la quitina posee un grupo acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) (González y col., 2005).

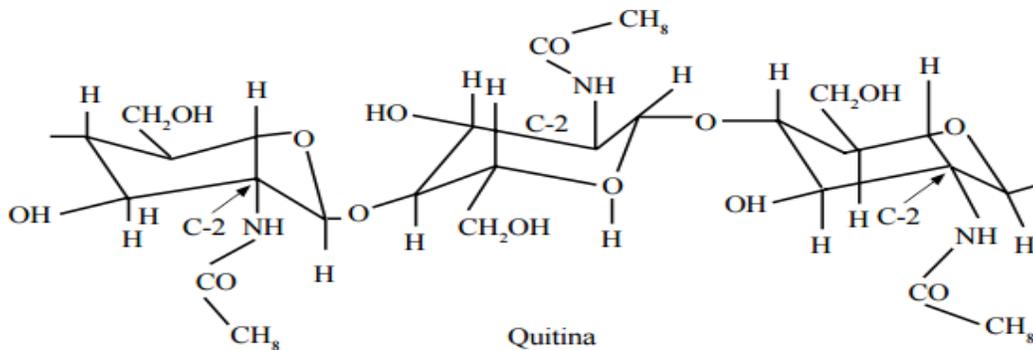


Figura 4. Estructura química de la quitina.

Fuente: Hernández y col, 2005.

Estructura Química

El quitosano (Figura 5) es su principal derivado desacetilado y está formado por unidades de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa) enlazadas por uniones β (1-4). Es un polisacárido lineal de cadena larga poco frecuente en la naturaleza y se obtiene comercialmente por desacetilación termoalcalina a alta temperatura de la quitina. El proceso para su extracción involucra la eliminación parcial de los grupos acetilos de las cadenas poliméricas, en cuyo lugar queda un grupo amino ($-\text{NH}_2$) característico del quitosano (Gimeno, 2011).

Propiedades Físicoquímicas

El quitosano se comporta como un polielectrolito lineal a pH ácido, posee una alta densidad de cargas, tiene la capacidad de quelar iones metálicos (hierro, cobre, plata, metales pesados, etc.) y de adherirse fácilmente a superficies cargadas negativamente. Este compuesto natural es biodegradable y no tóxico, sus cargas positivas le confieren propiedades biológicas y fisiológicas únicas (Hernández y col., 2005).

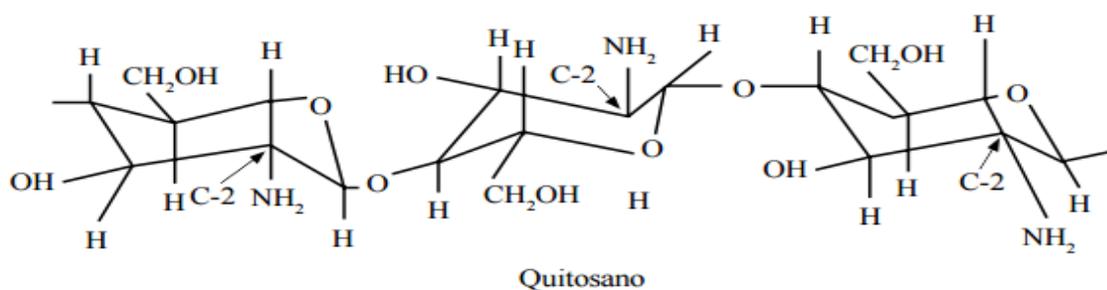


Figura 5. Estructura química del quitosano.

Fuente: Hernández y col., 2005.

Este polisacárido/polímero se ha estudiado en el campo de los biomateriales debido a su biodegradabilidad, bioactividad y biocompatibilidad, por lo que actualmente es ampliamente utilizado en la industria alimentaria, farmacéutica y en biotecnología, por ser un excelente formador de películas y por ser utilizado para elaborar microcápsulas, microesferas e hidrogeles a partir de sus soluciones (Rojas y col., 2011).

Las principales propiedades físicoquímicas del quitosano que determinan sus propiedades funcionales son su grado de desacetilación y su peso molecular promedio, aunque la cristalinidad, el contenido de agua, cenizas y proteínas también son características físicoquímicas a considerar para la aplicación de un quitosano específico (Expósito, 2009).

Peso molecular. El peso molecular puede afectar al quitosano como espesante, regulador de la viscosidad, antifúngico, agente ligante de color, grasa y agua, entre otras aplicaciones. Puede ser determinado por varios métodos, tales como espectrometría por dispersión de luz, cromatografía de permeación en gel y viscosimetría (Morey y Quinde, 2012).

Grado de desacetilación y solubilidad. Los quitosanos típicos tienen comúnmente un grado de desacetilación entre el 75 a 85% y este se ve afectado por factores en su procesamiento, tales como la concentración del álcali, tamaño de partícula, relación soluto/solvente, temperatura y densidad de la quitina empleada (Morey y Quinde, 2012). El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano es lo

que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad.

Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas (acético, fórmico, clorhídrico, entre otros) ya que el pKa del grupo amino del quitosano es de 6.5. La protonación de los grupos amino en medio ácido le confiere al biopolímero un carácter altamente reactivo (Expósito, 2009). Cuando este se solubiliza en ácido diluido funciona como un polímero catiónico de estructura lineal, con una alta densidad de carga positiva (Morey & Quinde, 2012).

La solubilidad del quitosano es dependiente del pH y se atribuye a sus grupos amino ($-NH_2$). Estos llegan a ser protonados hasta disoluciones a pH 6 o por debajo de esta concentración, para formar grupos amino catiónicos, incrementando la repulsión eléctrica intermolecular y resultando en un polisacárido soluble policatiónico, con un gran número de grupos cargados en base al peso. Por otra parte, el quitosano tiende a perder esta carga a un pH más alto, y por lo tanto puede precipitar de la solución debido a la desprotonación de los grupos amino (Morey y Quinde, 2012).

Viscosidad. Las soluciones de quitosano muestran propiedades pseudoplásticas y viscoelásticas. La viscosidad es afectada por el grado de desacetilación, peso molecular y concentración, el tipo y la concentración del solvente, el pH prevaleciente de la solución y la fuerza iónica, así como la temperatura (Morey y Quinde, 2012).

Propiedades Biológicas

El quitosano es un polímero natural no tóxico para el humano, que presenta en su estructura grupos funcionales hidroxilo ($-OH$), amino ($-NH_2$) y N-acetilamino ($-NHCOCH_3$), los que tienen la propiedad de formar puentes de hidrógeno intermoleculares que proporcionan una gran estabilidad al polímero. Entre sus propiedades funcionales se enlistan la biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antifúngica y antibacteriana, antiolesterolémica y antioxidante, propiedades que tornan a este polímero natural superior a los sintéticos actuales (Expósito, 2009).

Con respecto a su actividad antifúngica, este puede actuar sobre ciertas especies de hongos y levaduras con excepción de los *Zigomycetes*, que lo poseen como componente mayoritario de sus paredes celulares. Esta acción está condicionada por las características propias del biopolímero y por las condiciones del medio en el que actúa, dentro de las primeras sobresale el grado de acetilación, la actividad fungicida y el peso molecular (González y col., 2005).

Actividad antifúngica. El quitosano inhibe el desarrollo de numerosas especies de hongos, siendo menos efectivo con aquellas que lo poseen en sus paredes celulares. Los hongos que lo poseen como componente de sus paredes celulares deberían ser menos sensibles a la aplicación de dosis razonables de éste por dos razones: (a) la presencia natural de quitosano en las paredes celulares no genera efectos adversos para el microorganismo y (b) las interacciones electrostáticas del quitosano añadido (exógeno), cargado positivamente, deberían verse menos favorecidas con paredes celulares que poseen quitosano endógeno que cuando éstas poseen material con cargas negativas (Ayala y col., 2014).

El quitosano logra su efecto antifúngico por vías diferentes en las que parece desempeñar un papel importante, en base al grado de polimerización de la cadena de glucosamina, dependiendo del tipo y concentración del quitosano, el nivel de desacetilación e inclusive el tiempo de exposición del polímero en la célula fúngica (Rodríguez y col., 2009).

Además, el quitosano tiene propiedades antifúngicas asociadas a su habilidad para afectar la integridad o distorsionar la membrana citoplasmática del hongo, promoviendo cambios en la permeabilidad de ésta, provocando un desequilibrio osmótico interno y, por lo tanto, ocasionando la inhibición del crecimiento del microorganismo. Así mismo, la intervención del quitosano frente a la pared celular ocurre mediante hidrólisis de peptidoglucanos de la pared del microorganismo, dando lugar a la fuga intracelular de electrolitos tales como iones de potasio y otros componentes proteicos de bajo peso molecular, tales como proteínas, ácidos nucleicos, glucosa, entre otros. (Goy y col., 2009).

En conjunto, se ha reportado que las moléculas de quitosano se pueden adherir a las superficies celulares del microorganismo e interactuar con la membrana celular, dando lugar a estructuras similares a “vacuolas”. Posteriormente, se puede generar el desprendimiento de iones y agua como flujo de salida, provocando una disminución de la presión interna. Por otro lado, en el núcleo, la unión del quitosano con el ADN microbiano conduce a la inhibición de la síntesis de ARNm y de proteínas. En este mecanismo, las moléculas de quitosano, de muy bajo peso molecular, pueden ser capaces de pasar a través de la pared celular y llegar a la membrana plasmática (Goy y col., 2009).

La actividad antifúngica del quitosano se ha comprobado en diferentes especies de hongos, afectando fundamentalmente el crecimiento micelial, la esporulación, la germinación y la morfología de las hifas y esporas (Hernández y col., 2005).

En la actualidad, el quitosano se ha utilizado como un sistema de liberación controlada de sustancias bioactivas, combinando dicho polímero con otros materiales para mejorar sus propiedades hidrofílicas. Lo anterior ha permitido aprovechar su actividad inmunoestimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica, además de su acción como promotor de la cicatrización de heridas (Expósito, 2009).

Materiales Elaborados con Quitosano

Debido a las peculiares propiedades fisicoquímicas del quitosano, que a su vez influyen en sus características funcionales y biológicas como su acción antifúngica, existen diversos materiales utilizados como medio de soporte para la aplicación del quitosano.

Envases

Los envases antimicrobianos constituyen una forma de empaques activos a los que se les añade una sustancia activa que permite mejorar la funcionalidad de estos. Al respecto, se han desarrollado diversas películas biodegradables, comestibles y no comestibles, a partir de soluciones de quitosano, las cuales han sido efectivas para reducir el crecimiento de

un amplio rango de hongos y bacterias, además de inducir mecanismos de defensa en células vegetales (Hernández y col., 2011).

Las películas comestibles elaboradas a base de quitosano tienen como objeto principal proteger productos alimenticios perecederos, prolongando la vida de anaquel y su calidad mediante el retardo de la deshidratación, disminución de la respiración, mejoramiento de la textura, retención de compuestos volátiles y reducción del desarrollo bacteriano (González y col., 2005).

Materiales Superabsorbentes

La industria alimentaria utiliza polímeros superabsorbentes en productos frescos perecederos como carnes y pescados debido problemas de transporte y empaquetado. Los cambios de temperatura en el envase pueden conducir a una condensación del agua sobre los productos, que repercute directamente en la calidad y en la caducidad de los mismos. Estos problemas se han remediado mediante el uso de bandejas de envasado que incluyen polímeros en su composición, las cuales son capaces de absorber hasta 40 veces su propio peso, incluso bajo presión, y retener el líquido permanentemente. Esto permite mantener la calidad de los productos durante un mayor periodo de tiempo (González y col., 2005).

Hidrogeles. Utilizando como medio de soporte al quitosano, la función de los hidrogeles radica en la capacidad de hinchamiento que este material puede presentar en diferentes medios, a través de la polimerización de monómeros vinílicos tales como el ácido acrílico, la acrilamida o la vinilpirrolidona (Bocourt y col., 2009). Las principales características de los hidrogeles son:

- Alta capacidad de absorción, son biodegradable, no tóxicos y su producción se realiza a bajo costo.
- Tienen buenas propiedades mecánicas y permiten la mejor interacción de los elementos integrados en la matriz del material.

No se ha encontrado una definición precisa del término hidrogel, sin embargo, la descripción más usual es que son materiales poliméricos entrecruzados ya sea de origen

natural o sintético, con una gran capacidad de absorción de agua. Pueden retener una fracción significativa de la misma sin disolverse; al entrar en contacto con el agua se hinchan formando materiales blandos y elásticos (Bocourt y col., 2009).

El contenido de agua en la matriz polimérica juega un papel muy importante para las propiedades de permeabilidad, biocompatibilidad y difusión, ya que a menudo son sensibles y varían de acuerdo a las condiciones del medio ambiente. A estos materiales se les conoce como “materiales inteligentes” ya que al absorber agua pueden ser sensibles a la temperatura, pH, o fuerza iónica de las soluciones, mejorando sus propiedades mecánicas (Rojas y col., 2011). Los sólidos poliméricos son especialmente aptos para formar geles gracias a sus cadenas largas y su flexibilidad, lo que hace posible que se deformen para permitir la entrada de moléculas de disolvente dentro de su estructura tridimensional (Sáez y col., 2003).

Las cadenas de los polímeros comerciales suelen ser lineales o ramificadas, aunque una familia importante son las macromoléculas que forman enlaces covalentes entre sí, generando una estructura tridimensional reticulada como los geles entrecruzados (Rojas y col., 2011). Su carácter hidrófilo se debe a la presencia de grupos funcionales solubles en agua o cadenas poliméricas con grupos de ácidos carboxílicos, aminas, hidroxilos, amidas, ácidos sulfónicos, carboxamidas, e imidas (Ferfera y col., 2013).

En lo que respecta al hinchamiento, existe una diferencia fundamental entre los diferentes polímeros. Una estructura entrecruzada es insoluble, mientras que la no entrecruzada puede disolverse. La apariencia externa que tiene un gel depende de su proporción líquido/sólido. En caso de los polímeros entrecruzados, los geles mantienen su aspecto de sólidos elásticos. En el caso de polímeros no entrecruzados, a medida que aumenta la proporción de líquido se va pasando desde un aspecto de sólido elástico al de líquido viscoso (Sáez y col., 2003).

Los hidrogeles de redes interpenetradas (IPN) técnicamente están definidos como la combinación de dos polímeros y pueden ser sintetizados de dos formas: a) de manera secuencial, en la que se tiene uno de los constituyentes ya polimerizado en forma de gel con una red interna tridimensional, el cual se mezcla con un monómero bajo ciertas condiciones de temperatura, en presencia de un agente entrecruzante y un iniciador; b)

por el método simultáneo, en el cual la polimerización ocurre entre un polímero y un monómero, que es polimerizado en presencia de un iniciador y un agente entrecruzante sobre la base de la macromolécula (Rojas y col., 2011).

La investigación de estos materiales ha llevado a la formación de hidrogeles poliméricos con mejores propiedades mecánicas, como son las redes semi-interpenetradas (semi-IPN). En estos materiales se incorpora un polímero durante la síntesis, de manera que este queda ocluido dentro de la red polimérica. Un ejemplo son las redes de acrilamida sintetizadas en presencia de quitosano (Rojas y col., 2011), los cuales tienen aplicaciones prometedoras en diversas áreas.

Mecanismo de penetración del agua en los hidrogeles. La difusión de pequeñas moléculas depende de las propiedades físicas de la red del polímero y las interacciones entre los segmentos del mismo y las moléculas pequeñas. Cuando un polímero entra en contacto con el agua, sufre una transformación de un estado seco a uno más flexible, favoreciendo la movilidad de las cadenas y el hinchamiento del sistema (Figura 6) (Benítez y col., 2015).

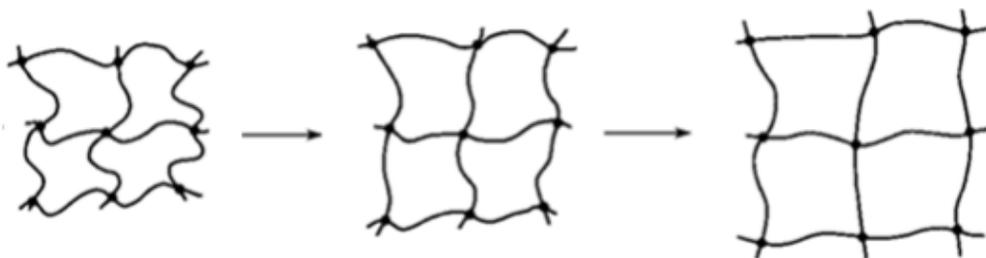


Figura 6. Cambio en la estructura de los hidrogeles en la transición de fase.

Fuente: Romero, 2011.

Si las cadenas del polímero son muy flexibles, la penetración del disolvente es más fácil; sin embargo, si las cadenas no son suficientemente móviles, la penetración del disolvente en el polímero disminuye. Así pues, el proceso de difusión del agua hacia el

interior de los hidrogeles se incrementa, debido al incremento de las interacciones entre los grupos funcionales hidrófilos que conforman el copolímero con el solvente, y al disminuir el grado de reticulación de la red (Benítez y col., 2015). Este equilibrio está directamente relacionado con la presencia de monómeros hidrofílicos y con la densidad de entrecruzamiento de las cadenas (Romero, 2011).

Básicamente son los materiales que pueden absorber grandes cantidades de agua o fluidos más de 15 veces su propio peso en seco, ya sea bajo carga o sin carga, tales como agua, soluciones de electrolitos, orina sintética, salmueras y fluidos biológicos como la sangre. Los polímeros reticulados que exhiben un alto equilibrio de hinchamiento en agua o soluciones acuosas pueden ser basados exclusivamente en macromoléculas con un alto carácter hidrófilo y flexibilidad, que a menudo son una función de la naturaleza de las cadenas polielectrolítico (Saber-Samandari y col., 2011).

El uso de este tipo de materiales para tratamiento antimicótico proporciona ciertas ventajas, tales como la suavidad al aplicarlos en forma de gel o crema, no son antigénicos ni alergénicos, son estériles, son de fácil aplicación, pueden permitir el monitoreo de la evolución de las afecciones a tratar debido a su transparencia, no son pegajosos, forman una barrera protectora entre el organismo y el medio ambiente, evitan la salida de fluidos, entre otras (Aguilar, 2007).

Uso de hidrogeles en enfermedades causadas por hongos. Los gels tienen un buen poder de adherencia a la piel, producen una acción refrescante y se eliminan sin dificultad con agua. Estos hidrogeles se han elegido para su uso en diversas formulaciones en la industria de la biomedicina debido a su biocompatibilidad, a sus características físicas y propiedades mecánicas, que son similares a las de los tejidos biológicos (Tabla 3) (Reyes y col, 2012). Una aplicación es para la liberación controlada de fármacos debido principalmente a su eficiencia, versatilidad, bajo costo y facilidad de producción utilizando equipamientos y técnicas convencionales (Romero, 2011).

En este contexto, se han elaborado apósitos antimicrobianos tópicos con uso potencial para prevenir o tratar infecciones causadas por microorganismos en una amplia variedad de heridas (WIEH, 2012). La elección del material se basa en las siguientes

características: cantidad de exudado, dolor, colonización, región anatómica, tunelizaciones, piel perilesional y lecho de la lesión (Fornes y col., 2008).

Por definición, un apósito es un producto que aísla, cubre y protege de factores externos perjudiciales al medio y que actúa de manera pasiva absorbiendo exudados, o de manera activa modificando el lecho de la herida e interviniendo en el proceso de cicatrización. Los beneficios que proporciona son tanto la reducción de los tiempos de curación, reducción de tiempos de enfermería, disminución del dolor por seguir los principios de la cura en un ambiente húmedo y menor manipulación de la herida y por tanto, también una mejor calidad de vida del paciente (Fornes y col., 2008).

Tabla 3. Aplicación de materiales adsorbentes contra enfermedades fúngicas.

Material	Función
Hidrocoloides	Están constituidos por una capa de material formador de gel adherida a una película semipermeable o a una espuma de apoyo. La capa de gel consta de una matriz adhesiva que contiene una combinación de materiales absorbentes como carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina. El apósito resultante es absorbente y autoadhesivo, incluso en condiciones de humedad (Fletcher y col., 2011).
Alginatos	Es un apósito polimérico derivado de las algas marinas. La base es una fibra de alginato cálcico y al absorber sodio del exudado liberan las sales de calcio, formándose un gel que recubre la herida. Tienen gran capacidad de absorción, hasta 30-40 veces su peso. Se utiliza en heridas de alta y muy alta exudación, infectadas o que precisan desbridamiento autolítico, muy útiles en heridas cavitadas o fistulizadas. Es hemostático, los iones de Ca^{+2} inducen la formación de protrombina (Fornes y col., 2008).
Hidrogeles	Se presentan en forma de gel, malla o placa, compuestos por agentes humectantes que son polímeros hidrófilos. Se componen entre 60-95% de agua, polisacáridos, pectina, almidón, hidrocoloides, cloruro sódico, e incluso alginatos. Son desbridantes autolíticos, alivian el dolor, favorecen el tejido de granulación y la fase de epitelización. Es compatible con lesiones infectadas, tejido necrótico y tejido de granulación. Necesitan para su acoplamiento un apósito secundario y cambio diario de este (Fornes y col., 2008).
Purilon-Gel	Es un hidrogel líquido, estéril, compuesto de carboximetilcelulosa sódica (hidrocoloide), alginato cálcico y agua, envasado en un aplicador anatómico que permite su correcta dosificación en el mismo lecho de la úlcera, utilizando una sola mano. Aporta una elevada capacidad de hidratación, superior a la de otros competidores, estimulando el desbridamiento autolítico en heridas con tejido necrótico seco u otras fases del proceso de reparación tisular (Coloplast, 2015).

El empleo de hidrogeles elaborados con polímeros naturales como el quitosano constituye una estrategia para la reducción de la acrilamida. Lo anterior debido a la abundancia de los grupos amino en la estructura del biopolímero, lo que permitiría impedir la formación de acrilamida ya que el grupo amino competiría en la unión con algún grupo carbonilo presente. Esto impactaría de manera positiva en el diseño de una variedad de productos con propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales, antiácidas y antiulcerosas, siendo considerado un producto inocuo y no alergénico, biocompatible y biodegradable (Gimeno, 2011).

Geles de Poliacrilamida

Mediante la polimerización de la poliacrilamida es posible obtener hidrogeles con una mayor capacidad de adsorción, con estructuras predecibles (aleatorio, alternado o en bloque) en función de la concentración y del tipo de monómero (Rojas de Gáscue y col., 2010). Los geles de poliacrilamida son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica; de esta manera la poliacrilamida se considera un polímero atóxico, no carcinógeno, no alergénico, no mutagénico y resistente a degradación tanto enzimática como microbiológica (Souza y col., 2014).

Polimerización de la Poliacrilamida

La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N, N'-metilén-bis-acrilamida) como agente entrecruzante, en una reacción iniciada por la N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED) y en presencia de un catalizador de ion persulfato en forma de persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómero (Figura 7) (Pérez-Chabela y col., 2015).

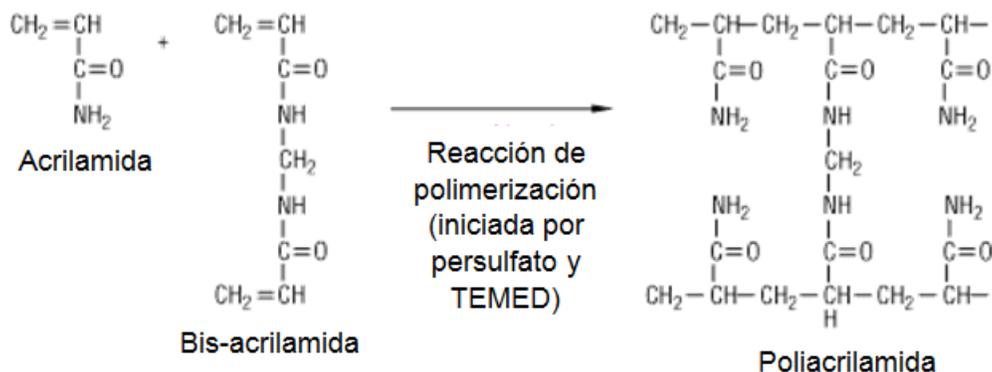


Figura 7. Representación esquemática de la polimerización de poliacrilamida.

Fuente: García, 2000.

La reacción de polimerización es exotérmica y se lleva a cabo con contracción de volumen. Este efecto es más marcado cuanto mayor es la concentración de acrilamida. Las concentraciones óptimas de persulfato amónico y TEMED dependen de la concentración de acrilamida. Una concentración demasiado baja puede traducirse en que parte del monómero no polimerice, mientras que un exceso de catalizador origina un número elevado de cadenas de acrilamida anormalmente cortas (Souza y col., 2014).

La polimerización depende de la temperatura y se recomienda utilizar una temperatura por arriba de los 20°C para prevenir una polimerización incompleta. Se debe realizar en una atmósfera inerte ya que el oxígeno puede actuar como un neutralizador de radicales libres. Las soluciones de acrilamida se desgasifican, pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante el proceso se libera calor, que puede provocar la formación de burbujas en el seno del gel. La polimerización se inicia por la formación de radicales libres en el medio, que se logra mediante la adición al medio de los generalmente llamados catalizadores (Souza y col., 2014).

La velocidad se determina por la concentración de persulfato de amonio y TEMED, mientras que la porosidad del gel se determina por las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida; el poro es menor cuando la concentración de bisacrilamida

es mayor en relación a la concentración de acrilamida. El porcentaje total de acrilamida/bis-acrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente, los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen (Pérez-Chabela y col., 2015).

Formación de Hidrogel de Poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ (Figura 8). La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el TEMED se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato (Figura 8) (Souza y col., 2014).

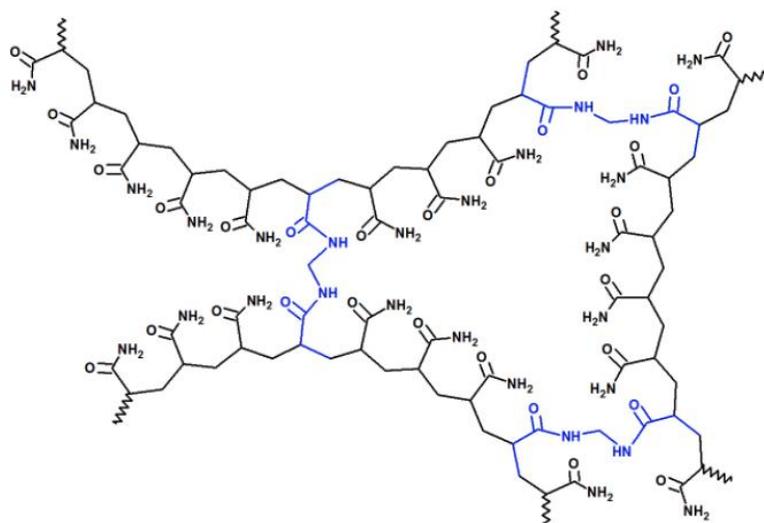


Figura 8. Representación esquemática del hidrogel de poliacrilamida.

Fuente: Souza y col, 2014.

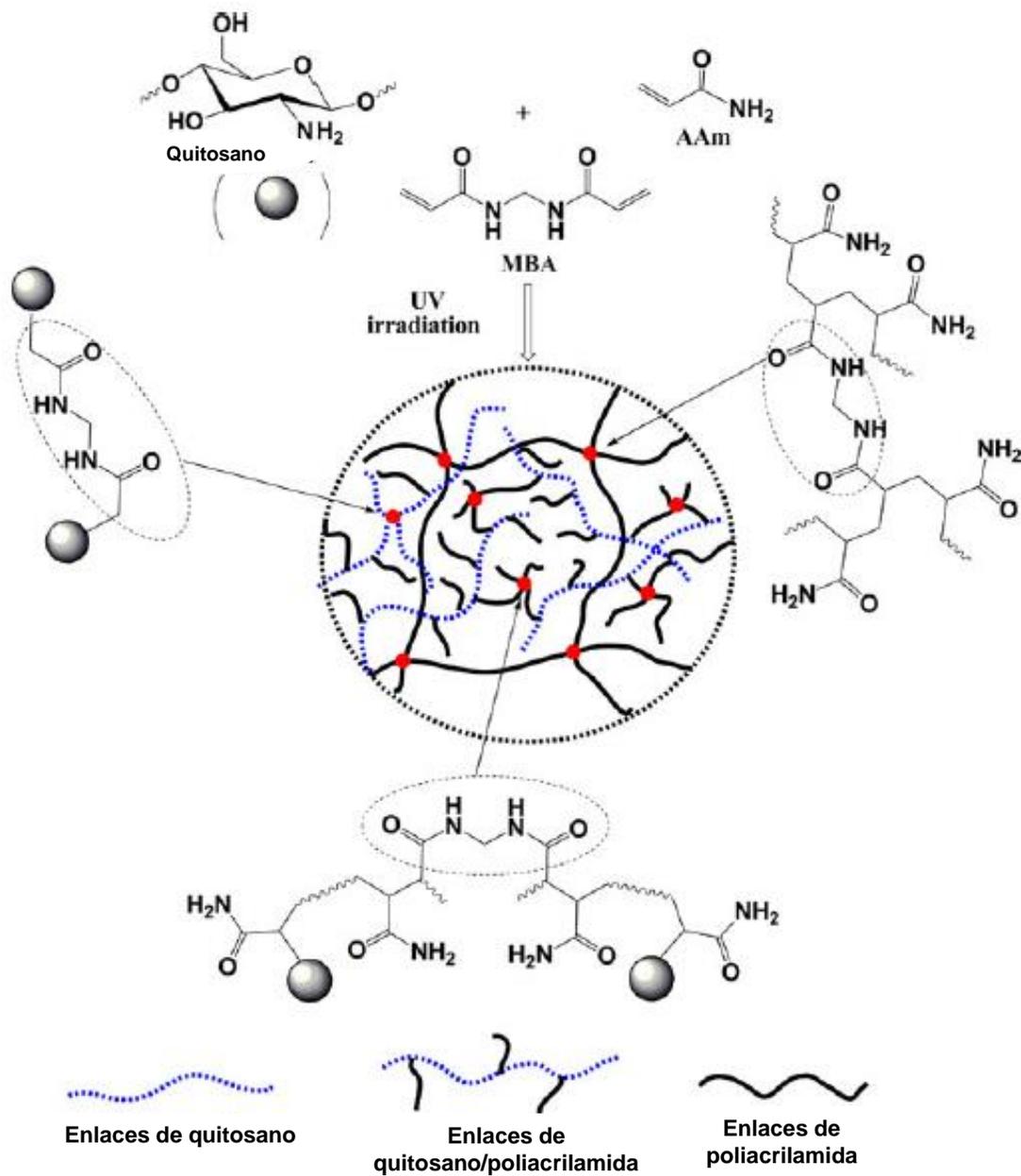


Figura 9. Ilustración esquemática de la síntesis de semi-IPN superabsorbente.

Fuente: Saber-Samandari y col., 2011.

En relación al porcentaje de hinchamiento, este aumenta de manera proporcional a la cantidad de acrilamida añadida, alcanzando un valor máximo de capacidad de hinchamiento. Esto se debe a una mayor disponibilidad de monómeros disponibles en la zona del quitosano y por consiguiente a un mayor número de colisiones moleculares (Saber-Samandari y col., 2011).

Por otra parte, existen moléculas que al adicionarse al complejo quitosano/poliacrilamida incrementan su capacidad de adsorción. Tal es el caso de la zeolita, la cual incrementa el tamaño de poro y la resistencia mecánica de la red polimérica, ampliando la aplicabilidad de este material como relleno de columnas de adsorción de lecho fijo (Gallardo y col., 2014).

Uso de Zeolita en la Elaboración de Materiales Superabsorbentes

La zeolita es un alúmino-silicato que presenta una estructura tridimensional con una elevada área específica que lo torna óptimo como material adsorbente. Algunas de las características generales son: diámetro de poro de 2 a 12 Å, diámetro de cavidades de 6 a 12 Å, varios cientos de m²/g de superficie interna, 0 a 650 meq/100 g de capacidad para intercambio catiónico, <0.35 cm³/g de capacidad de adsorción y estabilidad térmica desde 200° hasta más de 1,000°C (Costrafreda, 2014).

Una característica común de las zeolitas es que al ser calentadas a vacío o en corriente de gas (H₂, He, aire) pierden el agua de hidratación que alojan en sus cavidades, sin que modificar su estructura. En este estado de deshidratación, y dada la gran superficie interna creada (300-800 m²/g), presentan una gran capacidad para la adsorción selectiva de cualquier molécula que pueda penetrar en sus cavidades. (Gómez, 2001).

Es probablemente uno de los materiales de mayor uso como catalizador industrial, ya sea en la refinación de petróleo, petroquímica y síntesis orgánica para la producción de química fina. Esta versatilidad se debe a sus extraordinarias propiedades de selectividad, acidez y capacidad de adsorción. Sin embargo, debido al tamaño de sus canales, las zeolitas presentan problemas de difusión de especies, pudiendo “transformar” solamente aquellas moléculas con tamaños en el rango de 5 a 15 Å. Esto hace que presenten una limitación importante para aplicaciones que implican el uso de moléculas de mayor tamaño (Hidrobo y col., 2010).

Las aplicaciones comerciales de la zeolita se encuentran en función de sus propiedades físicoquímicas, como son su capacidad de intercambio iónico, la adsorción y la deshidratación-hidratación como procesos físicos. Todas estas propiedades se asocian a su estructura, armazón molecular y a su composición catiónica (Gallardo y col., 2014).

En condiciones ambientales, la cavidad central, así como sus canales, se encuentran repletos por moléculas de agua en forma de esferas que rodean a los cationes intercambiables. Si el agua es desplazada a temperatura adecuada (según el tipo de zeolita), estos serán capaces de adsorber moléculas cuyo diámetro sea inferior al de la cavidad central, es decir, que adsorben algunas moléculas, mientras que a otras no las deja pasar (Gallardo y col., 2014).

Con base a lo anterior, en la actualidad se busca que los polímeros naturales reemplacen en las aplicaciones biomédicas a los materiales sintéticos empleados comúnmente debido a las características que estos biomateriales presentan, tales como su biodegradabilidad, biocompatibilidad y funcionalidad. Por lo anterior, la elaboración de un hidrocoloide superabsorbente elaborado con polímeros naturales como el quitosano constituye una alternativa potencial para la obtención de materiales con propiedades antifúngicas, capaces de controlar el crecimiento de especies de hongos de importancia, tales como *Aspergillus* y *Fusarium*.

Además, los hidrogeles superabsorbentes formulados con quitosano pueden ser utilizados en la elaboración de apósitos para diversas aplicaciones, como por ejemplo pañales, materiales antimicrobianos, entre otros, diseñados para su uso en pacientes inmunodeprimidos, lo cual los hace susceptibles a infecciones ocasionadas por bacterias y hongos de importancia clínica. Los polímeros naturales presentan bajas propiedades mecánicas, lo cual hace que su utilización directa sea más complicada para obtener este tipo de materiales; por tal motivo, la polimerización y entrecruzamiento químico del quitosano junto con polímeros superabsorbentes es una opción que permite el mejoramiento de las propiedades mecánicas, aumentado así su rango de aplicabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo experimental, para demostrar las propiedades antifúngicas de un material adsorbente compuesto con quitosano, poliacrilamida y zeolita. Se realizaron las siguientes técnicas:

Reactivación de Cepas

Se utilizaron cepas de los hongos filamentosos *Aspergillus niger* (ATCC 16888), *Fusarium verticilloides* (ATCC 24378) y *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992). Se propagaron en placas con medio agar papa dextrosa (PDA, Bioxon). De cada cepa se realizó un cultivo monospórico, proveniente de una sola célula o espora, con la finalidad de asegurar la pureza del cultivo.

Cultivos Monospóricos

Primeramente, se preparó un inóculo a partir de las placas de los hongos desarrollados en el punto anterior (reactivación). Se tomó la placa con las colonias más aisladas desarrolladas en el medio de cultivo, se adicionó un volumen de solución estéril de Tween 80 al 0.05% (v/v), un surfactante hidrofílico, a fin de favorecer la dispersión de las esporas o propágulos fúngicos.

Las esporas fueron resuspendidas mediante agitación magnética utilizando un imán estéril y el inóculo preparado se utilizó para preparar diluciones seriadas con diferente concentración de esporas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}). Cada dilución fue depositada sobre una placa con medio agar PDA e incubada a 28°C durante 3 días. Una vez desarrolladas las colonias, se inspeccionaron las placas visualmente y con ayuda de una espátula estéril se tomaron una por una las colonias más aisladas desarrolladas en los medios con las últimas diluciones (10^{-4} y 10^{-5}). En estas diluciones se observó una mayor dispersión de las colonias, sin contaminación evidente.

Las colonias se cortaron completamente desde el agar y se depositaron en placas con medio PDA estéril, incubando nuevamente a 28°C, a fin de obtener los cultivos monospóricos puros.

Preparación del Inóculo y Conteo de Esporas

Se prepararon matraces de 125 mL con 30 mL de agar PDA, se esterilizaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta la solidificación del medio. Se inocularon con los cultivos monóspóricos de cada uno los tres hongos anteriormente mencionados y posteriormente se llevaron a incubar de 4 a 5 días a 28°C. Una vez desarrolladas las esporas, fueron resuspendidas agregando medio de cultivo líquido Czapek estéril, mediante agitación magnética por 5 min en una placa de calentamiento.

El inóculo se transfirió a un tubo falcon estéril de 50 mL y se determinó la concentración de esporas/mL de la suspensión mediante conteo en cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico (Olympus CX 311) (Plascencia, 2004). El inóculo se ajustó a una concentración de 2×10^5 esporas/mL.

Preparación de las Soluciones de Quitosano

Se utilizó quitosano comercial de medio peso molecular (Sigma-Aldrich, USA). Antes de su uso, las hojuelas del polímero se pusieron a secar en estufa a 60°C durante 24 horas, se guardaron en frasco de vidrio y se almacenaron en desecador a temperatura ambiente hasta su uso.

A partir de las hojuelas secas se prepararon las soluciones de quitosano. Para ello, en vasos de precipitados de 50 mL se adicionaron diferentes cantidades de quitosano en polvo (por separado) (Tabla 4), 30 mL de agua destilada y 1 mL de ácido acético concentrado. La solución se mantuvo bajo agitación magnética en una placa de calentamiento a 240-280 rpm, durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo se revisó la homogeneidad y viscosidad de cada solución de quitosano.

Elaboración de Hidrogeles

La elaboración de los hidrogeles se realizó variando las cantidades de acrilamida, solución de quitosano y zeolita. Las formulaciones se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4. Formulaciones utilizadas para la elaboración de los hidrogeles de quitosano/poliacrilamida/zeolita.

Componentes	Hidrogel 1	Hidrogel 2	Hidrogel 3	Hidrogel 4
Acrilamida¹	83.3% (5 g)	87.5% (5.25 g)	91.7% (5.5 g)	95.8% (5.75 g)
Bis-acrilamida²	1% (0.05 g)	1% (0.0525 g)	1% (0.055 g)	1% (0.0575 g)
NNN'N-tetrametil-etilendiamina	450 µl en 60 mL			
Zeolita³	2.4% (0.12 g)	2.3% (0.12 g)	2.2% (0.12 g)	2.1% (0.12 g)
Quitosano⁴	16.7% (1.0 g)	12.5% (0.75 g)	8.3% (0.5 g)	4.2% (0.25 g)
Persulfato de amonio⁵	2% (0.12 g)	2% (0.12 g)	2% (0.12 g)	2% (0.12 g)

¹Las soluciones de acrilamida (AAM) se disolvieron en 30 mL de agua destilada.

²La Bis-AAM se añadió en % peso con respecto al % peso de la acrilamida.

³La zeolita se añadió en % peso con respecto al % peso de la acrilamida.

⁴Las soluciones de quitosano se disolvieron en 30 mL de agua destilada + 1 mL de ácido acético concentrado.

⁵El persulfato de amonio (APS) se añadió en % peso con respecto al peso total del hidrogel polimérico equivalente a 6 g.

Para la obtención de los hidrogeles se utilizó como monómero la acrilamida (AAM), como agente entrecruzante la N,N'-metilenbisacrilamida (NNMBA), la NNN'N'-trimetiletildiamina como catalizador y persulfato de amonio (APS) como iniciador. La concentración de TEMED y persulfato de amonio se mantuvieron constantes.

En un vaso de precipitado de 100 mL se añadieron los gramos de acrilamida requeridos según el hidrogel a preparar. Al vaso con acrilamida se añadió la bis-acrilamida como agente entrecruzante, cuya función es la copolimerización de la acrilamida. Enseguida se agregaron 30 mL de agua destilada y la mezcla se colocó en agitación magnética en una placa de calentamiento hasta disolver por completo la acrilamida. Después se añadieron 450 µL de NNN'N'-trimetiletilendiamina, cuya función es actuar como catalizador de la reacción para que la formación del polímero sea más rápido. La mezcla se dejó en agitación hasta la disolución completa, lo cual ocurrió aproximadamente a los 20-30 minutos. En total se obtuvieron cuatro tipos de hidrogeles (Tabla 4) y para cada uno se preparó la solución de quitosano correspondiente a la mezcla a realizar.

Para agregar la zeolita fue necesario primero activarla. Para ello se colocó aproximadamente 1 g de zeolita, previamente tamizada entre 100 y 300 µm y secada en estufa a 100°C durante 10 minutos. Para obtener una solución preparada a partir de una mezcla de acrilamida, bis-acrilamida y NNN'N'-trimetiletilendiamina en 30 mL de agua, se agregaron 0.12 g de zeolita con respecto al % peso/peso de la AAm, y se disolvieron por 15-20 min hasta que la solución fue completamente homogénea. A continuación, se adicionó la solución de quitosano (g de quitosano + 30 mL de agua destilada + 1 mL de ácido acético) correspondiente a la formulación de los cuatro hidrogeles (Tabla 4), hasta obtener una solución uniforme.

Por último, se añadió 0.12 g de persulfato de amonio (APS). A los 5 min de haber adicionado el APS se sacó el agitador magnético y se agitó manualmente hasta la solidificación completa. En total se obtuvieron 60 mL de solución para formar el gel polimérico, equivalente a 6 g en peso del mismo.

Hidrogel de Poliacrilamida (Control) Sin Zeolita

En un vaso de precipitado de 100 mL se añadieron 6 g de acrilamida, 0.06 g de bis-acrilamida, 60 mL de agua destilada y 450 µL de NNN'N'-tetrametiletilendiamina. La mezcla se mantuvo en agitación magnética en una placa de calentamiento durante 10-15 min hasta la disolución completa de los componentes y por último, se añadió 0.12 g de persulfato de amonio.

Hidrogel de Poliacrilamida (Control) Con Zeolita

En un vaso de precipitado de 100 mL se añadieron 6 g de acrilamida, 0.06 g de bis-acrilamida, 60 mL de agua destilada, 450 µl de NNN'N'-tetrametiletilendiamina y 0.12 g de zeolita en polvo. La mezcla se mantuvo en agitación magnética en placa de calentamiento durante 10-15 min hasta disolver por completo los componentes. Al final se agregaron 0.12 g de persulfato de amonio para finalizar la polimerización del polímero.

Una vez obtenidos todos los geles, se procedió a lavarlos por separado utilizando tres lavadas con agua destilada, una cada hora, para eliminar los monómeros excedentes que no participaron en la polimerización.

Evaluación de la Actividad Antifúngica de los Hidrogeles

Para la evaluación de la actividad antifúngica se realizaron análisis de morfometría, germinación de esporas, viabilidad y conteo de esporas viables, utilizando material estéril y condiciones asépticas.

Acondicionamiento de los hidrogeles. Antes de su inoculación, los hidrogeles se cortaron con un cuchillo estéril en cuadros con medidas de 1 cm² y 0.6-0.8 cm de grosor. Cada trozo se colocó sobre un portaobjetos estéril, el cual a su vez se colocó dentro de una cámara húmeda con 5 ml de solución de glicerol al 5% (v/v) para evitar la deshidratación del hidrogel. Los portaobjetos con los hidrogeles se esterilizaron mediante exposición directa a luz UV germicida en campana de flujo laminar durante 10 min, para eliminar la carga microbiana sobre la superficie.

Inoculación del hidrogel con las cepas de hongos. Para la inoculación se depositó un volumen de la suspensión de esporas con concentración conocida (2×10^5 esporas por cada hidrogel) sobre la cara superior del material. El inóculo se dispersó cuidadosamente con un rastrillo microbiológico estéril por la superficie del hidrogel, el cual se introdujo de nuevo en la cámara húmeda. Después de adicionar la solución de glicerol estéril, la cámara húmeda se cerró y se incubó a 28°C durante 24 horas.

Análisis morfométrico. La morfometría (diámetros de esporas e hifas) de las estructuras fúngicas desarrolladas en contacto directo con el hidrogel se determinó mediante la técnica de procesamiento de imágenes, utilizando el programa Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc.). Para ello, los portaobjetos con los hidrogeles (con los hongos adheridos) se retiraron de las cámaras húmedas al azar y se observaron directamente en un microscopio óptico (Olympus CX311, Japón) conectado a una cámara (Infinity 1, Japón). De cada tratamiento se contabilizaron mínimo 60 esporas a las cuales se les midió el diámetro.

Análisis de germinación de esporas. Esta técnica consistió en determinar el porcentaje de esporas que germinaron durante el lapso de incubación. El ensayo se realizó en portaobjetos con los hidrogeles previamente inoculados de acuerdo al procedimiento antes descrito. Al finalizar el periodo de incubación se procedió a su posterior observación. De cada hidrogel se capturaron imágenes del hongo a las 24 h de su incubación, utilizando un microscopio óptico Olympus CX311 equipado con cámara Infinity 1 (Media Cybernetics, USA). Una espora se considera germinada cuando la longitud de su tubo germinal fue igual o mayor que el diámetro total de la espora (Plascencia-Jatomea y col., 2003).

Análisis de viabilidad por tinción con azul de tripán. Se utilizó un microscopio invertido (Leica DMI8, USA). Se tomaron imágenes de las cepas desarrolladas, previamente teñidas con el colorante azul de tripán, el cual sirve para notar la pared de la célula y evaluar la viabilidad por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. Se contabilizaron 100 esporas y se determinó el porcentaje de viabilidad celular.

Conteo de células viables en placa. Los ensayos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, utilizando hidrogel en húmedo y pulverizado.

Ensayo 1: hidrogel húmedo. Se cortaron los hidrogeles en trozos de 1 cm² de área, se esterilizaron con luz UV germicida y se colocaron en una microplaca estéril de 12 pozos. Cada trozo de gel se inoculó con 2x10⁵ esporas de cada especie de hongo, incubando a 28°C durante 24 horas. La placa se mantuvo en una cámara húmeda con glicerol al 5% (v/v) para evitar la deshidratación del gel durante la incubación. Una vez transcurridas las 24 horas, con pinzas estériles se tomó el hidrogel con el hongo desarrollado, se introdujo en un tubo falcón previamente adicionado con 20 mL de agua peptonada estéril y se homogenizó 25 veces durante 1 min. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (10⁻¹ y 10⁻²) en tubos con tapón rosca de 13x100 adicionados con 9 ml de agua peptonada estéril.

De cada dilución se añadió 1 ml a una placa de agar PDA y se esparció por toda la superficie de la placa con ayuda de un rastrillo estéril. Las placas inoculadas se incubaron a 28°C durante 48 horas y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias o células viables, de cada hidrogel. El ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo 2: hidrogel seco y pulverizado. En este ensayo se seleccionó y utilizó el hidrogel que presentó la mayor actividad contra las especies de hongos utilizadas en el ensayo anterior.

Primeramente se realizó un secado y tamizado del hidrogel. Para ello, el hidrogel húmedo se trituró en pedazos pequeños lo más uniforme posible, se congelaron durante 24 horas y se liofilizaron durante 48 horas. El hidrogel seco se molió y tamizó para obtener diferentes fracciones con tamaños de 25 (0.710 mm), 40 (0.425 mm), 70 (0.212 mm), 100 (0.150 mm) y 300 (0.053 mm). El hidrogel tamizado se encuentra entre 100 y 300, es decir, atraviesa el tamiz a 100 pero no el de 300, eso significa que el tamaño del poro está entre 0.15 mm y 0.05 mm.

Una vez secos y pulverizados (Figura 10), se pesaron 0.06 g del polvo de hidrogel (con tamaño de partícula entre 0.15-0.05 mm) y se colocaron en microplacas de 12 pozos. Enseguida el hidrogel se inoculó con 30 μ l de la suspensión de esporas de cada hongo (con concentración de 2×10^5 esporas) y se añadió agua destilada estéril hasta completar un volumen de 500 μ l (para obtener una consistencia similar a la del gel húmedo). Adicionalmente se meterá un tratamiento el cual será inoculado solamente con orina infectada (reportada con microorganismos moderados) de un paciente con incontinencia urinaria. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, con pinzas estériles se tomaron los hidrogeles con los hongos desarrollados, se introdujeron por separado en tubos falcón previamente adicionados con 20 mL de agua peptonada estéril y se homogenizaron 25 veces durante 1 min. Enseguida se procedió a realizar la técnica de conteo de viables en placa, siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior.

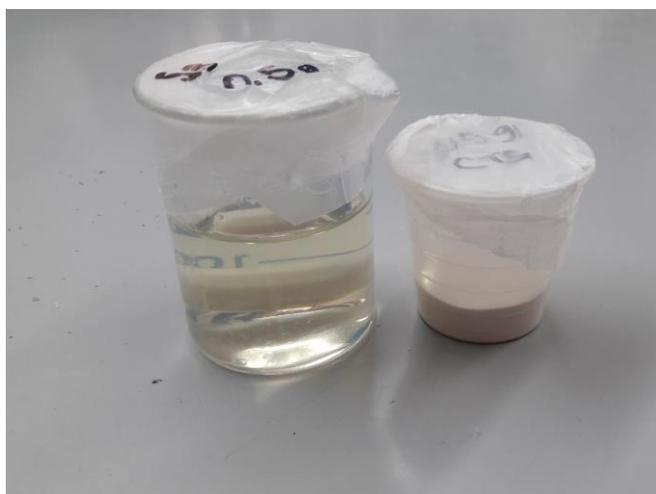


Figura 10. Hidrogel 3 pulverizado y solución de quitosano utilizada (conteniendo 0.50 g del biopolímero).

Diseño Experimental y Análisis de Datos

Se realizó un diseño bifactorial a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Los factores fueron el tratamiento (tipo de hidrogel) y la especie de hongo (*Aspergillus niger*, *A. parasiticus* y *Fusarium verticillioides*). La variable respuesta fue la viabilidad de las esporas de los hongos. Asimismo se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de rangos múltiples de Tukey para la comparación de medias, a un intervalo de confianza del 95% (López y González, 2014). Se utilizó el programa SPSS versión 19.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elaboración de los Hidrogeles

Los hidrogeles elaborados presentaron un aspecto firme, suave e insoluble en agua. En cuanto a su estado físico, el hidrogel conformado solamente por acrilamida presentó un aspecto transparente e incoloro (Figura 11F), en comparación con el hidrogel que contenía acrilamida con zeolita, cuyo aspecto fue semitransparente y un poco opaco (Figura 11E). La mezcla quitosano-poliacrilamida-zeolita presentó un aspecto opaco y amarillento comparado con el control de poliácridamida (Figuras 11A, 11B, 11C y 11D).

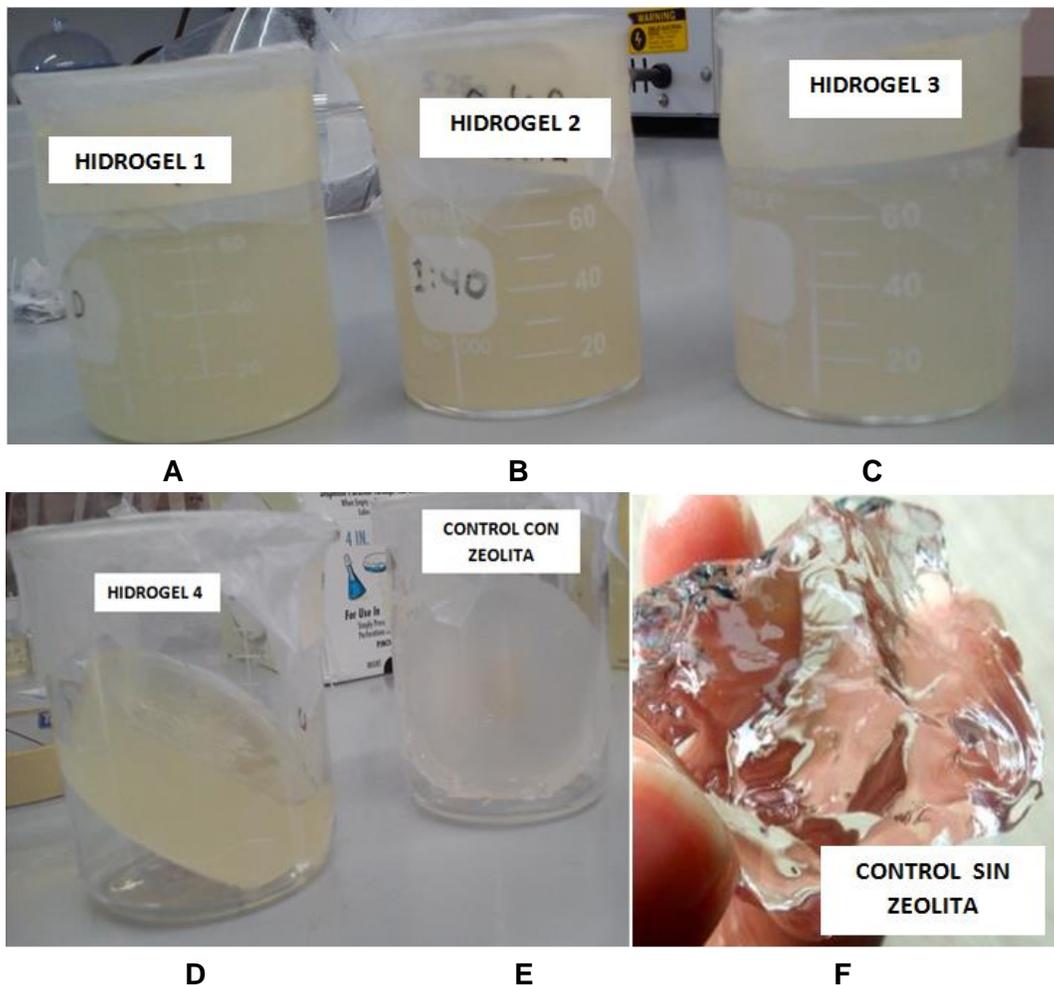


Figura 11. Aspecto físico de los controles respecto a hidrogeles con quitosano; **A)** Hidrogel 1 con 1.0 g; **B)** Hidrogel 2 con 0.75 g; **C)** Hidrogel 3 con 0.5 g; **D)** Hidrogel 4 con 0.25 g; **E)** Control con zeolita; **F)** Control sin zeolita.

Morfometría

En el análisis morfométrico se observó que el diámetro promedio de las esporas de los tres hongos estudiados se afectó cuando estos fueron expuestos a los hidrogeles, lo que se puede atribuir a los componentes que conforman el hidrogel (Tabla 5). La presencia de quitosano en los hidrogeles afectó de manera significativa ($p \leq 0.05$) el diámetro con respecto a los controles, lo cual puede relacionarse al estrés osmótico.

Tabla 5. Morfometría de las esporas de *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium verticilloides* inoculadas en hidrogeles de poliacrilamida-zeolita-quitosano, e incubadas a 28°C por 24 horas.

Hidrogel	<i>A. parasiticus</i> ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	<i>A. niger</i> ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	<i>F. verticilloides</i> ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)
Control sin zeolita	4.38 \pm 0.69 ^a	3.67 \pm 0.60 ^{de}	3.06 \pm 0.71 ^{bc}
Control zeolita	4.81 \pm 0.59 ^{bc}	3.82 \pm 0.58 ^e	3.34 \pm 0.67 ^c
Hidrogel 1 (1.0 g)	4.47 \pm 0.88 ^a	3.37 \pm 0.63 ^{bc}	2.83 \pm 0.70 ^{ab}
Hidrogel 2 (0.75 g)	4.94 \pm 0.77 ^c	2.91 \pm 0.48 ^a	2.63 \pm 0.63 ^a
Hidrogel 3 (0.50 g)	4.64 \pm 0.60 ^{ab}	3.28 \pm 0.42 ^b	2.55 \pm 0.73 ^a
Hidrogel 4 (0.25 g)	4.48 \pm 0.59 ^a	3.56 \pm 0.51 ^{cd}	3.68 \pm 0.88 ^d

Valores promedio de al menos sesenta mediciones \pm desviación estándar.

*Diferentes letras minúsculas en el superíndice indican diferencias significativas entre los tratamientos (tipo de hidrogel), para cada especie de hongo. Comparación de medias con Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuando *Fusarium verticilloides* fue inoculado en los hidrogeles 2 y 3 el diámetro de las esporas se redujo ($p \leq 0.05$), mientras que en el hidrogel 4 se incrementó ($p \leq 0.04$) de manera significativa comparado con los hidrogeles control, con y sin zeolita (Tabla 5). Asimismo, al analizar la morfometría de *Aspergillus parasiticus* se encontró un mayor diámetro ($p \leq 0.05$) en las esporas inoculadas en el hidrogel 2 con respecto a los controles. Este hidrogel 2 también afectó la morfometría de *A. niger*, encontrando esporas con menor ($p \leq 0.05$) diámetro promedio comparado con los hidrogeles control, en donde se observaron los mayores diámetros promedio.

A nivel intracelular, el modo de acción del quitosano se asocia a interacciones sobre la superficie de la célula, ocasionando desorganización celulares que comprenden el ensanchamiento de la pared celular, la pérdida de la misma y hasta la desintegración del citoplasma (Ayala y col., 2014). Los resultados muestran que cada especie de hongo filamentoso en estudio presentó diferente grado de sensibilidad a los hidrogeles formulados con quitosano, lo cual puede relacionarse con la capacidad de adaptación del microorganismo.

La actividad antifúngica del quitosano se ha comprobado en diferentes especies de hongos, afectando fundamentalmente el crecimiento micelial, la esporulación, la germinación y la morfología de las hifas y esporas (Hernández y col., 2005).

Germinación de Esporas

En ninguno de los tratamientos se observó la formación de hifas, lo cual indica que el contacto con los hidrogeles afectó fuertemente la primera etapa de desarrollo de los hongos (Figuras 12 y 13). Los cambios en la morfometría sugieren un estrés osmótico asociado a la pérdida de la integridad de la membrana celular, lo cual a su vez puede llevar a la pérdida de componentes vitales para el crecimiento.

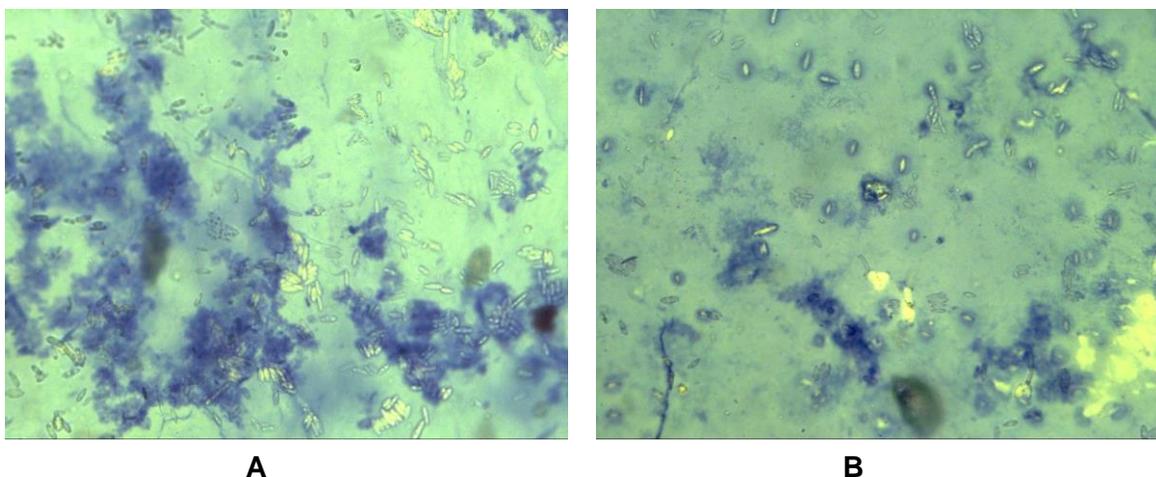


Figura 12. Esporas de *Fusarium verticilloides* inoculadas en los hidrogeles 1 y 4, observadas a las 24 horas de incubación a 28°C, con el objetivo de 40x: **A)** Hidrogel 1 con 1g de quitosano; **B)** Hidrogel 4 con 0.25g de quitosano.

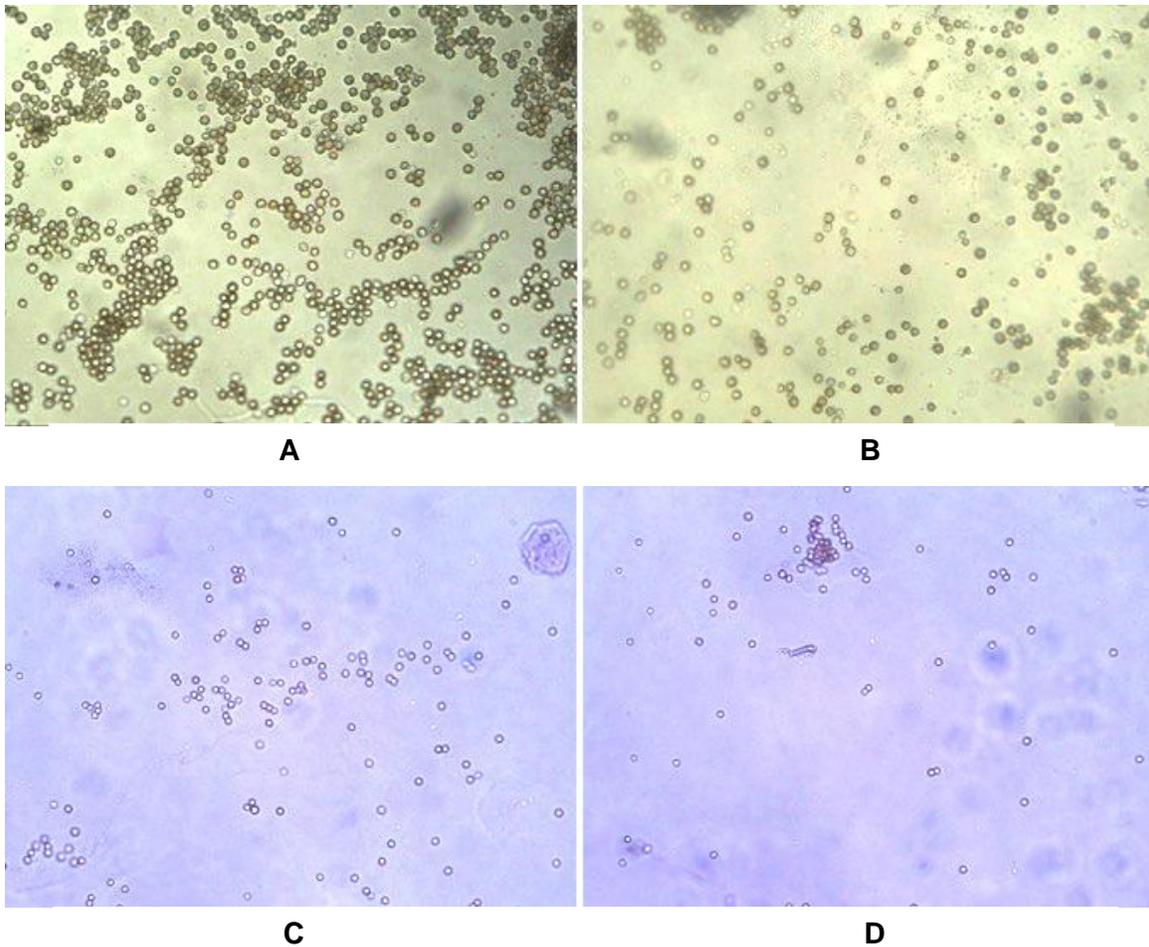


Figura 13. Esporas de *Aspergillus parasiticus* y *A. niger* inoculadas en los hidrogeles control, observadas a las 24 horas de incubación a 28°C, con el objetivo de 40x: **A)** *A. parasiticus* en el control sin zeolita; **B)** *A. parasiticus* en el control con zeolita; **C)** *A. niger* en el control sin zeolita; **D)** *A. niger* en el control con zeolita.

El mecanismo antifúngico de quitosano puede estar relacionado con afectaciones en el proceso de diferenciación celular o la morfogénesis de la pared celular, ya que la interacción con las moléculas de quitosano interfiere directamente con el crecimiento del hongo, en particular sobre la actividad enzimática responsable del crecimiento del hongo (Goy y col., 2009). Esto puede explicar el fuerte efecto inhibitorio encontrado en la etapa de germinación de las esporas, al no encontrar formación de túbulos germinales o hifas en ninguno de los hidrogeles elaborados.

Recientes estudios muestran la tendencia del quitosano a caracterizarlo como fungistático más que fungicida, aunque el mecanismo no se conoce del todo (Ayala y col., 2014). Otros factores que pueden contribuir a esta acción antifúngica son:

- a) La concentración utilizada, es decir, que una alta o baja inhibición en el desarrollo del hongo está ligada simultáneamente a la dosis aplicada.
- b) La naturaleza policatiónica del quitosano es la clave para su actividad antifúngica, ya que la mayoría de las paredes celulares de los hongos están cargadas negativamente.
- c) La longitud de la cadena de este biopolímero, aumenta la superficie catiónica en contacto con el hongo.

El efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas puede atribuirse a los componentes presentes en el material, que al hacer contacto con la pared celular del hongo, este propicia a una interacción de cargas. Tanto la poliacrilamida como el quitosano tienen grupos aminos los cuales se pueden encontrar disponibles para interactuar con los compuestos cargados negativamente en la membrana celular.

Considerando que el quitosano no tiene interacciones muy específicas, la poliacrilamida juega un papel similar a este por su interacción electrostática. El compuesto cargado positivamente (polielectrolito catiónico) y las membranas celulares cargadas negativamente alteran de manera significativa las propiedades de la membrana exterior del microorganismo, impidiendo su crecimiento (Laréz, 2008).

Análisis de Viabilidad Utilizando Azul de Tripán

La viabilidad celular se evaluó mediante tinción con el colorante azul de tripán, el cual se utiliza en tinciones para ensayos de viabilidad ya que permiten diferenciar las células vivas (no teñidas) de células muertas (teñidas de azul).

En la Tabla 6 se muestran los porcentajes de esporas viables encontrados para cada especie de hongo inoculado en los diferentes hidrogeles formulados a distintas concentraciones de quitosano. En general, las esporas de *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticilloides* presentaron una mayor sensibilidad al estar en contacto con todos

los hidrogeles elaborados, observando una menor ($p \leq 0.05$) viabilidad (0 y 36.4%, respectivamente) en los hidrogeles 2 y 3, respectivamente. Esto se puede relacionar con la disminución del diámetro promedio de las esporas, ocasionado por el estrés (Tabla 5).

Por el contrario, el tipo de hidrogel no afectó significativamente ($p > 0.05$) la viabilidad de las esporas de *Aspergillus niger* con respecto a los controles, con y sin zeolita; sin embargo, en el hidrogel 2 se encontró una menor ($p > 0.05$) cantidad de esporas viables (45.4%). De las tres especies analizadas, *A. niger* presentó una mayor resistencia a los materiales, al contabilizar un mayor porcentaje de esporas viables en los diferentes hidrogeles. Sin embargo, las esporas de *A. parasiticus* presentaron un mayor incremento en el diámetro promedio (Tabla 5, Figura 13), lo cual indica que ambas especies de *Aspergillus* exhiben diferente tipo de estrés al estar en contacto con los hidrogeles.

Tabla 6. Porcentaje (%) de viabilidad de *Aspergillus parasiticus*, *A. niger* y *Fusarium verticilloides*, inoculadas en hidrogeles e incubadas a 28°C por 24 horas.

Hidrogeles	<i>A. parasiticus</i>	<i>F. verticilloides</i>	<i>A. niger</i>
Control sin zeolita	57.9 ± 13.15 ^{BCa}	45.2 ± 0.29 ^{ABa}	73.0 ± 0.44 ^{Aa}
Control zeolita	59.6 ± 8.18 ^{BCa}	64.4 ± 0.79 ^{Ca}	55.2 ± 12.94 ^{Aa}
Hidrogel 1	49.7 ± 8.41 ^{BCa}	41.9 ± 5.98 ^{ABa}	64.0 ± 5.98 ^{Aa}
Hidrogel 2	0.0 ^{Aa}	57.9 ± 3.65 ^{BCc}	45.4 ± 0.47 ^{Ab}
Hidrogel 3	69.6 ± 1.80 ^{Cb}	36.4 ± 4.22 ^{Aa}	63.5 ± 2.44 ^{Ab}
Hidrogel 4	26.7 ± 6.67 ^{Aba}	43.4 ± 1.57 ^{ABa}	58.9 ± 12.50 ^{Aa}

Valores promedio de esporas viables ± error estándar.

*Diferentes letras mayúsculas en el superíndice indican diferencias significativas entre los tratamientos (tipo de hidrogel), para cada especie de hongo.

*Diferentes letras minúsculas en el superíndice indican diferencias significativas entre las tres especies de hongos estudiadas, para cada tipo de hidrogel. Comparación de medias por Tukey ($p \leq 0.05$).

Al comparar la viabilidad entre las tres especies analizadas en cada uno de los tratamientos se observó que el tipo de hidrogel afectó de manera significativa ($P \leq 0.05$) la viabilidad de las esporas de *A. parasiticus* y *F. verticilloides*, encontrando una menor viabilidad en los hidrogeles 2 y 3 para *A. parasiticus* (0%) y *F. verticilloides* ($36.4 \pm 4.22\%$), respectivamente (Tabla 6). Estos resultados indican que la inclusión de quitosano en la formulación da como resultado la obtención de un material con actividad contra hongos filamentosos de importancia en alimentos.

Las especies de hongos se afectó de manera significativa ($P \leq 0.05$) al estar en contacto con cada uno de los materiales, por lo que no se observó una relación lineal entre la concentración de quitosano en el hidrogel y su efecto sobre la viabilidad de las esporas de las tres especies, lo cual podría estar relacionado con las interacciones intra e intermoleculares en el seno de la estructura de los materiales. Es posible que las conformaciones que adopten los polímeros en la mezcla varíen en función de la proporción acrilamida-quitosano, dando como resultado la indisponibilidad de grupos reactivos para interactuar con la pared celular de los microorganismos.

Conteo de Celúlas Viables en Placa por la NOM-110-SSA1-1994

Ensayo 1: Hidrogel Húmedo

Los hidrogeles formulados con diferentes concentraciones de quitosano presentaron un mayor efecto sobre la viabilidad de *Fusarium verticilloides*, encontrando una inhibición del 100% al no observar colonias desarrolladas (reportadas como UFC/mL), comparando con los controles con y sin zeolita, en dónde se observó la mayor cantidad de UFC/mL para las tres especies analizadas (Tabla 7, Figuras 14 y 15).

Tabla 7. Promedio de UFC/mL utilizando hidrogeles de quitosano, a diferente concentración.

Dilución	<i>A. parasiticus</i>		<i>A. niger</i>		<i>F. verticilloides</i>	
	-1	-2	-1	-2	-1	-2
Control sin zeolita	10.0 ± 2.6	0.7 ± 0.6	52.7 ± 10.7	6.0 ± 1.7	300 ± 60.8	225 ± 24.5
Control zeolita	30.3 ± 5.5	0.7 ± 1.2	73.7 ± 17.2	10.0 ± 3.5	373 ± 98.7	119 ± 24.4
Hidrogel 1 (1.00g)	5.3 ± 1.5	0.7 ± 1.2	15.3 ± 2.5	1.0 ± 1	1.0 ± 1.0	0.0
Hidrogel 2 (0.75g)	12.3 ± 4.9	2.0 ± 1.7	4.7 ± 2.1	0.3 ± 0.6	0.0	0.0
Hidrogel 3 (0.50g)	0.0	0.0	4.3 ± 3.2	0.3 ± 0.6	0.0	0.0
Hidrogel 4 (0.25g)	58 ± 4.4	7.7 ± 1.5	26.3 ± 2.1	4.7 ± 2.1	0.0	0.0

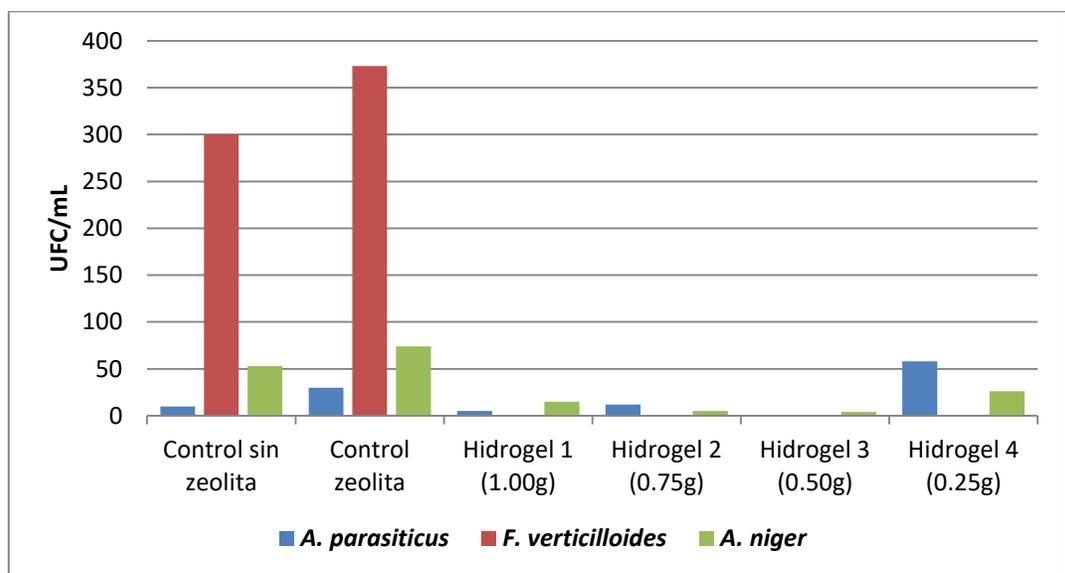


Figura 14. Efecto de los hidrogeles sobre la viabilidad de *A. parasiticus*, *A. niger* y *F. verticilloides*, determinada mediante conteo de células viables en placa y reportada como unidades formadoras de colonias (UFC), a 28°C, a las 24 horas de incubación.

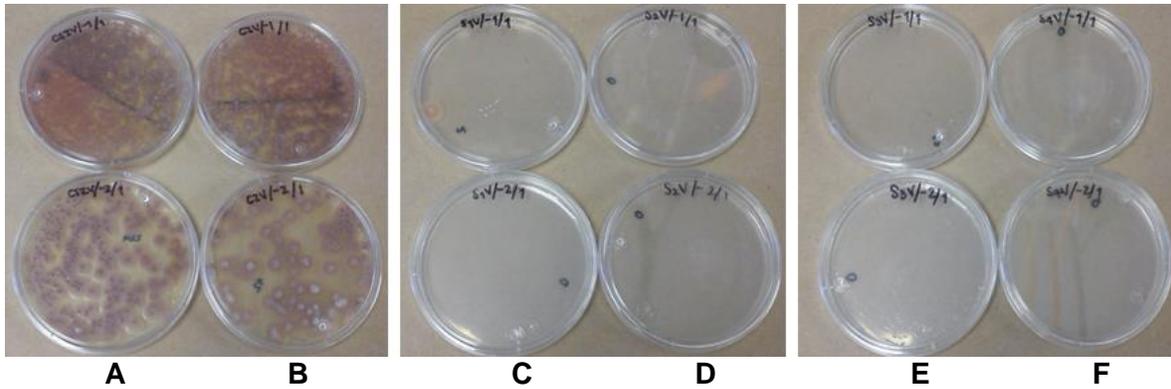


Figura 15. Unidades formadoras de colonias (UFC) en placa de *Fusarium verticilloides* (diluciones -1 y -2, de arriba hacia abajo) desarrolladas después de la exposición a los hidrogeles formulados con diferente concentración de quitosano: **A)** Control sin zeolita; **B)** Control zeolita; **C)** Hidrogel 1 (1.0 g); **D)** Hidrogel 2 (0.75 g); **E)** Hidrogel 3 (0.50 g); **F)** Hidrogel 4 (0.25 g).

En el caso de *A. parasiticus*, el hidrogel 3 (0.50 g de quitosano) mostró una mayor actividad antifúngica comparado con los demás hidrogeles, encontrando un 100% de inhibición en el desarrollo de UFC/mL, a las 24 horas (Tabla 7, Figuras 14 y 16). Este hidrogel fue el que presentó el mayor efecto inhibitorio sobre las tres especies de hongos, determinado mediante cuenta de células viables en placa.

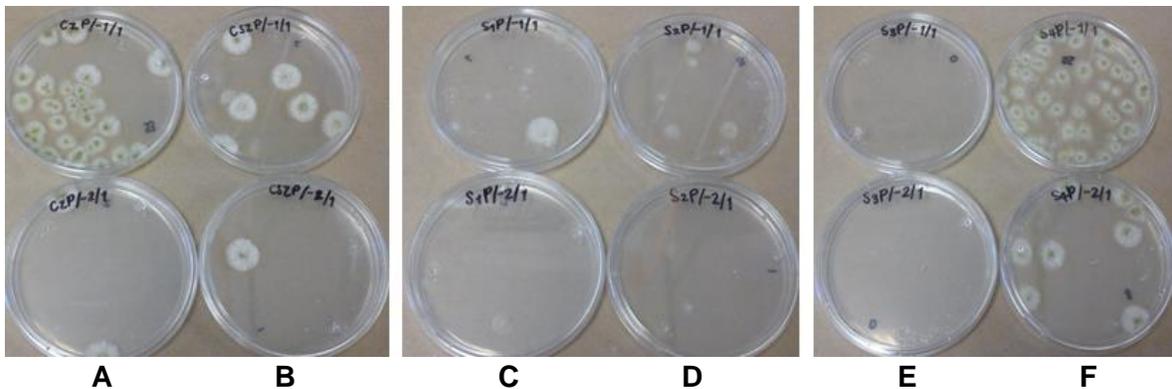


Figura 16. Unidades formadoras de colonias (UFC) en placa de *Aspergillus parasiticus* (diluciones -1 y -2, de arriba hacia abajo) desarrolladas después de la exposición a los hidrogeles formulados con diferente concentración de quitosano: **A)** Control sin zeolita; **B)** Control zeolita; **C)** Hidrogel 1 (1.0 g); **D)** Hidrogel 2 (0.75 g); **E)** Hidrogel 3 (0.50 g); **F)** Hidrogel 4 (0.25 g).

Con respecto a *A. niger*, los hidrogeles 2 y 3 (formulados con 0.75 y 0.50 g de quitosano, respectivamente) fueron los que mostraron el mayor efecto antifúngico, encontrando un menor número de UFC/mL (Tabla 7, Figuras 14 y 17).

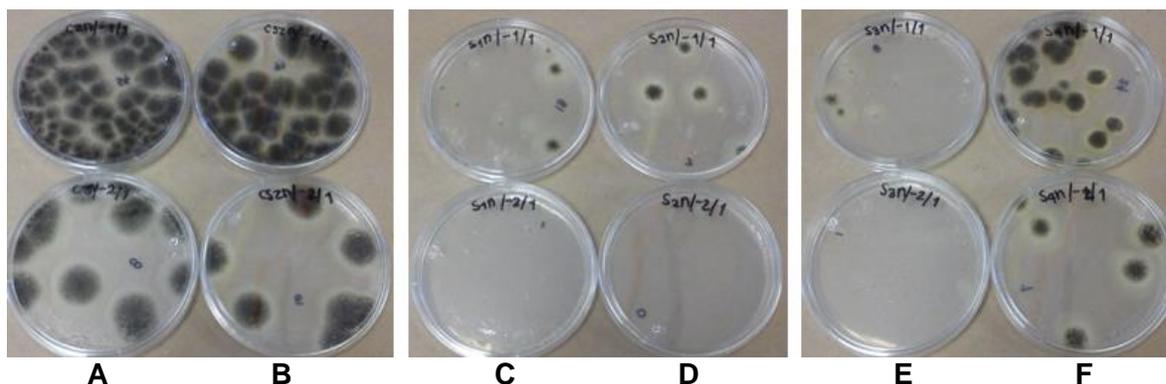


Figura 17. Unidades formadoras de colonias (UFC) en placa de *Aspergillus niger* (diluciones -1 y -2, de arriba hacia abajo) desarrolladas después de la exposición a los hidrogeles formulados con diferente concentración de quitosano: **A)** Control sin zeolita; **B)** Control zeolita; **C)** Hidrogel 1 (1.0 g); **D)** Hidrogel 2 (0.75 g); **E)** Hidrogel 3 (0.50 g); **F)** Hidrogel 4 (0.25 g).

Se ha reportado que el quitosano interactúa a nivel de la membrana plasmática de los microorganismos interfiriendo en sus funciones, es decir, al ocurrir la formación del complejo polielectrolito se bloquea físicamente la membrana celular externa del microorganismo, impidiendo el flujo normal de nutrimentos y/o desechos, provocando la muerte (Laréz, 2008; Ayala y col., 2014). Esto podría explicar la reducción en el número de UFC encontradas después de la exposición de las esporas fúngicas a los diferentes hidrogeles.

Ensayo 2: Hidrogel Seco y Pulverizado

Derivado de los resultados obtenidos al evaluar el efecto de los hidrogeles sobre el número de UFC mediante conteo de viables en placa, para este ensayo se seleccionó el hidrogel 3 por tener mayor efecto inhibitorio a una menor concentración de quitosano.

Tras la exposición de las esporas al hidrogel seco y pulverizado, el mayor efecto antimicrobiano se encontró para *F. verticilloides*, inhibiendo completamente el desarrollo

de UFC en comparación con las especies del género *Aspergillus* (Tabla 8, Figura 18). Resultados similares fueron reportados por Rodríguez y col. (2009), quienes utilizaron una solución al 3% (p/v) de quitosano en cultivos de *Fusarium oxysporum* y lograron la inhibición completa del desarrollo del hongo.

Tabla 8. Promedio de UFC/mL en placa utilizando el hidrogel 3, formulado con 0.05 g de quitosano.

Dilución	<i>A. parasiticus</i>		<i>A. niger</i>		<i>F. verticilloides</i>	
	-1	-2	-1	-2	-1	-2
Hidrogel 3	140	66	*	135	0.0	0.0

*Colonias incontables en placa (>300).

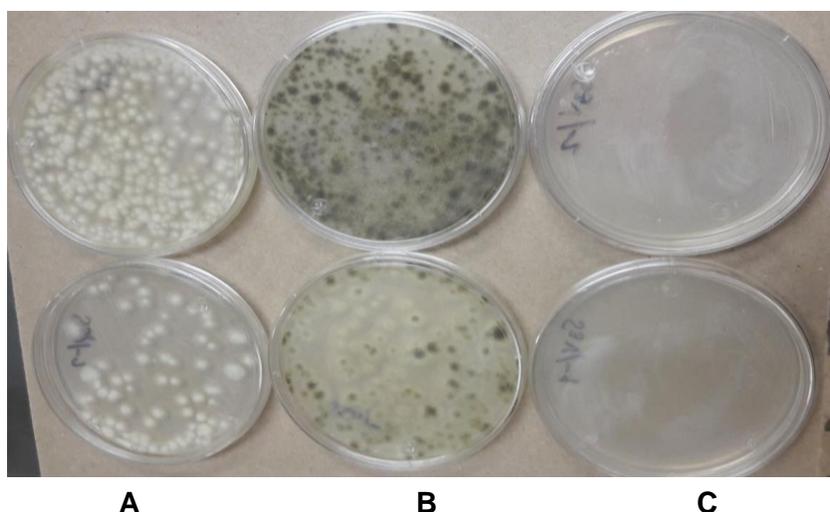


Figura 18. Unidades formadoras de colonias de las tres especies de hongos, en la dilución -1 y -2 (de arriba hacia abajo), determinadas por cuenta de viables en placa después de estar en contacto directo con el hidrogel 3: **A)** *Aspergillus parasiticus*; **B)** *Aspergillus niger*; **C)** *Fusarium verticilloides*.

La unión del quitosano a los polímeros de la pared celular microbiana desencadena efectos secundarios celulares como la desestabilización y posterior desorganización de la función de la permeabilidad de la membrana, conduciendo a la fuga de componentes celulares y originando la formación de poros. Además, la generación de

energía ligada a las vías de la membrana se afectan, probablemente debido al deterioro en la funcionalidad de la cadena de transporte de electrones, interfiriendo así con una adecuada reducción de oxígeno y obligando a las células a producir energía anaeróbica, originando una disfunción de todo el aparato celular (Kong y col., 2010).

Como se mencionó anteriormente, una de las aplicaciones potenciales de los hidrogeles elaborados a base de quitosano involucra el desarrollo de materiales o apósitos superabsorbentes con propiedades antimicrobianas, los cuales puedan ser utilizados para ayudar a controlar infecciones cutáneas en pacientes con problemas de incontinencia. Con base a lo anterior, a fin de evaluar la eficacia de los hidrogeles elaborados, en este trabajo se llevó a cabo un ensayo utilizando orina infectada de un paciente con problemas de incontinencia urinaria.

Los resultados obtenidos mostraron que en el hidrogel 3 inoculado con orina infectada se encontró crecimiento de 2 UFC/mL en la dilución -1 (Figura 19), lo cual podría estar relacionado con la actividad antimicrobiana del biopolímero en el material. Es posible que el quitosano, al interactuar con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos presentes en la orina, generan un rompimiento o lisis de estas estructuras, poniendo así en manifiesto su efecto antimicrobiano (Ayala, 2015).

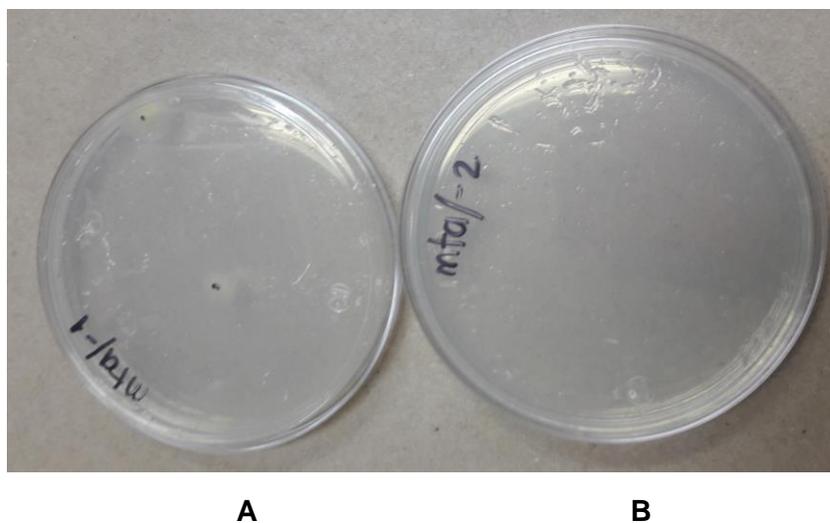


Figura 19. Unidades formadoras de colonias (UFC) en muestra de orina; **A)** dilución -1, **B)** dilución -2.

Con base a los resultados obtenidos, el quitosano resulta ser un buen agente antimicótico, ya que en hongos suprime la esporulación y posterior producción de esporas, llevándolo a la lisis celular, donde el quitosano puede ingresar y desnaturalizar las enzimas o inhibir el ADN y la síntesis de mRNA, influenciado por cuatro factores: (1) microorganismos: especie y fase de desarrollo; (2) Factores intrínsecos del quitosano: peso molecular, solubilidad, grado de desacetilación, densidad de carga positiva y capacidad quelante; (3) estado físico del quitosano: líquido (coloide) o sólido (membrana); (4) factores ambientales: pH, temperatura y tiempo (Ayala, 2015).

Teniendo en cuenta su efecto antimicrobiano, Pera y Escobar (2015) obtuvieron hidrogeles de polivinilalcohol/quitosano (30/70, con polivinilalcohol al 10%) y aloe vera, encontrando que el biopolímero funciona como un agente liberador que acelera procesos de curación y cicatrización de heridas en la piel. El hidrogel presentó buenas características para ser implementado a futuro como un medio liberador de aloe vera y quitosano, sin embargo, los autores concluyeron que es conveniente realizar estudios *in vivo* y mejorar las características bactericidas de este para su posterior aplicación cutánea.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron hidrogeles de poliacrilamida-quitosano-zeolita y se logró evaluar la actividad antifúngica contra especies de hongos filamentosos. La inclusión de quitosano en los hidrogeles favoreció la bioactividad del material, en la morfometría de las células de *Aspergillus niger*, *A. parasiticus* y *Fusarium verticilloides* el diámetro de sus esporas se afectó de manera significativa para cada especie, y respecto a la etapa de germinación de esporas se encontraron efectos inhibitorios.

Los hidrogeles formulados con quitosano fueron efectivos para reducir la viabilidad de las tres especies con respecto a los hidrogeles control, encontrando un mayor efecto en *Fusarium verticilloides*, este hongo resultó ser también el más susceptible al evaluar el efecto del hidrogel en forma de polvo.

Es conveniente continuar investigando acerca de los mecanismos por los cuales el quitosano, al estar en forma de gel, ejerce un rol inhibitorio sobre estos hongos. Asimismo, realizar pruebas variando el peso molecular y la concentración de quitosano en las formulaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar G. 2007. *Preparación de dos formas farmacéuticas con propiedades antimicrobianas a partir de extractos de Romero (Rosmarinus officinalis), Tila (Ternstroemia pringlei) y Gordolobo (Verbascum thapsus)*. Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas Puebla. Cholula, Puebla, México
- Alcalá L, Muñoz P, Peláez T, Bouza E. 2008. *Aspergillus y aspergilosis*. Servicio de Microbiología Clínica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid
- Aranda A, López F, López V. 2016. *Cell wall composition plays a key role on sensitivity of filamentous fungi to chitosan*. Journal of Basic Microbiology, pp. 1-12
- Arias E, Piñeros P. 2008. *Aislamiento e Identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias. Bogotá, D.C
- Ayala A, Colina M, Molina J, Vargas J, Ricón D, Medina J, Rosales L, Cárdenas H. 2014. *Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo Mycosphaerella fijensis morelet que produce la Sigatoka negra que ataca el plátano*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 15: 312-338
- Ayala VG. 2015. *Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura*. Scientia Agroalimentaria, 2: 32-38
- Benítez J, Lárez C, Rojas de Gáscué B. 2015. *Cinética de absorción y transporte del agua en hidrogeles sintetizados a partir de acrilamida y anhídrido maleico*. LatinAm. Metal. Mat, 35(2): 247-248
- Biasoli M. 2014. Microbiología Farmacia. *Micología*. Universidad Nacional de Rosario. Facultad de Ciencias Bioquímica y Farmacéutica
- Bocourt M, Bada N, Arguelles W, Peniche C. 2009. *Síntesis y caracterización de redes poliméricas interpretadas de quitosana-poli(ácido acrílico-co-acrilamida)*. Revista CENIC Ciencias Químicas, 40(2): 75-76
- Bocourt M, Cruz J, Bada N, Peniche C. 2008. *Síntesis y caracterización de hidrogeles biocompatibles interpretados de quitosana y poliacrilamida*. CENIC Ciencias Químicas, 39(2): 70-71
- [CDC 24/7] Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Types of fungal diseases. Clifton Road, Atlanta, Estados Unidos

- Costafreda J. 2011. *Tectosilicatos con características especiales: las zeolitas naturales*. Fundación Gómez Pardo. Madrid
- Expósito R. 2009. *Quitosano, un Biopolímero con Aplicaciones en Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos*. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid, España
- Ferfera H, Aiouaz N, Dairi N, Hadj-Hamou A. 2013. *Preparation of Chitosan-g-Poly(acrylamide)/Montmorillonite Superabsorbent Polymer Composites: Studies on Swelling, Thermal, and Antibacteria Properties*. Applied Polymer Science, 1: 1-14
- Fletcher J, Moore Z, Anderson I, Matsuzaki K. 2011. *Úlceras por presión e hidrocoloides*. Wounds international, 2: 1-4
- Fornes B, Palomar F, Díez P, Muñoz V, Luchas V. 2008. *Apósitos en el tratamiento de úlceras y heridas*. Enfermería dermatológica, 4: 16-19
- Frieden T. 2016. *Types of Fungal Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 24/7, pp. 2-8
- Gallardo E, Maioco S, Franois N. 2014. *Remoción de un colorante básico por adsorción con Quitosano y con un material compuesto de Quitosano-Zeolita*. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ingeniería. Buenos Aires, Argentina
- García P. 2000. *Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia*. Laboratorios Beterá, UNIV DIAG, 1(2): 31-41
- Gimeno H. 2011. *Funcionalidad del quitosano para reducir la formación de acrilamida en sistemas modelo*. Tesis de Maestría. Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universitat Politècnica de València. Valencia
- González A, Gardea A, Cuamea F. 2005. *Uso del Quitosano en Alimentos*. En Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C.), pp. 381-384
- Gómez J. 2001. *Síntesis, caracterización y aplicaciones catalíticas de zeolitas básicas*. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ingeniería Química
- Goy R, Britto D, Assis O. 2009. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciencia e Tecnología*, 19: 241-247
- Gregorí B. 2005. *Estructura y actividad de los antifúngicos*. Cubana Farm, 39(2): 23-78
- Hernández A, Bautista A, Velázquez M, Rodríguez S, Corona M, Solano A, Bosquez E. 2005. *Potencial del Quitosano en el Control de las Enfermedades Postcosecha*. Mexicana de Fitopatología, 23(2): 98-205

- Hernández L, Gonzales A, Gutiérrez N, Muñoz L, Quintero A. 2011. *Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos*. Mexicana de Ingeniería Química, 10(3): 455-463
- Hidrobo E, Retuert J, Araya P. 2010. *Aluminosilicatos Mesoporosos Catalíticamente activos obtenidos usando el biopolímero quitosano como agente formador de poros*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Santiago, Región Metropolitana, Chile
- Kong M, Guang Chen X, Xing K, Jin H. 2010. *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. International Journal of Food Microbiology, 144: 51-63
- Lárez C. 2008. *Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica*. UDO Agrícola 8, pp. 1-22
- León C. 2003. *Evaluación de dos métodos para diagnóstico de Dermatofitosis en perros en los municipios de Guatemala, Santa Catarina pínula y Mixco del departamento de Guatemala*. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guatemala, Guatemala
- López E, González B. 2014. *Diseño y análisis de experimentos*. Tesis de doctorado. Universidad de San Carlos Guatemala, Facultad de Agronomía, Guatemala, pp-47-52
- Luque A. 2012. *Micología*. Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Rosario, Santa fe, Argentina
- Monzón A, Rodríguez J. 2008. *Infecciones causadas por el género Fusarium*. Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología., Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda
- Morey A, Quinde A. 2012. *Obtención de Quitosano y Su Aplicación en Recubrimientos Comestibles en Mezcla con Almidón*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química. Ecuador
- Palmeira-de-Oliveira A, Palmeira-de-Oliveira R, Correlá I, Pina-Vaz C. 2010. *Anti-Candida Activity of a Chitosan Hydrogel: Mechanism of Action and Cytotoxicity Profile*. Gynecologic and Obstetric Investigation, 70(4): 322-327
- Pemán J, Salavert M. 2011. *Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora*. Enferm Infecc Micobiol Clin, 30(2): 90-98

- Pera Y, Escobar D. 2015. *Fabricación y evaluación mecánica de hidrogeles de quitosano, PVA y Aloe Vera para aplicaciones cutáneas*. Programa de Bioingeniería
- Pérez Chabela M, Soriano J, Ponce E, Díaz L. 2015. *Electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares*. Nacameh, 9(2): 77-96
- Plascencia, M. 2004. *Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D.F
- Reyes F, Rodríguez G, Aguilar M, Gracia SanMartín, Martínez A, San Román J. 2012. *Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa*. Biomecánica, 20: 7-19
- Rodríguez. A, Ramírez M, Rivero D, Bosquez E, Barrera L, Bautista S. 2009. *Propiedades Químico Estructurales y Actividad Biológica de la Quitosana en Microorganismos Fitopatógenos*. Revista Chapingo Serie Horticultura, 15(3): 307-317
- Rojas de Gáscue B, Ramírez M, Prin J, Torres C, Bejarano L, Villarroel H, Rojas L, Murillo M, Katime I. 2010. *Hidrogeles de acrilamida/ácido acrílico y de acrilamida/poli(ácido acrílico): estudio de su capacidad de remediación de efluentes industriales*. Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 30(1): 28-39
- Rojas B, Rodríguez R, Prin J, Ramírez A, Astudillo H, Contreras D, Rojas L, Figueroa Y, Ramírez M, Katime I. 2011. *Hidrogeles Semi-IPN sintetizados a partir de quitosano y acrilamida: su aplicación en aguas industriales residuales de una empresa automotriz*. Iberoamericana de Polímeros, 12(6): 343-345
- Romero P. 2011. *Obtención de Hidrogeles de Quitosano a partir del micelio de Aspergillus niger y su estudio en la liberación controlada de Cefalexina*. Tesis de Licenciatura. Universidad del Valle, Santiago de Cali
- Saber-Samandari S, Gazi M, Yilmaz E. 2011. *Uv-induced sythesis of chitosan-g-polyacrylamide semi-IPN superabsorbent hydrogels*. Polym.Bull, 68: 1623-1638
- Sáez V, Hernández E, Angulo L. 2003. *Liberación controlada de fármacos. Hidrogeles*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 4(1): 23-78
- Souza M, Figueroa Y, Ramírez A, Prin J, Guzmán P, Otero B, Rodríguez C, Katime I, Rojas de Gáscue B. 2014. *Hidrogeles de poli(acrilamida): Evaluación de su comportamiento en fluido fisiológico simulado (SBF)*. Iberoamericana de Polímeros, 15(4): 198-199

Suárez D, García C, Velazco G, Ortiz R, González A. 2009. *Biogel de quitosano a partir de la desacetilación termoalcalina de conchas de camarón propuesta para el tratamiento de la estomatitis subprotésica*. *Odontología de los Andes*, 4(2): 5-12

[WC] Wound Care. 2015. *Purilon Gel*. Coloplast. Buenos Aires, Argentina