

QUITOSANO Y SUS DERIVADOS: UNA ACTUALIZACIÓN DE SUS POTENCIALIDADES COMO AGENTES ANTIVIRALES EN LA LUCHA CONTRA EL SARS-CoV-2

Cristóbal Lárez Velásquez^{1*}, Susana Patricia Miranda Castro²

- 1) Grupo de Polímeros, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101 – Venezuela. cclarez@ula.ve
- 2) Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli – México. mircas@unam.mx

Recibido: Febrero de 2022; Aceptado: Marzo de 2022

RESUMEN

Se realizó una revisión de los trabajos más recientes sobre las posibles aplicaciones del biopolímero quitosano y sus derivados más prometedores, como agentes antivirales en la lucha contra el coronavirus, en particular los resultados relacionados con el SARS-CoV-2. Se destaca el papel protagónico de la investigación con estos biopolímeros en el esclarecimiento de algunos de los mecanismos propuestos para prevenir la acción infectiva de este letal virus. Entre los diferentes derivados del quitosano que tienen actividad antiviral eficaz, destacan los genéricamente denominados haluros de N-[2-hidroxi-3-trimetil-amonio]-propil]-quitosanos (cuyos cloruros se conocen como HTCCs), que han demostrado una elevada capacidad para bloquear las proteínas de las espigas del SARS-CoV-2 y prevenir sus interacciones con la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) y otros receptores celulares; Además, se ha propuesto que estos derivados puedan modificarse para inhibir varios tipos de coronavirus ya que pueden prepararse con diferentes porcentajes y distribución de sustituyentes cargados positivamente, lo que los haría muy versátiles en la lucha contra estos patógenos tan cambiantes. De igual forma, la revisión permite apreciar el poderoso apoyo que brindan los análisis *in silico* en esta lucha, al brindar la oportunidad de establecer parámetros definidos para comparar posibles candidatos antivirales, antes de emprender ensayos experimentales que consumen tiempo y recursos. También permite entender que la búsqueda de nuevos materiales a base de quitosano y sus derivados, para estos fines, está lejos de terminar y, por el contrario, parece estar recién comenzando, como por ejemplo algunos complejos quitosano/glucano que pueden obtenerse por métodos enzimáticos de fuentes naturales, lo que actualmente es importante por el papel determinante que parecen jugar las glicoproteínas en la lucha contra el COVID-19. Asimismo, el creciente conocimiento de nuevas rutas sintéticas para la derivatización exitosa del quitosano y para la preparación de sistemas nano-particulados a partir de estos materiales, permite proponer el uso de estos sistemas para el transporte y liberación controlada de agentes antivirales, incluidos los basados solo en derivados del quitosano.

Palabras clave: N-[2-hidroxi-3-trimetilamonio]-propil]-quitosano; inhibición del SARS-CoV; bloqueo de proteína de la espiga; derivatización del quitosano; candidatos antivirales

ABSTRACT

A review of the most recent works on the possible applications of the biopolymer chitosan and its most promising derivatives, as antiviral agents in the fight against coronavirus, in particular the results related to SARS-CoV-2, was carried out. The leading role of research with these biopolymers in clarifying some of the mechanisms proposed to prevent the infective action of this lethal virus is highlighted. Among the different derivatives of chitosan that have effective antiviral activity, those generically called halides of N-[2-hydroxy-3-trimethyl-ammonio]-propyl]-chitosan (whose chlorides are known as HTCCs) stand out, which have shown a high capacity to block SARS-CoV-2 spike proteins and prevent their interactions with angiotensin-converting enzyme II (ACE2) and other cellular receptors. In addition, it has been proposed that these derivatives can be modified to inhibit various types of coronaviruses, since they can be prepared with different percentages and distribution of positively charged substituents, which would make them very versatile in the fight against these highly variable pathogens. Similarly, the review allows us to appreciate the powerful support that *in silico* analysis provide in this fight, by providing the opportunity to establish defined parameters to compare potential antiviral candidates, before embarking on time- and resource-consuming experimental trials. It also allows us to understand that the search for new materials based on chitosan and its derivatives, for these purposes, is far from over and, on the contrary, seems to be just beginning, i.e., some chitosan/glucan complexes obtained by enzymatic methods from natural sources, which are currently important due to the determining role that glycoproteins seem to play in the fight against COVID-19. Likewise, the growing knowledge of new synthetic routes for the successful derivatization of chitosan and for the preparation of nanoparticulate systems from these materials, allows us to propose the use of these systems for the transport and controlled release of antiviral agents, including those only based on chitosan derivatives.

Keywords: N-[2-hydroxy-3-trimethylammonio)-propyl]-chitosan; SARS-CoV inhibition; spike protein blockade; derivatization of chitosan; antiviral candidates

1. INTRODUCCIÓN

La inducción de resistencia a virus por parte del quitosano comenzó a ser declarada a fines de la década de 1980 [1], posteriormente se reportaron varios estudios sobre la inducción de resistencia a diversas infecciones virales en plantas [2-4] y también en la inhibición de infecciones virales en células animales a través de varios mecanismos de acción, incluida la inducción de la secreción de óxido nítrico (NO) por macrófagos [5]. En el caso de las plantas, desde los estudios pioneros se ha propuesto que el quitosano puede actuar por diversas vías, tanto de forma indirecta, como en el caso de la activación de genes relacionados con los mecanismos generales de defensa en las plantas [6], o directamente, destruyendo la estructura del virus [7], bloqueando la replicación del ARN o inhibiendo proteínas específicas del patógeno [8]. Recientemente se ha presentado una propuesta global que describe los posibles mecanismos de acción de la quitina, el quitosano y algunos de sus prometedores derivados [9].

En cuanto a la prevención y tratamiento de enfermedades virales en humanos, se han propuesto diversas estrategias para la preparación de formulaciones que contengan quitosano para ser ensaya-das en casos asociados a virus de ADN y ARN, así como a retrovirus [10]. Para tales fines, también se ha estudiado la preparación de compuestos de quitosano que contienen materiales con propiedades antivirales, como nanopartículas de plata [11] o extractos naturales [12]. Asimismo, el quitosano y sus derivados han sido probados para la elaboración de sistemas de protección, como trajes y mascarillas, para uso de trabajadores de la salud con exposición a pacientes con COVID-19 [13].

Sin embargo, en los últimos años se ha impulsado la investigación hacia el uso del quitosano, y especialmente de sus derivados que contienen fracciones de amonio cuaternario, como componentes de posibles sistemas terapéuticos para combatir enfermedades asociadas a coronavirus (CoVs), como el síndrome respiratorio agudo severo, es decir, SARS-CoV y SARS-CoV-2 [14 -20]. En este sentido, las cuatro principales estrategias que se desarrollan son: la preparación y ensayo de vacunas, el control de la tormenta de citoquinas, la terapia pasiva de anticuerpos y el desarrollo y uso de antivirales específicos. En este trabajo se revisan los principales informes sobre el desarrollo y ensayos de potenciales sistemas antivirales que contienen quitosano en su formulación, con énfasis en aquellos que lo contienen como principio activo.

2. LA FAMILIA DE LOS CORONAVIRUS

Los CoVs son virus pertenecientes a la familia de los *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, orden Nidovirales [21], responsables de causar infecciones respiratorias, entéricas, hepáticas y neurológicas en humanos y animales [22]. Inicialmente, esta familia se dividió en tres grupos con base en métodos serológicos; sin embargo, tras la implementación de técnicas moleculares para su reconocimiento, se ha reorganizado su división en cuatro grupos [20]: alfa-, beta-, gamma- y delta-CoVs, siendo esta última variante la responsable de los preocupantes rebrotos de COVID-19 que se han presentado en diversas regiones del planeta.

Estos virus no se consideraron patógenos para los humanos hasta el brote del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) en 2002-2003, que ocurrió en la provincia de Guangdong, China [23,24]. Antes de este brote, los CoVs solo se asociaban con infecciones leves, principalmente en personas inmunocompetentes [25]. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) definió a los coronavirus como una “*amplia familia de virus que pueden causar diversas afecciones, desde el resfriado común hasta enfermedades más graves, como el coronavirus que causa el síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV) y el uno que causa el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV)*” [26].

Estructuralmente, los CoVs son virus con un tamaño que oscila entre 80 y 220 nm y poseen una envoltura caracterizada por largas proyecciones de proteínas en forma de espiga que sobresalen de ella, parecidas a una corona cuando se observan en el microscopio electrónico. En su parte interna se encuentra el núcleo que contiene el genoma, formado por ARN monocatenario positivo no segmentado (ARNmc+), que se encuentra protegido por la nucleocápside. Muchos de los CoVs se distinguen por tener genomas muy grandes, que pueden llegar hasta las 32 kilobases [27].

Los CoVs se caracterizan por tener una amplia diversidad de hospedadores y tropismo tisular [28]. En los humanos, los coronavirus alfa y beta a menudo causan enfermedades respiratorias. Algunos CoVs se han encontrado solo en ciertas especies, lo que no significa que estén restringidos solo a sus huéspedes; algunos beta-coronavirus (SARS- y MERS-CoV) tienen la capacidad de pasar de sus reservorios zoonóticos a los humanos, cruzando la barrera de las especies [25,29,30].

3. EL QUITOSANO Y SUS DERIVADOS COMO AGENTES ANTIVIRALES FRENTE AL SARS-CoV-2

3.1 Mecanismos de acción propuestos

Recientemente se ha propuesto que varios derivados del quitosano, especialmente los relacionados con el N-[2-hidroxi-3-trimetilamonio]-propil]-quitosano (HTCC, ver figura 1), con diferentes grados de sustitución de sus grupos amino, podrían utilizarse como antivirales altamente efectivos y selectivos en la inhibición de diferentes coronavirus (MERS-CoV y SARS-CoV-2) asociados a enfermedades respiratorias agudas, incluida la COVID-19 [31]. El grado de sustitución de los grupos amino y la disposición de los grupos amonio cuaternario sustituyentes a lo largo de la cadena polimérica, así como la presencia de otros tipos de sustituyentes, son factores clave para la actividad antiviral de estos derivados del quitosano. Anteriormente, uno de estos compuestos (HTCC-63) había sido reportado como altamente efectivo para inhibir otros CoVs como HCoV-NL63 y HCoV-OC43 [32] y como un adyuvante seguro y efectivo para vacunas formuladas con recombinantes polipéptidos del virus de la hepatitis E que se aplicaron a ratones [33]. El mecanismo de acción propuesto para HTCC-63 durante la inhibición de estos CoVs, sustentado básicamente en estudios de microscopía confocal, se ha asociado con el bloqueo de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), especulándose que tal interacción puede ocurrir debido a la naturaleza concatémica de la superficie del virus y el hecho de que el polímero tenga una distribución adecuada de sus cargas positivas, pudiendo interactuar mejor con múltiples sitios en la superficie. La longitud de las moléculas de HTCC-63 se ha estimado en torno a los 700 nm [31].

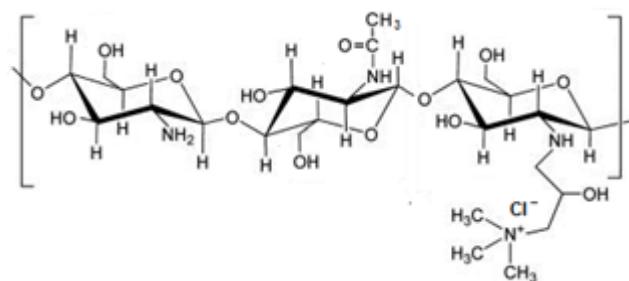


Fig. 1 Estructura química del cloruro de N-[2-hidroxi-3-trimetilamonio] -propil]-quitosano.

Por otro lado, un estudio reciente basado en el análisis del perfil genético reflejó la abundancia del receptor CD147 (conocido como basigina, Bsg), entre otros, en el epitelio de las vías respiratorias y de la mucosa respiratoria, lo que apunta fuertemente a la participación de diversas proteínas receptoras en la mediación de la infección inicial del SARS-CoV-2 [34,35]. En este sentido, debido a que los oligoquitosanos y algunos de sus derivados parecen regular la

expresión de los receptores CD147 en pacientes con cáncer gástrico [36], se ha propuesto que estas moléculas tienen el potencial de limitar la diseminación de SARS-CoV-2 en células inmunitarias que expresan el receptor CD147. Otros resultados interesantes, obtenidos mediante estudios de acoplamiento molecular ciego, y en sitios específicos, de algunas variantes del SARS-CoV-2, indican que los oligómeros de N-bencil-O-acetil-quitosano, imino-quitosano y quitosano-sulfato tienen una apreciable potencial antiviral debido a la alta afinidad de unión que sus ligandos mostraron con la glicoproteína heparán sulfato, interactuando con los residuos Tirosina 449, Asparagina 501, Tirosina 501, Glicina 493, Glicina 498, así como con otros sitios específicos asociados con alta transmisibilidad y gravedad de la infección [18]; también se ha propuesto que el sulfato de heparán en la superficie celular actúa como un cofactor auxiliar durante la entrada del virus a la célula [37]. Un estudio relacionado ha demostrado que la unión de la proteína S en la célula podría ocurrir a través de la formación de un complejo ternario que requiere las glicoproteínas heparán sulfato y ACE2 [38]. También se ha propuesto la existencia de una cavidad homotrimérica formada por las glicoproteínas de las espigas del SARS-CoV-2 como posible sitio de unión de los receptores celulares; los estudios de dinámica molecular mostraron que este sitio puede ser bloqueado por moléculas pequeñas como los oligómeros de quitosano y la rapamicina [39]. Así mismo, se ha propuesto que la entrada del SARS-CoV-2 en las células depende de los receptores ACE2 y serina proteasa 2 transmembrana (TMPRSS2) [40].

Como se puede ver en los estudios anteriores, en el caso de infecciones causantes de COVID-19, el mecanismo de acción antiviral del quitosano más considerado en la actualidad, especialmente para sus derivados que contienen residuos de amonio cuaternario, es la inhibición de la interacción de diferentes receptores celulares con proteínas presentes en espigas del virus [17,18,31]. En este sentido, se ha propuesto que la agregación de estas proteínas podría ser responsable de algunos interesantes resultados observados [18] y que la interacción de HTCC con las proteínas de las espigas es de naturaleza electrostática [31]. La figura 2 muestra algunos receptores diana propuestos para la inhibición del SARS-CoV-2 por derivados del quitosano.

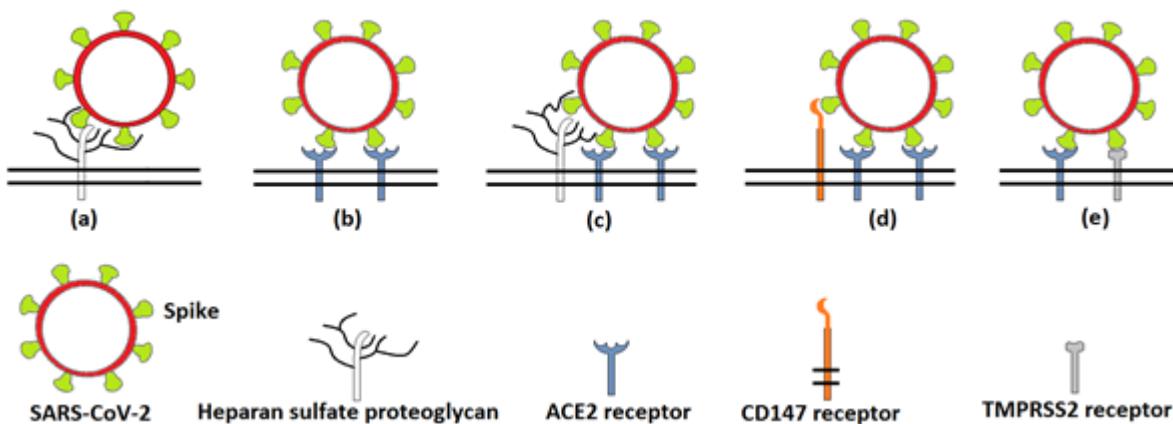


Fig. 2 Mecanismos propuestos para la unión del SARS-CoV-2 a las células huésped: (a) Unión no específica mediada por proteoglicanos de heparán sulfato, (b) Unión al receptor ACE2, (c) Unión asistida por proteoglicanos de heparán sulfato a los receptores ACE2, (d) Unión asistida por CD147 al receptor ACE2, (e) Unión asistida por TMPRSS2 a los receptores ACE2.

3.2 Actividad antiviral y propiedades fisicoquímicas del quitosano y sus derivados

Los estudios de inhibición de CoVs con algunos derivados del quitosano han sido sumamente esclarecedores, habiéndose confirmado que una parte importante en la lucha contra estos patógenos pasa por la inhibición de la interacción de las proteínas de superficie del virus con los receptores celulares. Sin embargo, con la información científica reunida hasta el momento, es difícil establecer cómo la actividad antiviral de estos materiales se ve afectada por sus propiedades fisicoquímicas básicas (peso molecular, grado de desacetilación, grado y naturaleza de sustitución, concentración, contracción asociado, forma de aplicación etc.), considerando, además, que su actividad suele depender de la fuente del quitosano [41] y del tipo de virus considerado [18]. Así, se ha encontrado que el β -quitosano, obtenido a partir de quitina extraída de plumas de calamar, tiene una mayor actividad antiviral que un α -quitosano comercial (preparado con quitina procedente de caparazones de camarones) en la inhibición de la enfermedad de Newcastle [41]; posteriormente se encontró que el β -quitosano también es un fuerte bloqueador de la unión entre la proteína del virus y el receptor celular [42]. Con respecto al efecto del peso molecular sobre la actividad antiviral del quitosano es un tema controvertido debido a que algunos investigadores han reportado (en estudios con plantas) una mayor inhibición por quitosanos de alto peso molecular mientras que otros obtuvieron resultados contrarios [18]. En cuanto al grado de desacetilación, la poca información disponible indica que esta variable tiene poco efecto sobre la actividad antiviral del quitosano cuando las muestras de quitosano tienen pesos moleculares similares [43].

Por otro lado, aunque el quitosano puede tener una actividad antiviral limitada para muchos virus, su modificación química con residuos que llevan grupos amonio cuaternario, cambia favorablemente su

desempeño como agente antiviral. El porcentaje de sustitución, el tipo de sustituyente y la distribución de dichos sustituyentes a lo largo de la cadena son factores clave para alcanzar los niveles de actividad requeridos para la inhibición de diferentes tipos de CoVs, como ha sido elegantemente demostrado en el reciente trabajo de Milewska y colaboradores [31]. La siguiente tabla muestra algunos de los derivados del quitosano que se han investigado en estudios relacionados al tema.

Tabla 1. Algunos de los derivados del quitosano que han sido investigados por sus propiedades antivirales.

Derivado	Estudios realizado	Observaciones
- Quitosano-Arginina	Efectos sobre la infectividad de los virus: La infectividad disminuye en virus envueltos influenza A (H1N1), vaccinia (cepa y no envueltos [44]. Copenhague), Herpes Simplex 1 (cepa SP7) y Encefalomielitis (cepa B).	
-N-bencil-O-acetil-quitosano	Acoplamiento molecular con la glicoproteína heparán sulfato.	Alta afinidad de los ligandos (-6,0 a -6,6 Kcal/mol) con la glicoproteína [16].
- Imina-quitosano		
- Quitosano-sulfato		
N-[(2-hidroxi-3-trimetil-amonio)-propil]-quitosano (HTCC)	Inhibición de MERS-CoV y SARS-CoV-2 por HTCC con diferentes grados de titución y tipo de sustituyente.	Inhibición dependiente del grado de sustitución [31].
- N-carboximetil-quitosano-(N,O-sulfato)	Capacidad para detener la infección por VIH-1 en células CD4+	Bloqueo de la unión del virus a los receptores de la célula huésped [45].
6-desoxi-6-bromo-N-ftaloilquitosano	Inhibición del virus de Newcastle en huevos de gallina libres de patógenos específicos.	El título de hemaglutinación del virus se redujo a cero [46].
- N-(sialil-lactosa)-quitosano con diferentes grados de sustitución	Inhibición del virus de la influenza (H1N1) en eritrocitos de cobayo.	Inhibición significativa de la aglutinación de eritrocitos. Alta afinidad de unión a la proteína de superficie hemoaglutinina del virus [47].
N-Aminofosfonatos -quitosanos	Síntesis química y estudios de acoplamiento con la proteasa principal del SARS-CoV-2	Los estudios de acoplamiento mostraron una excelente afinidad de unión de derivados a la proteína objetivo [48].

4. TENDENCIAS EN LA INVESTIGACIÓN DEL QUITOSANO Y SUS DERIVADOS COMO AGENTES ANTIVIRALES

Como se ha mostrado en los apartados anteriores, el quitosano y algunos de los diversos derivados que se han estudiado tienen características destacadas que los convierten en potentes candidatos para su uso como agentes antivirales en la lucha contra el actual SARS-CoV-2 y, probablemente, contra las posibles variaciones que podrían seguir apareciendo en el futuro. El uso más prometedor de estos materiales parece ser como agente bloqueador, tanto de las proteínas presentes en la espiga del coronavirus como de los receptores en las células susceptibles a la infección, impidiendo así la penetración y posterior replicación y propagación del patógeno. El

mecanismo propuesto para esta acción es una interacción electrostática, a través de las cargas positivas del quitosano, que luego es estabilizada por otras interacciones, incluyendo las propuestas con los proteoglicanos de sulfato de heparán, que pueden verse favorecidas por el tipo de sustituyentes y su ordenación a lo largo de la cadena. Para ayudar en la comprensión completa de estos procesos, seguramente será necesario continuar realizando nuevos estudios sobre la relación estructura/propiedades de estos materiales, incluido el análisis *in silico* [49], los cuales tienen mucho que aportar para dilucidarlos.

Otra prometedora área en el uso del quitosano y sus derivados como principios activos en formulaciones antivirales, es la búsqueda de nuevos materiales que cumplan con los parámetros estructurales dictados por la investigación sobre los mecanismos inhibidores de la infección, independientemente de que estos se obtengan de fuentes naturales, mediante la aplicación de métodos apropiados, como por ejemplo la obtención del complejo quitosano/glucano extraído de las paredes celulares del hongo *Gongronella butleri*, o mediante el uso de un método enzimático específico [50], o el diseño y preparación en el laboratorio mediante rutas sintéticas experimentales ya bien establecidas para modificaciones específicas del quitosano [51-53]. En este sentido, las tendencias actuales parecen apuntar al diseño y preparación de nuevos derivados que porten fracciones de tipo glucano, dado el papel fundamental que las investigaciones actuales asignan a la presencia de glicoproteínas en los receptores celulares y en las proteínas de las espigas del virus [54-56]; se ha reportado que estas últimas están profusamente decoradas por cadenas de glucanos, proyectadas desde las superficies de los viriones, ocultando la superficie de la proteína y restringiendo el acceso de los anticuerpos a los epítopos neutralizantes de las proteínas [57].

Por otra parte, y teniendo en cuenta la proclamada eficacia de los sistemas nano particulados en la liberación de agentes terapéuticos, hoy es posible proponer la preparación de nanosistemas basados solo en quitosano, los cuales pueden asumir los roles duales de transportadores para la liberación inteligente de derivados apropiados del quitosano como agentes activos, lo que podría permitir el logro de actuaciones antivirales mejoradas.

5. CONSIDERACIONES FINALES

La lucha contra los CoVs que afectan a animales y humanos en todas las regiones del planeta se ha convertido en una actividad académica y biotecnológica multidisciplinaria, que debe conducir a la investigación y el intercambio de resultados en beneficio de la humanidad. En esta lucha, el quitosano y algunos de sus derivados han sido ensayados dentro del arsenal terapéutico de los potenciales agentes antivirales, siendo especialmente relevantes para el estudio de los diferentes mecanismos de acción viral que se consideran en la actualidad. Entre estos derivados destacan los

de naturaleza poliacidónica, obtenidos mediante la sustitución de los grupos amino e hidroxilo por residuos que contienen fracciones de amonio cuaternario en diferente proporción y/o disposición dentro de las cadenas poliméricas, que pueden denominarse genéricamente como N-[(2-hidroxi-3-trimetil-amonio)-propil]-quitosanos. La característica más importante de estos materiales es su actividad antiviral frente a diferentes tipos de CoVs, la cual se puede afinar variando las propiedades del quitosano de partida (grado de acetilación, peso molecular, origen, etc.) y/o sus porcentajes de sustitución.

Finalmente, es importante tener en cuenta que las intensas actividades de investigación relacionadas con la pandemia del COVID-19, que actualmente se realizan en todo el mundo, y que aportan diariamente nuevas evidencias sobre factores fundamentales del problema, abren nuevas perspectivas para estos biomateriales que pueden inspirar el desarrollo de sistemas antivirales tan sorprendentes como los basados únicamente en quitosano y/o derivados de quitosano, como por ejemplo los policomplejos de quitosano aniónico/quitosano catiónico y nanopartículas basadas en quitosano para la liberación controlada de derivados de quitosano antiviral.

REFERENCIAS

- [1] Pospieszny H, Atabekov J, *Plant Science*, **62**(1), 29 (1989).
- [2] Pospieszny H, Chirkov S, Atabekov J, *Plant Science*, **79**, 63 (1991).
- [3] Chirkov S, Surguchova N, Atabekov J, *Arch. Phytopathol. Plant Prot.*, **29**(1), 21 (1994).
- [4] Chirkov S, *App. Biochem. Microbiol.*, **38**(1), 1 (2002).
- [5] Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosic L, Calabró D, Avallone B, Balsamo G, *Biomaterials*, **15**(15), 1215 (1994).
- [6] Brodelius P, Funk C, Haner A, Villegas M, *Phytochemistry*, **28**, 2651 (1989).
- [7] Hu Y, Cai J, Du Y, Lin J, Wang C, Xiong K, *J. App. Polym. Sci.*, **112**(6), 3522 (2009).
- [8] Hadwiger, LA, Kendra, DF, Fristensky, BW, Wagoner W, “Chitosan Both Activates Genes in Plants and Inhibits RNA Synthesis in Fungi”. En: Muzzarelli, R., Jeuniaux, C., Gooday, G.W. (Editores) *Chitin in Nature and Technology*. Boston (USA): Springer, 1986, p 209–214.
- [9] Safarzadeh M, Sadeghi S, Azizi M, Rastegari-Pouyani M, Pouriran R, Haji-Molla HM, *Int. J. Biol. Macromol.*, **31**, 235(2021).
- [10] Zhu Y, Fu M, Cao F, Patent No. CN1548056A, China. 2003.
- [11] Mori Y, Ono T, Miyahira Y, Nguyen VQ, Matsui T., Ishihara M, *Nanoscale Res. Let.*, **8**, 93 (2013).
- [12] Randazzo W, Fabra M, Falcó I, López- Rubio A, Sánchez G, *Compreh. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **17**, 754 (2018).
- [13] Hathout R, Kassem D, *Front. Bioeng. Biotech.*, **8**, 885 (2020).
- [14] Pyrć K, Milewska A, Nowakowska M, Szczubialka, Kaminski K, Patent No. EP 2 849 763 B1, European Office. 2017.
- [15] Iravani S, Varma R, *Applied Sciences*, **11**(8), 3512 (2021).
- [16] Modak C, Jha A, Sharma N, Kumar A, *Int. J. Biol. Macromol.*, **187**, 492 (2021).
- [17] Pyrć K, Milewska A, Duran E, Botwina P, Dabrowska A, Jedrysiak M et al., *Scientific Reports*, **11**, 20012 (2021).
- [18] Sharma N, Modak C, Kumar-Singh C, Kumar R, Khatri D, Singh SB, *Int. J. Biol. Macromol.*, **179**, 33 (2021).
- [19] Umar Y, Al-Batty S, Rahman H, Ashwaq O, Sarief A, Sadique Z et al., *J. Polym. Environ.*, **9**, 1 (2021).
- [20] Jaber N, Al-Remawi M, Al-Akayleh F, Al-Muhtaseb N, Al-Adham IS, Collier P J, *J. App. Microb.*, **132**(1), 41 (2022).
- [21] International Committee on Taxonomy of Viruses Executive Committee, *Natural Microbiology*, **5**(5), 668-674 (2020).

- [22] Lárez-Velásquez C, Rojas-Pirela M, *Avances en Química*, **15**(1), 23 (2020).
- [23] Zhong N, Zheng B, Li Y, Poon L L, Xie Z H, Chan K H *et al.*, *Lancet*, **362**(9393), 1353 2003.
- [24] Drosten C, Günther S, Preiser W, Van Der Werf S, Brodt HR, Becker S *et al.*, *New Eng. J. Med.*, **348**(20), 1967 (2003).
- [25] Cui J, Li F, Shi Z, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**(3), 181 (2019).
- [26] PAHO. <https://www.paho.org/es/temas/coronavirus>. Accessed: 24/01/2022.
- [27] Li F, *Ann. Rev. Virol.*, **3**(1), 237 (2016).
- [28] Millet J, Whittaker G, *Virus Res.*, **202**, 120 (2015).
- [29] de Wit E, van Doremale, Falzarano D, Munster DJ, *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**(8) 523 (2016).
- [30] Qu X, Hao P, Song X, Jiang S M, Liu Y X, Wang P G *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **280**(33), 29588 (2005).
- [31] Milewska A, Chi Y, Szczepanski A, Barreto-Duran E, Liu K, Liu D *et al.*, *J. Virol.*, **95**(4), e01622-20 (2021).
- [32] Milewska A, Kaminski K, Ciejka J, Kosowicz K, Zeglen S, Wojarski J *et al.*, *PLOS ONE*, **11**(6), e0156552 (2016).
- [33] Tao W, Zheng H, Fu T, He Z J, Hong Y, *Human Vac. Immunotherap.*, **13**(8), 1818 (2017).
- [34] Aguiar JA, Tremblay BJ, Mansfield MJ, Wood O, Lobb B, Banerjee A *et al.*, *Eur. Respirat. J.*, **56**(3), 2001123 (2020).
- [35] Wang K, Chen W, Zhang Z, Deng Y, Lian J Q, Du P *et al.*, *Signal Transd. Targ. Therapy*, **5**, 283 (2020).
- [36] Luo Z, Dong X, Ke Q, Duan Q, Shen L, *Oncol. Lett.*, **8**(1), 361 (2014).
- [37] Zhang Q, Chen C, Swaroop M, Xu M, Wang L, Lee J *et al.*, *Cell Discovery*, **6**(1), 80 (2020).
- [38] Clausen T, Sandoval D, Spliid C, Pihl J, Perrett HR, Painter CD *et al.*, *Cell*, **183**, 1043 (2020).
- [39] Kalathiy U, Padariya M, Mayordomo M, Lisowska M, Nicholson J, Singh A *et al.*, *J. Clin. Med.*, **9**(5), 1473 (2020).
- [40] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S *et al.*, *Cell*, **181**(2), 271 (2020).
- [41] He X, Xing R, Li K, Qin Y, Zou P, Liu S *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **82**, 614 (2016).
- [42] Alitongbieke G, Li X, Wu Q, Lin Z C, Huang J F, Xue Y *et al.*, *Preprint bioRxiv* (2020).
- [43] Davydova V, Nagorskaia V, Gorbach V, Kalitnik A, Reunov A, Solov'Eva T *et al.*, *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, **47**(1), 113. (2011).
- [44] Baker M, Wiesmann W, Ryan S, Patent Application US2007/0281904 A1. 2007
- [45] Sosa M, Fazely F, Koch J, Vercellotti, S, Ruprecht, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**(2), 489 (1991).
- [46] He X, Xing R, Liu S, Qin Y, Li K, Yu H *et al.*, *Drug Chem. Toxicol.*, **44**(4), 335 (2021).
- [47] Li X, Wu P, Gao G, Cheng S, *Biomacromolecules*, **12**(11), 3962 (2011).
- [48] Packialakshmi P, Gobinath P, Ali D, Alarifi S, Alsaiari N S, Idhayadhulla A *et al.*, *Polymers*, **13**, 1046 (2021).
- [49] Tallei T, Maulana R, Windah A, Wahongan IF, Tumilaar SG, Kumaunang M *et al.*, “The potential use of chitosan deduced from the results of *in silico* analysis”. En *The 2nd International Conference on Agriculture and Bio-industry 2021*. Jakarta (Indonesia) IOP Publishing 2021. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 667, 012034.
- [50] New N, Stevens W, Tokura S, Tamura H, *Enz. Microb. Technol.*, **42**(3), 242 (2008).
- [51] Argüelles-Monal W, Lizardi-Mendoza J, Fernández-Quiroz D, Recillas-Mota M T, Montiel-Herrera M, *Polymers*, **10**(3), 342 (2018).
- [52] Kritchenkov A, Skorik Y, *Russian Chem. Bull.*, **66**, 769 (2017).
- [52] Carvalho L, Queda F, Almeida-Santos C, Marques M, *Asian Journal*, **11**(24), 3468 (2016).
- [53] Lardone R, Garay Y, Parodi P, de la Fuente S, Angeloni G, Bravo E O *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100375 (2021).
- [55] Wang D, *Curr. Trends Immunol.*, **21**, 17 (2020).
- [56] Zhao X, Chen H, Wang H, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 53 (2021).
- [57] Walls A, Tortorici M, Frenz B, Snijder J, Li W, Rey FA *et al.*, *Nature Structural & Molecular Biology*, **23**(10), 899–905 (2016).