

PROPIEDADES QUÍMICO-ESTRUCTURALES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA QUITOSANA EN MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS

A. T. Rodríguez-Pedroso¹; M. A. Ramírez-Arrebató¹;
D. Rivero-González¹; E. Bosquez-Molina²;
L. L. Barrera-Necha³; S. Bautista-Baños^{3¶}

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), km 3.5 Carr. Tapaste-San José de las Lajas, Gaveta Postal Núm. 1, La Habana, Cuba. C. P. 32700. CUBA.

²Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186 Michoacán y la Purísima, Col. Vicentina, D. F. México. C. P. 09340. MÉXICO.

³Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, km 8.5 Carr. Yautepec-Jojutla, San Isidro, Yautepec, Morelos, México C. P. 62731. MÉXICO.
Correo-e: sbautis@ipn.mx; atania@inca.edu.cu (¶Autora responsable)

RESUMEN

El propósito de este artículo es proporcionar una revisión de la investigación publicada acerca de la quitosana que es la forma desacetilada de la quitina, un compuesto natural biodegradable que se deriva de cubiertas de crustáceos siendo su principal atributo su naturaleza policatiónica. Se revisan las características químicas y estructurales, métodos de obtención, actividad antimicrobiana y modo de acción. Asimismo, se analiza el potencial de la quitosana para inducir una serie de reacciones de defensa correlacionadas con la actividad enzimática tales como la PAL, β -1,3 glucanasa, quitinasa y quitosanasa.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: obtención; PAL; glucanasa, quitinasa, quitosanasa.

CHEMICAL-STRUCTURAL PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CHITOSAN ON PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS

SUMMARY

The purpose of this paper is to provide an overview of the published research about chitosan, which is the deacetylated form of chitin, a natural biodegradable compound derived from crustacean shells whose major attributes corresponds to its polycationic nature. This review points out its chemical and structural characteristics, obtainment methods, antimicrobial activity and its action mode. The potential of chitosan to induce a series of defence reactions correlated with certain enzymatic activities carried out by PAL, β -1,3-glucanase, chitinase and chitosanase is also reviewed.

ADDITIONAL KEY WORDS: obtention; PAL, glucanase, chitinase, chitosanase

INTRODUCCIÓN

El uso de productos bioactivos es uno de los principales retos de la agricultura moderna. En este sentido la quitosana representa una alternativa muy promisoría debido a su carácter natural, significativa actividad biológica y facilidad de obtención.

Numerosos trabajos se han realizado con el objetivo de demostrar los mecanismos de acción y la eficiencia de este principio activo, para las prácticas agrícolas, especialmente a nivel de laboratorio y en condiciones

controladas. La quitosana ha demostrado tener actividad contra un amplio espectro de patógeno, la cual puede ser manifestado de dos formas: por inhibición del crecimiento de patógenos y por la inducción de resistencia sistémica a infección de patógenos. La segunda forma es la más importante para las prácticas agrícolas y representa un novedoso método de control de las enfermedades, la cual está basado en la activación de los mecanismos de control de la enfermedad en la planta. El objetivo del presente artículo es brindar información sobre los métodos de obtención, características químicas, actividad biológica y mecanismo de acción de este principio activo.

Aspectos generales sobre la quitosana

La quitosana, es un polisacárido que se obtiene de la quitina parcialmente desacetilada y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, es un copolímero lineal formado por unidades de glucosamina y en menor medida de N-acetil D-glucosamina unidos por enlaces β 1-4, cuya denominación química, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (D-glucosamina GlcN) y 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa N-acetil glucosamina (Sato *et al.*, 1998).

Ha sido comprobado por muchos investigadores (Hadwiger *et al.*, 1986; El Ghaouth *et al.*, 1992a; Rodríguez *et al.*, 2006; Kauss *et al.*, 1997; Santhiyabama y Balasubramanian, 1998) que la quitosana y sus derivados, a diferencia de otros inductores, tienen la doble propiedad de inhibir el crecimiento de hongos, bacterias y virus fitopatógenos, así como la de activar *in vivo* diversos mecanismos vinculados con la resistencia sistémica adquirida (Benhamou, 1992; Benhamou y Theriault, 1995), lo que ha generado diversas investigaciones científicas y tecnológicas en muchos países, para promover su aplicación con fines diversos en la industria agrícola (De Abraham e Higuera, 2004; Rinaudo, 2006; Chen, 2006). Actualmente, el uso de agentes químicos para el control de microorganismos fitopatógenos se encuentra muy cuestionado, los graves daños al medio ambiente debido al uso irracional de estos productos sintéticos siguen latentes lo que ha llevado a considerar otras opciones de control. El uso de otros compuestos naturales como la quitosana podría ser una solución adecuada a esta problemática.

CARACTERÍSTICAS DE LA QUITOSANA

Fuente

La quitina es el polímero más abundante después de la celulosa. Está presente en la pared celular de hongos, levaduras y en el exoesqueleto de los invertebrados como cangrejos e insectos. La principal fuente de obtención de la quitina son los desechos de los crustáceos. Se ha reportado la presencia de este polisacárido natural en bajas concentraciones en la pared celular de algunos hongos fitopatógenos como es el caso de *Fusarium solani* (Paz-Lago *et al.*, 1999), *Rhizopus oryzae* (Yu y Hang, 1989; Wei *et al.*, 2008) y hongos del orden de los *Mucorales*, además es un importante componente en hongos filamentosos de la clase de los Zygomycetos (Bartnicki-García *et al.*, 1970; Zamani *et al.*, 2007).

Química y estructura

La quitosana tiene un contenido de nitrógeno (N) mayor al 7 % (Muzzarelli, 1977) y posee una distribución regular de los grupos aminos libres, que pueden ser protonados por ciertos ácidos cargándose positivamente lo que le

confiere un comportamiento de polielectrolito (Glasser, 1997). Este hecho permite explicar algunas propiedades de la quitosana como son: la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes, entre otras; así como su comportamiento como floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de las aminas (Sugimoto, 1999; Crini, 2005). Una propiedad importante de la quitosana es su estructura rígida, caracterizada por numerosos enlaces por puentes de hidrógeno, la cual le confiere una buena estabilidad térmica. De acuerdo a Sugimoto (1999), se descompone aproximadamente a 170 °C y se degrada antes de fundir, lo cual es característico de polisacáridos que poseen muchos enlaces por puentes de hidrógeno.

En cuanto al grado de acetilación se ha establecido, que la quitina con más de un 50 % de desacetilación debe ser considerada quitosana e incluso algunos investigadores la definen como tal con un grado de desacetilación superior al 60 %. Usualmente en el caso de las quitosanas el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98 % (Harish *et al.*, 2007); sin embargo, también se ha reportado que para lograr una mayor actividad biológica, el contenido de los acetilos debe encontrarse alrededor de un 40 % (Muzzarelli, 1977).

Las diversas funciones reportadas sobre la quitosana están relacionadas principalmente con la presencia de los grupos aminos libres en cada residuo monomérico de su molécula. Estas funciones se atribuyen a las tres formas estructurales fundamentales en que se puede encontrar la molécula: la forma cristalina hidratada, la cristalina no hidratada y la no cristalina o amorfa. Ogawa y Yui (1993), encontraron que muestras de quitosana ricas en cristales anhidros no se disuelven con facilidad en disolventes tales como ácido acético en solución acuosa; asimismo reportan que los estudios de difracción de rayos x muestran que en una quitosana totalmente desacetilada prevalece la presencia de formas polimórficas hidratadas. A medida que disminuye la desacetilación aparecen en el patrón de rayos x las señales débiles que sugieren la presencia de pequeñas cantidades remanentes de alfa quitina y la aparición de cristales de quitosana no hidratados. En estudios de cristalinidad de la quitosana realizados también por Agüero *et al.* (1989), se obtuvieron resultados concordantes aplicando diferentes métodos analíticos tanto para muestras sólidas como para películas de quitosana.

MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LA QUITOSANA

Se han desarrollado varios procedimientos para la obtención de quitosana en los últimos años. El método más utilizado es la reacción de conversión de quitina en este polisacárido natural principalmente por N-desacetilación alcalina (Aiba y Muraiki, 1998). Dicho proceso se realiza mediante el tratamiento directo de la quitina con una solución

concentrada de hidróxido de sodio o potasio (40-50 %) a una temperatura de 100 °C o más, con hidrólisis de la mayoría o todos los grupos acetilos del polímero.

Otro de los procedimientos de obtención de este polímero, es también la desacetilación de la quitina pero mediante el uso de reactivos ácidos; sin embargo, este método puede provocar la hidrólisis del polisacárido y traer como consecuencia, bajos rendimientos del producto final (quitosana). Por esta razón, los métodos alcalinos son los procesos comúnmente empleados para la desacetilación de la quitina (Muzzarelli, 1977).

Por su parte, Baxter *et al.* (1992), emplearon una metodología en la cual parten de quitosana totalmente desacetilada, para realizar el proceso de acetilación parcial homogénea en disolución metanólica de ácido acético. En este método se pudo controlar mejor el contenido de grupos acetilo, pero presentó el inconveniente de la obtención inicial de la quitosana completamente desacetilada. Una desacetilación casi completa de la quitosana es muy difícil de lograr por las condiciones heterogéneas en que transcurre la reacción. El drástico tratamiento a que es sometido el polímero original hace inevitable una ruptura parcial de los enlaces glicosídicos, con la siguiente disminución de la masa molecular y la alteración de su distribución con respecto a la quitina de partida.

Es conocida la dificultad que presenta la preparación de quitosana con un grado de desacetilación superior al 90 %, sin que produzca degradación de la cadena del polímero. Sin embargo, Mima *et al.* (1983), establecieron un método de preparación de quitosana con un grado de desacetilación cercano al 100 % sin tener degradaciones significativas en la cadena polimérica. El método consiste en lavar sucesivamente el producto intermedio con agua, dos o más veces durante el tratamiento alcalino a un tiempo menor a 5 h para una concentración de NaOH del 47 % a una temperatura de 110 °C. Domard y Rinaud (1983), establecieron un método para obtener quitosana completamente desacetilada sin disminución excesiva del peso molecular. El mismo incluye el uso del tiofenol durante los tratamientos sucesivos de álcali, durante 1 h a una temperatura de 100 °C.

La quitosana también ha sido preparada a partir de caparazones de camarón tigre (*Penaeus monodon*) desacetilando la quitina dos veces, con disoluciones de NaOH al 50 % bajo vacío durante 30 min a 100 °C, obteniendo productos con grado de desacetilación entre 43 y 54 % en cada lavado (Benjakul y Sophanodora, 1993). El proceso termoquímico consiste en someter la quitina a 230 °C en una solución alcalina al 10 % durante 1 min a presión reducida. Una descompresión repentina en el proceso y posterior tratamiento durante 24 h, a una temperatura de 4 °C permite alcanzar una desacetilación completa de la quitina.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA QUITOSANA

Actividad antifúngica

La quitosana exhibe actividad antimicrobiana contra algunos hongos filamentosos, levaduras y virus (Rhoades y Roller, 2000; Nápoles *et al.*, 1997), sin embargo, se ha reportado que las bacterias son poco sensibles (Pospieszny, 1999; Guo-Jane y Wen-Huey, 1999). Por otra parte, existen algunos hongos que contienen quitosana como principal componente, tal es el caso de los *Zygomycetos*, que son vulnerables a la quitosana (Leuba y Stossel, 1986). La quitosana logra su efecto antifúngico por vías diferentes en las que parece desempeñar un papel importante el grado de su polimerización. Una disminución en el grado de polimerización de la molécula de quitosana provoca una disminución en el número de especies de hongos inhibidos. La inhibición del crecimiento es debido a los grupos aminos protonados a pH 5.6 de la quitosana y esto puede formar complejos poli electrolitos con los grupos ácidos y básicos de la superficie celular creando desórdenes (Hirano y Nagao, 1995); pero también ha sido encontrado que existe cierto requerimiento mínimo de tamaño molecular para poder mostrar actividad antifúngica *in vitro*. Hadwiger *et al.* (1986), demostraron que para *Fusarium solani* este valor es de al menos siete residuos de glucosamina a través de estudios histoquímicos demostró que la quitosana se acumula en el interior celular del hongo y evita su crecimiento.

Otros autores reportan que el grado de acetilación es de gran importancia en la actividad antifúngica *in vitro* de la quitosana. En este sentido El Ghaouth *et al.* (1992b), demostraron que quitosanas de similar grado de polimerización y diferentes grados de acetilación presentan actividad inhibitoria sobre el crecimiento de algunos hongos, correspondiendo las mayores inhibiciones con el menor grado de acetilación. También Díaz (2001), comprobó que la quitosana al 1 % de grado de acetilación y de elevado carácter policatiónico mostró mayor efecto inhibitorio que una quitosana de un 36 % de grado de acetilación sobre el hongo *Phytophthora parasitica*.

Por otra parte, Chien y Chou (2006), encontraron que la quitosana dependiendo del tipo y su concentración, pueden causar desde un 25 hasta un 90.5 % de inhibición del crecimiento de diferentes hongos que afectan la calidad de los frutos del cítrico (*Citrus tankan Hayata*), comprobaron que con un aumento de la concentración, se aumentaba la inhibición sobre los microorganismos. Plascencia *et al.* (2003), también comprobaron que la quitosana inhibía el crecimiento radial y la germinación de esporas del hongo *Aspergillus niger* a la concentración de 3 g·litro⁻¹.

Otros investigadores de Egipto, comprobaron que la quitosana reducía el crecimiento micelial y producción de esporas del patógeno *Phytophthora infestans*, a la concentración de 1 mg·mL⁻¹ (Atia *et al.*, 2005). El Ghaouth *et al.* (1992b), observaron que los hongos *Botrytis cinerea*,

Alternaria alternata, *Colletotrichum gloeosporoides* y *Rhizopus stolonifer* redujeron marcadamente su crecimiento radial aplicando una elevada concentración de quitosana. Otros investigadores también plantearon que la quitosana reduce la germinación de uredospora de *Puccinia arachidis* a una concentración de 1 g·litro⁻¹ y con igual concentración fue probado contra *Pyricularia grisea* observándose en este caso infertilidad en las hifas (Sathiyabama y Balasubramanian, 1998; Rodríguez *et al.*, 2002). De donde se deduce que la sensibilidad a la acción de la quitosana depende del género y especie. La sensibilidad de los hongos patógenos hacia la quitosana puede cambiar en los diferentes estadios de su desarrollo. Liu *et al.* (2007), reportaron que la quitosana es mejor inhibidor de la germinación de *Penicillium expansum* que la de *Botrytis cinerea*, contrario a lo que se observó en el crecimiento micelial de estos hongos. También, Trotel *et al.* (2006), observaron que la quitosana inhibe el crecimiento micelial y desarrollo *in vitro* del hongo *B. cinerea*.

Bautista-Baños *et al.* (2003; 2004), lograron la inhibición completa del crecimiento de hongos como *Fusarium oxysporum*, *R. stolonifer*, *Penicillium digitatum* y *C. gloeosporioides* a concentraciones de 3 %. Estos mismos autores reportaron estudios de análisis de imágenes para medir el efecto de la quitosana sobre parámetros morfológicos individuales de las esporas de estos hongos. La forma, la longitud y el área de los conidios de cada hongo estudiado fueron afectadas de acuerdo a la especie de hongo y el tiempo de incubación en la solución de la quitosana. La quitosana mostró efecto antifúngico *in vitro* sobre el hongo *Microdochium nivale* a la concentración de 2000 µg·mL⁻¹ (Hofgaard *et al.*, 2005). También Hassni *et al.* (2004), encontraron que la quitosana tiene efecto sobre el crecimiento y morfología del hongo *F. oxysporium* f. sp. *albedinis* (Foa). Ellos comprobaron que la quitosana reduce el crecimiento de *Foa* a una concentración de 1 mg·mL⁻¹ en un medio sólido de papa dextrosa agar en un 75 %, mientras que en el mismo medio pero líquido lo inhibe totalmente.

Estudios ultraestructurales realizados en *R. stolonifer* mostraron que la quitosana erosiona la pared celular lo que se relacionó positivamente con el incremento del material proteico que se detectó en el medio. Laflamme *et al.* (1999), reportaron que la quitosana reduce el crecimiento de los hongos *Fusarium acuminatum*, *F. oxysporium*, *Cylindrocladium floridanum* y *Cylindrocarpon destructans* provocando un aumento de la vacuolación, retractación y alteración de su membrana plasmática, así como el espesamiento de la pared celular y distorsión de la hifa. Igualmente, la quitosana ha demostrado el efecto antifúngico sobre el patógeno *B. cinerea* provocando también reducción en su desarrollo y alteraciones citológicas según Ait *et al.* (2004).

Otros autores como Rivero *et al.* (2004), también comprobaron que la quitosana tenía efecto sobre la germinación de los conidios del hongo *Fusarium* sp. a la concentración de 1000 mg·mL⁻¹. También Ben-Shalom *et al.*

(2003), demostraron que la quitosana inhibe la germinación de conidios de *B. cinerea* a la concentración de 50 mg·litro⁻¹.

Actividad antibacteriana

La quitosana inhibe el crecimiento de una amplia variedad de bacterias. (Liu *et al.*, 2000; Helander *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Hayes *et al.*, 2008). Según sus características químicas será su actividad antibacteriana (Shih-Bing *et al.*, 2008). La concentración de la quitosana es una propiedad química de gran importancia para su actividad antibacteriana. Se demostró que soluciones de quitosana hasta la concentración de 0.10 mg·mL⁻¹ inhibieron marcadamente el crecimiento de la bacteria patógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* aislada de *Euphorbia pulcherrima*, a medida que se aumentaba la concentración mayor era el efecto inhibitorio de la misma (Bin *et al.*, 2007). Una quitosana parcialmente desacetilada se estudió sobre otras dos bacterias: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* demostrando que retarda el crecimiento de dichas bacterias a la concentración de 0.5 % (Wisniewska *et al.*, 2007).

Actividad antiviral

La actividad antiviral de la quitosana depende del grado de polimerización, del grado de desacetilación, de la carga positiva y el carácter de las modificaciones químicas de la molécula. Los posibles mecanismos de supresión de la infección viral por la quitosana son aún discutidos (Chirkov, 2002; Liu y Yao, 2002). Los principales factores para suprimir infecciones del fago por quitosana son inactivación de la partícula del fago e inhibición de reproducción del bacteriófago a nivel celular. La quitosana posee una actividad antiviral por su habilidad para inducir resistencia a las enfermedades virales en plantas y para prevenir la multiplicación del bacteriófago en cultivos infectados por microorganismos. (Chirkov *et al.*, 2001, 2002). La capacidad de la quitosana para suprimir la infección viral en plantas no depende del tipo de virus, la quitosana afecta a la planta induciendo su propia resistencia a las infecciones virales. La quitosana imita el contacto de la planta con un fitopatógeno, induce un amplio espectro de reacciones protectoras en la planta, la cual delimita una propagación sistémica de los virus sobre la planta y conduce al desarrollo de la resistencia adquirida sistémica (Rabea *et al.*, 2003).

La quitosana aplicada por aspersión o inoculación protege a las hojas de las plantas de la infección local y sistémica causada por el virus mosaico de alfalfa (ALMV), virus necrosis del tabaco (TNV), virus mosaico del tabaco (TMV), virus malformación del maní (PSV), virus mosaico del pepino (CMC) y virus X de la papa (PVX). La eficiencia de la quitosana para inhibir la infección viral depende de la combinación del hospedero-virus, la concentración de la quitosana y el método de aplicación (Pospieszny, 1997; Irriti y Faoro, 2008).

MODO DE ACCIÓN DE LA QUITOSANA

Actividad antimicrobiana

Se plantea que cuando la carga positiva sobre el C-2 del monómero de glucosamina se encuentra por debajo de pH 6, la quitosana es más soluble y tiene una mejor actividad antimicrobiana que la quitina (Chen *et al.*, 1998; Larez, 2008). El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana de la quitina, quitosana y sus derivados es aún desconocido, aunque diferentes mecanismos han sido propuestos en uno de ellos se sugiere que la interacción entre la carga positiva de la molécula de quitosana y la carga negativa de las células de la membrana microbiana conduce a la salida de proteínas y otros constituyentes intracelulares (Chen *et al.*, 1998).

La quitosana también tiene propiedades antifúngicas ante un amplio espectro de patógenos, provocando la inhibición total o parcial de estos según la especie fúngica, considerándose que existe una posible dependencia entre el grado de polimerización y el de N-acetilación de la quitosana y el nivel de inhibición que ésta provoca. Leuba y Stössel (1986) plantearon que la quitosana a pH 5.8 inducía un rompimiento masivo de los compuestos de proteínas y sugirieron que la actividad antifúngica estaba asociada a su habilidad para distorsionar la membrana plasmática del hongo. También El Ghaouth *et al.* (1992b), relacionaron la propiedad fungistática de la quitosana parcialmente acetilada con la habilidad para inducir cambios morfológicos en la pared celular del hongo, reducciones en el tamaño de las hifas y ramificaciones. La interacción de la quitosana con el plasmalema fúngico, especialmente en la hifa donde la membrana está menos protegida, puede causar la formación de poros y consecuentemente inducir cambios en la formación de la membrana. Tales cambios pueden alterar el balance existente entre biosíntesis y degradación de componentes de la pared celular del hongo.

Hadwiger (1999), ha expuesto cómo la quitosana se acumula en las células de los hongos y evita el crecimiento de éstos y que la mayor actividad antifúngica se presenta en oligómeros de siete o más unidades comprobándose cómo el tamaño de los oligómeros de quitosana constituyen un importante aspecto en la acción del compuesto. La quitosana actúa principalmente sobre la superficie externa de la bacteria. A concentraciones inferiores de $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, la quitosana policatiónica probablemente se une a la carga negativa de la superficie de la bacteria para causar aglutinación, mientras que a elevadas concentraciones, el mayor número de cargas positivas permitieron lograr una carga positiva neta a las superficies bacterianas para mantenerla en suspensión (Sudarsham *et al.*, 1992). La quitosana también actúa como un agente quelante que une selectivamente a trazas de metales y por consiguiente inhibe la producción de toxinas y el crecimiento micelial (Cuero *et al.*, 1992). Además activa algunos procesos de defensa en los tejidos hospederos (El Ghaouth *et al.*, 1992b) actúa

inhibiendo varias enzimas. La unión de la quitosana con el ADN y la inhibición de la síntesis de ARN_m ocurren a través de la penetración de la quitosana hacia el núcleo de los microorganismos y la interferencia con la síntesis de ARN_m y síntesis de proteínas (Sudarsham *et al.*, 1992).

La quitosana muestra su actividad antibacteriana solamente en medio ácido debido a su pobre solubilidad por encima de pH 6.5. De esta forma, los derivados de quitosana solubles en agua (solubles en pH fisiológicos ácidos y básicos) pueden ser buenos candidatos como biocidas policatiónicos.

El efecto del peso molecular sobre la actividad antibacterial y antifúngica ha sido explorado (Chen, 1998). La quitosana con un peso molecular con un rango de 10,000 hasta 100, 000 kDa puede ser utilizada para restringir el crecimiento de la bacteria. Además, la actividad antibacterial está influenciada por el grado de desacetilación, su concentración en solución y el pH del medio. La actividad antibacteriana encontrada fue un incremento en el orden quitosana N,O-carboximetilada, quitosana y quitosana O-carboximetilada (Liu *et al.*, 2006).

Los polímeros de amonio cuaternario han sido considerados bacteriostáticos, no bactericidas, porque ellos requieren de un tiempo largo de contacto para matar al microorganismo y generalmente ellos no son de actividad de amplio espectro. Algunos de estos polímeros han sido reportados que tienen actividad antimicrobiana. Se postula que esta acción se debe a que los compuestos son absorbidos en la superficie celular bacteriana, incrementando la permeabilidad de los lípidos de la membrana celular y causando la muerte a través de la pérdida de los materiales esenciales de la célula. Por otro lado, estos derivados de quitosana son generalmente más activos contra bacterias gram positivas que su correspondiente monómero. Se cree que este efecto es debido a la adsorción de los polímeros en la superficie celular y membrana bacteriana con la subsiguiente alteración de la integridad de la membrana. La actividad antimicrobiana generalmente se incrementa con el incremento del amonio cuaternario (Rabea *et al.*, 2003).

Por otra parte, además de la formación de película de gas permeable, la quitosana tiene como función dual: (a) interferir directamente en el crecimiento de los hongos y (b) activar algunos procesos de defensa (Bai *et al.*, 1988). Estos mecanismos de defensa incluyen acumulación de quitinasas, síntesis de inhibidores de proteínas, lignificación e inducción de síntesis de calosa (El Ghaouth *et al.*, 2000).

MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE LA DEFENSA DE LAS PLANTAS POR QUITOSANA

Los inductores son sustancias que promueven respuestas de defensa cuando se le aplica a los tejidos de las plantas o cultivos celulares de plantas (oligosacáridos,

glicoproteínas, péptidos y lípidos). Los más estudiados son los oligosacáridos que incluye oligoglucanos, oligoquitinas, oligoquitosanas y ácidos oligalacturónicos. Cuando una planta que ha desarrollado un mecanismo de resistencia al ser atacada por un patógeno, rápidamente ocurre la muerte celular o respuesta hipersensible en el sitio de la infección y ocurre también una serie de respuestas de defensa en la célula dañada. Esto incluye la producción de especies reactivas de oxígeno, cambios estructurales en la pared celular, acumulación de proteínas relacionadas con la defensa y biosíntesis de fitoalexinas. La quitosana ha sido extensamente evaluada para determinar la capacidad de inducir respuestas de defensa natural en la planta. Cambios fisiológicos y bioquímicos ocurren dentro de la planta debido a la inducción por quitosana.

Actividad inductora

Existen evidencias que comprueban las propiedades inductoras de la quitosana, en forma de respuestas de defensa en las plantas u órganos vegetales. Las proteínas relacionadas con la patogenicidad (Pathogenesis Response Proteins, PR-Proteínas) son un grupo heterogéneo de proteínas solubles inducidas en muchas especies de plantas en situaciones patológicas o relacionadas con otros tipos de estrés. Son proteínas de bajo peso molecular, solubles en pH ácidos y resistentes a la proteólisis. Sobre la base de relaciones serológicas y secuencia de aminoácidos, se han reconocido hasta el presente 10 familias de PR-proteínas y de ellas, al menos tres, presentan actividad enzimática quitinasa, glucanasa y peroxidasa. Se ha reportado que los miembros de estas familias se encuentran presentes en muchas especies vegetales (Van Loon, 1999).

En relación a las respuestas de defensa que la quitosana activa se pueden citar las siguientes: la síntesis de lignina y calosa, inducción de la fenilalanina amonio liasa (PAL), biosíntesis de fitoalexinas, producción de inhibidores de proteasas y proteínas relacionadas con la patogenicidad como son: quitinasa, glucanasa, peroxidasa (POD) y quitosanasa (Vander *et al.*, 1998; Ben-Shalom *et al.*, 2003).

RESPUESTAS ENZIMÁTICAS DE DEFENSA

Fenilalanina Amonio Liasa (PAL)

La PAL (EC 4.3.1.5) cataliza la conversión de L-fenilalanina a ácido transcinámico con la liberación de amonio. Esta reacción es un punto clave del metabolismo primario y secundario del reino de las plantas debido a que en un tejido, los niveles de esta enzima pueden fluctuar significativamente en intervalos de tiempo relativamente cortos en respuesta a una amplia variedad de estímulos y bajo ciertas condiciones (Hammerschmidt, 1999). La actividad de la PAL se considera como la velocidad limitante en el metabolismo de la vía metabólica de los fenilpropanoides en la producción de estructuras fenólicas

y fitoalexinas en algunas especies (Hadwiger y Loschke, 1981). Dicha enzima también está involucrada en la síntesis directa del ácido salicílico por la vía del ácido benzoico que es considerado una importante señal en la amplificación de las respuestas sistémicas defensivas de las plantas (Yalpani *et al.*, 1993; Pallas *et al.*, 1996). Sin embargo, los cambios en la actividad de esta enzima son frecuentemente observados en la interacción hospedero-patógeno (Hadwiger, 1968; Minamikawa y Uritani, 1964) y en respuesta a la luz, inducción por compuestos químicos, heridas y otras condiciones de estrés (Millar y Higgings, 1968; Hadwiger *et al.*, 1994; Hadwiger, 1986).

Falcón *et al.* (2002), observaron protección contra *Phytophthora parasitica nicotianae* cuando trataron plántulas de tabaco vía raíz con quitosana durante 24 h con concentraciones entre 5 y 500 mg·litros⁻¹ e infectaron con una suspensión de esporas provocando inducción en la actividad de la PAL diferenciada en el tiempo de exposición de las plantas al patógeno. En plantas de arroz obtenidas a partir de semillas tratadas con quitosana hidrolizada a 500 mg·litros⁻¹ e inoculadas artificialmente con *Pyricularia grisea* también se observó un aumento marcado de la actividad de la PAL (Rodríguez *et al.*, 2007). Como ya se mencionó, el grado de acetilación de la quitosana tiene importancia desde el punto de vista biológico; en este sentido Vander *et al.* (1998), probaron en hojas de trigo quitosana con diferentes grados de acetilación y a diferentes concentraciones, y demostraron que se puede inducir el máximo de actividad PAL con un grado de acetilación de 35% y a una concentración de 0.10 mg·litros⁻¹.

En hojas de plántulas de trigo los niveles de actividad enzimática inducida por el quitosano hidrolizado a concentración de 1.0 mg·litros⁻¹ y después de la inoculación con *B. cinerea*, aumentó significativamente la actividad enzimática de PAL en el sitio de herida, alcanzando su máximo después de 16 h (Mitchell *et al.*, 1994). La aplicación de quitina y quitosana a hojas de soya causó un aumento de la actividad de PAL. La elevación de la actividad enzimática fue dependiente de la longitud de la cadena de los oligómeros y el tiempo de tratamiento. El hexámero de quitina y el pentámero de quitosana causaron las máximas actividades a las 36 h después del tratamiento (Khan *et al.*, 2003). En uvas de mesa tratadas con quitosana al 1.0 % se observó un aumento significativo de la actividad enzimática de PAL y una disminución de la incidencia de *B. cinerea* (Romanazzi *et al.*, 2002). La aplicación de la quitosana a concentración de 1.0 g·litro⁻¹ en precosecha indujo la actividad de PAL en frutos de uva y disminuyó la infección por patógenos (Meng *et al.*, 2008). Las hojas de plantas de tabaco tratadas con diferentes dosis de la quitosana (por inmersión de semillas y aspersión foliar) presentaron diferencias de acuerdo a la concentración empleada. Por ejemplo en la inmersión de semillas las dosis más bajas (0.1 y 0.5 g·litro⁻¹) incrementaron la actividad enzimática de PAL mientras que en la aspersión foliar las dosis más altas

(0.5 y 1.0 g·litro⁻¹) estuvieron asociadas con una mayor actividad (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2007).

β-1,3 glucanasa

La β-1,3 glucanasa (EC 3.2.1.39) (endo 1,3 glucosidasa glucano) cataliza el rompimiento hidrolítico tipo endo de los enlaces β-1,3 glucosídico en los β-1,3 glucanos, que es uno de los componentes principales de la pared celular de muchos hongos fitopatógenos (Van Loon, 1999). El principal interés en la β-1,3 glucanasa es su posible función en la respuesta de plantas a patógenos microbianos. Así por ejemplo, durante el crecimiento de plantas de pepino en presencia de quitosana se controló el daño causado por *Pythium aphanidermatum* y se estimuló la producción de β-1,3-glucanasa en raíces y hojas (El Ghaouth *et al.*, 1994). Esta inducción de mecanismos de defensa por la quitosana también se ha demostrado en vainas de chícharo en las cuales se incrementó la actividad de quitinasa y de β-1,3-glucanasa (Mauch *et al.*, 1984). Mangos tratados con quitosana a diferentes concentraciones y previamente inoculados con *C. gloeosporioides* presentaron menor desarrollo de la enfermedad observándose un aumento significativo en las actividades de quitinasa y β-1,3-glucanasa (Jitareerat *et al.*, 2007). Una respuesta de resistencia inducida contra *Puccinia arachidis* fue reportada en cacahuate (*Arachis hypogaea*). Las hojas tratadas con quitosana, después de diez días presentaron actividades intercelulares máximas de quitinasa y β-1,3-glucanasa a 1000 ppm (Sathiyabama *et al.*, 1998). Actividades enzimáticas similares se reportaron en tejidos de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*), después de 12 y 48 h de tratamiento con soluciones acuosas de quitosana de bajo peso molecular a 500 µg·litro⁻¹ e inoculadas con *Phytophthora infestans* (Vasyukova *et al.*, 2001).

Quitinasas

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) cortan el enlace entre el C₁ y C₄ de dos N-acetilglucosaminas consecutivas del polímero de quitina. Se les considera como enzimas de defensa de las plantas contra la infección de patógenos. En los casos en los que se ha observado su acumulación alrededor del hongo, provocan la lisis de las hifas, reduciendo los daños que éstas causan en las plantas (Broglie *et al.*, 1991; Boller, 1987; Mauch y Staenling, 1989). Las mismas pueden ser inducidas mediante el tratamiento con quito oligosacáridos, extractos de hongos y bacterias, estrés físico o químico y por heridas. Autores como Mauch *et al.* (1987), y Collinge y Slusarenko (1987), encontraron que en plantas después de la inoculación con hongos, bacterias, virus patógenos y la aplicación de inductores como quitina y quitosana provocan un incremento en la actividad de la quitinasa.

Zhang y Punja (1994), compararon la inducción de la actividad quitinasa en plántulas de pepinos de dos semanas de germinadas, tratadas con quitosana a una concentración

de 1 mg·mL⁻¹ y tratadas e infectadas; al tercer día después del tratamiento se observó un aumento en la actividad quitinasa. Al mismo tiempo, tomaron otras plántulas de pepino y las inocularon con una suspensión de esporas de *S. fuliginea* y mostraron un incremento rápido en la actividad quitinasa a partir del segundo día después de la inoculación. Otros investigadores como Chang *et al.* (1995), también trataron plántulas de chícharos con quitosana 0-5 mg·litro⁻¹ y posteriormente las infectaron con *F. solani* f sp. *pisi* y observaron una elicitación en la actividad de quitinasa a las 0, 10, 29, 57 y 72 h después de inoculadas, encontrándose la máxima actividad a las 10 h. En plantas de pepino creciendo en presencia de quitosana, se controló el daño radicular causado por *Pythium aphanidermatum* y se indujeron varias respuestas de defensa de la planta incluyendo el aumento de la actividad de quitinasa en hojas (El Ghaouth *et al.*, 1994). Estudios sobre el proceso de germinación y la actividad de quitinasa en semillas de soya tratadas con quitosana a diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 %) durante 15 min y 6 h, mostraron que el período de exposición a la quitosana fue más decisivo para aumentar la actividad quitinasa en las semillas de soya que la concentración de quitosana (Tejchgraber *et al.*, 1991).

Quitosanasas

Las quitosanasas (EC 3.2.1.99) catalizan la degradación hidrolítica de la quitosana obteniéndose dímeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros de quitosana. En las plantas, las quitosanasas han sido consideradas como proteínas relacionadas con la patogénesis involucrada en los mecanismos de defensa contra hongos patógenos (Grenier y Asselin, 1990). Ellas representan una clase de enzimas hidrolíticas que se encuentran en bacterias, hongos y plantas.

Para ciertos hongos, tienen la función de debilitar o provocar la lisis de la pared celular de las hifas. En la fase autolítica de crecimiento *Mucor rouxii*, son producidas y degradan la pared celular del hongo. En cacahuate, la actividad quitosanasasa está involucrada en los mecanismos de defensa contra hongos patógenos y toxigénicos (Cuero y Osuji, 1993). Esto sugiere que actúan como enzimas de defensa en plantas contra hongos que contienen quitosana en su pared celular.

Los niveles de acetilación en el sustrato de la quitosana parece ser que influyen en la velocidad de hidrólisis catalizada por diferentes quitosanasas. *F. solani* y *N. orientalis* podrían actuar óptimamente solo sobre la quitosana que tiene un 30% de acetilación (Shimosaka *et al.*, 1996). La quitosanasasa de *Bacillus lincheniformis* UTK demostró un máximo de actividad sobre la quitosana de un 65-80% de desacetilación (Uchida *et al.*, 1992). Por otro lado, un aumento en la actividad de quitosanasasa se reportó en raíces y hojas de plantas de pepino tratadas con quitosana (El Ghaouth *et al.*, 1994). La quitosana estimuló su actividad 1.9 veces más que las plantas no tratadas en plantas de pepino (Ben-Shalom

et al., 2003). Las hojas de plantas de tabaco asperjadas con quitosana presentaron mayor actividad de quitosanasas y glucanasas a la concentración de 0.1 g-litro⁻¹ (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

Se ha demostrado que la quitosana induce o inhibe diferentes actividades bioquímicas durante la interacción planta-patógeno mejorando la tolerancia a una amplia variedad de fitopatógenos, lo cual indica que el uso de este compuesto como inductor natural puede ser explotado en la agricultura sostenible.

LITERATURA CITADA

- AGÜERO, G.; ARGUELLES, J.; PENICHE, C. 1989. Estudio de la cristalinidad. *Revista Cubana* 5: 25-32.
- AIBA, S.; MURAIKI, E. 1998. Preparation of higher N-acetylchitooligosaccharides in high yields. *Proceeding of the Third Asia-Pacific chitin and chitosan Symposium*. Feelung, Taiwán. pp. 89-96.
- AIT BARKA, E.; EULLAFFROY, P.; CLÉMENT, C.; VERNET, G. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Physiology and Biochemistry* 22: 608-614.
- ATIA, M.; BUCHEAUER, H.; ALY, A.; ABOU, M. 2005. Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans* and activation of defence mechanism in tomato to late blight. *Biological Agriculture and Horticulture* 23: 175-197.
- BARTNICKI-GARCÍA, S.; HERGERT, F.; GIERZ, G. 1970. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* 153: 46-47.
- BAI, R.; HUANG, M.; JIANG, Y. 1988. Selective permeabilities of chitosan-acetic acid complex membranes and chitosan-polymer complex membranes for oxygen and carbon dioxide. *Polymer Bulletin* 20: 83-88.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Mexican Journal of Phytopathology* 22: 178-186.
- BAXTER, A.; DILLON, M.; TAYLOR, K.; ROBERTS, G. 1992. Improved method for IR determination of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 4: 166-169.
- BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R.; AKI, C.; FALLIK, E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection* 22: 285-290.
- BENHAMOU, N. 1992. Ultrastructural and citochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-Lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. *Phytopathology* 82: 1185-1193.
- BENHAMOU, N.; THERIAULT, A. 1995. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 35-42.
- BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R.; AKI, C.; FALLIK, E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection* 22: 285-290.
- BENJAKUL, S.; SOPHANODORA, P. 1993. Chitosan production from carapace and shell of black tiger shrimp. *ASEAN Food Journal* 8: 145-148.
- BIN, L.; XIAO, W.; RUOXIA, CH.; WEIGUO, H.; GUANLIN, X. 2007. Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydrate Polymers* 72: 287-292.
- BOLLER, T. 1987. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance *Phytophthora parasitica* En: *Plant-microbe interactions molecular genetic perspectives* (T. Kosuge; E. Nester, eds.) vol. 2 New York, MacMillan Press. USA pp 385-414.
- BROGLIE, K.; CHET, I.; HOLLIDAY, M.; CRESSMAN, R.; BIDDLE, P.; KNOWLTON, S.; MAUVALS, C.; BROGLIE R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.
- CHANG, M.; HOROVITZ, D.; CULLEY; HADWIGER, L. 1995. Molecular cloning and characterization of a pea chitinase gene expressed in response to wounding, fungal infection and the elicitor chitosan. *Plant Molecular Biology* 28: 105-111.
- CHEN, C.; LIAU, W.; TSAI, G. 1998. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *Journal of Food Protection* 61: 1124-1128.
- CHEN, T. 1998. Specific properties and use of chitosan. En: *National Symposium on Nature Marine Product and Nature Biological Medicine*; Beijing, China, p 282.
- CHEN, L. 2006. Anti-microbial chitosan composition for textile products. *United States Patent Application*, 20060008515.
- CHIEN, P.; CHOU, CH. 2006. Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 1964-1969.
- CHIRKOV, S.; ILINA, A.; SURGUCHEVA, N.; LETUNOVA, E.; VARITSEV, Y.; TATARINOVA, N.; VARLAMOV, V. 2001. Effect of chitosan on systemic viral infection and some defense responses in potato plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 774-779.
- CHIRKOV, S. 2002. The antiviral activity of chitosan (Review). *Applied Biochemical Microbiology* 38: 1-8.
- CHUNG, Y.; WANG, H.; CHEN, Y. 2003. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology* 88: 179-184.
- CRINI, G. 2005. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science* 30, 38-70.
- COLLINGE, D.; SLUSARENKO, A. 1987. Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Molecular Biology* 9: 389-410.
- CUERO, R.; DUFFUS, E.; OSUJI, G.; PETTIT. 1992. Aflatoxin control in preharvest maize. Effect of chitosan and microbial agents. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 117: 165-169.
- CUERO, R.; OSUJI, G. 1993. Chitosanase induction in maize and peanuts: Enzyme inducing factor. En: *Chitin Enzymology* (R.A.A. Muzzarelli ed.) *European Chitin Society. Ancan*. pp. 277-288.
- DE ABRAHAM, A.; HIGUERA, I. 2004. Generalidades. Quitina y quitosano. Obtención, caracterización y aplicaciones. A. P. D. Abraham. Lima, Perú. Pontificia Universidad Católica de Perú, 25-65.

- DÍAZ D. 2001. Potencialidades biológicas de la quitosana y sus hidrolizados enzimáticos. Trabajo de Diploma, Universidad de La Habana, Facultad de Biología, La Habana.
- DOMARD, A.; RINAUD, M. 1983. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 5: 49.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN. 1992a. Antifungal activity of chitosan on two post harvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82: 398-402.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; ASSELIN, A.; BENHAMOU, N. 1992b. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and citological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research* 96: 769-779.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; BENHAMOU, N.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. *Phytopathology* 84: 313-320.
- EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J.; BROWN, G.; IPPOLITO, A.; WISNIEWSKI, M.; WILSON, C. 2000. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial. *Plant Disease* 84: 243-248.
- FALCÓN, A.; RAMÍREZ, M. A.; MÁRQUEZ, R.; HERNÁNDEZ, M. 2002. Chitosan and its hydrolysate at tobacco-*Phytophthora parasitica* interaction. *Cultivos Tropicales* 23: 61-66.
- FALCÓN-RODRÍGUEZ, A. B., COSTALES-MENÉNDEZ, D., ORTEGA-DELGADO, E., LEÓN-DÍAZ, O., CABRERA-PINTO, J. C.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A. 2007. Evaluation of chitosan as an inhibitor of soil-borne pathogens and as an elicitor of defense markers and resistance in tobacco plants. *Spanish Journal of Agricultural Research* 5: 533-541.
- GLASSER, W. 1997. Preparation of N-acetylglucosamine polymers from chitosan for chitin fibers and filaments. Canada Pat CA 2172232.
- GRENIER, J.; ASSELIN, A. 1990. Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Molecular Plant Microbe International* 3: 401-407.
- GUO-JANE, T.; WEN-HUEY, S. 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 62: 239-243.
- HADWIGER, L. 1968. Changes in plant metabolism associated with phytoalexin production. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 74: 163-169.
- HADWIGER, L.; BECKMAN, A. 1980. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiology* 66: 205-211.
- HADWIGER, L.; LOSCHKE, D. 1981. Molecular communication in host-parasite interactions: hexosamine polymers (chitosan) as regulator compounds in race-specific and other interactions. *Phytopathology* 71: 756-762.
- HADWIGER, L. 1986. International Conference on Chitin and Chitosan. En: *Chitin in nature and technology*. (Muzzarelli R.; Jeuniaux C., Gooday G. Eds.) Plenum Press: New York, p. 209.
- HADWIGER, L.; OGAWA, T.; KUYAMA, H. 1994. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and suppression are verified with synthesized oligomers. *Molecular Plant Microbe International* 7: 531-533.
- HADWIGER, L. 1999. Host parasite interactions: Elicitation of defence responses in plants with chitosan. En: *Chitin and chitinases*. (Jolles P., Muzzarelli R.A., eds.). Boston: Birkhauser Verlag 87: 185-200.
- HAMMERSCHMIDT, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 37: 285-306.
- HASSNI, M.; HADRAMI, A.; DAAYF, F.; BARKA, E.; HADRAMI, I. 2004. Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporium* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 195-204.
- HAYES, M.; CARNEY, B.; SLATER, J.; BRUCK, W. 2008. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: Chitin and Chitosan- Part B: Applications. *Journal of Biotechnology* 3: 878-89.
- HELANDER, I.; NURMIAHO, E.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-positive bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 71: 235-244.
- HIRANO, S.; NAGAO, N. 1995. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 3065-3066.
- HOFGAARD, I.; ERGON, A.; WANNER, L.; TRONSMO, A. 2005. The effect of chitosan and Bion® on resistance to pink snow mould in perennial ryegrass and winter wheat. *Phytopathology* 153: 108-119.
- IRRITI, M.; FAORO, F. 2008. Abscisic acid is involved in chitosan induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 1106-1111.
- JITAREERAT, P.; PAUMCHAI, S.; KANLAYANARAT, S.; SANGCHOTE, S. 2007. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*Mangifera indica*) fruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 35: 211-218.
- KAUSS, H.; JEBLICK, W.; DOMARD, A.; SIEGRIST, J. 1997. Partial acetylation of chitosan and a conditioning period are essential for elicitation of H₂O₂ in surface-abraded tissues from various plants. En: *Advances in Chitin Science II* (Alain Domard, G.A.F. Roberts, K.M. Vårum eds.), J. André Publisher, Lyon, pp. 94-101.
- KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology* 160: 859-863.
- LAFLAMME, P.; BENHAMOU, N.; BUSSIERES, G.; DESSUREAULT, M. 1999. Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogen in forest nurseries. *Canadian Journal of Botany* 77: 1460-1468.
- LAREZ, V. C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Rev. UDO Agrícola* 8: 1-22.
- LEUBA, J. L.; STOSSEL, P. 1986. Chitosan and other polyamines: antifungal activity and interaction with biological membranes. En: *Chitin in Nature and Technology* (Muzzarelli R., Jeuniaux C., Gooday G. eds.) Plenum Press, New York, USA pp. 215-222.
- LIU, X.; GUAN, Y.; YANG, D.; LI, Z.; YAO, K. 2000. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymers Science* 79: 1324-1335.
- LIU, W.; YAO, K. 2002. Chitosan and its derivatives a promising non viral vector for gene transfection. *Journal of Controlled Release* 83: 1.
- LIU, N.; CHEN, X.; PARK, H.; LIU, C.; MENG, G. 2006. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* 64: 60-65.
- LIU, H.; TIAN S.; MENG X.; XUA Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 44: 300-306.

- MAUCH, F.; HADWIGER, L. A.; BOLLER, T. 1984. Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinase and α -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiology* 76: 607-611.
- MAUCH, F.; HADWIGER, L.; BOLLER, T. 1987. Antifungal hydrolases in pea tissue I Purification and characterization of two chitinases and two α 1,3 glucanases differentially regulated during development and response. *Plant Physiology* 87: 325-333.
- MAUCH, F.; STAENLING, L. 1989. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinases and α 1,3 glucanases in bean leaves. *Plant Cell* 1: 447-456.
- MENG, X., LI, B., LIU, J.; TIAN, S. 2008. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry* 106: 501-508.
- MILLAR, R.; HIGGINGS, V. 1968. Phytoalexin production by alfalfa response to infection by *Colletotrichum phomoides*, *Helminthosporium turcicum*, *Stemphylium loti* and *S. botryosum*. *Phytopathology* 58: 1377-1383.
- MIMA, S.; MIYA, M.; IWAMOTO, R.; YOSHIKAWO, S. 1983. Highly deacetylated chitosan and its properties. *Journal of Applied Polymers Science* 28: 1909-1917.
- MINAMIKAWA, T.; URITANI, I. 1964. Phenylalanine deaminase and tyrosine deaminase in sliced or black rot-infected sweet potato roots. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 108: 573-574.
- MITCHELL, H.; HALL, J.; BARBER, M. 1994. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiology* 104: 551-556
- MUZZARELLI, R. A. A. 1977. Enzymatic synthesis of **chitin** and chitosan. En: **Chitin**. Pergamon Press, Oxford University pp. 164-167.
- NÁPOLES, M.C.; CABRERA, J.C.; CABRERA, G.; VARELA, M. 1997. Efecto de diferentes polisacáridos sobre el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales* 18: 27-29.
- OGAWA, K.; YUI, T. 1993. Crystallinity of partially N-acetylated chitosans. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57: 1446-1469.
- PALLAS, J. A.; PAIVA, N. L.; LAMB, C. J.; DIXON, R. A. 1996. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 10: 281-293.
- PAZ-LAGO, D.; CABRERA, G.; RAMÍREZ, M.; POMBO, R.; GUTIÉRREZ, A. 1999. Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici* a nivel de bioensayo. *Cultivos Tropicales* 20: 59-61.
- PLASCENCIA, M.; VINIEGRA, G.; OLAYO, R.; CASTILLO, M.; SHIRAI, K. 2003. Effect of chitosan and temperatura on spore germination of *Aspergillus Níger*. *Macromolecular Bioscience* 3: 582-586.
- POSPIESZNY, H. 1999. Potential use of chitosan in plant protection. In: *Chitin and chitosan*. Polish-Russian Monograph. Eds: Struszczuk, H. Pospieszny, H. and Gamzazade, A. pp: 115-130.
- PRASHANTH, H.; THARANATHAN, K. V. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview. *Trends in Food Science & Technology* 18: 117-131.
- RABEA, E.; BADAWY, M.; STEVENS, C.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. 2003. *Biomacromolecules* 4: 1457-1465.
- RHOADES, J.; ROLLER, S. 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organism in laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology* 80-86.
- RINAUDO, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31: 603-632.
- RIVERO, D.; CRUZ, A.; MARTÍNEZ, B.; RAMÍREZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; CÁRDENAS, R. 2004. Efecto protector de la quitosana en semillas de arroz frente a *Fusarium* sp. *Protección vegetal* 19: 140-144.
- RODRÍGUEZ, A. T.; RAMÍREZ, M.; MÁRQUEZ, R.; NÁPOLES, M. 2002. Comparación de la actividad antifúngica de dos productos derivados de quitina sobre el hongo *P. grisea*. *Memorias del 2do Encuentro Internacional del Arroz*. 10 al 12 de julio. Palacios de las Convenciones, Cuba.
- RODRÍGUEZ, A. T.; RAMÍREZ, M. Á.; CÁRDENAS, R.; FALCÓN, A.; BAUTISTA 2006. Efecto de la quitosana en la inducción de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa*, L.) contra *Pyricularia grisea*, Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 1-7.
- RODRÍGUEZ, A. T.; RAMÍREZ, M. A.; CÁRDENAS, R. M.; HERNÁNDEZ, A. N.; VELÁZQUEZ, M. G.; BAUTISTA, S. 2007. Induction of defense response of *Oryza sativa* L. against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. By treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89: 206-215.
- ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; DIVENERE, D.; SALERNO, M. 2002. Effects of Pre- and Postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science* 67: 1862-1867.
- SATHIYABAMA, M.; BALASUBRAMANIAN, R. 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. *Crop Protection* 17: 307-313.
- SATO, H.; MIZUTANI, S.; TSUGE, S. 1998. Determination of the degree of acetylation of chitin/chitosan by pyrolysis-Gas chromatography in the presence of oxalic acid. *Analytical Chemistry* 70: 7-12.
- SHIH-BING, L.; SHAN-HE, CH.; KOU-CHEN, P. 2008. Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of α -chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 238-244.
- SHIMOSAKA, M.; KUMEHARA, M.; ZHANG, X. Y.; NOGAWA, M.; OKAZAKI, M. 1996. Cloning and characterization of a chitosanase gene from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82: 426-431.
- SUDARSHAM, N.; HOOVER, D.; KNORR, D. 1992. *Food Biotechnology*, 6: 257.
- SUGIMOTO K. 1999. Preparation and characterization of chitin and chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers* 36: 49-59.
- TEJCHGRABER, P., POPPER, L.; KNORR, D. 1991. Chitosan as an elicitor for the production of chitinase and antifungal enzyme from soybean seeds. *Agro-Ind. Hi-Tech*. 11-14.
- TROTEL, P.; COUDERCHET, M.; VERNET, G.; AZIZ, A. 2006. Chitosan stimulates defence reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 114: 405-413.
- UCHIDA, Y.; TATEICHI, K.; SHIDA, O.; KADOWAKI, K. 1992. Purification and enzymatic properties of chitosanase from *Bacillus licheniformis* UTK and their application. En: *Advances in Chitin and Chitosan*. (Brine Ch. J., Sandford P. A., Zikakis J.

- P., eds.) Elsevier Applied Science, London and New York pp. 282-291.
- VAN LOON, L. C. 1999. Occurrence and properties of pathogenesis-related proteins. En: Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press, 193 p.
- VANDER, P.; VARUM, K.; DOMARD, A.; EL GUEDDARI, N.; MOERSCHBACHER, M. 1998. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharide to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiology* 118: 1353-1359.
- VASYUKOVA, N. I.; ZINOVEVA, S. V.; ILINSKAYA, L. I.; PEREKHOD, E. A.; CHALENKO, G.I.; GERASIMOVA, N.G.; ILINA, A.V.; VARLAMOV, V.P.; OZERETSKOVSKAYA, O.L. 2001. Modulation of plant resistance to disease by water soluble chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37: 103-109.
- WEI, W.; YU, D.; XIAO, W. 2008. Physical properties of fungal chitosan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2717-2720.
- WISNIEWSKA, M.; NIEKRASZEWICZ, A.; CIECHANSKA, D.; POSPIESZNY, H.; ORLIKOWSKI, L. 2007. Biological properties of chitosan degradation products. Polish Chitin Society, Monograph XII, 149-156.
- YALPANI, N.; LEON, J.; LAWTON, M.; RASKIN, I. 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* 103: 315-321.
- YU, R.; HANG, Y. D. 1989. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L (+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters* Vol 11: 597-600.
- ZAMANI, A.; EDEBO, L.; SJOSTROM, B.; MOHAMMAD, J. 2007. Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. *Biomacromolecules* 8: 3786-3790.
- ZHANG, Y.; PUNJA, Z. 1994. Induction and characterization of chitinase isoforms in cucumber (*Cucumis sativus*): effect of elicitors, wounding and pathogen inoculation. *Plant Science* 99: 141-150.