

Revisión bibliográfica

LA QUITOSANA: UN PRODUCTO BIOACTIVO DE DIVERSAS APLICACIONES

Ileana Hernández✉

ABSTRACT. This review is made with the purpose of being used as help or a guide book for those who pretend to get into the complex world of chitosans and its oligomers. In this work, some detailed topics present are related to obtain and characterize chitosans, according to its degree of acetylation and molar weight, taking into account the importance of these two factors and their influences on the application of this product, mainly in agriculture.

Key words: chitosan, bioproducts

RESUMEN. Esta revisión bibliográfica está hecha con la intención de que sirva como ayuda o guía de consulta a quienes pretendan adentrarse en el complejo mundo de las quitosanas y sus oligómeros. En este trabajo se exponen algunos tópicos detallados relacionados con la obtención y caracterización de quitosanas, de acuerdo esta última al grado de acetilación y masa molar, atendiendo a la importancia que revisten estos dos factores por sus influencias en las aplicaciones de este producto fundamentalmente en la rama agrícola.

Palabras clave: quitosana, productos bioactivos

INTRODUCCIÓN

La quitosana es un polímero lineal formado por monómeros de D-Glucosamina, los que se encuentran unidos por enlaces $\beta(1,4)$, siendo nombrada químicamente: 2-Amino-2-Desoxi- β -D-Glucopiranos. Su masa molar puede variar en el rango de 10 000 hasta el orden de los millones de Daltons. La quitosana es un producto natural derivado de la quitina, que es un polisacárido presente en el exoesqueleto de artrópodos y zooplancton marinos, formando parte de la pared celular de algunas familias de hongos y levaduras (1), también está presente en las alas de especies de insectos, siendo importante señalar que estos polisacáridos son dos de los más abundantes en la naturaleza. Se define la quitosana y la quitina como solubles o insolubles en ácido acético a 0.1 mol.L^{-1} respectivamente o por el grado de desacetilación (2). La quitina con más de un 50 % de desacetilación es considerada quitosana e incluso

otros la definen como tal ante un grado de desacetilación superior al 60 %. Usualmente en el caso de las quitosanas, se establece que el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98 % (3).

Es de particular interés la característica de las quitosanas de cargarse positivamente en un medio ácido asumiendo un rol único entre los glucanos (4), siendo los grupos amino responsables de esta densidad de carga positiva que hace al biopolímero soluble en sistemas acuosos. El carácter policatiónico del polímero también es responsable de las interacciones de carga con las superficies aniónicas, lo que es crucial en las propiedades bioadhesivas de las quitosanas que son de gran utilidad para su aplicación en la industria de cosméticos y en la farmacéutica (5). El carácter hidrofílico e hidrofóbico de la quitosana, dado por los grupos amino y N-acetilamino respectivamente, hacen de este polímero un contribuyente potencial a la estabilidad de las emulsiones. El carácter básico de la quitosana combinado a otras propiedades de ella, como la posibilidad de obtener quitosanas con distintas viscosidades, la facilidad para modificarlas químicamente, además de resultar un producto biodegradable y

biocompatible (6), hacen de la quitosana un producto con una amplia gama de aplicación en distintas ramas como la biomedicina, biotecnología, medicina, tratamientos de aguas, industria alimenticia, floculación y coagulación de proteínas y aminoácidos.

Estudios realizados anteriormente demuestran que tanto la quitosana como sus productos oligoméricos de degradación presentan actividad antifúngica y antibacteriana *in vitro* (7), además de ser elicitores de mecanismos de defensa en plantas (8). Climas tropicales como el nuestro favorecen el ataque de hongos a nuestros cultivos, provocando irreparables daños; de ahí la gran importancia que reviste la obtención de oligosacáridos de quitosanas de una manera adecuada y lo más optimizada posible.

Los oligosacáridos de quitosana pueden obtenerse por dos métodos fundamentalmente: químicos (9) y enzimáticos. Sin embargo, la degradación enzimática de los polímeros de quitosana posee una mayor efectividad, debido a que el curso de la reacción de hidrólisis y la distribución de los productos de ella, están sujetos a un mejor control, además de propiciar este método un rendi-

Ileana Hernández, Investigadora del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700

✉ ileana@inca.edu.cu

miento mayor de los productos de hidrólisis (10).

MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE QITOSANAS

El método más empleado en la obtención de quitosana es la reacción de conversión de quitina en quitosana por tratamiento directo de la quitina con hidróxido de sodio o hidróxido de potasio (40-50 %) a temperatura de 100°C o más, con hidrólisis de la mayoría de los grupos acetilo del polímero.

Se conoce que el aumento de la solubilidad del producto final (quitosana) está en estrecha relación con la distribución de los grupos N-acetilados en la cadena polimérica (11).

Los grupos N-Acetilo (-NH-COCH₃) no pueden ser hidrolizados por reactivos ácidos, pues pueden provocar la hidrólisis del polisacárido, luego, los métodos alcalinos siendo más "suaves" resultan más comunes en la desacetilación de la quitina (12). Para este proceso, son necesarias ciertas condiciones que eviten la degradación del polímero y permitan la obtención de buenos rendimientos del producto final (quitosana). Los factores que afectan el rendimiento en la obtención de quitosana son:

Temperatura de desacetilación. Este efecto se ha estudiado mucho, a medida que aumenta la temperatura de reacción se incrementa el porcentaje de desacetilación, aunque el tamaño del polímero disminuye, debido a las reacciones de degradación que sufren los polisacáridos con la temperatura (13). Se ha comprobado que existe una relación lineal entre la temperatura y el grado de desacetilación en el intervalo entre 40-150°C.

Tiempo de reacción y concentración alcalina. A una temperatura de 100°C y una concentración alcalina del 50 %, algunos autores estudiaron que el grado de desacetilación que se alcanza es del 68 % durante la primera hora de reacción, pasado este tiempo decrece el progreso de la reacción, alcanzándose un 78 % de desacetilación al cabo de las cin-

co horas; luego el tratamiento alcalino después de las dos horas no produce cambios significativos en el grado de desacetilación, pero sí en la degradación de la cadena macromolecular de la quitosana (14). Estos autores estudiaron varias concentraciones de disoluciones alcalinas en el intervalo entre 35-50 %, comprobándose que a medida que disminuye la concentración del hidróxido disminuye la viscosidad y el tamaño de partícula de la quitosana. Sin embargo, si son muy "suaves" las condiciones, se puede obtener que el producto resultante sea insoluble en soluciones ácidas. El aumento del tiempo de reacción para una concentración de hidróxido dada y una temperatura determinada, produce una disminución de la viscosidad y el tamaño del biopolímero.

Por otra parte, se ha estudiado la influencia de la concentración hidroxílica en el intervalo de 30-65 % (en masa) en la producción de quitosana a temperatura ambiente. Estos investigadores encontraron que a medida que aumenta la concentración de la disolución alcalina, el tiempo de reacción necesario para la obtención de una quitosana soluble en ácido disminuye, a partir de una concentración de solución salina de 45 % (1).

De forma general, se puede concluir que la disminución de la concentración de la disolución hidroxílica provoca que se requiera un tiempo mayor para obtener una quitosana soluble en medio ácido. Por tanto si se incrementa la concentración hidroxílica el tiempo necesario para obtener una quitosana soluble en ácido, será menor. Se debe tener presente que un incremento de tiempo en la reacción provocará una reducción del tamaño de la cadena polimérica en la quitosana obtenida. *Efecto debido a las condiciones de obtención de quitina.* El tamaño molecular de la quitosana se ve afectado por el proceso de desmineralización del material inicial del que se obtiene la quitina (15, 16) puesto que en este proceso para eliminar las impu-

rezas inorgánicas se emplean ácidos como el HCl (hasta el 10 %) y otros como el ácido nítrico, fórmico entre otros, los que se utilizan a temperatura ambiente y en ocasiones también a altas temperaturas en este proceso. Estos ácidos así como las condiciones en que se lleve a cabo este proceso pueden provocar la hidrólisis de la cadena polimérica y por tanto quede afectado el tamaño molecular de la quitosana que se obtiene. La viscosidad de una solución de quitosana disminuye con el incremento del período de desmineralización empleado en la obtención de quitina cuando el pH empleado sea igual o mayor que 3 (17).

La desproteínización de la quitina se lleva a cabo por dos métodos: alcalino y enzimático. El primero de estos se lleva a cabo empleando hidróxido de sodio al 3 %, obteniéndose quitosana de alta masa molar y mayor viscosidad; se informa que hasta un 10 % la concentración de álcali es permisible en este proceso. El método enzimático es una alternativa de tratamiento de desproteínización pero, además de emplear más tiempo, deja un pequeño porcentaje de proteína residual que es difícil de eliminar excepto con otras técnicas como el ultrasonido. Se ha estudiado que el empleo de la enzima Rhozyme 62 produce quitosanas de menor masa molar que mediante el alcalino, posiblemente debido a degradaciones enzimáticas de la quitina producto de las carbohidrasas de la Rhozyme 62 (18). Atendiendo a esto, es lógico que en el proceso de desproteínización se emplee preferentemente disoluciones acuosas y diluidas de hidróxido de sodio con el fin de disolver las proteínas presentes.

La presencia de coloraciones en el producto inicial o en el que obtenemos luego de los tratamientos ácidos y básicos puede ser eliminada mediante un proceso de decoloración que puede emplear solventes orgánicos como etanol, acetona y acetato de etilo, aunque a veces no se obtienen muy buenos resultados con ellos y puede también utilizarse

agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio, con el inconveniente de que al ser oxidantes pueden atacar los grupos amino libres del producto final que se obtiene. Debido a todo lo anterior, se hace vital escoger bien las condiciones para realizar este proceso así como su requerimiento de realizarse o no según el interés que se persiga con el producto a obtener.

Atmósfera. En 1936, Rigby demostró que cuando la reacción de obtención de quitosana se realiza en presencia de oxígeno, se aprecian sustanciales efectos en la quitosana final; este hecho fue corroborado posteriormente por Lusena y Rose en 1953 (18). En una atmósfera de nitrógeno aumenta el rendimiento de reacción, la viscosidad de la quitosana obtenida y la masa molar. El efecto degradativo del oxígeno del aire es mucho más pronunciado cuando aumenta el tiempo de reacción.

Proporción de quitina en disolución alcalina. Durante el proceso de desacetilación es necesaria una adecuada agitación con el fin de obtener uniformidad en la reacción. Para ello se requiere un alto grado de fluidez en la mezcla de reacción. Estudios realizados demuestran que la relación de quitina en la disolución alcalina juega un papel fundamental en este aspecto (16). En la literatura se informan relaciones quitina: disolución desde 1:10 hasta 1:100. La proporción adecuada para la obtención de una quitosana adecuada es de 1:10 hasta 1:100. En 1994, se demostró que un incremento (1:15 y 1:20) en la relación quitina: disolución de álcali no mostró ningún efecto en el grado de desacetilación de la quitina con respecto a una relación quitina: álcali de 1:10 (19).

Tamaño de partícula. La velocidad de desacetilación viene determinada por la extensión del hinchamiento de las partículas de quitina en disolución. A menor tamaño de partícula de quitina se requerirá menor tiempo para el hinchamiento de estas, lo cual hace que la velocidad de desacetilación sea mayor y viceversa. Tamaños de

partícula de 1 mm permiten obtener una quitosana de alta viscosidad y una masa molar superior que cuando se trabaja con partículas cuyo tamaño oscila entre los 2 y 6 mm (18). **Otras técnicas alternativas en la obtención de quitosanas.** Existen otros métodos empleados en la obtención de quitosana a partir de quitina. Mediante procesos termoquímicos se ha llevado a cabo la reacción en un reactor donde se realiza la reducción de la quitina a 230°C y concentración alcalina de 10 % durante un minuto a presión. En 1990, se realizó una descompresión repentina y posterior tratamiento durante 24 horas a la temperatura de 4°C de la disolución, alcanzando una desacetilación completa de la quitina (20).

Una técnica sencilla y barata de obtención de quitosana es el tratamiento de la disolución de quitina en disolución alcalina a temperatura ambiente, la concentración de la disolución alcalina es del 50 % y la relación quitina: disolución alcalina es de 1:56 variando el tiempo de reacción (1). Otros trabajos se refieren al hecho de utilizar disoluciones de álcali mezcladas con solventes orgánicos como 2-propanol, 2-metil-2-propanol o acetona (21). El uso de estos diluyentes hace posible el uso de concentraciones de álcali más pequeñas que las empleadas sin ellos. Sin embargo, el grado de desacetilación y la viscosidad de la disolución del producto final es menor que cuando se utiliza únicamente álcali en las mismas condiciones de temperatura y tiempo.

Por otra parte, en 1983 se estableció un método de preparación de quitosana con un grado de desacetilación cercano al 100 %, sin tener degradaciones significativas en la cadena polimérica (22). El método consiste en lavar sucesivamente el producto intermedio con agua dos o más veces, durante el tratamiento alcalino a un tiempo menor de cinco horas para una concentración alcalina del 47 % y a una temperatura de 110°C. En 1998, se obtuvo quitosana a partir de camarones de camarón tigre (*Penaeus monodon*),

desacetilando la quitina dos veces, con disoluciones de álcali al 50 % bajo vacío durante 30 min. a 100°C, obteniendo productos con un grado de desacetilación entre 43 y 54 % (23). Una desacetilación prolongada a 45 min en las mismas condiciones incrementó el grado de desacetilación a 57 y 68 % en el primer y segundo tratamientos respectivamente.

En 1983 se estableció un método de obtención de quitosana completamente desacetilada sin disminución excesiva de la masa molar; el método incluye el empleo de tiofenol durante los tratamientos sucesivos de álcali durante una hora y a una temperatura de 100°C. El empleo del tiofenol garantiza que se atrape el oxígeno, evitando así la degradación polimérica y ejerciendo a su vez un efecto catalítico en la reacción de obtención (4).

Existe otro método de obtención de quitosana, que constituye una alternativa muy atractiva, y que consiste en el empleo de la enzima quitina-desacetilasa, la cual cataliza la reacción de conversión de quitina en quitosana por desacetilación de los residuos de N-acetil-D-glucosamina. La actividad de la enzima quitina-desacetilasa a partir del hongo *Mucor Rouxii*, ha sido estudiada (25) y también ha sido informada la actividad de esta enzima en otros hongos por diferentes investigadores. La purificación completa de esta enzima y posterior caracterización fue presentada recientemente y en 1998, partir del *Mucor Rouxii* (24), desde entonces se ha realizado la purificación y caracterización de quitina-desacetilasa de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Absidia coerulea* y *Aspergillus nidulans*. Recientemente se han clonado dos genes que codifican al ADN de la enzima quitina-desacetilasa, a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, apreciándose que las enzimas purificadas exhiben diferentes roles en cuanto a potencial biológico. Este método de obtención de quitosanas permite también determinar el grado de desacetilación monitoreando la cantidad de grupos acetilo liberados por

la acción de la enzima sobre el sustrato quitinoso, de acuerdo con la cantidad de NADH formados. Existen otras variantes más actualizadas de desacetilación de la quitina empleándose radiaciones de microondas y ultrasonido.

Se puede afirmar que el grado de desacetilación de las quitosanas influye notablemente sobre sus propiedades químicas y físicas así como en su actividad biológica, siendo este determinante en diversas aplicaciones como en la adsorción de iones metálicos, en películas de quitosana donde es responsable de la fuerza de tensión de estas, en su actividad inmunológica y acción enzimática, entre otras.

Debido a lo anteriormente expuesto, es de particular importancia el control adecuado de los parámetros de reacción en la obtención de quitosanas, de manera que se garantice la reproducibilidad en el proceso de desacetilación, aunque es necesario acotar que el origen biológico del material de partida es un parámetro que también influirá en la reproducibilidad del proceso (3).

CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANA

Dos de los parámetros que revisten mayor importancia en la caracterización de quitosana son la masa molar y el grado de acetilación del polímero en cuestión, de ahí que distintos autores hayan desarrollado diferentes métodos que facilitan la determinación de estas variables determinantes en el estudio de quitosana.

Determinación de la masa molar de quitosana. Para determinar la masa molar de cadenas poliméricas, varios métodos han sido desarrollados, entre ellos la viscosimetría y la cromatografía de permeación de gel, los cuales son relativamente fáciles de desarrollar y no consumen mucho tiempo; por otra parte, están empíricamente relacionados con la masa molar, debido a que las mediciones dependen del volumen hidrodinámico de la macromolécula,

el cual está en función de la masa molar, de las propiedades conformacionales y de las interacciones polímero-solvente (26). En estos casos se requiere de una curva de calibración; por el contrario, el método de dispersión de la luz desarrollado por Hughlin en 1972, aporta valores absolutos de masa molar, pero la técnica es difícil de interpretar en presencia de asociaciones y/o agregaciones en las disoluciones. Los métodos comúnmente empleados en la determinación de la masa molar de la quitosana se describen a continuación:

a. Viscosimetría: En esta técnica, primeramente se preparan disoluciones de quitosana de diferentes grados de desacetilación en soluciones acuosas de acetato de sodio 0.2 mol.L^{-1} ácido acético 0.5 mol.L^{-1} . Las medidas de la viscosidad de las soluciones se realizan por comparación del tiempo de flujo o caída de un volumen específico de solución polimérica (t) a través de un tubo capilar con el correspondiente tiempo de flujo o caída del solvente (t_0). A partir de t , t_0 y la concentración del soluto, se definen ecuaciones que relacionan este parámetro con las viscosidades relativa, específica e intrínseca, donde la concentración del polímero se expresa en g.dL^{-1} y la viscosidad intrínseca se expresa en dL.g^{-1} . Aunque es práctica habitual utilizar directamente el valor de la viscosidad como índice de la masa molar, es posible calcular a partir de la viscosidad intrínseca, la masa molar mediante la ecuación de Mark-Houggins. La correlación entre la viscosidad intrínseca y la masa molar queda expresada en la siguiente ecuación:

$$[\eta] = K.M^a$$

donde K y a son parámetros viscosimétricos que están en función del solvente y del tipo de polímero. Para quitosanas disueltas en acético 0.5 mol.L^{-1} -acetato de sodio 0.2 mol.L^{-1} los valores de K y a son $3.5 \cdot 10^{-4}$ y 0.76 respectivamente y son independientes del grado de desacetilación (27).

b. Cromatografía de exclusión por tamaño: Aunque la técnica cromatográfica de exclusión por tamaño es una técnica establecida en la práctica habitual, da una medida de las masas molares de polímeros y su distribución. A título recordatorio para las personas no familiarizadas en el tema, permite la separación de fracciones de polímeros en función de su tamaño, en columnas cromatográficas rellenas de geles. En esta técnica una muestra de solución diluida en acetato de sodio 0.2 mol.L^{-1} -ácido acético 0.5 mol.L^{-1} , se introduce en las columnas junto a la fase móvil y pasa a través de ellas. Las cadenas del polímero disueltas se difunden a través de los geles (fase estacionaria), en dependencia de su tamaño. Grandes cadenas del polímero solo pueden difundir pequeñas cantidades en los poros de la fase estacionaria o son completamente excluidas, por tanto, requieren poco tiempo para atravesar la columna. Cuando las cadenas son pequeñas ocurre todo lo contrario. Al final de la corrida y empleándose un detector adecuado, se obtiene una curva de elución de cantidad de polímero contra el tiempo de retención (t_r) de diferentes tamaños moleculares. La masa molar se determina mediante una curva de calibración del sistema, en términos del tiempo de retención obtenido con patrones de masa molar conocidas (no siempre disponibles), por lo que suele utilizarse el poliestireno como patrón universal.

En contraste con los polímeros neutros, la caracterización de quitosana por cromatografía de exclusión por tamaño presenta ciertas complicaciones al ser esta un polielectrólito; primeramente, la forma y el tamaño de la molécula del polielectrólito depende fuertemente de la fuerza iónica del medio y además existen fenómenos de ión-inclusión y de ión-exclusión, mientras el primero no es fácil de eliminar, el segundo puede evitarse con la adición de un electrólito de baja masa molar a la fase móvil. Por otra parte, el pH de la solución es un factor a tener en cuenta, ya que mediante

este parámetro se logra controlar el grado de ionización de las especies poliméricas y de los grupos funcionales del soporte. Todas las interacciones entre el polímero y la columna son indeseables. Para controlar estos problemas, la determinación de la masa molar de la quitosana se realiza utilizando como fase móvil una solución de ácido acético 0.5 mol.L^{-1} , ya que este elimina la ionización de los grupos carboxílicos presentes en la superficie del soporte de la columna y reduce la adsorción de quitosana. La adición de acetato de sodio 0.2 mol.L^{-1} genera una fuerza iónica que elimina los efectos de ión-exclusión.

c. Dispersión de la luz (DL): El método en cuestión consiste en la medición de la intensidad de luz dispersada por una disolución de polímero, en función del ángulo de dispersión (θ) y la concentración (c). El requisito para que exista dispersión de la luz es la aparición de regiones "transitorias" con índices de refracción diferentes al del medio circundante. La intensidad de la luz dispersada es proporcional al cuadrado de la diferencia en cuanto al índice de refracción entre la solución y el solvente puro, además de la cuarta potencia de la longitud de onda (λ) y de la masa molar del soluto. La dependencia angular de la luz dispersada surge de la interferencia de los rayos de luz de las diferentes partes de la misma molécula del polímero; esta interferencia nos brinda información del tamaño de la molécula expresado como R_g que es independiente de la masa molar. Este efecto desaparece a ángulos (θ) cercanos a "0", después de la extrapolación a $\theta = 0$, el valor exacto de la masa molar se obtiene sin tener en cuenta el tamaño de la molécula. Finalmente, el segundo coeficiente del virial, A_2 , medida de las interacciones polímero-solvente, es determinado por la pendiente de la curva de luz dispersada contra la concentración, extrapolando a cero. La ecuación que permite el cálculo de la masa molar se describe a continuación:

$$K_c/Hq = 1/M_w + 2A_2 c$$

Donde Hq es el factor de dispersión y K_c es una constante óptica, los que se pueden calcular mediante expresiones matemáticas que relacionan la diferencia de las intensidades entre la luz dispersada de la disolución y el solvente a un ángulo determinado q en el caso del factor de dispersión Hq y la intensidad de luz dispersada del solvente a $q = 90^\circ$ y el incremento del índice de refracción específico para el cálculo de K_c .

Determinación del grado de acetilación. Uno de los parámetros de mayor importancia a la hora de caracterizar la quitosana es el grado de acetilación (GA). Este parámetro se define como el número de unidades acetiladas ($-\text{NHCOCH}_3$) presentes en la estructura de la molécula de quitosana. Se han propuesto en la literatura, diversos métodos para la obtención del GA. Con sus ventajas y desventajas estos métodos son de gran utilidad en los estudios de caracterización de este polímero natural. A continuación se muestran los métodos más empleados en la determinación del GA.

a. Espectroscopía Ultra Violeta-Visible: El método consiste en la determinación de las alturas correspondientes (H) a la primera derivada de los espectros ultravioleta de disoluciones de concentración conocida de N-Acetilglucosamina en ácido acético 0.01 mol.L^{-1} , entre los 240 y los 190 nm, utilizando como referencia agua.

Debido a que el ácido acético presenta contribuciones de absorción a 199 nm, donde las soluciones de N-Acetilglucosamina presentan un máximo, primeramente se obtienen los espectros de la primera derivada para concentraciones de ácido acético conocidas, para así determinar el punto cero, donde se entrecruzan estas curvas, desde este punto se miden los valores verdaderos de H . De estas medidas se obtiene una curva de calibración de H contra concentración de N-Acetilglucosamina (c), y la correspondiente ecuación de la recta $H=f(c)$.

Posteriormente se prepara una solución de 500 g de quitosana en 50 mL de disolución de acético 0.1 mol.L^{-1} y se disuelve totalmente en 500 mL de agua. Se registra el espectro ultravioleta empleándose cubetas de 1 cm de camino óptico, en el mismo intervalo de longitudes de onda mencionado anteriormente. El valor de pH obtenido se sustituye en la ecuación obtenida para la curva de calibración y el valor de c que se obtiene es directamente el grado de acetilación de la quitosana valorada.

Diferentes espectrofotómetros pueden ser usados en este método: por ejemplo, el Beckman DU 640, Kontron Uvikon 810 y Perkin Elmer 550 SE. Cuando el grado de acetilación de la quitosana es menor o igual a un 20 %, los errores asociados con la lectura son grandes, recomendándose en estos casos los métodos basados en la reacción del grupo amino libre, entre los cuales se encuentran el método de titración coloidal u otros métodos colorimétricos desarrollados a partir del método de Elson-Morgan (28).

b. Espectroscopía Infrarroja (IR): Por su sencillez, la espectroscopía infrarroja es quizás el método más empleado en la determinación cuantitativa del GA de quitosana.

El método consiste en la medida de las intensidades de las bandas de absorción correspondientes a amida I y amida II, utilizando una referencia interna para corregir el espesor de la muestra en un filme o la concentración en la pastilla de Bromuro de Potasio (KB_r).

Filmes: Se preparan filmes de disoluciones 0.5 % en masa de quitosana a partir de disoluciones de acético 0.1 mol.L^{-1} , que se secan a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente, se lavan en disoluciones de amonio en metanol, luego en agua y se secan a 60°C bajo vacío otras 24 h.

Pastillas: Se mezclan 2 mg de la muestra en polvo con 10 mg de KB_r y se obtiene la pastilla a vacío, según el procedimiento habitual. La pastilla se seca posteriormente du-

rante 24h a 110°C y se mantiene en un desecador al vacío hasta su registro en el espectrofotómetro.

Una vez obtenidos los espectros correspondientes, el GA se calcula mediante la relación de bandas de absorción $A_{\text{amida}}/A_{\text{referencia}}$. En la literatura se proponen diferentes relaciones de bandas, siendo la más reciente la propuesta por Baxter, A_{1655}/A_{3450} , que toma como línea base la comprendida entre los 4000 cm^{-1} y los 2500 cm^{-1} para la banda A_{3450} correspondiente al grupo OH de la quitosana y entre los 1800 cm^{-1} y los 1600 cm^{-1} para la banda de absorción en los 1655 cm^{-1} correspondiente a la Amida I. El grado de acetilación se obtiene a través de la expresión:

$$\text{GA}(\%) = (A_{1655}/A_{3450}) \cdot 115$$

Mediante este procedimiento se obtienen buenos resultados para muestras con un grado de acetilación entre 0 y 55 %. Sin embargo; cuando se trabaja con muestras que presentan un alto grado de acetilación, el método pierde precisión, debido a que la absorción en 1655 cm^{-1} es una mezcla de dos componentes: una centrada en 1655 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de tensión N-H₂. Teniendo esto en cuenta, se propone medir la absorción a 1655 cm^{-1} con una línea base entre los 1800-1500 cm^{-1} y para la banda de absorción a 1630 cm^{-1} una línea base entre 1650 y 1600 cm^{-1} . En este caso el GA se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{GA}(\%) = [(A_{1655}/A_{3450}) + (A_{1630}/A_{3450}) - 0.13] \cdot 85.5$$

Los resultados mediante esta expresión presentan una buena correlación con los obtenidos mediante RMN-H para un grado de acetilación entre 0 y 100 %. El único inconveniente de esta técnica es que la cantidad de muestra debe ser lo suficientemente pequeña como para asegurar que la banda OH posea una transmisión cercana al 10 % y que en el caso particular de una quitosana a la que se varía su estructura mediante acetilación con disoluciones ácidas de ácido clorhídrico, todos los grupos éster presentes como impurezas deben ser eliminados del medio con una disolu-

ción etanólica de concentración 0.5 mol.L⁻¹ de hidróxido de potasio (KOH), antes de registrar los espectros.

c. Análisis Elemental: En este caso, el grado de acetilación se calcula a partir del contenido de nitrógeno presente en la muestra de quitosana y del contenido de material inorgánico presente en su residuo después de una hora de tratamiento térmico a 600°C. La expresión utilizada en este caso es:

$$\% \text{GA} = [(8.695 - \% \text{N}) / 1.799] \cdot 100 \%$$

Donde 8.695 es el porcentaje de nitrógeno presente en una muestra de quitosana completamente desacetilada, 1.799 es la diferencia entre 8.695 y 6.896 (porcentaje de nitrógeno en una muestra de quitina completamente acetilada) y el porcentaje de nitrógeno obtenido de la fracción orgánica analizada.

d. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear: La determinación del grado de acetilación por RMN es la técnica más utilizada para el estudio de estructuras de carbohidratos (29). La caracterización por RMN es simple, rápida y forma parte de la rutina de análisis de estos compuestos. En principio las técnicas de RMN protónico y de carbono-13, son aplicables para la determinación del grado de acetilación. Sin embargo, la espectroscopía de ¹³C se aplica de forma más extensiva para el caso de muestras sólidas, donde se utilizan también algunos aditivos que mejoran la sensibilidad y la resolución de esta técnica, como son el desacoplador de protón de alta potencia para polarización cruzada/desacoplamiento dipolar de protón.

La mayor dificultad para aplicar esta técnica es la baja solubilidad de la quitosana en disolventes comunes utilizados en este tipo de determinaciones. Para minimizar esta dificultad se utiliza como disolvente agua deuterada (D₂O), a pH=3, ajustando con ácido clorhídrico o bien obteniendo el derivado clorado de la quitosana, el cual es bastante soluble en agua deuterada. Generalmente la determinación se realiza a temperaturas que oscilan entre 70 y 90°C, con el fin de disminuir el efec-

to de la viscosidad. Es recomendable usar campos altos debido a la simplificación que se obtiene en los espectros. En RMN H⁻¹, especialmente a campos bajos, la señal del disolvente solapa las señales de resonancia de los carbohidratos y hace difícil su análisis. El cálculo de GA de la quitosana se determina por la relación entre la intensidad relativa de la señal del protón N-acetilado y las intensidades de las resonancias de los restantes protones.

e. Potenciometría: Otro de los métodos empleados en la determinación del porcentaje de desacetilación de quitosana es el de la valoración potenciométrica de quitosana con hidróxido de sodio 0.2 mol.L⁻¹. La quitosana se disuelve previamente en ácido clorhídrico 0.3 mol.L⁻¹. Con los resultados obtenidos en la valoración se hace un gráfico y se obtienen los puntos de equivalencia por el método de las tangentes. Se obtiene la masa equivalente según la fórmula:

$$M_{\text{Equivalente}} = \text{Masa quitosana (gr)} / c(\text{NaOH}) \cdot v(\text{NaOH})$$

El V(NaOH) es la diferencia entre los dos puntos de inflexión del gráfico obtenido; en cuanto a la masa de quitosana se le debe corregir el porcentaje de humedad y cenizas pues ambos valores pueden influir sobre la pesada.

Se obtiene el porcentaje de desacetilación de la quitosana mediante la expresión:

$$\% \text{Desacetilación} = 203 / (42 + M_{\text{Equivalente}})$$

donde 203 es la masa molar de la glucosamina y 42 es la masa molar del grupo acetilo.

f. Otros métodos: Otros métodos son también empleados para la determinación del grado de acetilación como el enzimático, empleándose para esto quitosanas con diferentes grados de acetilación y las enzimas exo-β-D-glucosaminidasa y β-N-acetilhexosaminidasa de *Bacillus pumilus*. La cuantificación de la glucosamina y N-acetilglucosamina liberadas son determinados mediante ensayos colorimétricos y el grado de desacetilación es calculado mediante la ecuación:

$$\text{GD}(\%) = 100 [\text{GlcN} / (\text{GlcN} + \text{GlcNac})]$$

donde GlcN es la concentración de glucosamina y GlcNAc es la concentración de N-acetilglucosamina dada en $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$. El pH empleado en este método está comprendido en el rango de 5 a 6 que es donde se informa la mayor actividad de las enzimas exo- β -D-glucosaminidasa, β -N-acetilhexosaminidasa y quitosanasa. La titración coloidal y la hidrólisis ácida empleando HPLC son otros métodos que permiten la determinación de grado de acetilación de quitosanas.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE QUITOSANA

Aún cuando la quitosana mejora las condiciones de solubilidad comparada con la quitina, su empleo en el campo biológico presenta dificultades, dado fundamentalmente por el pH de la solución de la misma a emplearse, así como el tamaño del polímero que debe actuar a niveles celulares, debido a esto el estudio de derivados de quitosana solubles en agua comenzó a cobrar interés en el mundo científico, partiendo del conocimiento de la existencia en muchas especies de plantas de las enzimas quitinasas y quitosanasa capaces de hidrolizar quitinas y quitosanas hasta fragmentos de oligosacáridos solubles.

Estudios realizados hace varios años han demostrado que los oligómeros de quitosana presentan actividad antipatogénica (7, 30, 31), además de activar mecanismos de defensa en la planta tratada (8, 32); distintos autores sugieren que debido al tamaño molecular menor de los oligómeros, estos pudieran ser más efectivos en plantas (33) al ser más fácilmente absorbidos por la misma vía raíz o por aspersión foliar, evitando también cualquier inconveniente a presentarse con la solubilidad de las quitosanas así como con su alta viscosidad en soluciones concentradas; sin embargo, estudios realizados demuestran que este criterio no es absoluto y que en ciertos casos las quitosanas resultan elicitores más efectivos y presentan mayor carác-

ter antifúngico y antibacteriano que sus oligómeros, por lo que nos hace sugerir la idea de que el tamaño molecular aunque es un factor muy importante a tener en cuenta, no resulta el único a valorar al determinar cuán efectivo será para la planta el elicitore o cuánto inhibirá el crecimiento fúngico o bacteriano, por lo que se deben analizar la influencia de otros factores como son el tipo de cultivo que se esté tratando, las características del patógeno en específico, la composición de la pared celular de estos, el grado de desacetilación de la quitosana empleada y el pH de la disolución empleado (34, 35).

La hidrólisis de quitosana puede llevarse a cabo esencialmente por dos métodos: químico y enzimático. El método enzimático resulta el más ventajoso, atendiendo a las desventajas de la depolimerización química que conlleva a la desacetilación de los oligómeros resultantes, la dificultad en el control de la depolimerización, los bajos rendimientos de oligómeros de mayor grado de polimerización, debido a que las hidrólisis mediante agentes químicos se efectúan un poco al azar, pues los grupos NH_2 de la quitosana, al protonarse, forman una especie de escudo electrostático que impide el acercamiento ácido debido a la repulsión de cargas; además de estos inconvenientes de la vía química, el método enzimático tiene la gran ventaja de no producir desacetilación en los oligómeros resultantes y de que el ataque enzimático sea mucho más específico, garantizando esto mejores rendimientos de reacción si lo comparamos con los métodos químicos. Un ejemplo elocuente es una quitosana (GA=42%) hidrolizada con la proteasa papaina a 25°C de temperatura y empleando un tiempo de reacción de 48 horas produce un resultado equivalente a una hidrólisis de la quitosana con ácido clorhídrico 0.6 mol.L⁻¹ a 25°C empleando un tiempo de reacción de 20 días (10).

Es de interés aclarar que pese a estas limitaciones el método químico es empleado por distintos in-

vestigadores para depolimerizar quitosanas, ajustando determinadas condiciones que garanticen la efectividad de la hidrólisis, como por ejemplo la hidrólisis de quitosana con ácido nitroso formado *in situ*, previamente disuelta la quitosana en ácido acético al 20 % o ácido clorhídrico a concentraciones entre 0.16 y 0.25 mol.L⁻¹ y empleándose nitrito de potasio o de sodio a concentraciones entre 0.05 y 0.5 mol.L⁻¹. Estas reacciones presentan una cinética de segundo orden, lo cual implica que la concentración de quitosana influye en el rango de depolimerización, que se incrementa con un aumento de la concentración del biopolímero, pero debe considerarse que a concentraciones por encima de un 2 % se obtendrán disoluciones viscosas en detrimento de la reacción de depolimerización en sí, por lo que se recomienda un rango de concentración de la disolución polimérica entre 1.5 y 2 % (9). Son empleados además del ácido clorhídrico y el nitroso, otros ácidos como el fosfórico, también se han realizado hidrólisis químicas con quitosana en estado sólido y cloruro de hidrógeno.

El método enzimático de hidrólisis se basa en el empleo de enzimas con actividad quitosanasa, cuya acción sobre el polímero permite obtener hidrolizados compuestos por fragmentos menores u oligómeros de quitosana, los que pueden separarse cromatográficamente de acuerdo a su grado de polimerización (GP). Para el empleo de este método primeramente se disuelve la quitosana, en una disolución de ácido monobásico diluida a concentraciones preferentemente entre 0.2 y 3 %, preparándose una mezcla íntima, empleando para esto los ácidos clorhídrico, acético, fórmico, láctico, nítrico o disolviendo la quitosana en disoluciones *buffer* de los ácidos antes mencionados como *buffer* de ácido acético-acetato de sodio. El valor de pH requerido de la disolución de quitosana cuando se emplean celulasas debe estar en el rango de 4 a 7, que es donde estas exhiben actividad quitosanasa; cuando

el valor de pH está en el rango de 4 a 6, se obtendrá una solución transparente de quitosana mientras que a pH alrededor de 7 se obtendrá una dispersión de consistencia de gel. La enzima se adiciona a la disolución de quitosana, que deberá estar en un rango de temperatura de 10-70°C, preferiblemente de 20-60°C, en un tiempo desde decenas de minutos hasta varias horas, provocando una rápida disminución de la viscosidad de la solución de quitosana (36).

Los hidrolizados de quitosana son separados de la mezcla de reacción adicionando una solución acuosa de hidróxido de sodio para alcalinizar el medio, lo que causa la precipitación de la quitosana que no ha reaccionado y de los fragmentos de largas cadenas poliméricas, separando por centrifugación la disolución que contiene los fragmentos oligoméricos de GP menores (filtrado); esta disolución puede ser fraccionada en oligómeros desde dímeros a decámeros, teniendo en cuenta sus masas molares. Referente a esto es importante decir que diferentes trabajos científicos han demostrado que los oligómeros de quitosana con un grado de polimerización de 7 o más son los que presentan una mayor actividad biológica, por lo que se puede constatar la importancia que revisten los métodos de separación e identifica-

ción de los fragmentos presentes en los hidrolizados; para esto se emplean varios métodos cromatográficos como intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño entre otros (Figura 1).

La cromatografía de intercambio iónico fue propuesta por vez primera por Horowitz. Años después comenzó a aplicarse la técnica cromatográfica de HPLC de fase reversa en hidrolizados de quitosana. Esta técnica es muy empleada actualmente, por las múltiples ventajas que ofrece en la identificación y separación de componentes de muestras, atendiendo a la alta sensibilidad en los análisis, así como la rapidez y efectividad que caracteriza a esta técnica cromatográfica que está acoplada a un detector que ofrece información continua del líquido que sale de la columna (37).

En otros trabajos se han separado oligómeros por cromatografía de exclusión por tamaño, empleando como fase estacionaria sílica gel modificada o biogel; este método es muy adecuado para la separación de oligómeros de glucosamina, empleándose como eluyente el buffer acetato, que es bien conocido como disruptor de puentes de hidrógeno, evitando la interacción entre los grupos NH_2 y OH de la quitosana (oligos) con los geles. Fue elegido un pH 4,2 para disminuir el número de grupos funcionales NH_2 y también para re-

ducir la disociación de los grupos carboxílicos del biogel. Distintos investigadores emplean biogeles P-2 y P-4 para la separación de compuestos oligoméricos, empleando como eluyente el agua a velocidades de flujo en el orden de los $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$; a las fracciones colectadas se les realiza cromatografía de placa, donde se emplea como solvente una mezcla de acetonitrilo:agua (3:1) y se visualiza por aspersion con ácido sulfúrico al 50 % y a 120°C de temperatura.

Es conveniente señalar que además de los anteriores, existen otros métodos no cromatográficos usados en la separación de los componentes de los hidrolizados, como resulta el empleo de membranas de ultrafiltración para lograr la separación de acuerdo con los grados de polimerización de los fragmentos moleculares (11).

Izume y Ohtakara estudiaron la hidrólisis de quitosana con el empleo de la enzima quitosanasa proveniente del *Bacillus* sp. No. 7-M, se obtuvo en dicho estudio oligosacáridos de D-glucosamina de altas masas moleculares durante la degradación de quitosana, además de obtenerse una pequeña cantidad del monómero N-Glucosamina solo después de un largo tiempo de incubación (38).

De acuerdo con Aiba *et al.* en 1995, las quitosanas parcialmente acetiladas son hidrolizadas con quitinasa de *Streptomyces Griseus*; por otra parte, la enzima quitosanasa del *Bacillus* sp No 7-M es específica hacia los enlaces GlcN-GlcN en quitosanas parcialmente acetiladas y al menos tres residuos de Glc-N son necesarios para la hidrólisis de quitosana por quitosanasa (39). Previamente a esto, Ohtakara *et al.* en 1990 estudiaron la acción de quitinasas de *Streptomyces Griseus*, en quitosanas parcialmente acetiladas, demostrando que estas enzimas actúan específicamente sobre las uniones de N-acetilglucosamina, ya sea en la forma N-AcGluc-N-Gluc o N-AcGluc-N-AcGluc (40).

Izume *et al.* en 1992 demostraron que la producción de



Figura 1. Método general de preparación de oligómeros de quitosana

oligosacáridos en la hidrólisis con quitosanasas de *Bacillus sp. No 7-M* se incrementaba a medida que aumentaba el grado de desacetilación; sin embargo, no se observó gran diferencia en las hidrólisis de una quitosana de GD 70 % y otra de GD 76 % obtenidas en condiciones heterogéneas y homogéneas respectivamente. En este estudio la quitosana de un 99 % de desacetilación fue el sustrato más susceptible, indicando esto que la quitosanasas es específica a las uniones D-Glucosamina–D-Glucosamina en moléculas de quitosana (41); este resultado contrasta con otros criterios (42), quienes informaron que la quitosana preparada por desacetilación homogénea de quitina es un copolímero de unidades acetiladas y desacetiladas distribuidas al azar, mientras que por desacetilación heterogénea es un copolímero que contiene a las unidades acetiladas distribuidas en bloque, por lo que asumen que las hidrólisis debieran ser diferentes partiendo de este hecho. Parecía ser que las más obvias formas de producir quitooligómeros era mediante el empleo de quitinasas y quitosanasas, pero la evaluación de otras enzimas nos lleva a una conclusión diferente.

Algunos autores (43) han estudiado varias enzimas y han expresado su preferencia por las hemicelulasas, la quitosana es hidrolizada por hemicelulasa y acetilada con anhídrido acético. La habilidad de las lisozimas para depolimerizar quitinas y quitosanas está demostrada en la literatura. Varum *et al.* demostraron que la alta susceptibilidad de quitosanas parcialmente acetiladas a estas enzimas es debido a los bloques de secuencia de N-Acetilglucosamina, que contribuyen mayormente a la velocidad inicial de degradación; un pronunciado incremento del porcentaje de hidrólisis de quitosana parcialmente acetilada con lisozimas se observa al aumentar el grado de acetilación de la quitosana (44). Por otra parte, se recomienda, en las hidrólisis de quitosanas parcialmente acetiladas

con lisozimas, una concentración del polímero del 1 %, así como una concentración de ácido acético al 0.4 % y metanol al 50 % (10).

La enzima papaina es extensamente empleada en la industria alimenticia para el procesamiento de alimentos, por lo que se ha informado la habilidad de esta enzima para la depolimerización de quitosanas, que es una enzima comercial bastante barata y que resulta válida como alternativa a lisozimas y quitinasas. La hidrólisis de quitosana con papaina se ha seguido por cromatografía de permeación de geles, llegándose a la conclusión que estas enzimas depolimerizan preferencialmente a las fracciones de quitosana, que tienen los mayores grados de polimerización (GP). Mediaciones viscosimétricas confirmaron que la papaina depolimeriza con una alta velocidad inicial, siendo más susceptible entre tres quitosanas que utilizaron la que más grado de acetilación tenía (GA= 42 %); esto sugiere que la papaina actúa en la unión de las unidades acetiladas y no acetiladas de las quitosanas (10).

La acción hidrolítica de 36 preparados enzimáticos incluyendo cinco lipasas (1 de páncreas porcino y 4 de hongos) en quitosanas ha sido informada (45). En el estudio que realizó de lipasas, proteasas, celulasas y hemicelulasas no fue encontrado un común agente lítico, de hecho el pH y la temperatura óptimos, así como la dependencia del grado de acetilación (GA) y de la concentración de quitosana son diferentes para los distintos preparados enzimáticos. Se demostró mediante estudios viscosimétricos que las enzimas mencionadas anteriormente tenían actividades específicas más elevadas que la enzima quitinasa, o sea, que estas desplegaron una acción lítica mayor, siendo de todas la proteinasa papaina la que mostró una mayor velocidad de hidrólisis. Estos resultados son muy alentadores desde el punto de vista de contar con alternativas más baratas y eficientes para hidrolizar quitosana empleando enzimas menos costosas y de igual

o mejores rendimientos que enzimas establecidas en el mercado, como las quitinasas.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE QUITOSANA Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

Históricamente las infecciones fúngicas han ocasionado significantes pérdidas en los cultivos agrícolas. Los hongos pueden causar daños pre y pos-cosechas, afectando con esto los frutos y vegetales ya en etapas de procesamiento y almacenamiento; ciertamente se hace necesario un control adecuado para evitar las infecciones fúngicas de los productos agrícolas, usualmente se han empleado los agentes químicos como fungicidas pero esto ha traído consecuencias muchas veces negativas al resultar en ocasiones muy tóxicas a los cultivos, a los animales y al hombre. Además de que estos son de utilidad restringida al no ser siempre efectivos a muchos hongos y junto con esto, el hecho de que muchas familias de hongos han desarrollado cierta resistencia a diferentes tipos de agentes químicos empleados como fungicidas (46). Las tecnologías actuales de protección de plantas con una perspectiva ecológica han incentivado el interés en el tema, al constituir las quitosanas y sus productos de degradación una vía alternativa de sustitución de los productos químicos empleados como fungicidas, teniendo en cuenta además, que el clima húmedo y tropical del país, propicia el desarrollo de enfermedades fungosas en los cultivos ocasionando cuantiosas pérdidas en la agricultura si no se toman las medidas pertinentes para evitarlo lo más posible.

La quitosana ejerce una función dual, por activar numerosos mecanismos defensivos en el tejido del hospedero y por interferir directamente en el crecimiento del hongo.

Este biopolímero ha demostrado ser antifúngico 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 esta provoca. Leuba y Stossel en 1986 informaron que la quitosana a pH 5,8 inducía un rompimiento masivo de los compuestos de proteínas y sugirieron que la actividad antifúngica de la quitosana estaba asociada a su habilidad para distorsionar la membrana plasmática del hongo. También El Ghaouth relacionó la propiedad fungistática de la quitosana parcialmente acetilada contra *Rhizopus stolonifer*, con su habilidad para inducir cambios morfológicos en la pared celular del hongo, donde se observaron considerables cambios morfológicos como las marcadas reducciones de tamaño que experimentaron las hifas además de que estas adquirieron una forma ramificada; la quitosana provocó en las hifas hinchamientos pronunciados, estas hifas se observan mucho mas pequeñas que las células normales típicas, probablemente debido a la intensa distorsión. Estas alteraciones pueden ser debido a un incremento de la concentración de quitosana en la pared celular del hongo, ya que además es un componente de la pared celular del *Rhizopus stolonifer* y al ser este polímero bastante flexible se puede producir un reblandecimiento de la pared celular, lo que puede reflejarse en un incremento de la frecuencia de ramificación y así una alteración en la morfología. 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 conformación de la membrana. Tales cambios pueden alterar el balance existente entre biosíntesis y degradación de componentes de la pared celular del hongo (31).

Hadwiger ha expuesto cómo la quitosana se acumula en las células de hongos y evita el crecimiento de estos y que la mayor actividad antifúngica se presenta en

oligómeros de 7 o más unidades, comprobándose cómo el tamaño de los oligómeros de quitosana constituyen un importante aspecto en la acción de este producto (47). En correspondencia con lo planteado se ha comprobado como oligos de 7 y más unidades disminuyen *in vitro* el crecimiento de *Fusarium solani* a concentraciones de 4 mg.mL⁻¹; además, se ha estudiado la inhibición que ejercen la quitosana y derivados en otros hongos como el *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium acuminatum*, *Cylindrocladium floridanum* y otros de interés para la agricultura (48).

La quitosana y sus oligómeros no solo actúan específicamente contra hongos sino también afectan a las plantas como dijimos anteriormente, estimulando la expresión de diversos mecanismos defensivos.

La quitosana se une a los sitios de receptores fúngicos simulando un ataque de esporas fúngicas, por lo que la planta se activa como si estuviera ante el ataque de un hongo, enviando la información al núcleo de la célula por un proceso de transducción de la señal, provocando esto la elicitación de numerosas respuestas y procesos biológicos que contribuirán a inhibir las infecciones fúngicas. L. A. Hadwiger sostiene la teoría de que la respuesta de la planta puede ser manipulada genéticamente mediante el tratamiento con elicitores como las quitosanas, existiendo al parecer múltiples mecanismos a través de los cuales se activan los genes relacionados con la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), produciéndose la activación además de la superficie celular y de los receptores de membrana (49).

Desde hace dos décadas, las quitosanas así como sus hidrolizados han sido estudiados para determinar la capacidad de estos para incentivar respuestas defensivas en las plantas, generando esto mucha literatura en el tema, constatándose la ocurrencia de cambios a niveles fisiológicos y bioquímicos en las plantas tratadas con quitosanas y sus deri-

vados (50). Los cambios fisiológicos que se presentan son numerosos, como respuesta a la agresión de que es objeto la planta por parte del patógeno. Un cambio fisiológico primario ha sido observado, cuando la planta al ser tratada con quitosana reduce la apertura de los estomas, dificultando de esta manera la penetración del hongo; otro cambio que se aprecia es la producción de peróxido de hidrógeno, lo cual se ha relacionado con la disminución de la apertura de los estomas (51). Se produce también el endurecimiento de la pared celular como otra manifestación de resistencia en la planta. Se sabe que dos de los componentes principales de la pared celular de las plantas son la lignina y la celulosa, y se ha detectado que las plantas tratadas con quitosanas y/o derivados manifiestan un incremento apreciable en la biosíntesis de lignina, produciéndose una lignificación de la pared celular, haciéndola más dura y por tanto menos penetrable a los patógenos fúngicos (52).

Se han estudiado casos en que la quitosana ha sido asperjada a las hojas y se ha corroborado la presencia de barreras físicas en tejidos de las raíces de la planta, permitiendo esto llegar a la conclusión de la existencia de una resistencia sistémica inducida por la quitosana, produciéndose diversas manifestaciones físicas como son las oclusiones de los vasos de los xilemas, formaciones de sustancias que obstruyen el paso del patógeno a través de los capilares. Se informa en la literatura la ocurrencia de cambios ultraestructurales en células de las hojas, como son la aparición de pequeñas vesículas, la presencia entre los espacios intercelulares de sustancias fibrillosas y amorfas que se relacionan con la restricción de la infección fúngica (53).

Una extensa literatura científica existe en torno a los cambios bioquímicos presentes como parte de los mecanismos de defensa que desarrolla la planta ante el ataque de un patógeno. Cuando una planta es atacada por un patógeno rápidamente

te ocurre la muerte de células próximas al sitio de infección (hipersensibilidad) y ocurre además una variedad de respuestas defensivas bioquímicas en las células alrededor de la infección así como a nivel sistémico. Uno de los cambios más estudiados es el incremento en la producción de hidrolasas antifúngicas como quitinasas, quitosanasas y b1-3 glucanasas en hojas y raíces; estas enzimas despliegan un importante rol como mecanismo defensivo de la planta ante el ataque de hongos hidrolizando la pared celular de estos. Marcados incrementos de los niveles de estas enzimas se han detectado después de tratamientos con quitosana o derivados de esta (53).

La producción de fitoalexinas es otra respuesta provocada por la quitosana, las fitoalexinas son antibióticos producidos por la planta para destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos que la invadan. Estudios realizados muestran que la quitosana derivada de la pared celular de *Fusarium* o derivada de quitina del exoesqueleto de artrópodos induce la acumulación de fitoalexinas en la planta. La quitosana también estimula la acumulación de ácido jasmónico, molécula señal, que resulta un componente central en la regulación de los genes defensivos en plantas. Ha sido comprobado que los niveles de ácido jasmónico en plantas se incrementan varias veces después de un tratamiento a la planta con quitosana o derivados, sugiriéndose debido a esto que las quitosanas inician la activación de un sistema que regula la expresión genética relacionada con la defensa de la planta (50).

Como se mencionó en los cambios fisiológicos inducidos en plantas debido al tratamiento con quitosana, se induce la producción de peróxido de hidrógeno cuya acción también es bioquímica, pues es una especie reactiva de oxígeno que juega un importante papel en la defensa química de la planta contra patógenos. El peróxido de hidrógeno está relacionado con varias actividades relacionadas con la defensa,

algunas de las cuales activan genes defensivos en plantas y otras en las que actúa como un intermediario en el entrecruzamiento de proteínas que limitan la infección del patógeno a la planta. Otra respuesta bioquímica es la deposición de compuestos fenólicos en los espacios inter e intracelulares. Es conocido que los compuestos fenólicos son tóxicos a los hongos, se ha encontrado que estas deposiciones afectan las paredes de las hifas causando severas alteraciones a las mismas.

Como se aprecia los efectos producidos por la quitosana y derivados en plantas han sido ampliamente estudiados, tanto en el orden fisiológico como bioquímico, mostrándose que las plantas superiores han desarrollado complejos mecanismos de percepción y transducción de la señal de ataque de patógenos, siendo claramente probado que las quitosanas y sus oligómeros tienen un importante papel en las interacciones planta-patógenos.

Se ha encontrado a estos productos implicados en las interacciones hospedero-parásito entre el chícharo y el *Fusarium solani*; en este vegetal tanto la quitosana como sus oligómeros activan el desencadenamiento de procesos relacionados con la síntesis del ARN mensajero para la producción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), una importante enzima participante en la síntesis de productos fenilpropanólicos tóxicos al hongo. La inducción de respuestas defensivas por la aplicación de quitosana ha sido observada en otras plantas: en hojas de tomate, los oligosacáridos provocan la acumulación de inhibidores de proteinasas, así como la lignificación en tejidos de chícharo que incrementa la resistencia de la pared celular a la degradación enzimática, previniendo así la penetración de patógenos. Otras evidencias incluyen la síntesis de calosa en tejidos de cultivos de soya.

El tamaño de los oligómeros constituye un aspecto importante en la acción de este producto. Se ha comprobado que el heptámero y los

oligómeros superiores inducen el máximo incremento en la producción de pisatina en chícharo. Se ha demostrado que oligómeros de quitosana con GP entre 6 y 7 fueron los más activos en la protección de tabaco contra *Phytophthora parasitica* (54). El Ghaouth estudió que disoluciones al 1 y 1.5 % de quitosana provocan reducciones significativas en la aparición de la pudrición de fresas almacenadas a 4°C, al ser inoculadas con *Botrytis cinerea*, patógeno fungoso poscosecha (31). Las ventajas de la quitosana como fungicida protector contra enfermedades poscosecha radican en la capacidad para formar películas semipermeables compatibles con el recubrimiento céreo que se aplican a estos frutos y vegetales, y a sus propiedades combinadas de inhibir el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos y estimular reacciones defensivas en tejidos vegetales.

OTRAS APLICACIONES

La quitosana es uno de los polímeros naturales de mayor uso en numerosas industrias, debido a sus diversas propiedades, entre las que encontramos: agente quelatante, facilidad de conformar fibras, buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y actividad antihemostática entre muchas otras, lo cual hace que su uso se haya extendido a numerosos campos de aplicación, entre estos tenemos:

a. Clarificación y limpieza de aguas de proteínas y metales pesados: Debido a su estructura química una de las aplicaciones más extendidas de las quitosanas es la purificación de aguas residuales. La quitosana provoca la coagulación de las proteínas que contienen estos desechos y los productos de coagulación son degradables y no poseen ninguna toxicidad, por tanto su uso es preferible al de otros productos sintéticos. Por otra parte, los jugos de frutas y vegetales también son clarificados con ayuda de la quitosana.

Tanto la quitina como la quitosana son agentes quelatantes

que poseen la habilidad de formar complejos con muchos iones metálicos. Estos cationes se coordinan con el par de electrones libres del nitrógeno y del oxígeno presentes en la estructura de la quitosana. Por esta afinidad y a que es posible regenerar la quitosana con la ayuda de los ácidos apropiados como el ácido sulfúrico diluido, uno de los campos de aplicación de la quitosana es la purificación de metales pesados del agua contaminada (55).

b. En forma de fibras en la industria textil: La posibilidad de obtener fibras de quitosana por métodos relativamente sencillos y económicos ha hecho posible su utilización en la industria textil. Estas fibras poseen mejor comportamiento elástico que las fibras convencionales. Por otra parte, está siendo objeto de estudio el hecho de poder introducir grupos colorantes en la quitosana mediante enlaces covalentes a través del grupo amino presente en su estructura u otros grupos, capaces de mejorar las propiedades de la quitosana (56).

c. En diferentes campos de la medicina: La quitosana y sus derivados se degradan por la acción de enzimas endógenas y no poseen ningún efecto alérgico sobre el organismo humano. Es por ello que es posible su uso en diferentes campos de aplicación médica entre los que podemos mencionar: materiales de sutura, agente cicatrizante, componente del vendaje de heridas y como piel sintética entre otras (57). Se ha estudiado la influencia del grado de desacetilación de la quitosana en la aceleración del proceso de cicatrización en un ensayo realizado en ratas. El estudio histológico demostró que las quitosanas con un mayor grado de desacetilación presentaban a los siete días de realizado el implante, mejor integración con el tejido circundante. Se observó además que el tejido en el lugar de la herida estaba completamente repitelizado y reemplazado mediante un proceso de fibrosis.

La piel artificial para el tratamiento de quemaduras y otras lesiones de la piel es otra de las aplicaciones

más investigadas de la quitosana y sus derivados. Muchos trabajos presentan estudios de diversas matrices de quitosana con otros polímeros biodegradables como el colágeno y poli-L-leucina, los cuales son polímeros degradables enzimáticamente, que se colocan en forma de películas finas en la zona afectada reduciendo el riesgo de infección y promoviendo el crecimiento epitelial.

d. En la industria farmacéutica y de cosméticos: Recientemente, derivados de la quitosana son usados en la industria farmacéutica como un componente de productos de belleza gracias a sus propiedades de acondicionamiento, hidratación de la zona de aplicación, posibilidad de liberar ingredientes bioactivos de las formulaciones y a la capacidad de estimular el crecimiento de las células de las pieles dañadas. Su uso se amplía en cremas y ungüentos como materiales cosméticos (58).

e. En sistemas de liberación controlada: La capacidad de formar membranas interpenetradas de la quitosana hace posible su uso como sistemas de liberación controlada de fármacos, membranas para la ultrafiltración y actualmente como matriz orgánica en composites parcial o totalmente biodegradables.

En la literatura se recogen muchos trabajos sobre este tema de estudio, donde se obtienen membranas interpenetradas de quitosana con glutaraldehído y se han estudiado las cinéticas de hinchamiento y liberación de diferentes medicamentos como la gentamicina, se ha mezclado quitosana y ácido poliacrílico, utilizando el glutaraldehído como agente entrecruzante para obtener membranas con mejores propiedades mecánicas y características de liberación controlada (59).

Se han evaluado diferentes conjugados de drogas con quitosana y sus derivados, para reducir la toxicidad de las drogas empleadas y ampliar su actividad terapéutica, para combatir tumores cancerígenos (60). Estos conjugados pueden cambiar la retención de los fármacos en el organismo o liberarlos en el lugar de-

seado. Los agentes estudiados fueron: 5-fluoracil, 5-fluoridina y mitomicina. Se realizaron evaluaciones *in vitro* e *in vivo* obteniendo reducciones del tumor de un 56 %.

Otros autores preparan microcápsulas de quitosana con diferentes agentes entrecruzantes como el polietilenglicol, alginato y ácidos carboxílicos entre otros para la liberación de diferentes fármacos con actividades antitrombogénicas, analgésicas y vacunas, para su liberación en el organismo humano. Por otra parte, las características de bioabsorción y no-toxicidad de este polisacárido la hacen un material casi ideal para esta aplicación.

Otra de las aplicaciones de la quitosana es la de matriz orgánica en composites de aplicación biomédica. En la literatura abundan estudios de implantes biodegradables que usan como soporte de la carga empleada, membranas de quitosana y derivados entrecruzadas con diferentes agentes.

Composites a partir de biomembranas de la quitosana y poliácido acrílico por vía térmica se han obtenido, utilizando la hidroxiapatita, para su relleno de defectos periodontales. Ensayos histológicos realizados meses después del implante muestran que el material tiene buena compatibilidad, la membrana es reabsorbible en condiciones fisiológicas y promueve el crecimiento celular (61).

CONCLUSIONES

Se han presentado en este trabajo algunos aspectos importantes en el estudio de la extensa temática que revisten las quitosanas así como su fuente o material de origen las quitinas, siendo importante hacer énfasis en la idea de que son muchos y variados los parámetros a influir en la obtención del producto final ya sea esta quitosana o algún derivado de ella. Se puede apreciar la influencia que tienen en la quitosana a obtener, procesos vinculados directamente a la quitina

como son la desmineralización, desproteinización y decoloración.

Especial atención requieren procesos como la desacetilación de la quitina y las hidrólisis de la quitosana, pues estos ejercen un efecto directo en la estructura, composición y distribución de las unidades que conforman el copolímero y los oligómeros de quitosana, que son propiedades que influirán directamente en las aplicaciones que puedan tener los productos obtenidos; de ahí que sea evidente la importancia enorme que tiene el control de las condiciones que requieren estos procesos de reacción.

REFERENCIAS

- Alimuniar, A. y Zainuddin, R. An economical technique for producing chitosan. *Advances in Chitin and Chitosan*, 1992, p. 627-630.
- Dalwoo Corporation. A short introduction to the world of chitin and chitosan. [Consultado 5 Julio 2002]. Disponible en: <http://www.dalwoo.com/chitosan/what_is_chitosan.html>.
- Struszczyk, M. /et al./ Characterization of chitosan. *Carbohydrates as organic raw materials*, 2000, vol. 4, p. 15-19.
- Domard, A. y Rinaudo, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1983, vol. 5, p. 49-52.
- Watcher, R. /et al./ Cationic Biopolymers. USA, 5962663. 1999.
- Khan, T. A. /et al./ Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2000, vol. 3, p. 303-311.
- Pombo, R. /et al./ Actividad *in vitro* de hidrolizados de quitosana sobre hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales*, 1995, vol. 16, no. 3, p. 62-64.
- Hadwiger, L. A.; Ogawa, T. y Kuyama, H. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1994, vol. 7, p. 531-533.
- Allan, G. y Peyron, M. Depolymerization of chitosan by means of nitrous acid. En: *Chitin Handbook*. Oxford: Ed. Oxford university press, 1998. p.175-180.
- Muzzarelli, R. A. A.; Stanic, V. y Ramos, V. Enzymatic depolymerization of chitins and chitosans. *Methods in Biotechnology*, 2000, vol. 10, p. 197-211.
- Kubota, N. /et al./ A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydrate Research*, 2000, vol. 324, p. 268-274.
- Muzzarelli, R. A. A. Chitin. Oxford: Ed. Pergamon Press, 1977.
- Kyoon, H. y Meyers, S. P. Preparation of chitin and chitosan. En: *Chitin Handbook*. Oxford: Ed. Oxford University press, 1998. p. 475-489.
- Wu, A. C. M. y Bough, W. A. Effects of alkaline concentration in chitosan viscosity. Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan. 1978. p. 88.
- Brzeski, M. M. Influence of long period of demineralization in the degradation of chitin polymer. En: Proceedings of the international conference on chitin and chitosan. 1982. (2:1982). p. 15.
- Johnson, E. L. y Peniston, Q. P. Utilisation of shellfish waste for chitin and chitosan production. *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*, 1982, p. 415-422.
- Moorjani, M. N. y Achutha, V. Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste. *J. Food Sci. Technol.*, 1975, vol. 20, p. 187-189.
- Bough, W. A.; Salter, W. L.; Wu, A. C. M. y Perkins, B. E. Chitin deproteinization by enzymatic process. *Biotechnol. Bioeng*, 1978, vol. 20, p.136.
- Benjakul, S. y Wisitwuttikul, P. Study of relation: chitin-alkaline solution and its effect in chitin deacetylation degree. *Assian Food J.*, 1998, vol. 9, p. 136-139.
- Pelletier, A.; Lemire, I.; Sygusch, J.; Chornet, E. y Overend, R. P. A new technique for producing chitosan. *Biotechnol. Bioeng*, 1994, vol. 36, p. 310.
- Batista, I. y Roberts, G. A. F. A novel, facile technique for deacetylating chitin. *Makromol. Chem.*, 1990, vol. 191, p. 429-434.
- Mima, S.; Miya, M.; Iwamoto, R. y Yoshikawa, S. Preparation of fully deacetylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1983, vol. 28, p. 1909.
- Benjakul, S. y Sophanodora, P. A new technique to obtain chitosan by chitin from *Penaeus monodon*. *Assian Food J.*, 1998, vol. 8, p. 415-419.
- Martinou, A.; Tsigos, I. y Bouriotis, V. Preparation of chitosan by enzymatic deacetylation. En: *Chitin Handbook*. Oxford: Ed. Oxford University press, 1998. p. 501-505.
- Tsigos, I.; Zydowicz, N.; Martinou, A. y Domard, A. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxi* on N-acetylchitooligosaccharides. *European Journal of Biochemistry*, 1999, vol. 261, p. 698-705.
- Terbojevich, M. y Cosani, A. Molecular weight determination of chitin and chitosan. En: *Chitin Handbook*. Oxford: Ed. Oxford University press, 1998. p. 87-101.
- Terbojevich, M.; Cosani, A. y Muzzarelli, R. A. A. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. *Carbohydr. Polym.*, 1996, vol. 29, p. 63-68.
- Muzzarelli, R. A. A.; Rochetti, R.; Stanic, V. y Weckx, M. Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. En: *Chitin Handbook*. Oxford: Ed. Oxford University press, 1998. p. 109-119.
- Inoue, Y. N. M. R. Determination of the degree of acetylation. En: *Chitin Handbook*. Oxford: Ed. Oxford University press, 1998. p. 133-136.
- Hirano, S. y Nagao, N. Effect of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989, vol. 53, p. 3065-3066.
- El Gaouth, A.; Arul, J. y Asselin, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 1992, vol. 82, p. 398-402.
- Takeshi, Y.; Ito, Y. y Shibuya, N. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defence responses. *Trends in Glycosc. and Glycotech.*, 2000, vol. 12, no. 64, p. 113-120.

33. Kauss, H.; Jeblick, W.; Domard, A y Siegrist, J. Partial acetylation of chitosan and a conditioning period are essential for elicitation of H₂O₂ in surface-abraded tissues from various plants. *Advances in Chitin Sciences*, 1997, vol. 2, p. 94-101.
34. Vander, P.; Varum, K. M.; Domard, A.; El Gueddari, N. E. y Moerschbacher, B. M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 118, p. 1353-1359.
35. Pombo, R. Relación estructura-actividad de la quitosana y sus hidrolizados solubles sobre algunos hongos fitopatógenos. [Tesis de Maestría]; Universidad de La Habana, 1996.
36. Yaku, M. /et al./ Process for preparing chitosan oligosaccharides. USA, 4970150. 1990.
37. Chang, K. B. y Lee, J. HPLC analysis of N-acetyl-chitooligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2000, vol. 2, p. 75-83.
38. Zhu, B. y Laine, R. Depolymerization of chitin with chitinases. En: *Chitin Handbook*. Oxford: Ed. Oxford University press, 1998. p. 147-151.
39. Aiba, S. /et al./ Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with enzymes followed by acetylation. *Advances in chitin science*. 1995.
40. Ohtakara, A.; Matsunaga, H. y Mitsutomi, M. Action pattern of *Streptomyces griseus* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *Agr. Biol. Chem.*, 1990, vol. 54, p. 3191-3199.
41. Izume, M. /et al./ Action pattern of *Bacillus* sp. No.7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, vol. 56, p. 448-453.
42. Kurita, K. /et al./ *Makromol.Chem.*, 1998, vol. 178, p. 3197-3202.
43. Aiba, S. y Muraki, E. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with enzymes followed by acetylation. *Advances in Chitin Science*, 1997, p. 192-197.
44. Varum, K. /et al./ Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, vol. 129, p. 5-15.
45. Pantaleone, D.; Yalpani, M. y Scollar, M. Susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. *Carbohydr. Res.*, 1994, vol. 256, p. 159-175.
46. Ben-Shalom, N. y Platt, D. Composition and method for controlling fungal disease in plants. USA, 5965545. 1999.
47. Hadwiger, L. Host parasite interactions: Elicitation of defense responses in plants with chitosan. *Chitin and chitinases*, 1999, p. 185-200.
48. Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C. y Tarsi, R. Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*. *Arch. Phytopathol. Plant. Prot.*, 2000, vol. 129, p. 154-161.
49. SafeScience. Mode of action and elicitation of plant defense responses. [Consultado 7 Sept 2001]. Disponible en: <http://www.Elexa Mode of action-Technical information.html>.
50. Ebel, J. y Mithofer, A. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*, 1999, vol. 206, p. 335-348.
51. Lee, S. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol.*, 1999, vol. 121, p. 147-152.
52. Tiuterev, S. Chitosan mechanism of action and ways of using as ecologically safe means in enhancement of plant disease resistance. *Arch. Phytopathol. Plant. Prot.*, 1999, vol. 30, no. 4, p. 323-333.
53. Ito, Y. Oligosaccharide elicitor signaling in plant-pathogen interactions. [Consultado 6-9-2001]. Disponible en: <http://www.glyko world>.
54. Ramírez, M.; Cabrera, G.; Falcón, A.; Hernández, I. y Alfonso, L. Preparación de quitoooligosacáridos bioactivos por hidrólisis enzimática de quitosana. *SLAP*, 2000, p. 462-463.
55. Domard, A. Method of separating at least one metal present in a solution by fixation onto a chitosane. USA, 5932107. 1999.
56. Kawasaki, S. Method for manufacturing chitosan fiber. USA, 5897821. 1999.
57. Block, L. Methods of creating a unique chitosan and employing the form complexes with drugs delivery of the same within a patient and a related dosage form. USA, 5900408. 1999.
58. Chitosan and chitin. [Consultado 6-12-2002]. Disponible en: <http://www.Sonat Co-Chitosan and Chitin.html>.
59. Ganta, I. /et al./ Different molecular weight chitosan microspheres: influence on drug loading. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 1998, vol. 24, p. 779-784.
60. Kimura, Y. y Okuda, H. Prevention by chitosan of gastrointestinal toxicity by 5-fluorouracil without loss of antitumor activity. *J. Cancer. Res.*, 1999, vol. 30, p. 765-774.
61. Ito, M. y Hidaka, Y. A chitosan-bonded hydroxyapatite bone filling material. En: *Chitin Handbook*. Oxford: Ed. Oxford University press, 1998. p. 373-389.

Recibido: 7 de febrero de 2003

Aceptado: 26 de diciembre de 2003