

La quitosana: potencialidades antimicrobianas contra hongos y Oomycetes

Dianevis González-Peña Fundora,¹ Alejandro Falcón Rodríguez,¹ Guadalupe Gómez Izaguirre² y Ana Fernández Morales²

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera a Tapaste Km 3½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, G. P. 1, dianevis@inca.edu.cu

² Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.ª B y 5.ª F, Playa, La Habana, C. P. 11600

RESUMEN

La quitosana es un polímero inocuo y biodegradable que se obtiene en cantidades industriales a partir de la quitina que forma parte del exoesqueletos de crustáceos. Posee importantes propiedades antimicrobianas debido a sus características físico-químicas como grado de acetilación (GA), grado de polimerización (GP), pH de la solución, además que interfiere el organismo diana. Varios estudios se han realizado sobre diferentes tipos de estructuras celulares, ya sean micelio o esporas de microorganismos. Sus potencialidades como inhibidor del desarrollo de patógenos, así como inductor de respuestas defensivas y del desarrollo de las plantas avalan su introducción y generalización en la agricultura, aunque aún no se dilucidan completamente sus mecanismos de acción. La presente es una revisión del estado del arte de las propiedades de la quitosana como inhibidor del desarrollo de microorganismos patógenos de los reinos Fungi y Chromistas.

Palabras claves: Quitosana, hongos, oomycetes, antimicrobiano, mecanismo de acción

ABSTRACT

Chitosan is an innocuous and biodegradable polymer obtained from crustaceous exoskeleton chitin. Chitosan has important antimicrobial properties due to its physic-chemistry characteristics as acetilation degree (GA), polymerization degree (GP), pH solution, besides the target organism. A few studies has become against different cellular structures like mycelia or spores. The potential action of the chitosan as pathogen growth inhibitor and as elicitor of defensive response and growth of plants support its widespread introduction in agriculture, although its mode of action are not completed elucidated. The present work is a review of the actual condition of chitosan properties as inhibitor of pathogens microorganisms of Fungi and Chromista Kingdom.

Key words: Chitosan, fungi, oomycetes, antimicrobial, mode of action

INTRODUCCIÓN

La quitina es un polímero ampliamente distribuido en el planeta. Forma parte del exoesqueleto de crustáceos e insectos, así como de las paredes celulares de los hongos filamentosos. Su estructura consiste en unidades de n-acetil-glucosamina unidas por enlace β 1.4 que al desacetilarse, total o parcialmente, dan lugar a otro polímero denominado *quitosana* [Ramírez *et al.*, 2000; Prashanth y Tharanathan, 2007].

La quitosana es un compuesto inocuo y biodegradable que se obtiene en cantidades industriales de los desechos de la industria pesquera, fundamentalmente del exoesqueleto de cangrejo, camarón y langosta [Ra-

mírez *et al.*, 2000; Prashanth y Tharanathan, 2007]. Su carácter policatiónico, debido a la desacetilación de los grupos aminos, le confiere numerosas potencialidades para su empleo en diversos campos que incluyen la biotecnología, la agricultura, la industria alimenticia y la farmacéutica [Rabea *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2006; Lárez, 2008]. Sus propiedades se deben a factores como el grado de polimerización y de acetilación, pH de la solución y el organismo diana [Park *et al.*, 2002; Bautista *et al.*, 2005, Falcón *et al.*, 2008]. El objetivo del presente trabajo es dar a conocer el estado del arte de las potencialidades antimicrobianas de la quitosana, basado en los prin-

cipales supuestos mecanismos de acción debido a sus propiedades físico-químicas.

Mecanismo de acción

1. Grado de acetilación

El mecanismo de acción de la quitosana se basa principalmente en su carácter policationico, que varía en dependencia del grado de acetilación (GA). Se sugiere que los grupos aminos desacetilados interactúan con los residuos aniónicos de las superficies celulares. Esto conlleva a la desestabilización de la permeabilidad de la membrana microbiana y a un desbalance osmótico que puede provocar la lisis celular [Rabea *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2006].

Los estudios muestran que en dependencia del GA varía el efecto que ejercen diferentes tipos de quitosana sobre el desarrollo de microorganismos como *Fusarium graminearum* Shw., *Fusarium oxysporum* Schltdl., *Pythium irregulare* Buisman, *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn y *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan [Park *et al.*, 2002; Falcón *et al.*, 2008]. Generalmente se informa que existe una dependencia inversa del GA y el efecto antimicrobiano, ya que a medida que disminuyen los grupos acetilos se expone un mayor número de aminos que interactúan con las membranas celulares.

2. Grado de polimerización

Otra de las teorías que explica el mecanismo de acción de la quitosana se basa en el grado de polimerización (GP). Se plantea que a medida que disminuye el GP aumenta su acción antifúngica [Kendra y Hadwiger, 1984]. Este hecho podría deberse a que un compuesto con menor número de unidades podría penetrar la célula microbiana e incluso difundir hasta el núcleo con mayor facilidad. En el interior celular interactuaría con biomoléculas como los ácidos nucleicos, e inhibir los procesos de replicación, transcripción y síntesis proteica. Esta hipótesis se confirmó, en parte, al observar que el empleo de oligoquitosanas, que son compuestos que contienen hasta 10 residuos de glucosamina, provocó importantes daños celulares en *Phytophthora capsici* (Leonian), tales como la ruptura del sistema de endomembranas, especialmente de vacuolas y vesículas secretoras como los plasmalemosomas [Xu *et al.*, 2007 a]. También se observó que las oligoquitosanas disminuyeron la migración de los ácidos nucleicos en la electroforesis, con mayor fortaleza la del ADN, tal vez por la fuerte unión que se establecía con su doble hélice

[Xu *et al.*, 2007 b]; sin embargo, los ácidos nucleicos no parecen ser el único sitio de acción antifúngica, ya que oligoquitosanas marcadas se localizaron a través de todo el citoplasma en quistes germinados y en esporangios de *P. capsici* [Xu *et al.*, 2007 b].

Aunque numerosos trabajos reflejan resultados similares que confirman la hipótesis de la importancia del grado de polimerización, en otros no se observan diferencias al emplear quitosanas con diferente peso molecular. Los experimentos *in vitro* sobre *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz), *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler y *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. ex Fr.) mostraron que tres quitosanas (con pesos moleculares bajo, medio y alto) ejercían un efecto similar en el crecimiento de estas especies, sin observarse diferencias marcadas en su inhibición [Bautista *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2007; Guerra *et al.*, 2009].

3. Concentración

La concentración de quitosana generalmente se relaciona de manera directa con su actividad antimicrobiana [El Ghaouth *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007a; Falcón *et al.*, 2007; 2009; Liu *et al.*, 2007]. El crecimiento de especies como *Botrytis cinerea* (Pers.:Fr.) o *Penicillium expansum* Link se afecta significativamente a medida que las concentraciones del polímero oscilan entre 1 y 100 mg/L, y alcanzan su mayor inhibición con este último valor [Liu *et al.*, 2007]. De modo similar sucede con *F. oxysporum*, *Pythium ultimum* Trow, *R. stolonifer* y *Mucor* sp., donde aumentos de la concentración de quitosana de 0,5 hasta 2,0 g/L reducen marcadamente el crecimiento radial de estas especies [Palma *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2007]. Los trabajos de El Ghaouth *et al.* (1992) también muestran que el crecimiento de *A. alternata*, *R. stolonifer*, *B. cinerea* y *C. gloeosporoides* se redujo a medida que la concentración aumentaba de 0,75 a 6 g/L.

Algunos estudios apuntan una ligera o nula afectación del desarrollo de hongos nematófagos como *Pochonia chlamidosporia* (Goddard) Zare y W. Gams y *P. rubescens*, respectivamente, ante la presencia de este polisacárido en el medio de cultivo [Palma *et al.*, 2008]. Estos resultados son de gran importancia si se tiene en cuenta la función de estas especies como controladores biológicos. Otros microorganismos, como el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bassi) son menos susceptibles y muestran un crecimiento superior a otros patógenos evaluados, sobre todo a

concentraciones de 2,0 g/L. Esto puede estar relacionado con su capacidad de degradar la quitina del exoesqueleto de los insectos que constituyen su hospedante. En el mismo estudio se observó que las especies micoparásitas *Trichoderma harzianum* y *T. atroviridae* fueron muy sensibles al polímero, incluso a bajas concentraciones, aspecto que debe tenerse en cuenta en posibles aplicaciones del compuesto debido al amplio uso de esta especie en programas de manejo integrado de plagas [Palma *et al.*, 2008].

Existen informes de que bajas concentraciones de quitosana inducen un aumento del crecimiento micelial, incluso por encima del control en algunas especies de microorganismos [Hernández, 2002; Sánchez *et al.*, 2007]. En *A. alternata* el empleo de concentraciones iguales y menores del 1,5 % provoca un aumento del crecimiento respecto al control [Sánchez *et al.*, 2007], lo que sucede de manera similar en *R. stolonifer* al añadirse al medio un 0,5 % de quitosana [Hernández, 2002].

La velocidad de crecimiento de *Verticillium dahliae* se acelera con concentraciones de 0,5 y 1,0 g/L de quitosana, pero con 2,0 g/L se inhibe significativamente, lo que sugiere que a bajas concentraciones de este polímero estos microorganismos pudieran emplearlo como nutriente [Palma *et al.*, 2008]. *V. dahliae* también fue el microorganismo más resistente de un grupo de especies fitopatógenas sometidas a tratamientos con quitosana y oligoquitosanas, donde el porcentaje de inhibición del crecimiento dependió del GP y el organismo diana. Los resultados de la comparación mostraron que había mayor inhibición del crecimiento micelial de *P. capsici* cuando se empleaban las oligoquitosanas; para *B. cinerea* esta actividad era superior a la de la quitosana solo a las concentraciones más elevadas; y para *F. oxysporum* no hubo diferencias entre ellas. La quitosana resultó ser más efectiva que las oligoquitosanas en inhibir el crecimiento de *V. dahliae*, pero este fue más resistente que los otros microorganismos empleados [Xu *et al.*, 2007 a].

Además del crecimiento, la quitosana afecta otros procesos como la esporulación. El empleo de altas concentraciones la inhiben completamente en especies como *P. digitatum* y *A. alternata* [Bautista *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2007], aunque bajas concentraciones del polímero pueden inducir la esporulación en esta última [Sánchez *et al.*, 2007]. Algunos trabajos reflejan una relación directa de la inhibición

del desarrollo de las estructuras reproductivas de microorganismos, como sucedió en *N. crassa* con las suspensiones de conidios que se lisaron al interactuar con soluciones del polímero, aun a concentraciones de 0,0025 g/L [Palma *et al.*, 2009]. La germinación de las esporas también se afecta en gran medida con la presencia de este compuesto, aunque puede depender del organismo diana. De esta manera se observó que, mientras cepas de *P. chlamydosporia* disminuyeron su porcentaje de germinación al variar de 0,01 a 1,0 g/L la concentración de quitosana en el medio, en otros aislados no se perturbó este parámetro [Palma *et al.*, 2008]. Resultados similares plantearon Hernández *et al.* (2008) al demostrar que en varios aislados de *R. stolonifer* la esporulación y la germinación de las esporas dependía más del peso molar de las quitosanas que de las concentraciones empleadas.

4. pH

La quitosana es insoluble en agua, pero es soluble en otros solventes ácidos como el acético, láctico, ascórbico, clorhídrico [Park *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2008; Falcón *et al.*, 2009], lo que junto a su alta viscosidad limitan en parte su uso. Generalmente en su preparación se ajusta el pH entre 5 y 6, ya que se plantea que por debajo de estos valores la quitosana es inestable, y por encima de ellos la molécula puede sufrir cambios estructurales entre las formas protonadas y no protonadas [Cartaya *et al.*, 2008]. La quitosana es capaz de actuar como agente quelante que une selectivamente trazas de metales como el hierro y el cobre, con lo que impide el acceso de los microorganismos a estos [El Hadrami *et al.*, 2010]. Además, forma complejos con metales pesados, por lo que su uso resulta de gran importancia en la remediación de suelos [Varma *et al.*, 2004].

5. Penetración y daños intracelulares

Recientemente se ha estudiado la penetración de la quitosana a la célula microbiana [Palma *et al.*, 2008; 2009]. Se ha demostrado que su internalización en hongos filamentosos ocurre a través de endocitosis y es un proceso activo, ya que depende de ATP, como se demostró para especies como *Neurospora crassa* [Palma *et al.*, 2009], y se sugería para los conidios de *F. oxysporum* y *P. chlamydosporia* [Palma *et al.*, 2008].

Diferentes tipos de células (conidios, tubos germinativos, hifas vegetativas) muestran distinta sensibilidad a la quitosana, aunque estas últimas parecen ser las que menos se afectan [Plascencia *et al.*, 2003; Sánchez

et al., 2007; Xu et al., 2007a; Hernández et al., 2008; Pacheco et al., 2008; Palma et al., 2008; 2009].

El empleo de microscopía electrónica de barrido permite observar los diferentes daños que induce la quitosana sobre las estructuras vegetativas y reproductivas de los microorganismos. Entre ellos, se puede mencionar la retracción de la membrana plasmática, agregación del citoplasma y desorganización del contenido celular en los conidios de *F. oxysporum* cuando entran en contacto con soluciones de quitosana [Palma et al., 2008]. Estos daños estructurales en los conidios son similares a los que se encontraron en las hifas de otra cepa de esta especie, los que incluyeron, además, engrosamiento de las paredes celulares [Laflamme et al., 1999]. En el caso de *A. alternata*, las hifas presentaron también hinchazón, nodulación y distorsiones semejantes a las que se observaron en *R. stolonifer* [El Ghaouth et al., 1992].

CONCLUSIONES

- La quitosana afecta el desarrollo de hongos y oomycetes, ya que disminuye el crecimiento del micelio, además de la formación y germinación de las estructuras reproductivas, aunque esta inhibición depende en gran medida del organismo diana.
- Las características físico-químicas de la quitosana; grado de acetilación (GA), grado de polimerización (GP) y pH de la solución influyen en las afectaciones que provoca sobre las diferentes fases del ciclo de vida de estos microorganismos.
- El mecanismo de acción de la quitosana sobre la inhibición del desarrollo de los microorganismos aún no está completamente dilucidado; sin embargo, se ha demostrado que la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, su posible interacción con ácidos nucleicos y la quelación de nutrientes son algunas de las vías a través de las cuales se sugiere afecte a las especies microbianas.
- Las propiedades antimicrobianas de la quitosana son innegables, por lo que resulta necesario el estudio de la interacción que ejerce este compuesto sobre el desarrollo de los microorganismos y profundizar en sus potencialidades para el control de fitopatógenos.

REFERENCIAS

- Bautista, S.; M. Hernández; E. Bosquez: «Growth Inhibition of Selected Fungi by Chitosan and Plant Extracts», *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22: 178-186, 2004.
- Bautista, S.; A. N. Hernández; M. G. Velásquez; E. Bosquez; C. L. Wilson: «Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas», *Revista Iberoamericana Tecnología Postcosecha* 7 (1): 1-6, España, 2005.
- Bautista, S.; A. N. Hernández; M. G. Velásquez; M. Hernández; Ait E. Barka; E. Bosquez; C. L. Wilson: «Chitosan as a Potencial Natural Compound to Control Pre and Postharvest Diseases of Horticultural Commodities», *Crop Protection* 25 (2): 108-118, EE. UU., 2006.
- Cartaya, O.; O. Marrero; I. Reynaldo; C. Peniche: «Adsorción de iones Cu^{2+} por quitosana y su aplicación al suelo para la protección de las plantas ante la toxicidad del metal», *Cultivos Tropicales* 29 (3): 87-91, Cuba, 2008.
- Cho, M. H.; H. K. No; W. Prinyawiwatkul: «Chitosan Treatments Affect Growth and Selected Quality of Sunflower Sprouts», *Journal of Food Science* 73 (1): 70-77, EE. UU., 2008.
- El Ghaouth, A.; J. Arul; J. Grenier; A. Asselin: «Effect of Chitosan and Other Polymers on Chitin Deacetylase in *Rhizopus stolonifer*», *Experimental Mycology* 16: 173-177, Holanda, 1992.
- El Hadrami, A.; L. R. Adam; I. El Hadrami; F. Daayf: «Chitosan in Plant Protection», *Marine Drugs* 30 (8): 968-987, EE. UU., 2010.
- Falcón, A.; D. Costales; E. Ortega; O. León; J. C. Cabrera; M. A. Martínez: «Evaluation of Chitosan as an Inhibitor of Soil-Borne Pathogens and as an Elicitor of Defence Markers and Resistance in Tobacco Plants», *Spanish Journal of Agricultural Research* 5 (4): 533-541, 2007.
- Falcón, A.; J. C. Cabrera; D. Costales; M. A. Ramírez; G. Cabrera; V. Toledo; M. A. Martínez: «The Effect of Size and Acetylation Degree of Chitosan Derivatives on Tobacco Plant Protection Against *Phytophthora parasitica*», *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 103-112, EE. UU., 2008.
- Falcón, A.; J. C. Cabrera; E. Ortega; M. A. Martínez-Téllez: «Concentration and Physicochemical Properties of Chitosan Derivatives Determine the Induction of Defence Responses in Roots and Leaves of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Plants», *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 4 (3): 192-200, EE. UU., 2009.
- Guerra, M. G.; J. Vega; M. G. Velásquez; A. N. Hernández: «Antifungal Activity and Release of Compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. by Effect of Chitosan with Different Molecular Weights», *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 18-22, EE. UU., 2009.
- Hernández, A. N.; M. Hernández; M. G. Velásquez; M. G. Guerra; G. E. Melo: «Actividad antifúngica del quitosano en el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. y *Mucor* spp.», *Revista Mexicana de Fitopatología* 25 (2): 109-113, 2007.
- Hernández, A. N.; S. Bautista; M. G. Velásquez; M. G. Méndez; M. M. Sánchez; L. A. Bello: «Antifungal Effects of Chitosan with Different Molecular Weights on *in vitro* Development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill.», *Carbohydrate Polymers* 73: 541-547, EE. UU., 2008.
- Hernández, M.: «Uso potencial del quitosano y extractos vegetales en el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* y *Fusarium oxysporum* de la papaya (*Carica papaya*)», tesis en opción al grado científico de Máster, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Yautepec Morelos, México, 2002.
- Kendra, D. F.; L. A. Hadwiger: «Characterization of the Smallest Chitosan Oligomer that is Maximally Antifungal to *Fusarium solani* and Elicits Pisatin Formation in *Pisum sativum*», *Experimental Mycology* 8: 276-281, Holanda, 1984.
- Laflamme, P.; N. Benhamou; G. Bussiérés; M. Dessureault: «Differential Effect of Chitosan on Root Rot Fungal Pathogens in Forest Nurseries 0187», *Can. J. Bot.* 77: 1460-1468, Canadá, 1999.
- Lárez, C.: «Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica», *Revista UDO Agrícola* 8 (1): 1-22, Venezuela, 2008.

- Liu, J.; S. Tian; X. Meng; Y. Xu: «Effects of Chitosan on Control of Postharvest Diseases and Physiological Responses of Tomato Fruit», *Postharvest Biology and Technology* 44: 300-306, EE. UU., 2007.
- Pacheco, N.; P. Larralde; J. Sepulveda; S. Trombotto; A. Domard; K. Shirai: «Evaluation of Chitosans and *Pichia guilliermondii* as Growth Inhibitors of *Penicillium digitatum*», *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 20-26, Inglaterra, 2008.
- Palma, J.; H. B. Jansson; J. Salinas; L. V. López: «Effect of Chitosan on Hyphal Growth and Spore Germination of Plant Pathogenic and Biocontrol Fungi», *Journal of Applied Microbiology* 104: 541-553, Inglaterra, 2008.
- Palma, J.; I. C. Huang; H. B. Jansson; J. Salinas; L. V. López; N. D. Read: «Chitosan Permeabilizes the Plasma Membrane and Kills Cells of *Neurospora crassa* in an Energy Dependent Manner», *Fungal Genetics and Biology* 46: 585-594, EE. UU., 2009.
- Park, R.; J. Kyu; J. You; J. Yu; K. Kil; S. Jae; K. Yong: «Variation of Anti-Fungal Activities of Chitosans on Plant Pathogens», *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12: 84-88, Corea, 2002.
- Plascencia, M.; G. Viniestra; R. Olayo; M. M. Castillo; K. Shirai: «Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*», *Macromolecular Bioscience* 3: 582-586, EE. UU., 2003.
- Prashanth, K. V. H.; R. N. Tharanathan: «Chitin/chitosan: Modifications and Their Unlimited Application Potential-an Overview», *Trends in Food Science & Technology* 18: 117-131, Holanda, 2007.
- Rabea, E.; M. E. T. Bada; C. Stevens; G. Smagghe; W. Steurbaut: «Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action», *Biomacromolecules* 4 (6): 1457-1466, EE. UU., 2003.
- Ramírez, M. A.; G. Cabrera; A. Gutiérrez; T. Rodríguez: «Metodología de obtención de quitosana a partir de quitina de langosta», *Cultivos Tropicales* 21: 81-84, Cuba, 2000.
- Sánchez, D.; S. B. Bautista; P. Castillo: «Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl», *Anales de Biología* 29: 23-32, España, 2007.
- Varma, A. J.; S. V. Deshpande; J. K. Kennedy: «Metal Complexation by Chitosan and its Derivatives: a Review», *Carbohydrate Polymers* 55: 77-93, Inglaterra, 2004.
- Xu, J.; X. Zhao; X. Han; Y. Du: «Antifungal Activity of Oligochitosan Against *Phytophthora capsici* and Other Plant Pathogenic Fungi *in vitro*», *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87: 220-228, Inglaterra, 2007 a.
- Xu, J.; X. Zhao; X. Wang; Z. Zhao; Y. Du: «Oligochitosan Inhibits *Phytophthora capsici* by Penetrating the Cell Membrane and Putative Binding to Intracellular Targets», *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 167-175, Inglaterra, 2007 b.