

# RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS

SÉRIE DIGITAL

OLIGÓMEROS DE QUITOSANA,  
PREPARAÇÃO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS:  
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Irineu Batista, Inês Andrade e Helena Alves da Silva

2015

9



## **RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS DO IPMA – SÉRIE DIGITAL**

Destinam-se a promover uma divulgação rápida de resultados de carácter científico e técnico, resultantes da actividade de investigação e do desenvolvimento e inovação tecnológica nas áreas de investigação do mar e da atmosfera. Esta publicação é aberta à comunidade científica e aos utentes, podendo os trabalhos serem escritos em Português, Francês ou Inglês.

### **Edição**

IPMA

Rua C – Aeroporto de Lisboa  
1749-007 LISBOA  
Portugal

### **Corpo Editorial**

Francisco Ruano – Coordenador

Aida Campos

Irineu Batista

Lourdes Bogalho

Mário Mil-Homens

Rogélia Martins

Teresa Drago

### **Edição Digital**

Anabela Farinha

As instruções aos autores estão disponíveis no sitio web do IPMA

<http://ipma.pt>

ou podem ser solicitadas aos membros do Corpo Editorial desta publicação

### **Capa**

Conceição Almeida

### **ISSN**

**2183-2900**

Todos os direitos reservados

# OLIGÓMEROS DE QUITOSANA, PREPARAÇÃO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Irineu Batista; Inês Andrade; Helena Alves da Silva**

IPMA – Divisão de Aquacultura e Valorização (DivAV)

Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa

Recebido em 1.10.2015

Aceite em 10.11.2015

## RESUMO

A quitina e a quitosana, obtida por desacetilação da quitina, possuem múltiplas propriedades funcionais, levando a que encontrem aplicações em áreas muito diversificadas. Porém, a quitina é apenas solúvel em solventes muito específicos enquanto a quitosana, sendo solúvel em soluções ácidas diluídas, apresenta elevada viscosidade. Estes problemas de solubilidade em condições fisiológicas limitam as aplicações biológicas destes biopolímeros. Para ultrapassar estas dificuldades desenvolveram-se numerosos estudos sobre a obtenção de oligómeros resultantes da hidrólise destes biopolímeros os quais são solúveis em água, apresentam baixa viscosidade e são absorvíveis no intestino humano. Estes estudos envolveram o desenvolvimento de diferentes métodos de preparação destes oligómeros e de avaliação das respectivas actividades biológicas. Este trabalho constitui uma revisão bibliográfica dos métodos químicos e enzimáticos usados na preparação dos oligómeros, incluindo os mecanismos das reacções de hidrólise envolvidas, e dos resultados obtidos em estudos sobre as suas diferentes actividades biológicas.

**Palavras chave:** Quitosana, oligómeros, hidrólise química e enzimática, actividades biológicas

## ABSTRACT

**Title:** Preparation of chitosan oligomers and their biological activities: A review.

Chitin and chitosan possess many functional properties offering them a wide range of applications. However, chitin is only soluble in very specific solvents whereas chitosan is soluble in diluted acid solutions, highly viscous. These problems of solubility in physiological conditions have limited their biological applications. In order to overcome these problems numerous studies have been developed on the preparation of oligomers from these biopolymers. These oligomers are water-soluble, present low viscosity and are absorbed in the human intestine. These studies concerned the development of different methods on the oligomers preparation and the evaluation of their biological activities. The current work is a review of the chemical and enzymatic methods used in the preparation of oligomers, including the chemical hydrolysis mechanisms, and also the results obtained in the characterization of their biological activities.

**Keywords:** Chitosan, oligomers, chemical and enzymatic hydrolysis, biological activities

---

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BATISTA, I; ANDRADE, I.; SILVA, H. A., 2015. Oligómeros de quitosana, preparação e propriedades biológicas: uma revisão bibliográfica. *Relat. Cient. Téc. do IPMA* (<http://ipma.pt>) n° 9, 68p.



## Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Preparação de oligómeros de quitina e quitosana.....</b>	<b>7</b>
2.1. Preparação de oligómeros de quitina por hidrólise química.....	7
2.2. Preparação de oligómeros de quitosana por hidrólise química.....	8
2.3. Preparação de oligómeros por via enzimática.....	21
2.3.1. Preparação de oligómeros de quitina por hidrólise enzimática.....	21
2.3.2. Preparação de oligómeros de quitosana por hidrólise enzimática.....	23
2.4. Preparação de oligómeros por síntese enzimática ou química.....	29
<b>3. Actividades biológicas dos oligómeros.....</b>	<b>30</b>
3.1. Actividade antimicrobiana.....	30
3.2. Inibição do crescimento de fungos.....	32
3.3. Actividade inibidora de vírus.....	33
3.4. Actividade antiradicalar.....	34
3.5. Actividade antitumoral.....	35
3.6. Actividade anti-inflamatória.....	36
3.7. Outros efeitos biológicos.....	38
3.7.1. Efeito anti-hipertensivo.....	38
3.7.2. Efeito na absorção de cálcio e aumento da resistência do tecido ósseo.....	39
3.7.3. Prevenção e tratamento da asma.....	39
3.7.4. Efeito hipocolesterolémico.....	40
3.7.5. Efeitos imunoestimulantes.....	40
3.7.6. Utilização em terapia genética.....	40
<b>4. Referências bibliográficas.....</b>	<b>42</b>

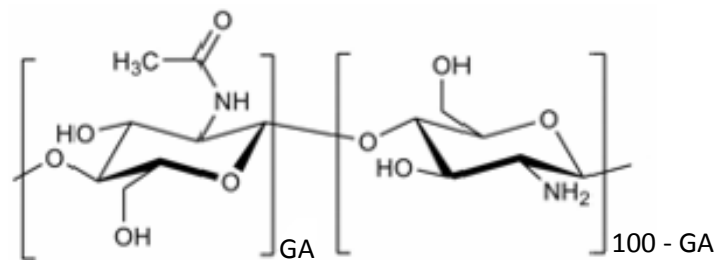
## Abreviaturas

Lista de abreviaturas usadas neste trabalho

<b>Abreviatura</b>	<b>Designação</b>
AAPH	Cloreto de 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
AChE	Acetilcolinesterase
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Ang II	Angiotensina II
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DPPH	2,2 difenil-1-picril hidrazilo
GA	Grau de N-acetilação
GlcN	Glucosamina
GlcNac	N-acetilglucosamina
GP	Grau de polimerização
HIV	Imunodeficiência adquirida
HMF	Hidroximetilfurfural
IL-6	Interleucina-6
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
iNOS	Forma inductível da sintase do óxido nítrico
LPS	lipopolissacarídeos
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear de transcrição
NO	Óxido nítrico
QBMM	Quitosana com baixa massa molecular
SN2	Reacção de substituição nucleófila bimolecular
TNF- $\alpha$	Factor de necrose tumoral- $\alpha$

## 1. Introdução

A quitina é um biopolímero do tipo da celulose que se encontra no exosqueleto de crustáceos e nas paredes celulares de fungos, insectos e leveduras. Tal como a celulose, a quitina desempenha funções de suporte e protecção naqueles organismos. Estima-se que a produção anual de quitina atinge  $10^{10}$ - $10^{11}$  toneladas (Arbia *et al.*, 2013), sendo o segundo polímero natural mais abundante. Este polímero apresenta uma estrutura química semelhante à celulose, sendo a N-acetilglucosamina (GlcNac) e a glucosamina (GlcN) os seus monómeros constituintes (Fig. 1) que se ligam entre si por ligações glicosídicas (1 → 4).



GA – grau de N-acetilação  
Quitina GA > 50%  
Quitosana GA < 50 %

Figura 1 - Estruturas químicas da quitina e da quitosana.

A quitina encontra-se associada a proteínas e outros constituintes no exoesqueleto de invertebrados aquáticos, insectos e aracnídeos e nas paredes celulares de vários fungos e algas. Os resíduos resultantes do processamento de crustáceos (e.g., camarão, lagostim, caranguejo, lagosta) contêm 14 % a 35 % de quitina em base seca. No exoesqueleto dos crustáceos, a quitina está fortemente associada não só a proteínas, mas também a lípidos, pigmentos e a compostos de cálcio. Assim, os processos de extracção da quitina envolvem a desmineralização, a desproteinização e o branqueamento. A desmineralização é usualmente conseguida por tratamento com soluções diluídas de HCl, mas está também referenciada a utilização de outros ácidos como o sulfuroso, o fórmico e o acético. A utilização de EDTA constitui uma alternativa para a desmineralização em condições muito suaves para evitar a despolimerização da quitina. Na desproteinização recorre-se normalmente ao NaOH, mas têm sido igualmente propostos processos biológicos, usando proteases (Takeda e Abe, 1962; Takeda e Katsuura, 1964) ou culturas de bactérias proteolíticas (Shimahara *et al.*, 1982). O trabalho de Arbia *et al.* (2013) apresenta uma revisão bibliográfica de diferentes métodos biológicos usados na extracção de quitina do exoesqueleto de crustáceos. Na descoloração da quitina têm sido usados solventes orgânicos como a acetona e o etanol, mas também

hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogénio e acetato de etilo para se conseguir uma remoção mais eficiente dos pigmentos.

Este polímero natural apresenta algumas características únicas como a elevada massa molecular e resistência mecânica, a insolubilidade na água e a biodegradabilidade, além de exibir diferentes actividades biológicas.

A quitosana, (1→4)-2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranosose, é um polímero obtido da quitina por desacetilação (Fig. 2). Esta pode realizar-se por processos químicos e biológicos. Os primeiros envolvem usualmente a utilização de soluções concentradas de NaOH a 100 °C (Gamage e Shahidi, 2007). Nos processos biológicos recorre-se ao tratamento directo da quitina com extractos microbianos de desacetilases (Knorr e Kein, 1986) ou à fermentação com diferentes espécies de fungos (Kauss *et al.*, 1982/1983; McGahren *et al.*, 1984). Na figura 2 apresenta-se um esquema da preparação de quitina e de quitosana a partir de carapaças de crustáceos ou de pena de lula.

A quitosana e os seus derivados apresentam um conjunto de propriedades muito interessantes como a não toxicidade, a biocompatibilidade, a biodegradabilidade controlada e,

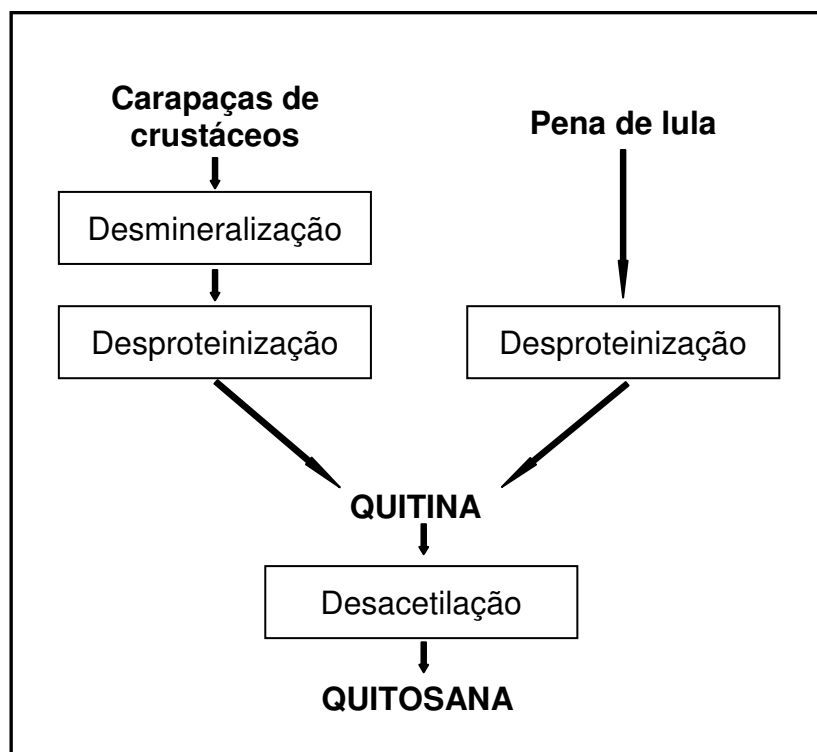


Figura 2 – Esquema geral de preparação de quitina e quitosana.

além disso, não são antigénicos. Estas propriedades levam a que a quitosana apresente um grande número de aplicações em áreas tão diversificadas como a biotecnologia, a farmacêutica, o tratamento de efluentes, a cosmética, a agricultura, a alimentar e a têxtil.

Apesar das múltiplas actividades biológicas e funcionais da quitina e quitosana e das suas aplicações em áreas muito

diversificadas, o limitado grau de absorção no intestino humano, as elevadas massas moleculares destes biopolímeros e a elevada viscosidade podem restringir as suas aplicações



em sistemas *in vivo*. Efectivamente, a maior parte dos intestinos dos animais e, em particular, o tracto digestivo humano, não possui enzimas como quitinases e quitosanases. Isto leva a que a quitina e a quitosana sejam excretadas nas fezes sem serem degradadas ou sem se registar uma absorção significativa (Weiner, 1992). A não biodisponibilidade destes biopolímeros constitui assim uma limitação o que despertou grande interesse pela preparação de oligómeros. Estes, em contrapartida, apresentam uma baixa viscosidade, têm massas moleculares baixas e cadeias curtas o que os torna muito solúveis em soluções aquosas neutras e facilmente absorvíveis por sistemas vivos.

## **2. Preparação de oligómeros de quitina e quitosana**

### *2.1. Preparação de oligómeros de quitina por hidrólise química*

Os métodos químicos mais utilizados na preparação de oligómeros de quitina envolvem a hidrólise ácida. Num trabalho de 1958, Barker *et al.* (1958) apresentaram uma revisão de trabalhos publicados até aquela data sobre a degradação da quitina por via ácida e descreveram a hidrólise deste polímero com ácido acético, seguida de desacetilação e purificação dos produtos preparados. Em trabalhos posteriores, Inaba *et al.* (1984) e Kurita *et al.* (1993) recorreram também ao ácido acético para hidrolisar a quitina. Os primeiros autores tinham como objectivo a obtenção de oligómeros de quitina para a preparação de um substrato sintético para a determinação da actividade da lisozima. Os últimos autores procederam à hidrólise de  $\beta$ -quitina de lula e obtiveram peracetato de oligómeros de quitina com elevado rendimento e uma considerável repetibilidade do processo hidrolítico.

Um dos primeiros trabalhos sobre a preparação de oligómeros de quitina com HCl concentrado (Rupley, 1964) teve em vista a obtenção de substratos para a lisozima. Este processo de hidrólise com HCl apresentava algumas desvantagens como a morosidade da preparação, o custo elevado do fraccionamento e a necessidade de muita mão-de-obra, obtendo-se, além disso, um rendimento baixo de oligómeros com um grau de polimerização (GP) elevado. Para obviar a estas dificuldades, Takahashi *et al.* (1995) estudaram o efeito conjunto de HCl e ultrassons na hidrólise de quitina. O rendimento obtido na degradação da quitina foi cerca de 2 a 4 vezes superior ao atingido na hidrólise sem aplicação de ultrassons. Verificaram também que o rendimento aumentava com a concentração do ácido (6 – 12 M) mas diminuía com o aumento da concentração de quitina. Bredehorst *et al.* (1998) patentearam um processo de produção de oligómeros de quitina com HCl concentrado e eliminação dos sais por electrodiálise ou ultrafiltração tangencial.

A hidrólise da quitina com ácido fluorídrico anidro foi ensaiada por Bosso *et al.* (1986), tendo sido verificado que o GP médio dos oligómeros dependia do tempo de reacção e da temperatura, tendo obtido produtos com GP de 2 a 10. Defaye *et al.* (1989), usando também ácido fluorídrico anidro, obtiveram oligómeros em condições bem controladas que permitiam obter produtos com 2 a 9 resíduos. No entanto, a maior proporção de oligómeros obtidos era de dímeros e tetrâmeros.

## 2.2. Preparação de oligómeros de quitosana por hidrólise química

Na preparação de oligómeros de quitosana por hidrólise química, o processo ocorre em soluções aquosas do polímero em meio ácido com pH inferior a 6,0. A primeira referência à hidrólise química da quitosana remonta a 1957 (Horowitz *et al.*, 1957) a qual foi realizada com HCl concentrado. Domard e Cartier (1989) obtiveram um largo espectro de oligómeros por hidrólise com HCl 12 M a 72 °C durante 90 minutos e fraccionamento por cromatografia de exclusão molecular, usando uma solução de acetato de amónio como eluente. Por sua vez, Rege e Block (1999) estudaram o efeito da temperatura e do tempo de reacção e a moagem prévia da quitosana na despolimerização deste polímero. Verificaram que a temperatura e o tempo de reacção afectavam a massa molecular bem como o grau de desacetilação dos oligómeros resultantes. Porém, a moagem não tinha efeito nestas propriedades. A cinética da hidrólise da ligação glicosídica em quitosana com soluções de HCl diluído e concentrado foi estudada por Vårum *et al.* (2001), apresentando-se na figura 3 os mecanismos propostos para a hidrólise ácida. Estes autores mostraram que a velocidade de hidrólise daquela ligação dependia da presença do grupo acetamida nos monómeros do polímero.

Por sua vez, a utilização de ácido fluorídrico em meio anidro (Defaye *et al.*, 1994) permitiu obter oligómeros com GP de 2 a 11 com um rendimento de quase 100 %. Um processo de hidrólise de quitosana com ácido fosfórico a quente foi patenteado por Omura *et al.* (1991). Os rendimentos referidos situavam-se entre 10 % e 20 % e os oligómeros apresentavam um GP de 6 a 8. Hasegawa *et al.* (1993) ensaiaram também a preparação de oligómeros de quitosana com este ácido à temperatura ambiente, obtendo dois tipos de produtos com GP de 7,3 e 16,8. Posteriormente, Jia e Shen (2002), também num estudo de hidrólise de quitosana com ácido fosfórico, mostraram que o rendimento e a massa molecular dos oligómeros obtidos dependiam grandemente da temperatura e do tempo da reacção. Para a hidrólise ácida da quitosana foram também patenteados dois processos, um com ácido sulfúrico concentrado (Maksinov *et al.*, 1990) e outro com ácido acético (Todashi, 1990). Il'ina e Varlamov (2004) usaram ácido láctico diluído na hidrólise de quitosana, tendo

verificado que a diminuição da massa molecular da quitosana era tanto mais elevada quanto maior fosse a massa molecular e o grau de acetilação da quitosana. Num trabalho mais recente, Trombotto *et al.* (2008) descreveram a preparação de séries homogêneas de oligómeros com a mesma distribuição de GP entre 2 e 12, mas com vários graus de acetilação entre 0 % e 90 %.

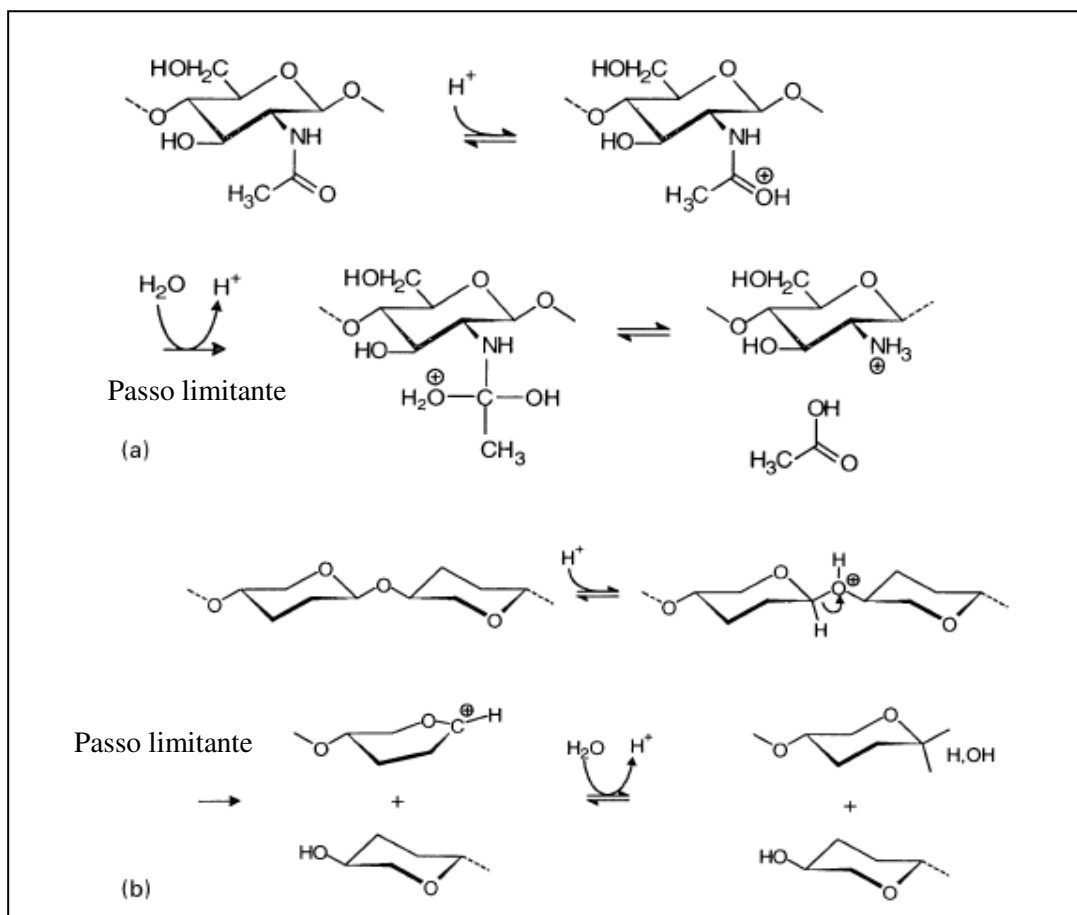


Figura 3 - Mecanismos propostos para a hidrólise por catálise ácida das ligações N-acetilo e glicosídica. (a) Hidrólise da ligação N-acetilo (reação SN2); (b) Mecanismo mais aceite da hidrólise da ligação glicosídica (Vårum *et al.*, 2001).

De um modo geral, a hidrólise ácida leva à produção de oligómeros com baixo GP. Por outro lado, os rendimentos atingidos na produção de oligómeros com maior GP, por exemplo, 5 e 7, são inferiores a 40 %.

Outro processo de obtenção de oligómeros de quitosana por via química envolve a degradação oxidativa deste polímero com ácido nitroso. De um modo geral, este processo permitiu obter oligómeros com GP de 9 a 18, mas era difícil produzir oligómeros com GP inferior a 10 e os produtos finais continham 2,5-anidro manose devido à desaminação provocada pelo ácido nitroso. O processo patenteado por Peniston e Johnson (1975) envolvia a utilização de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) para despolimerizar a quitosana e constitui uma das

primeiras referências à aplicação de um sal do ácido nitroso. Tomaya *et al.* (1987) patentearam também um processo para a obtenção de quitosana com baixa massa molecular (QBMM) solúvel em água, utilizando ácido nitroso. A cinética de despolimerização da quitosana por ácido nitroso em solução de HCl diluído foi estudada por Allan e Peyron (1995). Estes autores verificaram que a velocidade de despolimerização era independente da massa molecular da quitosana e era de primeira ordem em relação à concentração de ácido nitroso e de glucosamina. Furusaki *et al.* (1996) recorreram igualmente à degradação oxidativa de quitosana com  $\text{NaNO}_2$ . Os oligómeros obtidos foram subsequentemente tratados com borohidreto de sódio para reduzir o grupo aldeído no resíduo 2,5-anidro D-manose terminal, obtendo derivados mais estáveis de 2,5-anidro-D-manitol. Também Tømmeraas *et al.* (2001) estudaram o mecanismo de despolimerização de quitosana com ácido nitroso (Fig. 4), tendo obtido oligómeros estáveis totalmente acetilados e dispendo do grupo aldeído no

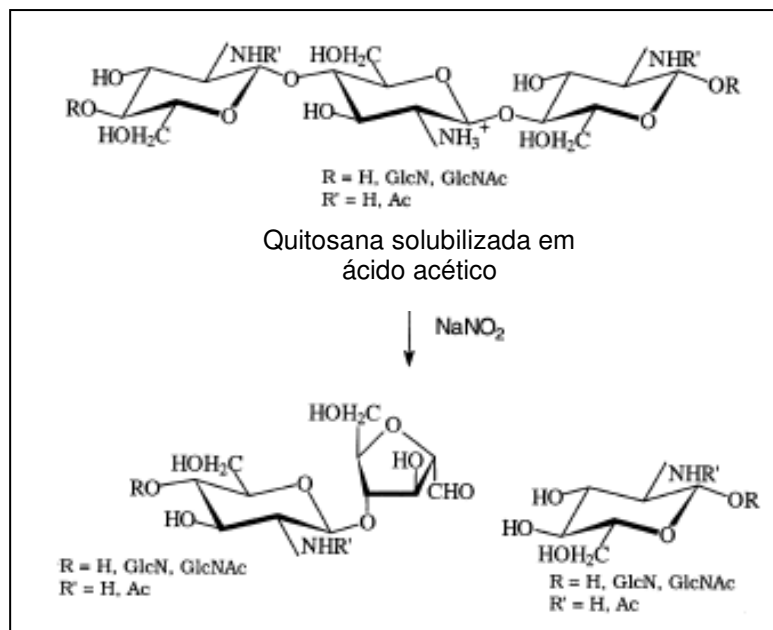


Figura 4 – Mecanismo da formação de 2,5-anidro-D-manose no terminal redutor durante a despolimerização de quitosana com ácido nitroso (Tømmeraas *et al.*, 2001).

terminal redutor. Obtiveram também oligómeros totalmente desacetilados, mas que participavam em reacções intermoleculares entre o grupo amina das unidades desacetiladas e o resíduo terminal 2,5-anidroD-manose. Esta base de Schiff facilitava a rotura da ligação glicosídica terminal e a formação de 5-hidroxi metilfurfural (HMF)

(Fig. 5). Mao *et al.* (2004) procederam também à despolimerização da quitosana

por degradação oxidativa com  $\text{NaNO}_2$ . A despolimerização realizada com diferentes razões molares quitosana/ $\text{NaNO}_2$  permitiu obter uma vasta gama de oligómeros com as diferentes massas moleculares pretendidas. A massa molecular variava linearmente com a razão molar quitosana/ $\text{NaNO}_2$  e diminuía logaritmicamente com o tempo de reacção. Do mesmo modo, Morris *et al.* (2009) verificaram que a massa molecular dos oligómeros de quitosana obtidos por degradação oxidativa com  $\text{NaNO}_2$  era proporcional à relação quitosana/ $\text{NaNO}_2$ .

A degradação oxidativa da quitosana foi igualmente ensaiada com peróxido de hidrogénio. O processo baseia-se na dissociação deste peróxido com formação de radicais hidroxilo os quais possuem uma elevada actividade oxidante, atacando as ligações

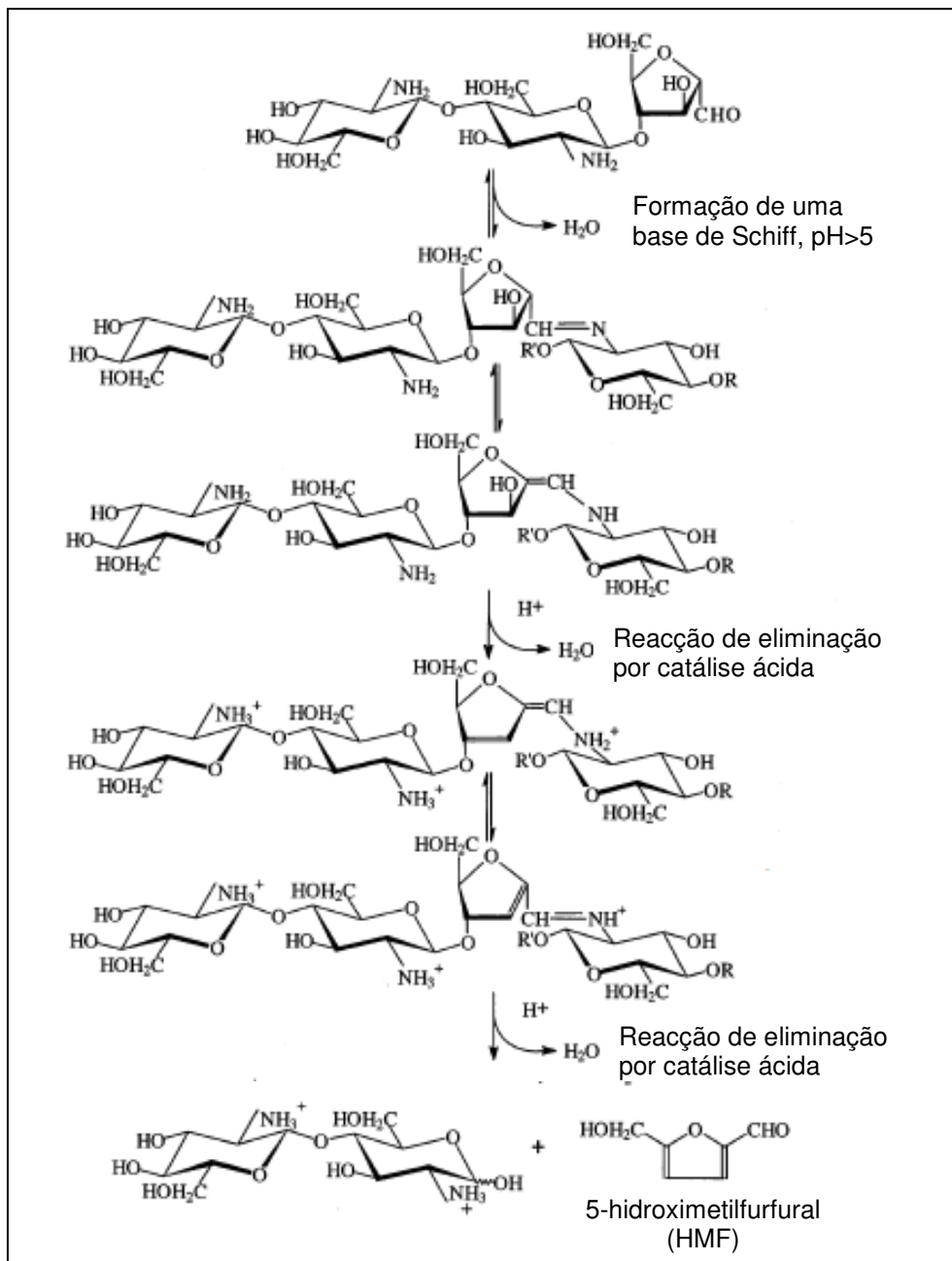


Figura 5 – Mecanismo proposto por Tømmeraas *et al.* (2001) para a formação de bases de Schiff que facilitam a eliminação de água, formação de HMF e rotura da cadeia.

glicosídicas da quitosana. Porém, para que a dissociação do peróxido de hidrogénio seja eficiente, é necessária a presença de um agente oxidante ou a interação com uma radiação electromagnética como a radiação ultravioleta ou microondas. Assim, Tanioka *et al.* (1996) procederam à despolimerização de quitosana num sistema gerador de radicais oxidrilo

( $\text{Cu}^{+2}$ /ácido ascórbico ou radiação ultravioleta/peróxido de hidrogénio). Estes autores concluíram que apenas a quitosana, e não a quitina, era susceptível de despolimerizar com o radical oxidrilo e que nem o radical superóxido, o peróxido de hidrogénio ou o oxigénio singleto provocavam a despolimerização. Chang *et al.* (2001) estudaram a cinética e os produtos de degradação da quitosana e Qin *et al.* (2002a) as alterações da massa molecular e da estrutura da quitosana degradada com peróxido de hidrogénio (Fig. 6). Por sua vez, Shao *et al.* (2003) prepararam oligómeros de quitosana aplicando em conjunto peróxido de hidrogénio e irradiação com microondas. Estes autores obtiveram oligómeros com massas moleculares na gama de 0,9-1,0 kDa e verificaram que o rendimento do processo dependia do tempo de reacção e da concentração de peróxido.

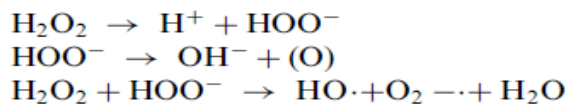


Figura 6 – Reacções de decomposição do peróxido de oxigénio (Qin *et al.*, 2002a).

A degradação oxidativa da quitosana com peróxido de hidrogénio foi estudada em pormenor por Tian *et al.* (2004). Estes autores verificaram que o grau de cristalinidade da quitosana se alterava durante a despolimerização. Propuseram que nas zonas cristalinas a

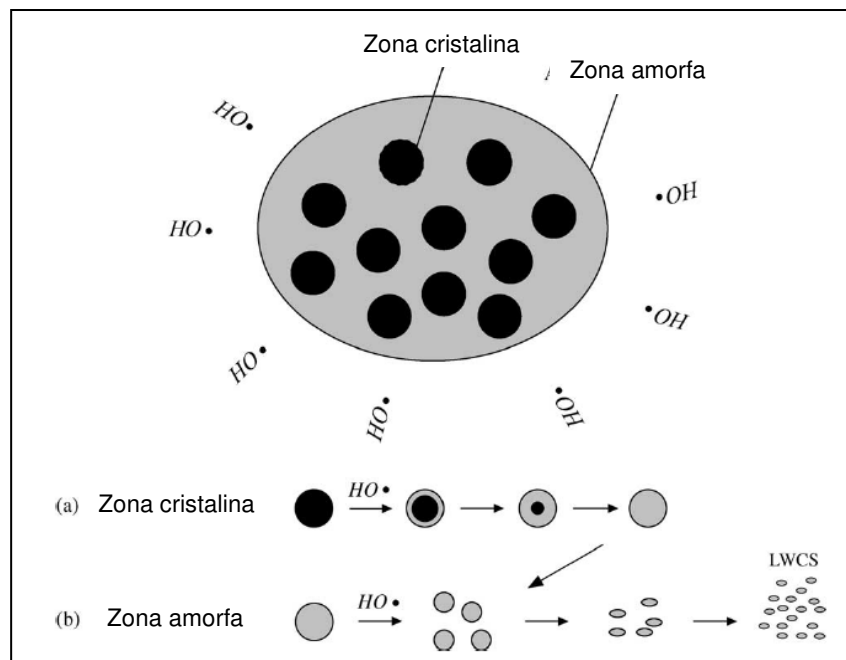


Figura 7 - Mecanismo proposto por Tian *et al.* (2004) para a despolimerização de quitosana na zona cristalina (a) e amorfa (b). LWCS – QBMM solúvel em água.

despolimerização ocorria por camadas enquanto nas zonas amorfas se processava por um processo de penetração (Fig. 7). Verificaram que o aumento do grau de desacetilação e da concentração de peróxido de hidrogénio levavam a uma diminuição mais rápida do grau de polimerização e também que o aumento da temperatura acelerava a reacção.

Sun *et al.* (2007) prepararam oligómeros por degradação oxidativa de soluções de quitosana com diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio e pela acção conjunta do peróxido e microondas. O processo de degradação da quitosana era acelerado pela aplicação de microondas com a consequente redução do tempo de degradação. Du *et al.* (2009) optimizaram o processo de degradação de quitosana com peróxido de hidrogénio, recorrendo à metodologia das superfícies de resposta.

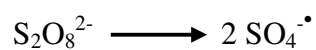
Hsu *et al.* (2002) recorreram ao persulfato de potássio para proceder à degradação de quitosana. Esta degradação processava-se através de um mecanismo envolvendo radicais livres resultantes da degradação térmica do persulfato de potássio que, por sua vez, promoviam a formação de radicais na quitosana, levando à sua despolimerização (Fig. 8). Por sua vez, Huang *et al.* (2007) e Xia *et al.* (2013) aplicaram peróxido de hidrogénio na degradação heterogénea de quitosana, mas recorrendo à catálise com ácido fosfotúngstico.

Wang *et al.* (2005) estudaram a degradação oxidativa da quitosana com peróxido de hidrogénio em conjunto com radiação ultravioleta. Estes autores mostraram que ocorria um efeito sinérgico entre o peróxido de hidrogénio e a radiação ultravioleta e o que o mecanismo de degradação estava relacionado com a rotura da ligação glicosídica. O efeito de sais inorgânicos na hidrólise de quitosana por microondas foi investigado por Xing *et al.* (2005). Os resultados obtidos permitiram verificar que a presença de alguns sais minerais (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>) acelerava a degradação da quitosana submetida à irradiação com microondas. A massa molecular da quitosana preparada nestas condições era consideravelmente mais baixa do que a obtida sem a adição de sais minerais.

Yue *et al.* (2008a) descreveram um método de preparação de QBMM solúvel em água e sem ácido usando ozono. A massa molecular do produto obtido situava-se entre 4,3 e 13,1 kDa, não se registando desacetilação da quitosana durante o processo de degradação.

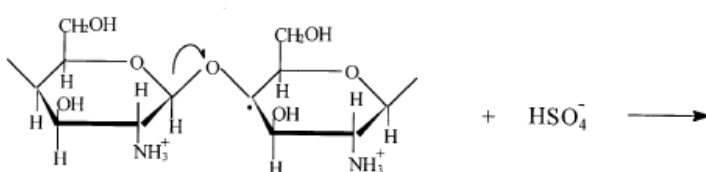
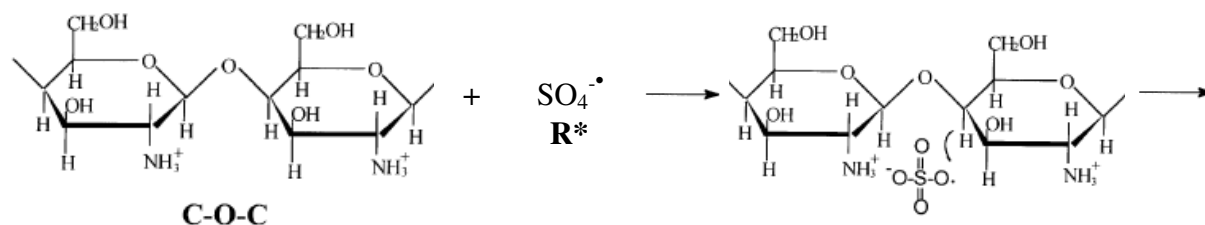
Recentemente, os líquidos iónicos têm vindo a merecer grande interesse por combinarem boas propriedades de solubilidade com uma pressão de vapor negligenciável e apresentarem também uma excelente estabilidade térmica. Têm sido usados para solubilizar diversas macromoléculas biológicas como a celulose, a queratina da lã e a fibroína da seda, sendo considerados solventes “verdes”. Assim, Zhao *et al.* (2009) desenvolveram um novo método de degradação oxidativa da quitosana com oxigénio molecular. Neste processo utilizaram, como catalisador, ftalocianina de ferro imobilizada num líquido iónico (1-n-butil-3-metilimidazólio bis((trifluometil)sulfonil) imida) (Fig. 9). A quitosana e o oxigénio encontravam-se numa solução aquosa de HCl. A reacção de degradação oxidativa decorria

(1) Dissociação térmica do persulfato de potássio

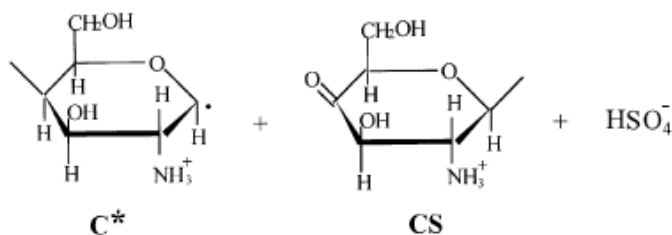


**R\***

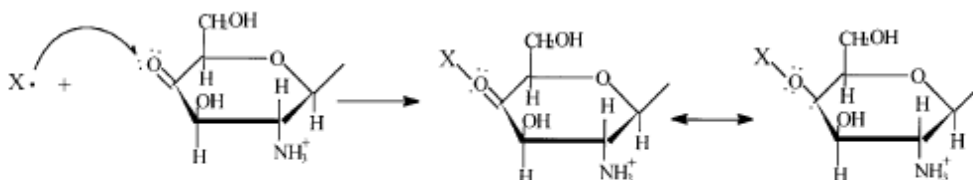
(2) O ião persulfato é atraído pelo grupo amina catiónico e o radical livre é transferido para o carbono C-4



(3) Rotura da cadeia na ligação C-O-C



(4) Inibição do radical livre pela cadeia de quitosana degradada que possui o grupo carbonilo terminal



(5) Desactivação dos iões persulfato

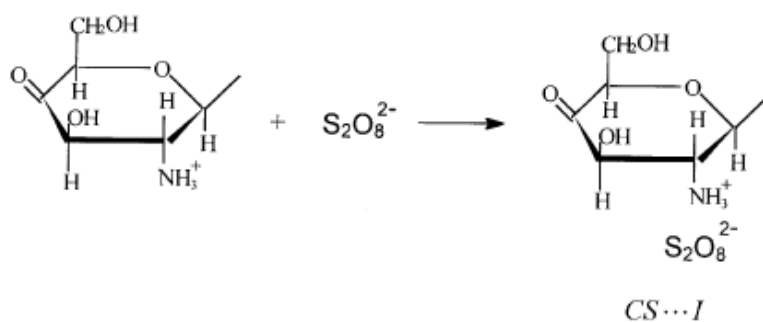


Figura 8 – Mecanismo proposto para a degradação de quitosana pelo persulfato de potássio (Hsu *et al.*, 2002).



sistema bifásico líquido iônico/água sob forte agitação. O catalisador podia ser reutilizado sucessivamente com evidentes vantagens económicas e redução de efluentes.

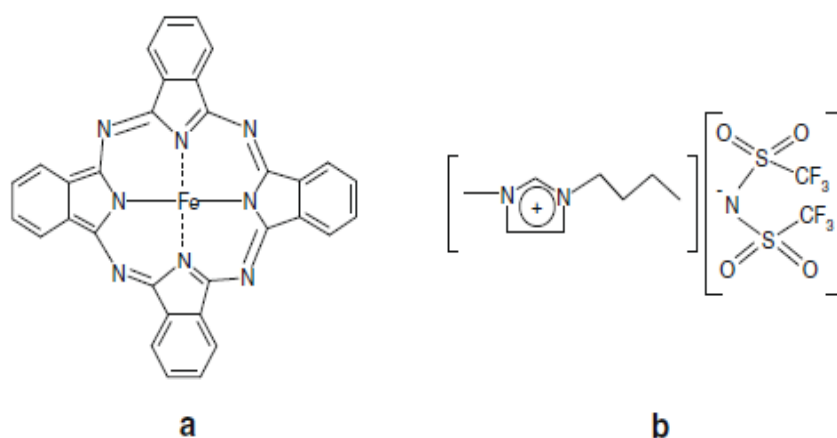


Figura 9 – Estrutura da ftalocianina de ferro II (a) e do 1-n-butil-3-metilimidazólio bis((trifluometil)sulfonil)imida (b).

Também Zhang *et al.* (2009) ensaiaram a hidrólise de quitosana em líquidos iônicos à base de cloreto ou brometo de 1-butil-3-metilimidazólio, tendo obtido um bom rendimento em açúcares totais redutores em condições de reacção suaves. De igual modo, Chen *et al.* (2012) estudaram a hidrólise de quitosana solubilizada em líquidos iônicos de ácido sulfónico funcionalizado (Fig. 10) que actuavam também como catalisadores e aplicando microondas. A hidrólise da quitosana nas condições optimizadas permitiu obter um rendimento de 90 % em 2 minutos.

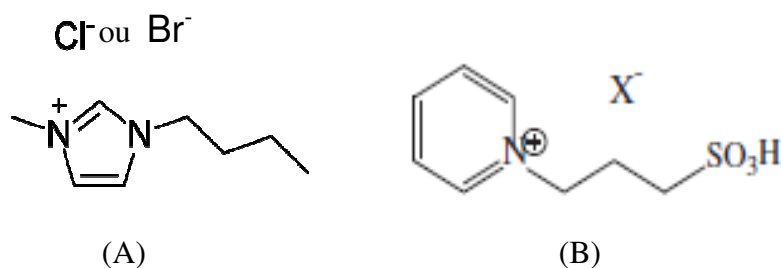


Figura 10 – Estrutura do cloreto (ou brometo) de 1-butil-3-metilimidazólio (A) e do ácido sulfónico funcionalizado, X<sup>-</sup> = HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, p-CH<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (B).

A radiação gama de <sup>60</sup>Co foi utilizada com diferentes doses (2-200 kGy) na preparação de oligómeros de quitosana (Choi *et al.*, 2002), apresentando-se na figura 11 a sequência de operações. A viscosidade da solução de quitosana diminuía rapidamente com doses até 10 kGy. A irradiação com doses acima de 100 kGy levou à obtenção de produtos com uma forte

cor castanha. Para doses de 100 kGy os oligómeros obtidos apresentavam 2 a 6 unidades de glucosamina e, segundo os autores, esta dose de irradiação era suficiente para conseguir a despolimerização da quitosana. Hai *et al.* (2003) ensaiaram igualmente a radiação gama na despolimerização de quitosanas (90 % e 99 % desacetiladas) no estado sólido (Fig. 12). De acordo com o estudo de Yoksan *et al.* (2004), a degradação de quitosana com radiação gama era mais eficiente na estrutura amorfa e, além disso, as QBMM obtidas mantinham a sua funcionalidade. A massa molecular das quitosanas apresentava uma diminuição substancial com o aumento da dose de radiação até 200 kGy após o que se mantinha praticamente constante. Além disso, o rendimento era mais elevado na quitosana menos desacetilada.

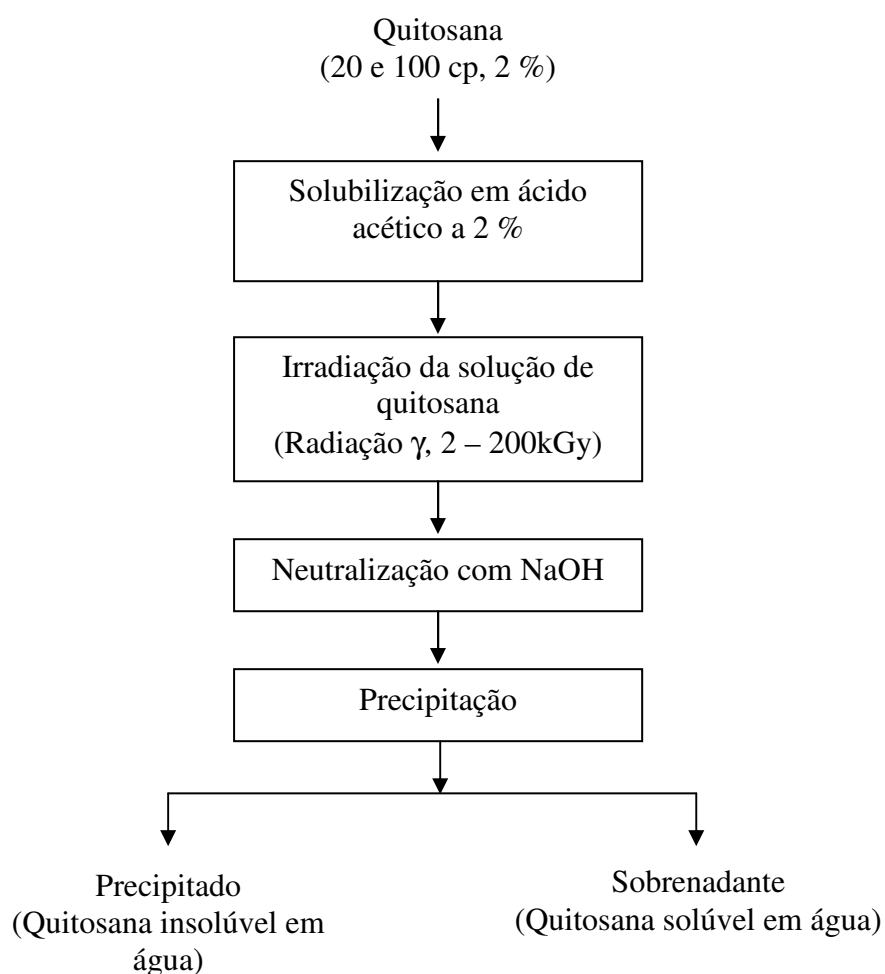


Figura 11 - Esquema de preparação de oligómeros de quitosana por radiação gama (Choi *et al.*, 2002).

Num estudo posterior de Gryczka *et al.* (2009) sobre o mecanismo envolvido na degradação de quitosana por radiação gama demonstrou-se que o grupo amina estava envolvido no processo de radiólise, podendo levar à formação de produtos derivados como éteres de hidroxilamina (Fig. 13). O efeito da massa molecular na degradação de quitosana

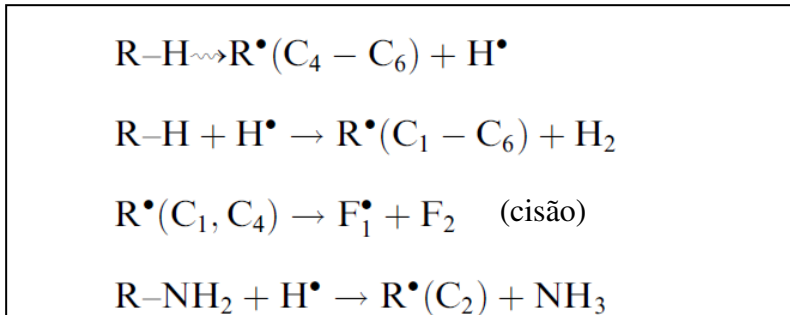
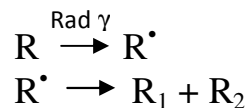


Figura 12 - Esquema proposto para o mecanismo de degradação de quitosana no estado sólido por radiação gama. R-H e R-NH<sub>2</sub> são moléculas de quitosana, R<sup>•</sup>(C<sub>n</sub>) é um radical de quitosana localizado no átomo de carbono n e F<sub>1</sub><sup>•</sup> e F<sub>2</sub> são fragmentos da cadeia principal após cisão (referido por Hai *et al.*, 2003).

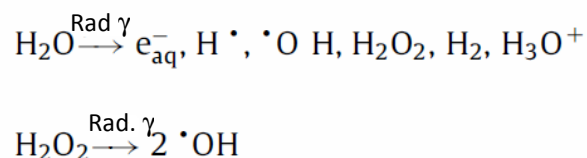
por radiação gama foi estudado por Tahtat *et al.* (2012). Os resultados obtidos mostraram que a degradação era mais rápida quando a quitosana se encontrava em solução. Por sua vez, a quitosana com massa molecular mais baixa era também a mais sensível à radiação.

Mais recentemente,

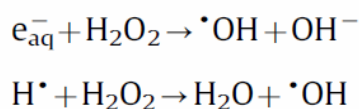
Taşkın *et al.* (2014), num estudo sobre a degradação de quitosana por este tipo de radiação, concluíram que o grau de desacetilação era um factor importante no controlo do rendimento do processo de degradação. Kang *et al.* (2007) estudaram o efeito conjunto da aplicação de radiação gama e peróxido de hidrogénio na degradação de quitosana. Verificaram um efeito sinérgico entre esta radiação e o peróxido de hidrogénio, resultando a formação acrescida de radicais hidroxilo por acção da radiação. Resultados posteriores obtidos por Duy *et al.* (2011) e Hien *et al.* (2012) confirmaram os referidos por Kang *et al.* (2007). Assim, a interacção da radiação gama com a quitosana provoca a sua degradação através de um processo radicalar:



Porém, na presença de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) podem ocorrer também as seguintes reacções:



Por sua vez, durante a irradiação, e<sup>-</sup><sub>aq</sub> (electrão hidratado) e H<sup>•</sup> podem reagir com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do seguinte modo:



Os radicais  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{H}\cdot$  provocam também a degradação da quitosana tal como a interação directa da radiação gama com este polímero.

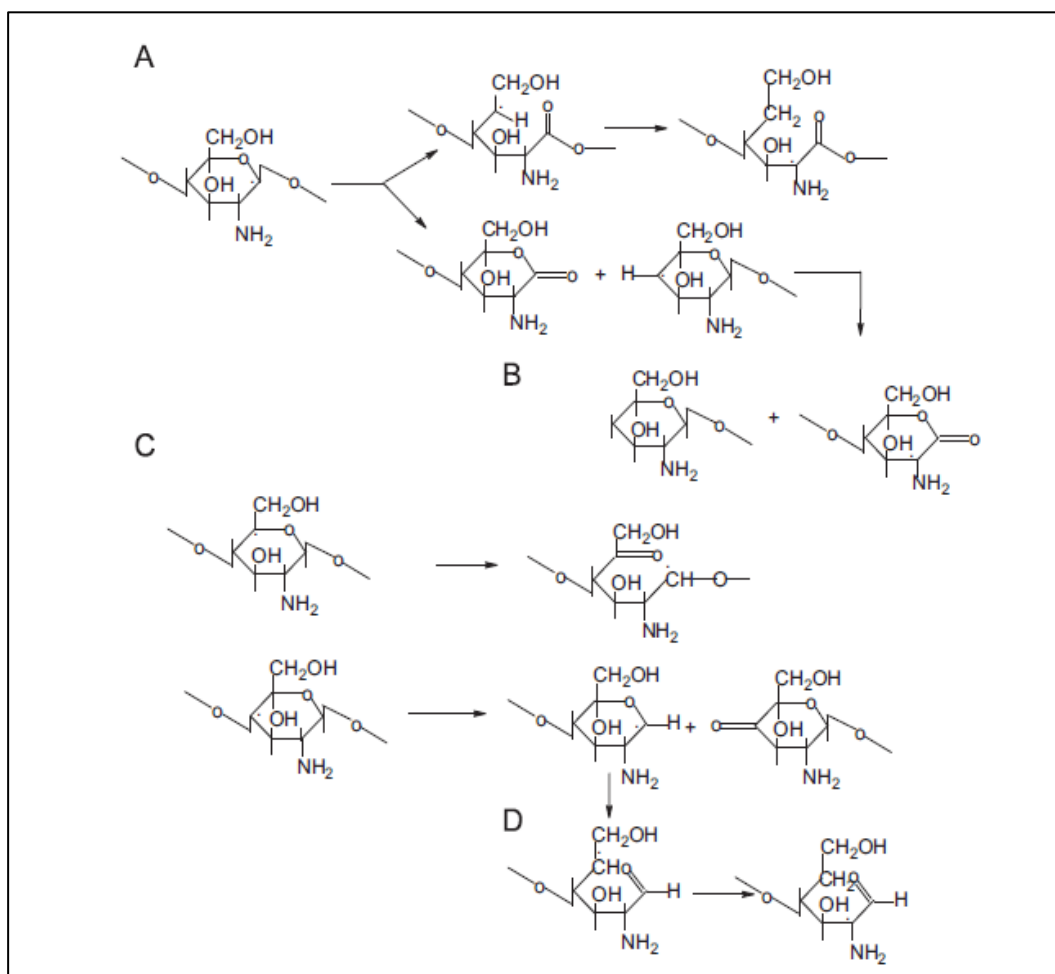
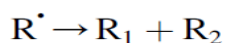
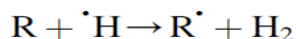
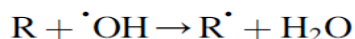


Figura 13 – Mecanismo da radiólise da quitosana proposto por Gryczka *et al.* (2009). A, B, C e D são radicais e compostos resultantes da radiólise.

Os ultrassons têm vindo a ser muito utilizados em múltiplos processos tecnológicos, em particular, na degradação de macromoléculas poliméricas. A degradação por ultrassons não é um processo aleatório, ocorrendo a rotura da ligação química próximo do centro da molécula. A aplicação de ultrassons na degradação da quitina e quitosana tem sido estudada por vários autores, sendo o trabalho de Chen e Chen (2000) um dos primeiros a aplicar ultrassons na despolimerização de quitina. Também Mislovičova *et al.* (2000) aplicaram ultrassons no

tratamento do complexo quitina-glucana extraído do micélio de *Aspergillus niger* e Cardoso *et al.* (2001) verificaram que a aplicação de ultrassons a quitina permitia atingir uma desacetilação mais eficiente. No estudo realizado por Tang *et al.* (2003) verificou-se que os ultrassons também provocavam a despolimerização da quitosana. O diâmetro médio das nanopartículas de quitosana era também afectado pelos ultrassons e concluíram, igualmente, que a aplicação de ultrassons de elevada intensidade provocava alterações nas nanopartículas de quitosana que podiam afectar a sua funcionalidade no transporte de fármacos. Tsaih e Chen (2003), num estudo sobre a aplicação de ultrassons a quitosanas com diferentes graus de desacetilação, concluíram que: (i) a massa molecular da quitosana diminuía com o tempo de exposição aos ultrassons; (ii) a velocidade de degradação e a constante de velocidade diminuía com o tempo; e (iii) a velocidade de degradação e a constante de velocidade aumentavam com o grau de desacetilação das quitosanas utilizadas. Cravotto *et al.* (2005) aplicaram também ultrassons para proceder à degradação de quitosana e preparar produtos derivados. Utilizando ultrassons de elevada intensidade de 17,8-18,5 kHz, obtiveram uma despolimerização controlada da quitosana e prepararam vários derivados da quitosana com elevados rendimentos. No estudo de Liu *et al.* (2006), também sobre a degradação de quitosana por ultrassons, verificou-se que as quitosanas com maior massa molecular e maior grau de desacetilação eram mais facilmente degradadas. Também no trabalho de Wu *et al.* (2008), sobre a degradação de quitosana com ultrassons, se verificou que a velocidade de degradação era afectada pelas características da quitosana (massa molecular e grau de desacetilação) e pelos parâmetros do processo. Yue *et al.* (2008b) combinaram o efeito dos ultrassons com o do ozono na degradação de quitosana. Verificaram um efeito sinérgico destes dois processos, considerando os autores que esta técnica era promissora para a obtenção de oligómeros de quitosana a uma maior escala.

Wasikiewicz *et al.* (2005) compararam três métodos de degradação da quitosana com ultrassons, radiação ultravioleta e radiação gama. Do ponto de vista energético, o método mais eficiente foi a radiação gama, mas o método com ultravioleta foi mais eficiente em termos de tempo de reacção. Também Czechowska-Biskup *et al.* (2005) ensaiaram a aplicação de radiação gama e ultrassons na despolimerização de quitosana. Mostraram que os rendimentos da degradação dependiam das propriedades do material de partida e das condições de irradiação. Verificaram também que a redução da massa molecular da quitosana levava a um aumento da capacidade de absorção de gordura.

Por sua vez, Cai *et al.* (2010) aplicaram um processo electroquímico na degradação de quitosana. A massa molecular dos oligómeros diminuía com o tempo de hidrólise e a intensidade da corrente, mas o grau de desacetilação não era afectado.

O sistema de plasma em solução foi utilizado por Prasertsung *et al.* (2012) na preparação de quitosana com massas moleculares da ordem de  $3,2 \times 10^4$  Da. Este sistema (Fig. 14) produz muitas espécies reactivas ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ , electrões livres,  $\text{O}_2^\bullet$  e  $\text{O}^-$ ) capazes de degradar a quitosana. O facto deste sistema não utilizar reagentes constitui uma vantagem em

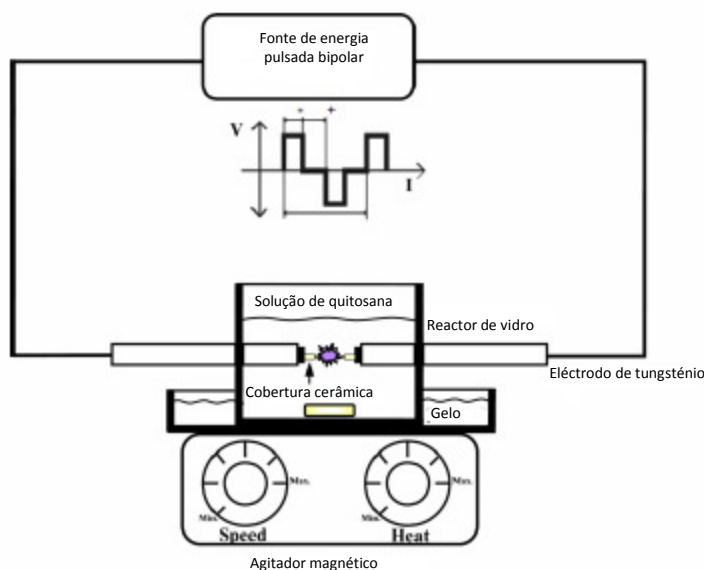


Figura 14 – Diagrama do sistema de plasma em solução (Prasertsung *et al.*, 2012).

relação a outros processos dado que não é necessária a sua eliminação após a reacção. Estes autores verificaram que a estrutura química dos produtos obtidos por este sistema não era afectada e que os oligómeros obtidos tinham um GP de 2 a 8. Na figura 15 apresenta-se o mecanismo envolvido na degradação da quitosana pelo radical hidroxilo.

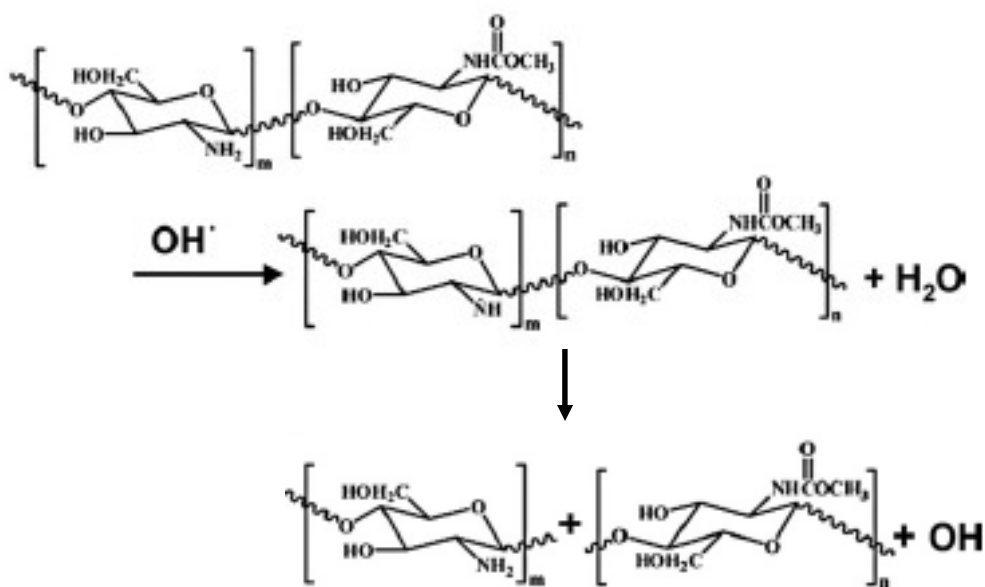


Figura 15 – Mecanismo de degradação da quitosana pelo radical hidroxilo, em que  $m$  e  $n$  representam o número de resíduos de glucosamina e acetilglucosamina, respectivamente (Prasertsung *et al.*, 2012).

### 2.3. Preparação de oligómeros por via enzimática

A hidrólise da quitina e quitosana por métodos químicos, embora seja comumente utilizada à escala industrial, apresenta algumas desvantagens. De entre estas têm sido indicadas a formação de compostos tóxicos, o maior risco associado à poluição ambiental e os rendimentos mais baixos. Como alternativa a este tipo de hidrólise, têm sido propostos métodos enzimáticos que permitem obter oligómeros com GP mais elevados e em condições mais suaves. Estes métodos minimizam as alterações químicas negativas e promovem as respectivas actividades biológicas (Kim e Rajapakse, 2005). A principal desvantagem destes métodos reside no facto das enzimas apresentarem custos elevados.

Na figura 16 apresenta-se um esquema geral de obtenção de oligómeros de quitina e de quitosana por via enzimática (Jeon *et al.*, 2000).

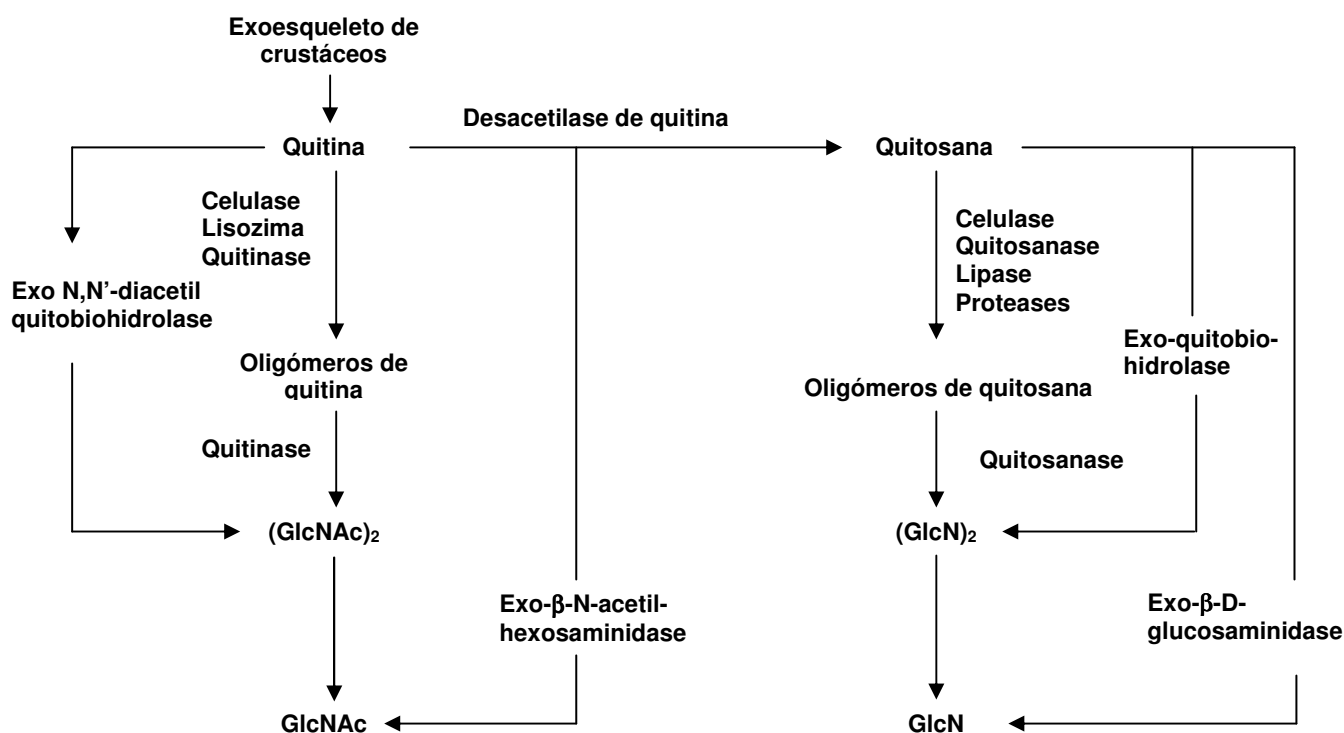


Figura 16 – Esquema de conversão de quitina e quitosana nos respectivos oligómeros por métodos enzimáticos. GlcNAc – N-acetil-D-glucosamina; GlcN – D-glucosamina.

#### 2.3.1. Preparação de oligómeros de quitina por hidrólise enzimática

A quitina pode ser degradada por hidrólise enzimática por quitinases e pela lisozima. As quitinases encontram-se em bactérias, fungos, plantas e insectos, mas apenas nalguns mamíferos como bovinos, caprinos e ovinos.

A quitinase e a  $\beta$ -acetilglucosaminidase de origem bacteriana estão envolvidas na degradação da quitina e a maior parte das quitinases bacterianas são do tipo endo e produzem oligômeros superiores a dímeros. A  $\beta$ -acetilglucosaminidase promove a hidrólise de N-acetilquitiligosacarídeos ou dímeros de GlcNac. Todavia, as referências a quitinases que produzem oligômeros de elevado GP são muito limitadas. Assim, vários trabalhos sobre a hidrólise de quitina por quitinases de origem bacteriana referem a produção de GlcNac livre, dímeros ou oligômeros até cinco unidades (Takiguchi e Shimahara, 1989; Mitsutomi *et al.*, 1990; Takayanage *et al.*, 1991; Ohtakara *et al.*, 1990; Mitsutomi *et al.*, 1995; Ilyina *et al.*, 2000; Sutrisno *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). De um modo geral, a maior parte das quitinases microbianas hidrolisam a quitina no estado sólido de modo aleatório, seguindo-se a imediata hidrólise dos oligômeros de grande massa molecular solúveis em água.

Uma alternativa para a preparação de oligômeros com maior GP envolve a transglicosilação enzimática que permite a obtenção de hexâmeros e heptâmeros a partir de oligômeros com baixos GP (Usui *et al.*, 1987; Nanjo *et al.*, 1990; Usui *et al.*, 1990).

Aiba e Muraki, citados por Jeon *et al.* (2000), recorreram a enzimas de preços acessíveis que incluíam lipase, celulase e hemicelulase para hidrolisarem quitina, tendo verificado que no caso da hemicelulase o rendimento de hexâmeros era superior a 20 %, quando o substrato era constituído por quitosanas com grau de acetilação de 9 % a 22 %. Zhang e Neau (2001) estudaram a despolimerização de quitosana com  $\beta$ -glucosidase comercial, tendo concluído que as quitosanas com maior massa molecular e grau de desacetilação apresentavam menor afinidade para esta enzima, sugerindo ainda os resultados a presença de uma quitinase naquela enzima comercial.

Ilnkovan *et al.* (2006) referem a obtenção de N-acetil quitobiose a partir de quitina usando enzimas proteolíticas. A pepsina era, entre estas, a que apresentava maior actividade quitinolítica, permitindo obter um rendimento de 71,5 % de quitobiose. As suspensões de quitina amorfa ou quitina pré-tratada com ácido fosfórico foram os melhores substratos para a hidrólise enzimática.

A lisozima é outra enzima utilizada na degradação de quitina ou quitina parcialmente desacetilada. Na degradação de quitosanas parcialmente acetiladas com lisozima verificou-se que os hexâmeros contendo três, quatro ou mais resíduos acetilados contribuíam maioritariamente para a velocidade inicial de degradação (Nordtveit *et al.*, 1994). Porém, as quitosanas com um grau de desacetilação superior a 95 % não eram hidrolisadas pela



lisozima. Mostrou-se também (Nordtveit *et al.*, 1996) que a degradação com lisozima aumentava com o grau de acetilação da quitosana de 12 % a 60 %. Por outro lado, Aiba (1992) verificou que a velocidade de hidrólise da quitosana por lisozima dependia do padrão de distribuição dos grupos N-acetilo na quitosana. A velocidade de hidrólise de quitosanas com sequências de mais de três resíduos de N-acetil-D-glucosamina era superior à registrada nas quitosanas em que estes resíduos de encontravam dispersos de modo aleatório na cadeia do polímero. No entanto, estas diferenças na velocidade de hidrólise não se verificavam com quitinases (Aiba, 1993), indicando que a actividade destas enzimas não dependia da distribuição das unidades de GlcNAc, em blocos ou aleatoriamente.

Também a lisozima foi utilizada no alongamento de di-N-acetilquitobiose para preparar polímeros com maior GP (Usui *et al.*, 1990).

Apesar dos diversos trabalhos publicados sobre a preparação de oligómeros de quitina por via enzimática, não existem referências à sua utilização em grande escala. Além disso, as hidrólises com quitinase ou lisozima apresentam velocidades baixas em virtude da insolubilidade da quitina em soluções ácidas ou alcalinas.

### 2.3.2. *Preparação de oligómeros de quitosana por hidrólise enzimática*

A quitosana é hidrolisada por quitosanases, mas também por outras carbohidrases, proteases e até lipases. As quitosanases têm sido extraídas principalmente de fungos (Muzzarelli *et al.*, 1994a; Kim *et al.*, 1998; Struszczyk *et al.*, 2006) e bactérias (Lee *et al.*, 1996; Vårum *et al.*, 1996; Yabuki *et al.*, 1998), mas algumas têm sido detectadas em plantas (Ouakfaoui e Asselin, 1992a; Sharma *et al.*, 1993; Osswald *et al.*, 1994; Chiang *et al.*, 2005) e animais (Aruchami *et al.*, 1982; Vårum *et al.*, 1989; Fu *et al.*, 2003). As diferenças entre as quitinases e a quitosanases são pequenas, pois ambas possuem a capacidade de degradar quitosanas com diferentes graus de acetilação. Porém, as quitosanases são mais eficientes na hidrólise de quitosanas com um baixo grau de acetilação. Além disso, as quitosanases apresentam massas moleculares mais baixas (Grenier e Asselin, 1990) e, de acordo com o processo hidrolítico, podem ser do tipo endo ou exo. As endo-quitosanases libertam uma mistura de dímeros, trímeros e oligómeros enquanto as exo-quitosanases produzem resíduos de glucosamina a partir do terminal não redutor da quitosana ou de oligómeros.

As quitosanases, de acordo com a especificidade das ligações glicosídicas que hidrolisam, podem ser classificadas em diferentes classes ou subclasses conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação das quitosanases de acordo com a especificidade da ligação glicosídica hidrolisada.

<b>Origem</b>	<b>Subdivisão</b>	<b>Especificidade das ligações glicosídicas hidrolisadas</b>	<b>Referência</b>
Microbiana	Subclasse I	GlcN-GlcN e GlcNAc-GlcN	Fukamizo <i>et al.</i> , 1995
	Subclasse II	Apenas GlcN-GlcN	Izume <i>et al.</i> , 1992
	Subclasse III	GlcN-GlcN e GlcN-GlcNAc	Mitsutomi <i>et al.</i> , 1996
Plantas	Classe I	Degradam apenas quitosanas	Grenier e Asselin, 1990
	Classe II	Degradam quitosanas e quitina	Pegg e Young, 1982; Ouakfaoui e Asselin, 1992a, b; Hung <i>et al.</i> 2002
Térmita	-	Degradam apenas quitosanas	Aruchami <i>et al.</i> , 1982
Salmão	-		Vårum <i>et al.</i> , 1989
Pepsina de porco	-	Degradam quitosanas e oligómeros N,N',N'' triacetilquitotriose	Fu <i>et al.</i> , 2003

Bazinet e Shee (2009) patentearam um processo de produção de oligómeros, usando electrodiálise numa célula de electrodiálise com membranas bipolares. Neste sistema a quitosana é hidrolisada com uma quitosanase e, de acordo com os inventores, permite obter oligómeros e proceder à respectiva desmineralização.

O elevado custo das quitosanases microbianas tem limitado as suas aplicações à escala industrial, embora sejam muito eficientes na hidrólise da quitosana. Isso levou a ensaiar várias enzimas comerciais na hidrólise de quitosana, de modo a permitir a redução dos custos de produção. Pantaleone *et al.* (1992 a,b) estudaram a actividade quitosanolítica de uma grande variedade de enzimas que incluíam 10 tipos de glucanases, 21 tipos de proteases, 5 lipases e uma tanase. Verificaram que a papaína apresentava a actividade específica mais elevada, seguida da lipase, hemicelulase e celulase, enquanto a quitinase exibia a menor actividade específica.

A celulase foi uma das enzimas não específicas mais ensaiadas por vários autores para despolimerizar quitosana. Assim, há a referir os trabalhos de Muraki *et al.* (1993) e de Tsai *et al.* (2000), tendo estes últimos autores obtido glucosamina livre e oligómeros com GP inferior a 8. Liu e Xia (2006), a partir de uma celulase comercial produzida por *Trichoderma viride*, purificaram uma enzima que tinha capacidade para hidrolisar quitosana e celulose. Lin *et al.* (2009a) compararam as características das QBMM obtidas a partir de duas quitosanas com 80

% e 92 % de desacetilação usando celulase, lisozima e quitinase. Verificaram que a massa molecular dos produtos dependia da enzima utilizada e do grau de desacetilação. Além disso, os produtos preparados da quitosana com 92 % de desacetilação e usando a lisozima apresentavam maior massa molecular e também maior actividade antibacteriana. Também Xie *et al.* (2009, 2010) estudaram a despolimerização de quitosana com uma celulase de *Aspergillus niger*. Tal como referem Xia *et al.* (2008), a celulase constitui um sistema enzimático complexo que apresenta actividade quitosanólítica superior à quitosanase, quitinase e lisozima. Os estudos realizados com celulases indicam a existência de uma enzima bifuncional, exibindo actividade de celulase e quitosanase. As celulases são relativamente mais económicas do que as quitosanases, sugerindo a sua aplicação para a produção de oligómeros de quitosana.

Terbojevich *et al.* (1993) e Muzzarelli *et al.* (1994b) ensaiaram a papaína e a pepsina e Yalpani e Pantaleone (1994) a bromelina, a ficina e a pancreatina na despolimerização da quitosana. Posteriormente, Muzzarelli *et al.* (1995) mostraram que a lipase de germen de trigo apresentava grande actividade na despolimerização de quitosana e de quitosanas modificadas em soluções ligeiramente ácidas. Do mesmo modo, Lee *et al.* (2008) prepararam oligómeros de quitosana com uma lipase comercial. A lipase apresentava maior actividade e afinidade para as quitosanas com graus de desacetilação entre 73,2 % e 82,8 % e actuava como uma endo- e exo-enzima. A papaína foi usada por Muzzarelli *et al.* (2002) para preparar quitosana parcialmente despolimerizada a partir de soluções de lactato de quitosana. Esta quitosana foi depois estabilizada por incubação a 60 °C com NH<sub>3</sub> sob pressão, tendo obtido quitosana sob a forma de glicosilamina com boa estabilidade e solubilidade em soluções de diferentes ácidos. Novikov e Mukhin (2003) obtiveram um extracto enzimático do hepatopâncreas de caranguejo real vermelho (*Paralithodes camtschaticus*) que exibia actividade quitinolítica e quitosanólítica. A análise dos produtos da hidrólise da quitina e da quitosana sugeria que o extracto enzimático era rico em endoquitinases. Kittur *et al.* (2003a) obtiveram QBMM (2 a 5 kDa) por despolimerização de quitosana com pectinase comercial de *Aspergillus niger*. Uma isoenzima destas pectinases foi purificada e usada na despolimerização de quitosana, tendo-se verificado que hidrolisava tanto as ligações GlcN-GlcN como as GlcNAc-GlcN (Kittur *et al.*, 2003b). Kumar *et al.* (2004), por sua vez, estudaram a despolimerização de quitosana com papaína, tendo obtido QBMM (4,1 – 5,6 kDa) a pH 3,5, 37 °C e durante 1 a 5 horas. Posteriormente, Kumar e Tharanathan (2004) avaliaram a actividade de várias proteases (pepsina, papaína e pronase) na despolimerização de quitosana. Os produtos da hidrólise eram constituídos por QBMM (4,1 – 10,0 kDa), cuja massa molecular dependia do tempo de

reação, e ainda por oligómeros e monómeros. Noutro estudo, Kumar *et al.* (2005) procederam à despolimerização de quitosana com papaína e pronase, tendo obtido uma mistura de oligómeros e monómeros com rendimentos de 14 a 19 %. Avaliaram também a actividade inibidora destas misturas no crescimento de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, tendo verificado que estes produtos da hidrólise da quitosana inibiam mais o crescimento destas estirpes bacterianas do que a quitosana nativa. A inibição óptima do crescimento destas estirpes era devida aos quito-oligómeros com maior GP e baixo grau de acetilação. Estes oligómeros causavam a formação de poros e a permeabilidade da membrana celular em *B. cereus* e no caso de *E. coli* o bloqueio do fluxo de nutrientes e consequente lise das células (Fig. 17).

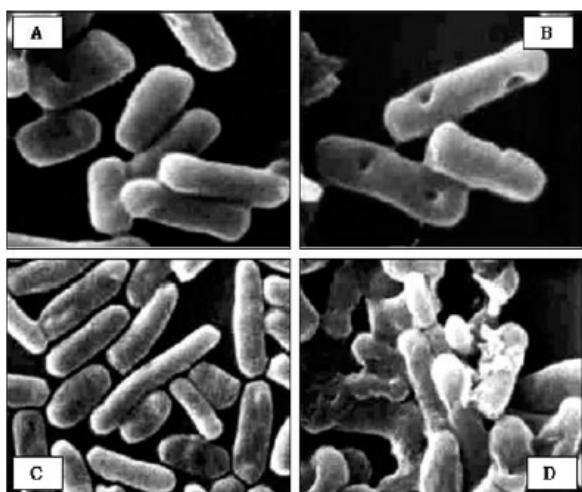


Figura 17 – *B. cereus* e *E. coli* antes (A e C, respectivamente) e depois (B e D, respectivamente) do tratamento com a mistura de quito-oligómeros e monómeros (Kumar *et al.*, 2005).

A fim de estudar o efeito da massa molecular e do grau de desacetilação na actividade bactericida de QBMM, Kumar *et al.* (2007a) procederam à despolimerização de quitosana com pronase, tendo verificado que os produtos obtidos eram mais eficientes do que a quitosana na lise de *B. cereus* e *E. coli*. Além disso, os oligómeros apresentavam um menor grau de acetilação (14 %-19 %) do que a quitosana nativa (~26 %). Neste mesmo ano, Kumar *et al.* (2007b) publicaram outro trabalho sobre a despolimerização de quitosana com pepsina de porco. As QBMM eram os principais produtos da hidrólise, apresentando um

rendimento de 75 % a 82 % o qual dependia do tempo de reação. De acordo com os autores, os resultados obtidos sugeriam que a pepsina poderia ser utilizada em substituição de quitosanases as quais apresentam preços muito mais elevados e não estão disponíveis no mercado em grande quantidade. Roncal *et al.* (2007), recorrendo igualmente a pepsina, obtiveram uma grande percentagem de oligómeros de quitosana com um elevado grau de desacetilação.

Cabrera e Van Cutsem (2005) compararam a hidrólise química de quitosana com HCl e a enzimática com Pectinex Ultra SP-L, um produto comercial. O método enzimático permitiu obter fragmentos mais pequenos com uma elevada proporção de oligómeros totalmente

desacetilados. Em contrapartida, com a hidrólise ácida obtiveram fragmentos com GP até 16, possuindo mais resíduos acetilados do que no método enzimático. Do mesmo modo, Li *et al.* (2005) ensaiaram a preparação de oligómeros de quitosana com uma protease comercial neutra. Esta protease permitia uma despolimerização óptima a pH 5,4 e 50 °C e obter oligómeros com um GP entre 3 e 8. A cinética da despolimerização de quitosana por bromelina foi estudada por Velásquez *et al.* (2007). Os parâmetros cinéticos obtidos eram semelhantes aos referidos para a degradação de quitosana por enzimas específicas e não específicas. Li *et al.* (2007) estudaram o efeito do grau de desacetilação e da massa molecular de quitosana na susceptibilidade à hidrólise por uma protease neutra. Os resultados obtidos mostraram que as quitosanas com maior grau de desacetilação e massa molecular apresentavam uma menor afinidade para a enzima e uma menor taxa inicial de degradação. Enzimas extracelulares produzidas por *Bacillus alvei* foram ensaiadas na despolimerização de quitosana com um grau de acetilação de 30 % (Abdel-Aziz *et al.*, 2008). Estas enzimas apresentavam actividade quitinolítica, quitosanolítica e também celulosolítica e proteolítica e permitiam obter uma redução da massa molecular de 88 kDa para 5 kDa após 2 horas de hidrólise. A fim de impedir o escurecimento de oligómeros obtidos com uma hemicelulase comercial, Qin *et al.* (2008) recorreram a borohidreto de potássio para obter oligómeros reduzidos. Estes apresentavam uma maior estabilidade química, não provocavam toxicidade oral aguda e tinham quase o mesmo efeito inibidor das células tumorais do sarcoma 180 no rato por injeção intraperitoneal que os oligómeros não reduzidos. Por sua vez, Pan e Wu (2011) prepararam quitosana solúvel em água com uma massa molecular de 1,7 kDa, usando glucoamilase na despolimerização de quitosana. Também Wu (2011) preparou quitosana solúvel em água por hidrólise de quitosana com  $\alpha$ -amilase, apresentando os oligómeros GP de 3 a 7. Posteriormente, este autor (Wu, 2012), usando igualmente  $\alpha$ -amilase, obteve oligómeros de quitosana preparada de quitina extraída da pele da larva de uma borboleta (*Clanis bilineata*). Os oligómeros obtidos tinham um GP na gama de 2 a 8 e apresentavam uma actividade antibacteriana mais elevada do que a quitosana original. Tischenko *et al.* (2011) compararam as características físico-químicas dos produtos de degradação de quitosana preparados por três métodos: hidrólise enzimática, degradação oxidativa e irradiação com micro-ondas. O processo enzimático permitia obter oligómeros com baixo GP (2-10), mas o processo químico parecia ser preferível para a preparação de QBMM (5-10 kDa) em grande escala. A despolimerização com microondas não alterava praticamente o grau de acetilação, mas a preparação de QBMM era muito lenta. Um complexo de enzimas isoladas do tracto digestivo de pepino do mar (*Stichopusces japonicus*) foi utilizado para despolimerizar

quitosana (Yao *et al.*, 2012). A quitosana hidrolisada apresentava uma massa molecular de 1,26 kDa.

Para ultrapassar algumas dificuldades associadas aos processos de hidrólise descontínuos tem-se recorrido à imobilização de enzimas. Esta metodologia apresenta algumas vantagens tecnológicas como a possibilidade de reutilização das enzimas, a realização do processo em contínuo, a rápida conclusão da reacção hidrolítica e a formação controlada do produto. Assim, Yamasaki *et al.* (1992) desenvolveram um método para a produção contínua de oligómeros de quitosana. Com este objectivo utilizaram enzimas quitosanólíticas de *Enterobacter* sp. imobilizadas em diferentes suportes, tendo atingido os melhores resultados nos ensaios em que a quitina era o suporte. Terbojevich *et al.* (1996) verificaram que papaína imobilizada em quitina despolimerizava quitosana com uma elevada velocidade inicial e os resultados obtidos sugeriam também que a papaína actuava sobre as unidades de GlcN e GlcNac. Posteriormente, Lin *et al.* (2002) usaram também papaína imobilizada para despolimerizar quitosana. Num processo desenvolvido por Jeon *et al.* (1998), procedeu-se à preparação de oligómeros de quitosana recorrendo a quitosanase imobilizada. De entre os suportes utilizados na imobilização da quitosanase, a quitina revelou-se o mais eficiente por permitir a maior actividade enzimática. Posteriormente foram publicados outros trabalhos sobre o efeito de diferentes condições de imobilização de quitosanas e das variáveis experimentais nos rendimentos dos oligómeros obtidos (Kuroiwa *et al.*, 2002; Kuroiwa *et al.*, 2003; Ming *et al.*, 2006). De um modo geral, os estudos com as enzimas imobilizadas não permitiram atingir os resultados esperados. A principal limitação resultava da menor afinidade da quitosanase imobilizada para a quitosana em relação à enzima livre. Deste modo, este processo não era eficiente para a produção de oligómeros com o GP de polimerização desejado. Li *et al.* (2006) ensaiaram a hidrólise de quitosana com uma protease neutra imobilizada em três suportes diferentes (quitosana (CS), carboximetilquitosana (CMCS) e N-succinilquitosana (NSCS)). As propriedades cinéticas e de estabilidade da enzima livre e imobilizada foram comparadas, tendo sido verificado que a actividade residual da protease imobilizada em CS, CMCS e NSCS era, respectivamente, 70,4 %, 78,2 % e 82,5 % após 10 ciclos de hidrólise em descontínuo.

Como alternativa às enzimas imobilizadas foi proposto um outro sistema recorrendo a um reactor equipado com uma membrana de ultrafiltração que permitia a remoção dos produtos da hidrólise da quitosana. Zhang *et al.* (1999) usaram este sistema no qual a hidrólise da quitosana era conseguida com uma mistura de celulase, alfa-amilase e uma protease, tendo obtido oligómeros com GP entre 3 e 10. Também Jeon e Kim (2000a)

verificaram que este sistema era muito mais eficiente do que o descontínuo e permitia a obtenção de oligómeros com um GP relativamente elevado e um baixo custo de produção. Estes sistemas não permitiam, no entanto, a produção de oligómeros em contínuo devido ao aumento da pressão transmembrana durante a reacção de hidrólise. Este aumento da pressão devia-se à elevada viscosidade da solução de quitosana e à colmatação da membrana pelo substrato acumulado. Por conseguinte, a redução da viscosidade da solução de quitosana antes do processo de ultrafiltração era um passo essencial. Com este objectivo, Jeon e Kim (2000b) propuseram um novo sistema que combinava uma hidrólise parcial da quitosana por quitosanases imobilizadas seguida por uma segunda hidrólise num reactor equipado com uma membrana de ultrafiltração. Este sistema duplo permitia obter uma maior produtividade por unidade de enzima, controlar a distribuição de massas moleculares e atingir uma produção contínua mais eficiente em comparação com os métodos convencionais. Também Lin *et al.* (2009b) desenvolveram um processo de obtenção de oligómeros de quitosana, usando quitosanases purificadas de *Bacillus cereus* NTU-FC-4 num reactor equipado com uma membrana de ultrafiltração. Este sistema permitia obter, com tempos de residência de 33 min, oligómeros com GP de 7 ou superior, os quais representavam 69 % do total dos oligómeros produzidos.

#### 2.4. Preparação de oligómeros por síntese enzimática ou química

Os diferentes métodos de obtenção de oligómeros de quitina ou quitosana anteriormente referidos apresentam várias limitações das quais se destaca a dificuldade de controlar o grau de polimerização. Assim, a síntese de oligómeros tem sido encarada como alternativa aos diferentes métodos de degradação da quitina ou da quitosana. A síntese pode ser realizada por métodos enzimáticos e químicos. De entre os estudos sobre a aplicação de métodos de síntese por via enzimática há a referir os de Usui *et al.* (1990), Drouillard *et al.* (1997), Akiyama *et al.* (1995), Monsan e Paul (1995), Samain *et al.* (1997, 1999), Demont-Caulet *et al.* (1999), Gressent *et al.* (1999), Grenouillat *et al.* (2004), Rasmussen *et al.* (2004), Yoon (2005), Huang *et al.* (2006), Hsiao *et al.* (2008) e Wang *et al.* (2008).

Relativamente aos métodos enzimáticos têm sido apontados vários problemas como a dificuldade de isolamento e purificação das enzimas e os rendimentos muito baixos obtidos. A síntese química procura ultrapassar estes problemas, sendo de mencionar os seguintes trabalhos: Nicolaou *et al.* (1992), Wang *et al.* (1994), Tailler *et al.* (1994), Ikeshita *et al.* (1994a, b), Debenham *et al.* (1996), Morais *et al.* (2003), Sedinkin *et al.* (2007) e Chevrier (2009).

### 3. Actividades biológicas dos oligómeros

As actividades biológicas dos oligómeros são grandemente influenciadas pelo GP, grau de acetilação, distribuição de carga e natureza das alterações químicas introduzidas nos oligómeros (Kim e Rajapakse, 2005). Os oligómeros são facilmente absorvidos a nível intestinal, entram rapidamente na corrente sanguínea e apresentam efeitos biológicos sistémicos no organismo. Na indústria alimentar, tal como refere Shahidi *et al.* (1999), os oligómeros são particularmente interessantes como agentes antimicrobianos, antioxidantes e promotores da qualidade nutricional dos produtos alimentares.

#### 3.1. Actividade antimicrobiana

A actividade antimicrobiana dos oligómeros de quitosana é considerada uma das suas principais propriedades. Esta actividade é influenciada pelo GP (Yun *et al.*, 1999; Rhoades e Roller, 2000; Jeon *et al.*, 2001; No *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Zheng e Zhu, 2003; Park *et al.*, 2004a; Kittur *et al.*, 2005), grau de desacetilação (Tsai *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004), tipo de microrganismo (Uchida *et al.*, 1989; Choi *et al.*, 2001; Gerasimenko *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004b) e ainda por outras propriedades físico-químicas. Fernandes *et al.* (2008) mostraram que a actividade antibacteriana de quitosanas com diferentes massas moleculares e de oligómeros dependia do tipo de microrganismo (Gram positivo ou Gram negativo) e da massa molecular. Os compostos com massa molecular mais baixa apresentavam maior actividade relativamente às bactérias Gram negativa, enquanto se registava o inverso no caso das bactérias Gram positivas. Concluíram também que a actividade antibacteriana das quitosanas dependia do tipo de produto alimentar onde eram aplicadas, sendo mais eficientes nos que tinham menor teor proteico. Estes autores consideraram ainda que a utilização dos oligómeros de quitosana em produtos alimentares era mais prometedora para o consumidor final. Também Du *et al.* (2009) verificaram que os oligómeros de quitosana apresentavam maior actividade antibacteriana nas estirpes *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* do que a quitosana utilizada na sua preparação. Benhabiles *et al.* (2012) testaram a actividade antibacteriana de quitina, quitosana e oligómeros de quitina e de quitosana em quatro estirpes de bactérias Gram positivas e sete estirpes de Gram negativas. Apenas os oligómeros exibiam um efeito bactericida em todas as estirpes ensaiadas, considerando ainda os autores que os oligómeros de quitina seriam preferíveis aos de quitosana uma vez que poderiam ser preparados directamente a partir de quitina. O efeito sinérgico entre oligómeros de quitosana produzidos por radiação  $\gamma$  e a lisozima foi verificado em sistemas modelo (Rao *et al.*, 2008). Neste trabalho verificou-se que o período de



conservação útil de carne picada conservada em refrigerado e com uma mistura de oligómeros e lisozima foi prolongado até 15 dias.

Têm sido propostos vários mecanismos para descrever a actividade antimicrobiana dos oligómeros, sendo aceite que o número de grupos amina presentes na estrutura destes compostos desempenha um papel importante nesta actividade (Chen *et al.*, 2002). O mecanismo que merece maior consenso baseia-se nas alterações da membrana celular bacteriana provocadas pelos oligómeros que lhe podem modificar as características de permeabilidade. Estas alterações poderiam impedir a entrada de nutrientes ou provocar a libertação de constituintes da célula, acabando por levar à morte da bactéria (Sudharshan *et al.*, 1992). O grupo amina carregado positivamente que se encontra no carbono C2 dos monómeros de glucosamina interage com o grupo carboxílico com carga negativa presente nas macromoléculas da membrana celular bacteriana formando complexos de polielectrólitos. Neste sentido, é de admitir que um maior número de aminas primárias presentes nos oligómeros possa tornar mais fortes as interacções com as células bacterianas (Tsai *et al.*, 2002). Por isso, a taxa de mortalidade das células bacterianas tende a aumentar com o grau de desacetilação dos oligómeros. Do mesmo modo, há uma tendência geral para a actividade antibacteriana dos oligómeros aumentar com a massa molecular (Park *et al.*, 2004b). Todavia, QBMM com massa molecular superior a 30 kDa não são utilizadas como agentes antibacterianos devido à baixa solubilidade em soluções aquosas a pH neutro (Sekiguchi *et al.*, 1994). Conforme referem Kim e Rajapakse (2005), a capacidade quelante dos oligómeros, ao eliminar metais ou nutrientes essenciais para a bactéria, poderia também contribuir para limitar o seu crescimento.

O facto da carga positiva dos oligómeros favorecer a respectiva actividade antibacteriana, levou à preparação de derivados dos oligómeros, introduzindo alterações no grupo amina em C2. Assim, Jeon e Kim (2001) prepararam derivados de oligómeros por introdução de asparagina na posição C2 a fim de aumentar a carga positiva dos oligómeros. Esta modificação levou a um aumento da actividade antibacteriana dos oligómeros. O mesmo efeito foi verificado por outros autores (Muraki e Aiba, citado por Jeon *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003) que prepararam outros tipos de derivados dos oligómeros também por modificação do grupo amina.

Também a distribuição de cargas nas membranas celulares das bactérias parece desempenhar um papel importante na actividade antibacteriana dos oligómeros. A adsorção dos oligómeros à superfície das células é, em regra, mais elevada nas bactérias Gram-negativas do que nas Gram-positivas que possuem menor carga negativa. Isto explica os

resultados obtidos por Wang (1992) ao verificar que a maior parte das bactérias Gram-negativas era mais sensível aos oligómeros, determinando deste modo a maior actividade antibacteriana dos oligómeros sobre este grupo. Kumar *et al.* (2007a) propuseram também mecanismos para explicar a actividade bactericida das QBMM. Assim, no caso das bactérias Gram negativas ocorreriam ligações iónicas entre os grupos  $\text{NH}_3^+$  das QBMM e diversos ácidos gordos da membrana celular carregados negativamente, levando à libertação de polissacarídeos da membrana celular mais externa. Esta interacção provocaria alterações nas membranas celulares, resultando num choque osmótico e na saída do conteúdo do citoplasma. Nas bactérias Gram positivas verificar-se-ia igualmente uma ligação dos grupos  $\text{NH}_3^+$  das QBMM a diversos constituintes da parede celular do que resultaria a distorção/rotura e exsudação dos constituintes do citoplasma.

### 3.2. Inibição do crescimento de fungos

A actividade antifúngica da quitosana e de quitosana de baixa massa molecular, isto é, oligómeros com massas moleculares da ordem de 4,6 kDa foi estudada por vários autores (Allan e Hadwiger, 1979; Hirano e Nagao, 1989; Hai *et al.*, 2003; Bautista-Baños *et al.*, 2006; Tikhonov *et al.*, 2006; Eweis *et al.*, 2006; Seyfarth *et al.*, 2008; Palma-Guerrero *et al.*, 2009, 2010; Park *et al.*, 2008; Ing *et al.*, 2012). De acordo com Palma-Guerrero *et al.* (2010), o efeito antifúngico da quitosana parece estar relacionado com a composição lipídica das membranas plasmáticas dos fungos sensíveis à quitosana as quais apresentam um teor mais elevado de ácidos gordos polinsaturados. A ligação da quitosana aos fosfolípidos carregados negativamente altera a fluidez da membrana e induz o aumento da sua permeabilidade.

A actividade antifúngica dos oligómeros de quitosana tem sido menos estudada, havendo a referir o trabalho de Kendra e Hadwiger (1984). Estes autores testaram a actividade antifúngica de vários oligómeros, desde monómeros até heptâmeros, em *Fusarium solani* e verificaram que os heptâmeros eram os mais eficientes. O efeito antifúngico de oligómeros de quitosana com GP de 3 a 9 foi testado em nove estirpes fitopatogénicas (Xu *et al.*, 2007). A estirpe *Phytophthora capsici* foi a mais sensível à actividade dos oligómeros de quitosana, tendo sido verificada a inibição do crescimento do micélio e dos diferentes estágios do seu ciclo de vida. Os autores concluíram ainda que a natureza policatiónica dos oligómeros contribui apenas em parte para a respectiva actividade antifúngica, existindo múltiplos modos de acção que incluem a rotura do sistema endomembranar. Hernández-Lauzardo *et al.* (2008) testaram igualmente o efeito antifúngico de quitosanas com massa molecular baixa (17,4 kDa) média (23,8 kDa) e alta (30,7 kDa) em *Rhizopus stolonifer*, tendo verificado que a quitosana

com massa molecular mais baixa era a mais eficiente na inibição do crescimento do micélio enquanto a de massa molecular mais alta afectava a forma dos esporos, a esporulação e a germinação. Também Guerra-Sánchez *et al.* (2009), usando quitosanas com as mesmas gamas de massas moleculares que os autores anteriores e ensaiando a mesma estirpe, verificaram que todos os tipos de quitosana apresentavam actividade antifúngica.

### 3.3. Actividade inibidora de vírus

Tem sido referido que a quitosana e os oligómeros têm a capacidade de limitar infecções virais em vários sistemas biológicos (Kim e Rajapakse, 2005). No entanto, na maioria dos casos, o mecanismo de inibição não é bem conhecido, embora se admita que os grupos amina protonados dos oligómeros possam activar os sistemas imunológico e de defesa de plantas e animais.

Segundo Kim e Rajapakse (2005), os derivados aniónicos de oligómeros de quitosana apresentavam uma menor actividade inibidora de vírus de plantas. Porém, a actividade antiviral aumentava com o grau de desacetilação, indicando que os grupos catiónicos presentes seriam responsáveis por esta actividade.

Relativamente à actividade antiviral em animais, concluiu-se, em estudos realizados em ratos, que o tratamento com oligómeros estimulava a actividade funcional dos macrófagos, levando à produção de radicais activos de oxigénio que provocariam a destruição dos vírus (Kim e Rajapakse, 2005). Estes autores referem também que outro possível mecanismo da actividade antiviral dos oligómeros envolveria interacções entre os receptores proteicos na superfície dos vírus e os leucócitos. Artan *et al.* (2010) estudaram a actividade anti-HIV-1 de sulfatos de oligómeros de quitosana com diferentes massas moleculares. Dos compostos sintetizados verificaram que os oligómeros com massas moleculares entre 3 kDa e 5 kDa eram os mais eficientes na inibição da replicação do HIV-1. Estes derivados dos oligómeros de quitosana bloqueavam também a entrada dos vírus e a fusão vírus-célula.

Os oligómeros são igualmente eficientes na prevenção de várias infecções por fagos. A actividade antiviral de fagos depende da massa e da estrutura molecular dos oligómeros, do respectivo grau de desacetilação e também do tipo de fagos. Kochkina e Chirkov (2000a) mostraram que os oligómeros eram mais eficientes contra a replicação do fago 1-97A em *Bacillus thuringiensis* do que as QBMM. Noutro trabalho, estes autores (Kochkina e Chirkov, 2000b) verificaram que as QBMM com maior GP eram mais eficientes na inibição do colifago do que as QBMM com pequeno GP. Estes resultados sugeriam que os oligómeros e

as QBMM podiam estar envolvidos na inibição da replicação de bacteriófagos através de diferentes mecanismos.

#### 3.4. Actividade antiradicalar

Yin *et al.* (2002) mostraram que QBMM podiam exibir uma capacidade de eliminação do radical superóxido superior a 80 % com uma concentração de 0,5 mg/ml. Além disso, oligómeros com 90 % de desacetilação apresentavam boa capacidade para eliminar radicais DPPH, hidroxilo, superóxido e radicais centrados no carbono. Igualmente Park *et al.* (2003a) verificaram que os oligómeros de quitosana com baixa massa molecular (1 kDa a ~3 kDa) apresentavam uma elevada capacidade para eliminar diferentes radicais. De igual modo, a actividade antiradicalar de oligómeros preparados de quitosanas parcialmente desacetiladas (50 %, 75 % e 90 % desacetiladas) e com massas moleculares nas gamas de 5 kDa a 10 kDa, 1 kDa a 5 kDa e <1 kDa foi avaliada por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (Je *et al.*, 2004). Os oligómeros obtidos de quitosanas mais desacetiladas (90 %) e massas moleculares entre 1 kDa e 5 kDa apresentavam a maior actividade antiradicalar. Além disso, esta actividade aumentava com a concentração dos oligómeros e dependia do grau de desacetilação e da massa molecular. Também a actividade antioxidante de quitosana e de diferentes derivados com baixa massa molecular e ainda de sulfato de quitosana foi estudada por Xing *et al.* (2005). De um modo geral, estes autores concluíram que o sulfato de quitosana e os compostos derivados da quitosana com baixa massa molecular apresentavam maior actividade antioxidante, avaliada por diferentes metodologias, do que a quitosana. De igual modo, no estudo de Feng *et al.* (2007) sobre a actividade antioxidante de quitosanas solúveis em água verificou-se que os compostos com a massa molecular mais baixa (1,7 kDa) exibiam maior actividade antioxidante. Prashanth *et al.* (2007) avaliaram a actividade antioxidante de QBMM e oligómeros de quitosana, recorrendo a ensaios de protecção da degradação de ADN do timo de vitela, tendo verificado que a actividade antiradicalar da QBMM era superior à dos oligómeros. Por outro lado, Yan *et al.* (2007) mostraram que a glucosamina possuía excelentes actividades antioxidantes devido à elevada actividade quelante do ferro ferroso e à protecção de macromoléculas, como proteínas, lípidos e desoxirribose, da degradação oxidativa induzida por radicais livres. A eficiência antiradicalar de oligómeros com diferentes massas moleculares foi testada por Mendis *et al.* (2007) em linhas celulares de melanoma da pele de rato murino (B16F1). Os resultados obtidos mostraram que os oligómeros apresentavam uma elevada capacidade para inibir os efeitos do radical  $\text{OH}^\bullet$  no ADN e induziam o nível de glutatião intracelular e a supressão da actividade do promotor NF- $\kappa$ B

(factor nuclear de transcrição). Ngo *et al.*, (2008a) verificaram também que oligómeros de quitina possuíam capacidade para eliminarem radicais livres em sistemas celulares, tendo sido já obtidos resultados semelhantes por Park *et al.* (2004c). O mecanismo exacto da actividade antiradicalar dos oligómeros de quitosana não é bem conhecido, mas admite-se que é devido aos grupos amina e hidroxilo ligados aos átomos C2, C3 e C6 do anel de piranose que reagem com radicais livres instáveis para formar radicais estáveis em macromoléculas. O efeito positivo dos oligómeros de quitosana na atenuação do stress oxidativo e da apoptose provocados pelo peróxido de hidrogénio foi demonstrado por vários autores (Liu *et al.*, 2009, 2010; Karadeniz *et al.*, 2010). A actividade antiradicalar de oligómeros de quitosana e QBMM foi testada por (Fernandes *et al.*, (2010) em eritrócitos e fagos. Estes autores concluíram que os compostos testados podiam ser utilizados como antioxidantes em sistemas biológicos pois que reduziavam a degradação hemolítica e a do ADN devido à inibição dos radicais resultantes do peróxido de hidrogénio e do AAPH (cloreto de 2,2'-azobis-2-metilpropanimidamida). Os resultados obtidos sugeriam ainda que as concentrações dos oligómeros e da QBMM tinham de ser baixas para evitar a degradação oxidativa.

### 3.5. Actividade antitumoral

Estudos sobre a actividade antitumoral de oligómeros de quitosana têm-na atribuído a efeitos imunoestimulantes que promovem o aumento da produção de linfoquinas e não à capacidade dos oligómeros para eliminarem as células cancerígenas (Suzuki, 1996; Tokoro *et al.*, 1998). Estas actividades dependem das características estruturais dos oligómeros tais como o grau de desacetilação e a massa molecular. Assim, Suzuki *et al.* (1986) referiram que oligómeros com cerca de 1 kDa, administrados por via intravenosa a ratos, inibiam o crescimento de células dos tumores do sarcoma 180 e do MM 146. Igualmente Tsukada *et al.* (1990) verificaram que um oligómero de quitina solúvel em água e com GP 6 apresentava um significativo efeito antimetastático contra o carcinoma do pulmão de Lewis transplantado em ratos. Este oligómero tinha também um efeito inibidor do crescimento do tumor deste carcinoma. Também Jeon e Kim (2002) verificaram que oligómeros com massas moleculares entre 1,5 kDa e 5,5 kDa inibiam o crescimento de diferentes tipos de células cancerígenas. Do mesmo modo, Qin *et al.* (2002b) mostraram que uma mistura de oligómeros (tetrâmeros e pentâmeros) podia inibir o crescimento de células do tumor S180 em ratos, aos quais tinham sido administrados estes oligómeros, tanto por via oral como intraperitoneal. Maeda e Kimura (2004) concluíram que oligómeros de quitosana com baixa massa molecular e oligoquitosana podiam limitar o crescimento do sarcoma 180 em ratos através da activação das funções

imunológicas intestinais. No estudo de Prashanth e Tharanathan (2005) mostrou-se que oligómeros de quitosana com ~37 kDa possuíam forte actividade antiangiogénica e induziam a apoptose das células do tumor ascítico de Ehrlich. Huang *et al.* (2006), por sua vez, estudaram a actividade anticancerígena de oligómeros com diferentes cargas eléctricas em três linhas de células cancerígenas. Os resultados obtidos indicaram que os oligómeros com carga elevada reduziam a viabilidade das células cancerígenas devido a necrose. Os efeitos inibidores do crescimento de tumores e metástases por oligómeros de quitosana foram ainda demonstrados nos trabalhos de Nam *et al.* (2007) e Shen *et al.* (2009). A actividade antitumoral de hidrolisados de material quitinoso (quitina, quitina coloidal e quitosana solúvel em água) obtidos com um extracto enzimático de *Bacillus amuloliquefaciens* V656 foi testada em células CT26 (Liang *et al.*, 2007). Os resultados obtidos neste estudo sugeriram que os oligómeros eram agentes indutores da apoptose destas células. Também Xu *et al.* (2008) verificaram que oligómeros de quitosana induziam a apoptose de células humanas de carcinoma hepático. Dou *et al.* (2011) estudaram os mecanismos subjacentes na apoptose de células de leucemia mielóide (HL-60) induzida por uma mistura de oligómeros de quitosana com GP entre 2 e 6. Estes autores concluíram que tanto os mecanismos intrínsecos como os extrínsecos participam na apoptose de HL-60 induzida pelos oligómeros de quitosana. Wang *et al.* (2008) referem, igualmente, a obtenção de produtos, resultantes da hidrólise de quitina da pena da lula usando bromelina, que exibiam actividade antitumoral. Trabalhos recentes têm relacionado a actividade antitumoral dos oligómeros de quitosana com o seu efeito inibidor da angiogénese (Prashanth e Tharanathan, 2005; Wang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2009; Quan *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010, 2012). No processo de angiogénese ocorre a formação de novos vasos capilares os quais são considerados de extrema importância para o crescimento de massas tumorais (Bhat e Singh, 2008). Neste contexto, Wang *et al.* (2007) verificaram também que os oligómeros acetilados apresentavam maior efeito inibidor da angiogénese do que os oligómeros totalmente desacetilados tanto *in vitro* como *in vivo*.

### 3.6. Actividade anti-inflamatória

A actividade anti-inflamatória da quitina e de produtos derivados tem merecido também a atenção de várias equipas de investigação. Assim, Shikhman *et al.* (2001) verificaram, em culturas de condrócitos (células presentes no tecido conjuntivo) articulares humanos, que a acetilglucosamina inibia a produção de óxido nítrico (NO), ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e interleucina-6 (IL-6) induzida pela interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e pelo factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ambos mediadores no processo inflamatório. Kim *et al.* (2002) verificaram que a

secreção e expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-6, eram inibidas em astrócitos (vários tipos de células não neuronais do sistema nervoso central em forma de estrela que proporcionam suporte e nutrição aos neurónios) humanos pré-tratados com quitosana solúvel em água. Os resultados obtidos por Yoon *et al.* (2007) mostraram que os oligómeros de quitosana podem apresentar um efeito anti-inflamatório em células de macrófagos (células de grandes dimensões do tecido conjuntivo que fagocitam elementos estranhos ao organismo) RAW 264.7 com processo inflamatório induzido por lipopolissacarídeos (LPS), através do estímulo de TNF- $\alpha$ . Também Qiao *et al.* (2010), em estudos com linhas celulares RAW 264.7 estimuladas com LPS, verificaram que os oligómeros de quitosana reduziam a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como a IL-1 $\beta$  e o NO. Num trabalho posterior (Qiao *et al.*, 2011) em que se utilizaram ratos injectados com LPS para induzir sepsis (condição médica caracterizada por uma resposta inflamatória sistémica, Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica), mostrou-se que os oligómeros de quitosana podiam atenuar a inflamação e o stress oxidativo. Os resultados obtidos por Vo *et al.* (2011) indicaram que oligómeros de quitosana, em particular, com 1-3 kDa, podiam ser utilizados como inibidores na regulação da resposta inflamatória alérgica em mastócitos (células do tecido conjuntivo que apresentam no citoplasma numerosas granações, contendo vários mediadores químicos como serotonina, histamina e heparina). Os oligómeros de quitosana revelaram-se também eficientes no tratamento da inflamação intestinal através da inibição do factor nuclear  $\kappa$ B (Yousef *et al.*, 2012). Por sua vez, no trabalho de Okamura *et al.* (2005) concluiu-se que os oligómeros e monómeros de quitina e quitosana influenciavam a libertação de colagenase do tipo I a qual desempenha um papel importante na cicatrização de feridas. Noutro estudo verificou-se que a actividade anti-inflamatória de oligómeros 90-HMWCOS (oligómeros com 90 % de desacetilação e 5 kDa a 10 kDa) podia ser devida à regulação da expressão transcripcional e translacional dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS (forma inductível da sintase do NO) e COX-2 (Lee *et al.*, 2009a). Os resultados obtidos por Ma *et al.* (2011) sugeriam que uma mistura de oligómeros de quitosana com GP entre 2 e 6 inibia uma elevada expressão de citocinas IL-6/TNF- $\alpha$  induzida por LPS em macrófagos. Pangestuti *et al.* (2011) estudaram também a capacidade de oligómeros de quitosana com diferentes massas moleculares para modularem mediadores inflamatórios em micróglia (células não neuronais mais pequenas do sistema nervoso central que possuem corpo alongado) BV2 estimulada por LPS. Estes autores verificaram que os oligómeros atenuavam a produção de NO e de prostagladina E2. Além disso, os níveis de libertação e

expressão de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) eram igualmente mais baixos devido aos oligómeros, sendo a maior actividade inibidora conseguida com os oligómeros de menor massa molecular. Por último, Bahar *et al.* (2012) demonstraram que os oligómeros de quitosana suscitavam uma resposta inflamatória aguda de citocina em células Caco-2 (células derivadas do carcinoma do cólon humano) e, por conseguinte, apresentavam potencialidades para estimular o sistema imunológico do epitélio intestinal.

Kim *et al.* (2002) verificaram que o efeito anti-inflamatório dos oligómeros de quitosana podia também reduzir e atrasar os efeitos patológicos da doença de Alzheimer. Igualmente o estudo de Joodi *et al.* (2011) concluía que estes oligómeros podiam ser considerados promissores no tratamento de doenças neurodegenerativas como a de Alzheimer. No combate a esta doença têm sido utilizados inibidores da acetilcolinesterase (ACHE) que visam a activação do sistema colinérgico (conjunto das células nervosas que utilizam a acetilcolina como neurotransmissor) cuja degeneração leva ao declínio do sistema cognitivo e da memória. O trabalho de Lee *et al.* (2009b) mostrou que os oligómeros 90-COS (oligómeros com 90 % de desacetilação) exibiam uma actividade inibidora da AChE superior à dos 50-COS (oligómeros com 50 % de desacetilação) e que, por sua vez, os 90-MMWCOS (oligómeros com 90 % de desacetilação e 1 kDa a 5 kDa) apresentavam a actividade inibidora mais elevada.

### 3.7. Outros efeitos biológicos

#### 3.7.1. Efeito anti-hipertensivo

O sistema renina-angiotensina desempenha um papel fundamental no controlo da tensão arterial dos mamíferos e na fisiopatologia de doenças cardíacas. A renina é uma enzima que converte o angiotensinogéneo em angiotensina I a qual é, por sua vez, convertida em angiotensina II (Ang II) pela ACE (Angiotensin Converting Enzyme). A Ang II possui uma elevada actividade vasoconstritora que tem sido identificada como o principal factor responsável pela hipertensão. Hong *et al.* (1998) avaliaram a actividade inibidora da ACE por vários oligómeros e verificaram que os trímeros eram os mais eficientes na redução da tensão arterial. Estudos realizados por Park *et al.* (2003b) mostraram que a capacidade inibidora da ACE dos oligómeros de quitosana dependia do grau de desacetilação. Posteriormente, Park *et al.* (2008) mediram o efeito inibidor da actividade da renina por oligómeros com diferentes graus de desacetilação e massas moleculares, tendo verificado que todos os oligómeros inibiam a actividade desta enzima. A actividade inibidora aumentava com a concentração, mas os oligómeros preparados a partir de quitosana com 90 % de desacetilação e massas



moleculares entre 1 kDa e 5 kDa apresentavam a actividade inibidora mais elevada com IC50 de 0,51 mg/ml e actuavam como um inibidor competitivo. De um modo geral, estes autores concluíram que, tanto o grau de desacetilação como a massa molecular, eram factores importantes na inibição da actividade da renina. Ngo *et al.* (2008b), por seu turno, prepararam derivados de oligómeros, tendo concluído que a substituição do átomo de hidrogénio localizado no carbono 6 do resíduo de piranose por um grupo aminoetilo promovia o efeito inibidor da ACE dos oligómeros com GP entre 0,8 kDa e 3 kDa e grau de desacetilação de 90 %.

### 3.7.2. Efeito na absorção de cálcio e aumento da resistência do tecido ósseo

O efeito potenciador da quitosana na diferenciação, em osteoblastos, das células estaminais do mesênquima (tecido embrionário da mesoderme, folheto embrionário que se forma na terceira semana de gestação) de ratos Webster e na mais rápida formação do tecido ósseo foi demonstrado por Klokkevold *et al.* (1996). O trabalho de Ohara *et al.* (2004) permitiu concluir que concentrações muito baixas de oligómeros de quitosana podiam modular a actividade de células osteoblásticas através do mRNA e que os genes relacionados com a diferenciação e proliferação destas células podiam ser controlados pelos oligómeros. Também Ratanavaraporn *et al.* (2009) verificaram que oligómeros de quitosana com massas moleculares de 1,4 kDa eram mais favoráveis para o crescimento e diferenciação ostogénica de células estaminais da medula óssea do que a quitosana. Os oligómeros de quitosana, tal como a quitosana, têm a capacidade de se ligarem a catiões como os iões cálcio. Jeon e Kim (1997), num estudo *in vivo*, mostraram que os oligómeros de quitosana aceleravam a absorção de cálcio. Os oligómeros com GP de 3 a 7 faziam diminuir a excreção de cálcio e melhoravam a resistência mecânica do fémur dos ratos suplementados com estes oligómeros. Também oligómeros de quitosana fosforilados, em particular oligómeros com massa molecular inferior a 1 kDa, exibiam uma elevada actividade inibidora da precipitação do fosfato de cálcio, contribuindo assim para uma maior absorção do cálcio (Kim *et al.*, 2005). Do mesmo modo, Jung *et al.* (2006) demonstraram que a inclusão de oligómeros de quitosana na dieta de ratos com osteoporose reduzia os níveis de cálcio fecal e aumentava a resistência do fémur.

### 3.7.3. Prevenção e tratamento da asma

No artigo de Muzzarelli (2010) são apresentados diversos efeitos benéficos da quitina e derivados que incluem a prevenção e tratamento da asma. Além disso, a presença de elevados níveis da enzima AMCase (quitinase ácida de mamíferos) foi assinalada em tecido humano

asmático (Elias *et al.*, 2005), levando a admitir que a inibição desta enzima constitui um alvo potencial no tratamento da asma. Foi também referido (Letzel *et al.*, 2000; Cederkvist *et al.*, 2006, 2008) que oligómeros parcialmente desacetilados inibiam uma família de 18 quitinases, sugerindo que os oligómeros de quitina ou de quitosana eram potenciais agentes anti-inflamatórios aplicáveis em doentes com asma.

#### 3.7.4. Efeito hipocolesterolémico

Sugano *et al.* (1988) referiram que a ingestão de oligómeros com diferentes massas moleculares tinha um efeito hipocolesterolémico em ratos, sugerindo que este efeito não dependia da massa molecular. Por outro lado, Ikeda *et al.* (1993) verificaram que oligómeros de baixa massa molecular (2 kDa) não impediam a absorção da gordura dietética, não facilitando, por conseguinte, a eliminação através do tracto digestivo. Embora, posteriormente, se tenham realizado diversos estudos e formulado várias hipóteses de mecanismos de actuação dos oligómeros de quitosana na redução dos níveis de colesterol no sangue, Kim e Rajapakse (2005) consideram que este mecanismo não está ainda bem elucidado.

#### 3.7.5. Efeitos imunoestimulantes

Os imunoestimulantes são, em geral, compostos que estimulam o sistema imunitário não específico através do aumento da capacidade de defesa dos fagócitos (macrófagos e neutrófilos). Okamoto *et al.* (2003) referiram que, tanto os oligómeros de quitina como os de quitosana, eram eficientes no aumento da actividade migradora de macrófagos. Por sua vez, Hoffman *et al.* (1997) mostraram que a quitosana e respectivos oligómeros estimulavam leucócitos de salmão *in vitro*, produzindo níveis elevados do anião superóxido. Verificou-se também que os oligómeros de quitosana podem activar a produção de citocinas e promover o sistema de defesa contra infecções microbianas (Shibata *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2004).

#### 3.7.6. Utilização em terapia génica

Vários estudos têm mostrado que a quitosana pode ser utilizada com sucesso em terapia génica (Mumper *et al.*, 1995; Köping-Höggård *et al.*, 2001; Jayakumar *et al.*, 2010). Porém, a aplicação deste polímero apresenta algumas desvantagens tais como: formação de complexos muito estáveis com o ADN plasmídico (pADN) que retardam a sua libertação; elevada massa molecular; limitada solubilidade a valores de pH fisiológicos; e ainda a elevada viscosidade das soluções de quitosana. A fim de ultrapassar estas desvantagens, foi ensaiada a

utilização de oligómeros de quitosana (Köping-Höggård *et al.*, 2003, 2004). Os resultados obtidos mostraram que os complexos dos oligómeros com o pADN se dissociavam mais facilmente do que os complexos de quitosana com o pADN e, além disso, apresentavam melhores propriedades físico-químicas. A influência da estrutura da quitosana na formação e estabilidade dos complexos ADN-quitosana foi estudada por Strand *et al.* (2005). Num segundo trabalho, avaliou-se em maior pormenor a relação entre o tamanho das cadeias de quitosana de baixa massa molecular (4,7 kDa a 33 kDa) e GP entre 21 e 88 e a absorção celular dos complexos e a eficiência da transferência de genes (Strand *et al.*, 2010). Os resultados obtidos permitiram concluir que os oligómeros com GP entre 31 e 42 permitiam o nível máximo de expressão transgénica e também que era possível modelar as interacções electrostáticas entre os oligómeros e o ADN, através do controlo do GP dos oligómeros e da sua substituição parcial por oligossacarídeos neutros. No trabalho de Puras *et al.* (2013) oligómeros de quitosana com 5,7 kDa revelaram-se promissores no tratamento de alterações da retina por terapia genética.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projecto “Development of innovating biomedical products from marine resources valorisation” (MARMED), Transnational Cooperation Programme Atlantic Area 2007-2013 Priority 1: Promote transnational entrepreneurial and innovation networks Marmed 2011-1/164.

#### 4. Referências bibliográficas

- ABDEL-AZIZ, S. M.; FOUKIA, E.; MOAFI, F. E., 2008. Preparation of low molecular weight chitosan by extracellular enzymes produced by *Bacillus alvei*. *J. appl. sci. res.*, 4 (12): 1755-1761.
- AIBA, S., 1992. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 14 (4): 225-228.
- AIBA, S., 1993. Studies on chitosan: 6. Relationship between *N*-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially *N*-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15 (4): 241-245.
- AKIYAMA K.; KAWAZU, K.; KOBAYASHI, A., 1995. A novel method for chemo-enzymatic synthesis of elicitor-active chitosan oligomers and partially N-deacetylated chitin oligomers using N-acylated chitotrioses as substrates in a lysozyme-catalyzed transglycosylation reaction system. *Carbohydr. Res.*, 279: 151-160.
- ALLAN, C. R.; HADWIGER, L. A., 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell-wall composition. *Exp. Mycol.*, 3: 285-287.
- ALLAN, G. G.; PEYRON, M., 1995. Molecular weight manipulation of chitosan. I: Kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydr. Res.*, 277: 257-272.
- ARBIA, W.; ARBIA, L.; ADOUR, L.; AMRANE, A., 2013. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods – a review. *Food Technol. Biotechnol.*, 51 (1): 12-25.
- ARTAN, M.; KARADENIZ, F.; KARAGOZLU, M. Z.; KIM, M. M.; KIM, S-K., 2010. Anti-HIV-1 activity of low molecular weight sulfated chitooligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, 345: 656-662.
- ARUCHAMI, M.; GOWRI, N.; RAJULU, G. S., 1982. Detection and characterization of chitosanase from termites. In: S. HIRANO and S. TOKURA (Eds), *Chitin and Chitosan*. Japanese Society of Chitin and Chitosan Publication, Sapporo, Japan, pp 131-134.
- BAHAR, B.; O'DOHERTY, J. V.; MAHER, S.; McMORROW, J.; SWEENEY, T., 2012. Chitooligosaccharide elicits acute inflammatory cytokine response through AP-1 pathway in human intestinal epithelial-like (Caco-2) cells. *Mol. Immunol.*, 51: 283- 291.
- BARKER, S. A.; FOSTER, A. B.; STACEY, M.; WEBBER, J. M., 1958. Amino-sugars and related compounds. Part IV. Isolation and properties of oligosaccharides obtained by controlled fragmentation of chitin. *J. Chem. Soc.*, 1958: 2218-2227.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; AIT BARKA, E.; BOSQUEZ-MOLINA, E.;

- WILSON, C. L., 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot.*, 25: 108–118.
- BAZINET, L.; SHEE, L. T., 2009. Method for transforming polysaccharides into oligosaccharides with bipolar membrane electro dialysis. WO patent 2009/039653 A1.
- BENHABILES, M. S.; SALAH, R.; LOUNICI, H.; DROUCHE, N.; GOOSEN, M. F. A.; MAMERI, N., 2012. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, 29: 48-56.
- BREDEHORST, R.; POMATO, N.; SCHEEL, O.; THIEM, J., 1998. High yield preparation of dimeric to decameric chitin oligomers. US patent 5,705,634. 17 p.
- BHAT, T. A.; SINGH, R. P., 2008. Tumor angiogenesis – A potential target in cancer chemoprevention. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 1334–1345.
- BOSSO, C.; DEFAYE, J.; DOMARD, A.; GADELLE, A.; PEDERSEN, C., 1986. The behavior of chitin towards anhydrous hydrogen fluoride. Preparation of  $\beta$ -(1→4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-d-glucopyranosyl oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, 156: 57-68.
- CABRERA, J. C.; VAN CUTSEM, P., 2005. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochem. Eng. J.*, 25: 165–172.
- CAI, Q.; GU, Z.; CHEN, Y.; HAN, W.; FU, T.; SONG, H.; LI, F., 2010. Degradation of chitosan by an electrochemical process. *Carbohydr. Polym.*, 79: 783–785.
- CARDOSO, M. B.; SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P., 2001. On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. *Polym. Bul.*, 47: 183–190.
- CEDERKVIST, F. H.; PARMER, M. P.; VÅRUM, K. M.; EIJSINK, V. G. H.; SØRLIE, M., 2008. Inhibition of a family 18 chitinase by chitooligosaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 74: 41–49.
- CEDERKVIST, F.; ZAMFIR, A. D.; BAHRKE, S.; EIJSINK, V. G. H.; SØRLIE, M.; PETER-KATALINIC, J.; PETER, M. G., 2006. Identification of a high-affinity-binding oligosaccharide by (+) nanoelectrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry of a noncovalent enzyme-ligand complex. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45: 2429–2434.
- CHANG, K. L. B.; TAI, M.-C.; CHENG, F.-H., 2001. Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (10): 4845–4851.

- CHEN, J.K.; SHEN, C.-R.; YEH, C.-H.; FANG, B.-S.; HUANG, T.-L.; LIU, C.-L., 2011. N-Acetyl glucosamine obtained from chitin by chitin degrading factors in *Chitinbacter tainanesis*. *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 1187-1195.
- CHEN, Q.; XIAO, W.; ZHOU, L.; WU, T.; WU, Y., 2012. Hydrolysis of chitosan under microwave irradiation in ionic liquids promoted by sulfonic acid-functionalized ionic liquids. *Polym. Degrad. Stab.*, 97: 49-53.
- CHEN, R. H.; CHEN, J. S., 2000. Changes of polydispersity and limiting molecular weight of ultrasound-treated chitosan. *Adv. Chitin Sci.*, 4: 361-366.
- CHEN, Y. M.; CHUNG, Y. C.; WANG, L. W.; CHEN, K. T.; LI, S. Y., 2002. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen. *J. Environ. Sci. Health Part A*, 37: 1379-1390.
- CHEVRIER, A. P. P., 2009. Nouvelle méthode de préparation de chitooligosaccharides possédant une structure et une architecture contrôlées. Thèse de Doctorat, L'Université Claude Bernard, Lyon 1, 209 p.
- CHIANG, C.-L.; CHANG, Y.-M.; CHANG, C.-T.; SUNG, H.-Y., 2005. Characterization of a chitosanase isolated from a commercial ficin preparation. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (19): 7579-7585.
- CHOI, B.-K.; KIM, K.-Y.; YOO, Y.-J.; OH, S.-J.; CHOI, J.-H.; KIM, C.-Y., 2001. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int. J. Antimicro. Ag.*, 18: 553-557.
- CHOI, W.-S.; AHN, K.-J.; LEE, D.-W.; BYUN, M.-W.; PARK, H.-J., 2002. Preparation of chitosan oligomers by irradiation. *Polym. Degrad. Stab.*, 78: 533-538.
- CHUNG, Y. C.; SU, Y. P.; CHEN, C. C.; JIA, G.; WANG, H. L.; WU, J. C., 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol. Sin.*, 25: 932-936.
- CRAVOTTO, G.; TAGLIAPIETRA, S.; ROBALDO, B.; TROTTA, M., 2005. Chemical modification of chitosan under high-intensity ultrasound. *Ultrason Sonochem*, 12: 95-98.
- CZECHOWSKA-BISKUP, R.; ROKITA, B.; ULANSKI, P.; ROSIAK, J. M., 2005. Radiation-induced and sonochemical degradation of chitosan as a way to increase its fat-binding capacity. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, 236: 383-390.

- DEBENHAM, J. S.; RODEBAUGH, R.; FRASER-REID, B., 1996. Nodulation factors: A strategy for convergent assembly of a late-stage key intermediate illustrated by the total synthesis of NodRf-III (C18:1) (MeFuc). *J. Org. Chem.*, 61 (19): 6478-6479.
- DEFAYE, J.; GADELLE, A.; PEDERSEN, C., 1989. Chitin and chitosan oligosaccharides. *In: G. SKJÅK-BRÆK, T. ANTHONSEN, and P. SANDFORD (Eds.), Chitin and Chitosan*, Elsevier, London, pp. 415-429.
- DEFAYE, J.; GADELLE, A.; PEDERSEN, C., 1994. A convenient access to  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-linked 2-amino-2-deoxy-d-glucopyranosyl fluoride oligosaccharides and  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-linked 2-amino-2-deoxy-d-glucopyranosyl oligosaccharides by fluorolysis and fluorohydrolysis of chitosan. *Carbohydr. Res.*, 261: 267-277.
- DEMONT-CAULET, N.; MAILLET, F.; TAILLER, D.; JACQUINET, J. C.; PROMÉ, J. C.; NICOLAOU, K. C.; TRUCHET, G.; BEAU, J. M.; DENARIE, J., 1999. Nodule-inducing activity of synthetic *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors and related lipo-chitooligosaccharides on alfalfa. Importance of the acyl chain structure. *Plant Physiol.*, 120 (1): 83-92.
- DOMARD, A.; CARTIER, N., 1989. Glucosamine oligomers: Preparation and characterization. *In: G. SKJÅK-BRÆK, T. ANTHONSEN, and P. SANDFORD (Eds.), Chitin and Chitosan*, Elsevier, London, pp. 287-383.
- DOU, J.; MA, P.; XIONG, C.; TAN, C.; DU, Y., 2011. Induction of apoptosis in human acute leukemia HL-60 cells by oligochitosan through extrinsic and intrinsic pathway. *Carbohydr. Polym.*, 86: 19–24.
- DROUILLARD, S.; ARMAND, S.; DAVIES, G. J.; VORGIAS, C. E.; HENRISSAT, B., 1997. *Serratia marcescens* chitobiase is a retaining glycosidase utilizing substrate acetamido group participation. *Biochem. J.*, 328: 945-949.
- DU, Y.; ZHAO, Y.; DAI, S.; YANG, B., 2009. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10: 103–107.
- DUY, N. N.; PHU, D. V.; ANH, N. T.; HIEN, N. Q., 2011. Synergistic degradation to prepare oligochitosan by  $\gamma$ -irradiation of chitosan solution in the presence of hydrogen peroxide. *Radiat. Phys. Chem.*, 80: 848–853.
- ELIAS, J. A.; HOMER, R. J.; HAMID, Q.; LEE, C. G., 2005. Chitinases and chitinase-like proteins in Th2 inflammation and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 116: 497–500.

- EWEIS, M.; ELKHOLY, S. S.; ELSABEE, M. Z., 2006. Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. *Int. J. Biol. Macromol.*, 38: 1–8.
- FENG, J.; ZHAO, L.; YU, Q., 2004. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317: 414-420.
- FENG, T.; DU, Y.; LI, J.; WEI, Y.; YAO, P., 2007. Antioxidant activity of half *N*-acetylated water-soluble chitosan in vitro. *Eur Food Res Technol*, 225: 133–138.
- FERNANDES, J. C.; EATON, P.; NASCIMENTO, H.; GIÃO, M. S.; RAMOS, Ó. S.; BELO, L.; SANTOS-SILVA, A.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X., 2010. Antioxidant activity of chitooligosaccharides upon two biological systems: Erythrocytes and bacteriophages. *Carbohydr. Polym.*, 79: 1101–1106.
- FERNANDES, J. C.; TAVARIA, F. K.; SOARES, J. C.; RAMOS, Ó. S.; MONTEIRO, M. J.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X., 2008. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol.*, 25: 922– 928.
- FU, J. Y.; WU, S. M.; CHANG, C. T.; SUNG, H. Y., 2003. Characterization of three chitosanase isozymes isolated from a commercial crude porcine pepsin preparation. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 1042-1048.
- FUKAMIZO, T.; HONDA, Y.; GOTO, S.; BOUCHER, I.; BRZEZINSKI, R., 1995. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174. *Biochem. J.*, 311: 377-383.
- FURUSAKI, E.; UENO, Y.; SAKAIRI, N.; NISHI N.; TOKURA, S., 1996. Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Carbohydr. Polym.*, 29(1): 29–34.
- GAMAGE, A.; SHAHIDI, F., 2007. Use of chitosan for the removal of metal ion contaminants and proteins from water. *Food Chem.*, 104: 989-996.
- GERASIMENKO, D. V.; AVDIENKO, I. D.; BANNIKOVA, G. E.; ZUEVA, O. Y.; VARLAMOV, V. P., 2004. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Appl. Biochem. Micro+*, 40: 253-257.
- GRENIER, J.; ASSELIN, A., 1990. Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 3: 401–407.
- GRENOUILLAT, N.; VAUZEILLES, B.; BONO, J.-J.; SAMAIN, E.; JEAN-MARIE BEAU, J.-M., 2004. Simple synthesis of nodulation-factor analogues exhibiting high affinity towards a specific binding protein. *Angew. Chem., Int. Ed.* 43: 4644-4646.



- GRESSENT, F.; DROUILLARD, S.; MANTEGAZZA, N.; SAMAIN, E.; GEREMIA, R. A.; CANUT, H.; NIEBEL, A.; DRIGUEZ, H.; RANJEVA, R.; CULLIMORE, J.; BONO, J.-J., 1999. Ligand specificity of a high-affinity binding site for lipochitooligosaccharidic Nod factors in *Medicago* cell suspension cultures. *Proc. Ntl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96 (8): 4704-4709.
- GRYCZKA, U.; DONDI, D.; CHMIELEWSKI, A. G.; MIGDAL, W.; BUTTAFAVA, A.; FAUCITANO, A., 2009. The mechanism of chitosan degradation by gamma and e-beam irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 78: 543–548.
- GUERRA-SÁNCHEZ, M. G.; VEGA-PÉREZ, J.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N., 2009. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pest. Biochem. Physiol.*, 93: 18–22.
- HAI, L.; DIEP, T. B.; NAGASAWA, N.; YOSHII, F.; KUME, T., 2003. Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, 208: 466–470.
- HASEGAWA, M.; ISOGAI, A.; ONABE, F., 1993. Preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydr. Polym.*, 20: 279-283.
- HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; S. BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁSQUEZ DEL VALLE, M. G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M. G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M. M.; BELLO-PÉREZ, L. A., 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Carbohydr. Polym.*, 73: 541–547.
- HIEN, N. Q.; PHU, D. V.; DUY, N. N.; LAN, N. T. K., 2012. Degradation of chitosan in solution by gamma irradiation in the presence of hydrogen peroxide. *Carbohydr. Polym.*, 87: 935– 938.
- HIRANO, S.; NAGAO, N., 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.*, 53: 3065-3066.
- HOFFMAN, J.; JOHANSEN, A.; STEIRO, K.; GILDBERG, A.; STENBERG, E.; BØGWALD, J., 1997. Chitooligosaccharides stimulate Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney leukocytes to enhanced superoxide anion production *in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118B (1): 105–115.
- HONG, S. P.; KIM, M. H.; OH, S. W.; HAN, C. H.; KIM, Y. H., 1998. ACE inhibitory and antihypertensive effect of chitosan oligosaccharides in SHR. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30: 1476-1479.

- HOROWITZ, S.; ROSEMAN, S.; BLUMENTHAL, H. J., 1957. The preparation of glucosamine oligosaccharides. I. Separation. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 5046-5049.
- HSIAO, Y.-C.; LIN, Y.-W.; SU, C.-K.; CHIANG, B.-H., 2008. High degree polymerized chitooligosaccharides synthesis by chitosanase in the bulk aqueous system and reversed micellar microreactors. *Process Biochem.*, 43: 76–82.
- HSU, S.-C.; DON, T.-M.; CHIU, W.-Y., 2002. Free radical degradation of chitosan with potassium persulfate. *Polym. Degrad. Stab.*, 75: 73–83.
- HUANG, G.-L.; ZHANG, D.-W.; ZHAO, H.-J.; ZHANG, H.-C.; WANG, P.-G., 2006. Chemo-enzymatic synthesis of allyl penta-*N*-acetyl-chitopentaose. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16 (7): 2042–2043.
- HUANG, Q. Z.; WANG, S. M.; HUANG, J. F.; ZHUO, L. H.; GUO, Y. C., 2007. Study on the heterogeneous degradation of chitosan with hydrogen peroxide under the catalysis of phosphotungstic acid. *Carbohydr. Polym.*, 68: 761–765.
- HUANG, R. H.; MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K., 2006. Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sci.*, 78 (20): 2399-2408.
- HUNG, T. H.; CHANG, Y. M.; SUNG, H. Y.; CHANG, C. T., 2002. Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4666-4673.
- IKEDA, I.; SUGANO, M.; YOSHIDA, K.; SASAKI, E.; IWAMOTO, Y.; HATANO, K., 1993. Effects of chitosan hydrolysates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 431-435.
- IKESHITA, S.; NAKAHARA, Y.; OGAWA, T., 1994a. Synthesis of lipooligosaccharide nodulation signals NodBj-V(RCO, MeFuc) and NodBj-IV(RCO, MeFuc) of *Bradyrhizobium japonicum* E<sup>[1]</sup>. *Glycoconjugate J.*, 11: 257-261.
- IKESHITA, S.; SAKAMOTO, A.; NAKAHARA, Y.; OGAWA, T., 1994b. Synthesis of the root nodule-inducing factor NodRm-IV(C16:2,S) of *Rhizobium meliloti* and related compounds. *Tetrahedron Lett.*, 35 (19): 3123-3126.
- IL'INA, A. V.; VARLAMOV, V. P., 2004. Hydrolysis of chitosan in lactic acid. *Appl. Biochem. Micro+*, 40 (3): 300–303.
- ILANKOVAN, P.; HEIN, S.; NG, C.-H.; TRUNG; T. S.; STEVENS, W. F., 2006. Production of N-acetyl chitobiose from various chitin substrates using commercial enzymes. *Carbohydr. Polym.*, 63, (2): 245–250.

- ILYINA, A. V.; TIKHONOV, V. E.; ALBULOV, A. I.; VARLAMOV, V. P., 2000. Enzymic preparation of acid-free-water-soluble chitosan. *Process Biochem.*, 35: 563–568.
- INABA, T.; OHGUCHI, T.; IGA, T.; HASEGAWA, E., 1984. Synthesis of 4-methylcoumarine-7-yloxy tetra-N-acetyl- $\beta$ -chitotetraoside, a novel synthetic substrate for the fluorometric assay of lysozyme. *Chem. Pharm. Bull.*, 32: 1597-1603.
- ING, L. Y.; ZIN, N. M.; SARWAR, A.; KATAS, H., 2012. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *Int. J. Biomat.*, Volume 2012, Article ID 632698, 9 p.
- IZUME, M.; NAGAE, S.; KAWAGISHI, H.; MITAUTOMI, M.; OHTAKARA, A., 1992. Action pattern of *Bacillus* sp. No.7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 56: 448-453.
- JAYAKUMAR, R.; CHENNAZHI, K. P.; MUZZARELLI, R. A. A.; TAMURA, H.; NAIR, S. V.; SELVAMURUGAN, N., 2010. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. *Carbohydr. Polym.*, 79: 1–8.
- JE, J.-Y.; PARK, P.-J.; KIM, S.-K., 2004. Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. *Food Chem. Toxicol.*, 42: 381–387.
- JEON, Y. J.; KIM, S. K., 1997. Antitumor, antibacterial and calcium absorption acceleration effect of chitosan oligosaccharides prepared by using ultrafiltration membrane enzyme reactor. *J Chitin Chitosan*, 2: 60–78.
- JEON, Y. J.; KIM, S. K., 2000a. Production of chitooligosaccharides using ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.*, 41: 133–141.
- JEON, Y. J.; KIM, S. K., 2000b. Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochem.*, 35: 623–632.
- JEON, Y. J.; KIM, S. K., 2001. Effect of antimicrobial activity by chitosan oligosaccharides N-conjugated with asparagines. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 281-286.
- JEON, Y. J.; KIM, S. K., 2002. Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in an ultra filtration membrane reactor system. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 503-507.
- JEON, Y. J.; PARK, P. J.; BYUN, H. G.; SONG, B. K.; KIM, S. K., 1998. Production of chitosan oligosaccharides using chitin-immobilized enzyme. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 12: 503-507.
- JEON, Y.-J.; PARK, P.-J.; KIM, S.-K., 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr. Polym.*, 44: 71–76.
- JEON, Y. J.; SHAHIDI, F.; KIM, S.-K., 2000. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Rev. Int.*, 16 (2): 159-176.

- JIA, Z.; SHEN, D., 2002. Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydr. Polym.*, 49: 393-396.
- JOODI, G.; ANSARI, N.; KHODAGHOLI, F., 2011. Chitooligosaccharide-mediated neuroprotection is associated with modulation of Hsps expression and reduction of MAPK phosphorylation. *Int. J. Biol. Macromol.*, 48: 726–735.
- JUNG, W. K.; MOON, S. H.; KIM, S.-K., 2006. Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats. *Life Sci.*, 78: 970-976.
- KANG, B.; DAI, Y. D.; ZHANG, H. Q.; CHEN, D., 2007. Synergetic degradation of chitosan with gamma radiation and hydrogen peroxide. *Polym. Degrad. Stabil.* 92: 359-362.
- KARADENIZ, F.; ARTAN, M.; KONG, C.-S.; KIM, S.-K., 2010. Chitooligosaccharides protect pancreatic  $\beta$ -cells from hydrogen peroxide-induced deterioration. *Carbohydr. Polym.*, 82: 143–147.
- KAUSS, H.; JEBLICK, W.; YOUNG, D. H., 1982/1983. Chitin deacetylation from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Sci. Lett.*, 28: 231-236.
- KENDRA, D. F.; HADWIGER, L. A., 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicit pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, 8: 276–281.
- KIM, J. Y.; LEE, J. K.; LEE, T. S.; PARK, W. H., 2003. Synthesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 32: 23-27.
- KIM, M.-S.; SUNG, M.-J.; SEO, S.-B.; YOO, S.-J.; LIM, W.-K.; KIM, H.-M., 2002. Water-soluble chitosan inhibits the production of pro-inflammatory cytokine in human astrocytoma cells activated by amyloid  $\beta$  peptide and interleukin-1 $\beta$ . *Neurosci. Lett.*, 321: 105–109.
- KIM, S.-K.; PARK, P.-J.; JUNG, W.-K.; BYUN, H.-G.; MENDIS, E.; CHO, Y.-I., 2005. Inhibitory activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the formation of calcium phosphate. *Carbohydr. Polym.*, 60: 483–487.
- KIM, S.-K.; RAJAPAKSE, N., 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr. Polym.*, 62: 357-368.
- KIM, S. Y.; SHON, D. H.; LEE, K. H., 1998. Purification and characteristics of two types of chitosanases from *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 8: 568–574.

- KITTUR, F. S.; KUMAR, A. B. V.; GOWDA, L. R.; THARANATHAN, R. N., 2003b. Chitosan analysis by a pectinase isozyme of *Aspergillus niger* — A non-specific activity. *Carbohydr. Polym.*, 53: 191–196.
- KITTUR, F. S.; KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ M. C.; THARANATHAN, R. N., 2005. Chitooligosaccharides—preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity. *Carbohydr. Res.*, 340: 1239–1245.
- KITTUR, F. S.; KUMAR, A. B. V.; THARANATHAN, R. N., 2003a. Low molecular weight chitosans preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization. *Carbohydr. Res.*, 338: 1283-1290.
- KLOKKEVOLD, P. R.; VANDEMARK, L.; KENNEY, E. B.; BERNARD, G. W., 1996. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) *in vitro*. *J Periodontol.*, 67 (11): 1170-1175.
- KNORR, D.; KLEIN, J., 1986. Production and conversion of chitosan with cultures of *Mucor rouxii* or *Phycomyces blakesleeanus*. *Biotechnol. Letts.*, 8:691-694.
- KOCHKINA, Z. M.; CHIRKOV, S. N., 2000a. Effect of chitosan derivatives on the development of phage infection in cultured *Bacillus thuringiensis*. *Mikrobiologiya*, 69: 266-269.
- KOCHKINA, Z. M.; CHIRKOV, S. N., 2000b. Effect of chitosan derivatives on the reproduction of coliphages T2 and T7. *Mikrobiologiya*, 69: 257-260.
- KÖPING- HÖGGÅRD, M.; TUBULEKAS, I.; GUAN, H.; EDWARDS, K.; NILSSON, M.; VÅRUM, K.M.; ARTURSSON, P., 2001. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*. *Gene Ther.*, 8: 1108–1121.
- KÖPING-HÖGGÅRD, M.; MEL'NIKOVA, Y. S.; VÅRUM, K. M.; LINDMAN, B.; ARTURSSON, P., 2003. Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system *in vitro* and *in vivo*. *J Gene Med.*, 5(2): 130-141.
- KÖPING-HÖGGÅRD, M.; VÅRUM, K. M.; ISSA, M.; DANIELSEN S.; CHRISTENSEN, B. E.; STOKKE, B. T.; ARTURSSON, P., 2004. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther.*, 11: 1441–1452.
- KUMAR, A. B. V.; THARANATHAN R. N., 2004. A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes. *Carbohydr. Polym.*, 58: 275–283.

- KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ, M. C.; GOWDA, L. R.; THARANATHAN, R. N., 2005. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 391: 167–175.
- KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ, M. C.; GOWDA, L. R.; THARANATHAN, R. N., 2007a. Low molecular weight chitosans—Preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1770: 495–505.
- KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ, M. C.; LALITHA, R.G.; THARANATHAN, R. N., 2004. Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1670: 137–146.
- KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ, M. C.; THARANATHAN, R. N., 2007b. Low molecular weight chitosan - Preparation with the aid of pepsin, characterization, and its bactericidal activity. *Biomacromolecules*, 8 (2): 566–572.
- KURITA, K.; TOMITA, K.; ISHII, S.; NISHIMURA, S.-I.; SHIMODA, K., 1993.  $\beta$ -chitin as a convenient starting material for acetolysis for efficient preparation of N-acetylchitooligosaccharides. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 31 (9): 2393–2395.
- KUROIWA, T.; ICHIKAWA, S.; SATO, S.; HIRUTA, O.; SATO, S.; MUKATAKA, S., 2002. Factors affecting the composition of oligosaccharides produced in chitosan hydrolysis using immobilized chitosanases. *Biotechnol. Progr.*, 18: 969–974.
- KUROIWA, T.; ICHIKAWA, S.; SATO, S.; MUKATAKA, S., 2003. Improvement of the yield of physiologically active oligosaccharides in continuous hydrolysis of chitosan using immobilized chitosanases. *Biotechnol. Bioeng.*, 84: 121–127.
- LEE, D. X.; XIA, W. S.; ZHANG, J. L., 2008. Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase. *Food Chem.*, 111: 291–295.
- LEE, H. W.; CHOI, J. W.; HAN, D. P.; PARK, M. J.; LEE, N. W.; YI, D. H., 1996. Purification and characteristics of chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 6: 19–25.
- LEE, S.-H.; PARK, J.-S.; KIM, S.-K.; AHN, C.-B.; JE, J.-Y., 2009b. Chitooligosaccharides suppress the level of protein expression and acetylcholinesterase activity induced by Ab25–35 in PC12 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19: 860–862.
- LEE, S.-H.; SENEVIRATHNE, M.; AHN, C.-B.; KIM, S.-K.; JE, J.-Y., 2009a. Factors affecting anti-inflammatory effect of chitooligosaccharides in lipopolysaccharides-induced RAW264.7 macrophage cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19: 6655–6658.

- LETZEL, M.; SYNSTAD, B.; EIJSINK, V. G. H.; PETER-KATALINIC, J.; PETER, M. G., 2000. Libraries of chito-oligosaccharides of mixed acetylation patterns and their interactions with chitinases. *Adv. Chitin Sci.*, 4: 545–552.
- LI, J.; DU, Y.; LIANG, H., 2007. Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme. *Polym. Degrad. Stab.*, 92: 515-524.
- LI, J.; DU, Y.; SUN, L.; LIANG, H.; FENG, T.; WEI, Y.; YAO, P., 2006. Chitosaneous hydrogel beads for immobilizing neutral protease for application in the preparation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 101: 3743–3750.
- LI, J.; DU, Y.; YANG, J.; FENG, T.; LI, A.; CHEN, P., 2005. Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. *Polym. Degrad. Stab.*, 87: 441-448.
- LIANG, T.-W.; CHEN, Y.-J.; YEN Y.-H.; WANG, S.-L., 2007. The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656. *Process Biochem.*, 42: 527–534.
- LIN, H.; WANG, H. Y.; XUE, C. H.; YE, M., 2002. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. *Enzyme Microb. Tech.*, 31: 588-592.
- LIN, S.-B.; LIN, Y.-C.; CHEN, H.-H., 2009a. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity. *Food Chem.*, 116: 47–53.
- LIN, Y.-W.; HSIAO, Y.-C.; CHIANG, B.-H., 2009b. Production of high degree polymerized chitoooligosaccharides in a membrane reactor using purified chitosanase from *Bacillus cereus*. *Food Res. Int.*, 42: 1355–1361.
- LIU, H.; BAO, J.; DU, Y.; ZHOU X.; KENNEDY, J. F., 2006. Effect of ultrasonic treatment on the biochemophysical properties of chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 64: 553–559.
- LIU, H.-T.; HE, J.-L.; LI, W.-M.; YANG, Z.; WANG, Y.-X.; BAI, X.-F.; YU, C. ;YU-GUANG DU, Y.-G., 2010. Chitosan oligosaccharides protect human umbilical vein endothelial cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Carbohydr. Polym.*, 80: 1062–1071.
- LIU, H.-T.; LI, W.-M.; XU, G.; LI, X.-Y.; BAI, X.-F., WEI, P.; YU, C.; DU, Y.-G., 2009. Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacol. Res.*, 59: 167–175.

- LIU, J.; XIA, W., 2006. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulose. *Biochem. Eng. J.*, 30: 82–87.
- MA, P.; LIU, H.-T.; WEI, P.; XU, Q.-S.; BAI, X.-F.; DU, Y.-G.; YU, C., 2011. Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  in RAW264.7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways. *Carbohydr. Polym.*, 84: 1391–1398.
- MAEDA, Y.; KIMURA, Y., 2004. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice. *J. Nutr.*, 134: 945–950.
- MAKSINOV, V. I.; DENISOV, V. M.; MAKAROV, N. V., 1990. Preparation of water-soluble oligosaccharides. SU patent, 1571047.
- MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; SIMON, M.; BI, D.; KISSEL, T., 2004. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. *Int. J. Pharm.*, 281: 45–54.
- McGAHREN, W. J.; PERKINSON, G. A.; GROWICH, J. A.; LEESE, R. A.; ELLESTAD, G. A., 1984. Chitosan by fermentation. *Process Biochem.*, 19: 88-90.
- MENDIS, E.; KIM, M.-M.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S.-K., 2007. An in vitro cellular analysis of the radical scavenging efficacy of chitoooligosaccharides. *Life Sci.*, 80: 2118–2127.
- MING, M.; KUROIWA, T.; ICHIKAWA, S.; SATO, S.; MUKATAKA, S., 2006. Production of chitosan oligosaccharides at high concentration by immobilized chitosanase. *Food Sci. Technol. Res.*, 12: 85-90.
- MISLOVIČOVÁ, D.; MASÁROVÁ, J.; BENDŽÁLOVÁ, K.; ŠOLTÉS, L.; MACHOVÁ, E., 2000. Sonication of chitin–glucan, preparation of water-soluble fractions and characterization by HPLC. *Ultrason. Sonochem.*, 7: 63–68.
- MITSUTOMI, M.; KIDOH, H.; TOMITA, H.; WATANABE, T., 1995. The action of *Bacillus circulans* WL-12 chitinases on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59 (3): 529–531.
- MITSUTOMI, M.; OHTAKARA, A.; FUKAMIZO, T.; GOTO, S., 1990. Action pattern of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *Agric. Biol. Chem.*, 54 (4): 871-877.
- MITSUTOMI, M.; UEDA, M.; ARAI, M.; ANDO, A.; WATANABE, T., 1996. Action patterns of microbial chitinases and chitosanases on partially N-acetylated chitosan. *In:*



- MUZZARELLI, R. A. A. (Ed.), *Chitin Enzymology*, vol. 2, Atec Edizioni, Italy, pp 273-284.
- MONSAN, P.; PAUL, F., 1995. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol. Rev.*, 16 (2-3): 187–192.
- MORAIS, L. L.; BENNIS, K.; RIPOCHE, I.; LIAO, L.; AUZANNEAU, F.-I.; GELAS, J., 2003. Synthesis of S-linked thiooligosaccharide analogues of Nod factors: synthesis of new protected thiodisaccharide and thiotrisaccharide intermediates. *Carbohydr. Res.*, 338 (13): 1369-1379.
- MORRIS, V. B.; NEETHU, S.; ABRAHAM, T. E.; PILLAI, C. K. S.; SHARMA, C. P., 2009. Studies on the condensation of depolymerized chitosans with DNA for preparing chitosan-DNA nanoparticles for gene delivery applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 89B: 282–292.
- MUMPER, R.J.; WANG, J.; CLASPELL, J. M.; ROLLAND, A. P., 1995. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.*, 22: 178–179.
- MURAKI, E.; YAKU, F.; KOJIMA, H., 1993. Preparation and crystallization of d-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8. *Carbohydr. Res.*, 239, 1, 27–237.
- MUZZARELLI, R. A. A., 2010. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Mar. Drugs*, 8: 292-312.
- MUZZARELLI, R. A. A.; ILARI, P.; TARSÌ, R.; DUBINI, B.; XIA, W., 1994a. Chitosan from *Absidia coerulea*. *Carbohydr. Polym.*, 25: 45–50.
- MUZZARELLI, R. A. A.; TERBOJEVICH, M.; MUZZARELLI, C.; FRANCESCANGELI, O., 2002. Chitosans depolymerized with the aid of papain and stabilized as glycosylamines. *Carbohydr. Polym.*, 50: 69-78.
- MUZZARELLI, R. A. A.; TOMASETTI, M.; ILARI, P., 1994b. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 110-114.
- MUZZARELLI, R. A. A.; XIA, W.; TOMASETTI, M.; ILARI, P., 1995. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation. *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 541-545.
- NAM, K. S.; KIM, M. K.; SHON, Y. H., 2007. Inhibition of proinflammatory cytokine-induced invasiveness of HT-29 cells by chitosan oligosaccharide. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 2042–2045.

- NANJO, F.; ISHIKAWA, M.; KATSUMI, R.; SAKAI, K., 1990. Purification, properties, and transglycosylation reaction of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from *Nocardia orientalis*. *Agric. Biol. Chem.*, 54: 899–906.
- NGO, D. N.; KIM, M. M.; KIM, S. K., 2008a. Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells. *Carbohydr. Polym.*, 74: 228-234.
- NGO, D. N.; QIAN, Z. J.; JE, J. Y.; KIM, M. M.; KIM, S. K., 2008b. Aminoethyl chitooligosaccharides inhibit the activity of angiotensin converting enzyme. *Process Biochem.*, 43(1): 119-123.
- NICOLAOU, K.C.; BOCKOVICH, N. J.; CARCANAGUE, D. R.; HUMMEL, C. W.; EVEN, L. F., 1992. Total synthesis of the NodRm-IV factors, the rhizobium nodulation signals. *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (22): 8701–8702.
- NO, H. K.; PARK N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P., 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.*, 74: 65– 72.
- NORDTVEIT, R. J.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O., 1994. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. *Carbohydr. Polym.*, 23 (4): 253-260.
- NORDTVEIT, R. J.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O., 1996. Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydr. Polym.*, 29 (2): 163-167.
- NOVIKOV, V. YU.; MUKHIN, V. A., 2003. Chitosan depolymerization by enzymes from the hepatopancreas of the crab *Paralithodes camtschaticus*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 39 (5): 464–468.
- OHARA, N.; HAYASHI, Y.; YAMADA, S.; KIM, S.-K.; MATSUNAGA, T.; YANAGIGUCHI, K.; IKEDA, T., 2004. Early gene expression analyzed by cDNA microarray and RT-PCR in osteoblasts cultured with water-soluble and low molecular chitooligosaccharide. *Biomaterials*, 25: 1749–1754.
- OHTAKARA, A.; MATSUNAGA, H.; MITSUTOMI, M., 1990. Action pattern of *Streptomyces griseus* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *Agric. Biol. Chem.*, 54 (12): 3191–3199.
- OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S., 2003. Effect of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Polym.*, 53: 337-342.

- OKAMURA, Y.; NOMURA, A.; MINAMI, S.; OKAMOTO, Y., 2005. Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on release of type I collagenase from fibroblasts. *Biomacromolecules*, 6 (5): 2382–2384.
- OMURA, H.; UEHARA, K.; TANAKA, Y., 1991. Manufacture of low-molecular weight chitosan. Japanese Patent (Jpn Kokai Tokyo Koho), 03-02203.
- OSSWALD, W. F.; SHAPIRO, J. P.; DOOSTDAR, H.; MCDONALD, K. E.; NIEDZ, R. P.; NAIRN, C. J.; HEARN, J.; MAYER, R. T., 1994. Identification and characterization of acidic hydrolases with chitinase and chitosanase activities from sweet orange callus tissue. *Plant Cell Physiol.*, 35: 811-820.
- OUAKFAOUI, S. E.; ASSELIN, A., 1992a. Diversity of chitosanase activity in cucumber. *Plant Sci.*, 85: 33-41.
- OUAKFAOUI, S. E.; ASSELIN, A., 1992b. Multiple forms of chitosanase activities. *Phytochemistry*, 31: 1513-1518.
- PALMA-GUERRERO, J.; HUANG, I. C.; JANSSON, H. B.; SALINAS, J.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; READ, N. D., 2009. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genet. Biol.*, 46: 585–594.
- PALMA-GUERRERO, J.; LOPEZ-JIMENEZ, J. A.; PÉREZ-BERNÁ, A. J.; HUANG, I.-C.; JANSSON, H.-B.; SALINAS, J.; VILLALÁIN, J.; READ, N. D.; LOPEZ-LLORCA, L. V., 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Mol. Microbiol.*, 75(4): 1021–1032.
- PAN, S. K.; WU, S. J., 2011. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis with commercial glucoamylase containing chitosanase activity. *Eur. Food. Res. Technol.*, 233: 325-329.
- PANGESTUTI, R.; BAK, S.-S.; KIM, S.-K., 2011. Attenuation of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated BV2 microglia by chitooligosaccharides via the MAPK signaling pathway. *Int. J. Biol. Macromol.*, 49: 599– 606.
- PANTALEONE, D.; YALPANI, M.; SCOLLAR, M., 1992a. Susceptibility of chitosan to enzymatic hydrolysis. In: C. J. BRINE, P. A. SANDFORD, and J. P. ZIKAKIS (Eds.), *Advances in Chitin and Chitosan*, Elsevier, London, pp. 292–303.
- PANTALEONE, D.; YALPANI, M.; SCOLLAR, M., 1992b. Unusual susceptibility of chitosan to enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. Res.*, 237: 325–332.
- PARK, P.-J.; AHN, C.-B.; JEON, Y.-J.; JAE-YOUNG JE J.-Y., 2008. Renin inhibition activity by chitooligosaccharides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18: 2471–2474.

- PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K., 2003a. Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4624-4627.
- PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K., 2003b. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4930-4934.
- PARK, P. J.; JE, J. Y.; BYUN, H. G.; MOON, S. H.; KIM, S. K., 2004a. Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 317-323.
- PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K., 2004c. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydr. Polym.*, 55: 17-22.
- PARK, P. J.; LEE, H. K.; KIM, S. K., 2004b. Preparation of hetero-chitooligosaccharides and their antimicrobial activity on *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 41-47.
- PARK, P. J.; KIM, S. K.; LEE, H. K., 2002. Antimicrobial activity of chitooligosaccharides on *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Chitin Chitosan*, 7: 225-230.
- PARK, Y.; KIM, M. H.; PARK, S. C.; CHEONG, H.; JANG, M. K.; NAH, J. W.; HAHM, K. S., 2008. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 1729–1734.
- PEGG, G. F.; YOUNG, D. H., 1982. Purification and characterization of chitinase enzymes from healthy and *Verticillium albo-atrum*-infected tomato plants and from *V. albo-atrum*. *Physiol. Plant Pathol.*, 21: 389-409.
- PENISTON, Q. P.; JOHNSON, E. L., 1975. Process for depolymerization of chitosan. US patent, No. 3922260.
- PRASERTSUNG, I.; DAMRONGSAKKUL, S.; TERASHIMA, C.; SAITO, N.; TAKAI, O., 2012. Preparation of low molecular weight chitosan using solution plasma system. *Carbohydr. Polym.*, 87: 2745– 2749.
- PRASHANTH, K. V. H.; DHARMESH, S. M.; RAO, K. S. J.; THARANATHAN, R. N., 2007. Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. *Carbohydr. Res.*, 342: 190–195.
- PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. N., 2005. Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1722: 22–29.

- PURAS, G.; ZARATE J.; ACEVES, M.; MURUA, A.; DÍAZ, A. R.; AVILÉS-TRIGUERO, M.; FERNÁNDEZ, E.; PEDRAZ, J.L., 2013. Low molecular weight oligochitosans for non-viral retinal gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 83: 131–140.
- QIAO, Y.; BAI, X.-F.; DU, Y.-G., 2011. Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. *Int. Immunopharmacol.*, 11: 121–127.
- QIAO, Y.; RUAN, Y.; XIONG, C.; XU, Q. WEI, P.; MA, P.; XUEFANG BAI, X.; DU, Y., 2010. Chitosan oligosaccharides suppressant LPS binding to TLR4/MD-2 receptor complex. *Carbohydr. Polym.*, 82: 405–411.
- QIN, C.; DU, Y.; XIAO, L.; LI, Z.; GAO, X., 2002b. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 31: 111-117.
- QIN, C.; WANG, W.; PENG, H.; HU, R.; LI, W., 2008. Preparation and properties of reduced chitooligomers. *Carbohydr. Polym.*, 72: 701–706.
- QIN, C. Q.; DU, Y. M.; XIAO, L., 2002a. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. *Polym. Degrad. Stab.*, 76: 211–218.
- QUAN, H.; ZHU, F.; HAN, X.; XU, Z.; ZHAO, Y.; MIAO, Z., 2009. Mechanism of anti-angiogenic activities of chitooligosaccharides may be through inhibiting heparanase activity. *Med. Hypotheses*, 73: 205–206.
- RAO, M. S.; CHANDER, R.; SHARMA, A., 2008. Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation. *LWT - Food Sci. Technol.*, 41: 1995-2001.
- RASMUSSEN, M. O.; HOGG, B.; BONO, J.J.; E. SAMAIN, E.; DRIGUEZ, H., 2004. New access to lipo-chitooligosaccharide nodulation factors. *Org. Biomol. Chem.*, 2: 1908-1910.
- RATANAVARAPORN, J.; KANOKPANONT, S.; TABATA, Y.; DAMRONGSAKKUL, S., 2009. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films. *Carbohydr. Polym.*, 78: 873–878.
- RONCAL, T.; OVIEDO, A.; ARMENTIA, I. L. D.; FERNÁNDEZ, L.; VILLARÁN, M. C., 2007. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. *Carbohydr. Res.*, 342: 2750-2756.

- REGE, P. R.; BLOCK, L. H., 1999. Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydr. Res.*, 321: 235–245.
- RHOADES, J.; ROLLER, S., 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(1): 80–86.
- RUPLEY, J. A., 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid and the preparation of low molecular weight substrate for lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 83: 245-255.
- SAMAIN, E.; CHAZALET, V.; GEREMIA, R. A., 1999. Production of *O*-acetylated and sulphated chitooligosaccharides by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of *nod* genes. *J. Biotechnol.*, 72: 33–47.
- SAMAIN, E.; DROUILLARD, S.; HEYRA, A., 1997. Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in *Escherichia coli*. *Carbohydr. Res.*, 302 (1997) 35-42.
- SEDINKIN, S. L.; ZININ, A. I.; MALYSHEVA, N. N.; SHASHKOV, A. S.; TORGOV, V. I.; SHIBAEV, V. N., 2007. Synthesis of two lipopentasaccharides related to the nodulation factors of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium* sp. NGR 234. *Mendeleev Commun.*, 17 (1): 10-13.
- SEKIGUCHI, S.; MIURA, Y.; KANEKO, H.; NISHIMURA, S.-I.; NISHI, N.; IWASE, M.; TOKURA, S., 1994. Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers. In: K. NISHINARI and E. DOI, (Eds), *Food hydrocolloids: structures, properties, and functions*, Plenum Press, New York, pp. 71–76.
- SEYFARTH, F.; SCHLIEMANN, S.; ELSNER, P.; HIPLER, U. C., 2008. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *Int. J. Pharm.*, 353: 139–148.
- SHAHIDI, F.; VIDANA ARACHCHI, J. K., JEON, Y. J., 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Tech.*, 10: 37–51.
- SHAO, J.; YANG, Y.; ZHONG, Q., 2003. Studies on preparation of oligoglucosamine by oxidative degradation under microwave irradiation. *Polym. Degrad. Stab.*, 82: 395-398.
- SHARMA, P.; BORJA, D.; STOUGAORD, P.; LONNEBORG, A., 1993. PR-proteins accumulating in spruce roots infected with a pathogenic *Pythium* sp. isolate include chitinase, chitosanase and  $\beta$ -1,3-glucanases. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 43: 57-67.

- SHEN, K.-T.; CHEN, M.-H.; CHAN, H.-Y.; JENG, J.-H.; WANG, Y.-J., 2009. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food Chem. Toxicol.*, 47: 1864–1871.
- SHIBATA, Y.; METZGER, W. J.; MYRVIK, Q. N., 1997. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: Mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *J. Immunol.*, 18: 947-951.
- SHIKHMAN, A. R.; KUHN, K.; ALAAEDDINE, N.; LOTZ, M., 2001. N-Acetylglucosamine prevents IL-1 $\beta$ -mediated activation of human chondrocytes. *J Immunol.*, 166: 5155-5160.
- SHIMAHARA, K.; OHKOUCHI, K.; IKEDA, M., 1982. A new isolation method of crustacean chitin using proteolytic bacterium, *Pseudomonas maltophilia*. In: S. HIRANO and S. TOKURA (Eds), *Proceedings of the 2nd International Conference of the Japanese Society of chitin and Chitosan*, Sapporo, Japan, 10-15.
- STRAND, S. P.; DANIELSEN, S.; CHRISTENSEN, B. E.; VÅRUM, K. M., 2005. Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-chitosan polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules*, 6 (6): 3357-3366.
- STRAND, S. P., LELU, S.; REITAN, N. K.; DAVIES, C. L.; ARTURSSON, P., 2010. Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials*, 31: 975–987.
- STRUSZCZYK, K.; SZCZĘSNA-ANTCZAK, M.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; BIELECKI, S., 2006. Study on catalytic activity of mucor in the process of chitosan biodegradation. *Polish Chitin Society, Monograph XI*, 153-158.
- SUDHARSHAN, N. R.; HOOVER, D. G.; KNORR, D., 1992. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.*, 6: 257-272.
- SUGANO, M.; WATANABE, S.; KISHI, A.; IZUME, M.; OHTAKARA, A., 1988. Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. *Lipids*, 23: 187-191.
- SUN, T.; ZHOU, D.; XIE, J.; MAO, F., 2007. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.*, 225: 451–456.
- SUTRISNO, A.; UEDA, M.; ABE, Y.; NAKAZAWA, M.; MIYATAKE, K., 2004. A chitinase with high activity toward partially N-acetylated chitosan from a new, moderately thermophilic, chitin-degrading bacterium, *Ralstonia* sp. A-471. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63(4): 398-406.

- SUZUKI, S., 1996. Studies on biological effects of water soluble lower homologous oligosaccharides of chitin and chitosan. *Fragrance J.*, 15: 61-68.
- SUZUKI, K.; MIKAMI, T.; OKAWA, Y.; TOKORO, A.; SUZUKI, S.; SUZUKI, M., 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, 151: 403-408.
- TAHTAT, D.; MAHLOUS, M.; BENAMER, S.; KHODJA, A. N.; YUCEF, S. L., 2012. Effect of molecular weight on radiation chemical degradation yield of chain scission of  $\gamma$ -irradiated chitosan in solid state and in aqueous solution. *Radiat. Phys. Chem.*, 81: 659–665.
- TAILLER, D.; JACQUINET, J.-C.; BEAU, J.-M., 1994. Total Synthesis of NodRm<sup>IV</sup> (S): a sulfated lipotetrasaccharide symbiotic signal from *Rhizobium meliloti*. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 16: 1827-1828.
- TAKAHASHI, Y.; MIKI, F.; NAGASE, K., 1995. Effect of sonolysis on acid degradation of chitin to form oligosaccharides. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 68 (7): 1851-1857.
- TAKAYANAGI, T.; AJISAKA, K.; TAKIGUCHI, Y.; SHIMAHARA, K., 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochim. Biophys. Acta*, 1078: 404-410.
- TAKEDA, M.; ABE, E., 1962. Isolation of crustacean chitin. Decalcification by disodium ethylenediaminetetraacetate and enzymic hydrolysis of incidental proteins. *Norisho Suisan Koshusho Kenkyu Hokohu*, 11: 339-345.
- TAKEDA, M.; KATSUURA, H., 1964. Purification of king crab chitin. *Suisan Daigaku Kenkyu Hokohu*, 13: 109-116.
- TAKIGUCHI, Y.; SHIMAMURA, K., 1989. Isolation and identification of a thermophilic bacterium producing N,N'-diacetylchitobiose from chitin. *Agric. Biol. Chem.*, 53:1537-1541.
- TANG, E. S. K.; HUANG, M.; LIM, L. Y., 2003. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 265: 103–114.
- TANIOKA, S.; MATSUI, Y.; IRIE, T.; TANIGAWA, T.; TANAKA, Y.; SHIBATA, H.; SAWA, Y.; KONO, Y., 1996. Oxidative depolymerization of chitosan by hydroxyl radical. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60: 2001-2004.
- TAŞKIN, P.; CANISAĞ, H.; ŞEN, M., 2014. The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan. *Radiat. Phys. Chem.*, 94: 236–239.
- TERBOJEVICH, M.; COSANI, A.; FOCHER, B.; MARSANO, E., 1993. High-performance gel permeation chromatography of chitosan samples. *Carbohydr. Res.*, 250: 301–314.



- TERBOJEVICH, M.; COSANIA, A.; MUZZARELLI, R. A. A., 1996. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. *Carbohydr. Polym.*, 29 (1): 63-68.
- TIAN, F.; LIU, Y.; HU, K.; ZHAO, B., 2004. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. *Carbohydr. Polym.*, 57: 31–37.
- TIKHONOV, V. E.; STEPNOVA, E. A.; BABAK, V. G.; YAMSKOV, I. A.; PALMAGUERRERO, J.; JANSSON, H.-B.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; SALINAS, J.; GERASIMENKO, D. V.; AVDIENKO, I. D.; VARLAMOV, V. P., 2006. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-(2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl)-derivatives. *Carbohydr. Polym.*, 64: 66–72.
- TISHCHENKO, G.; ŠIMŮNEK, J.; BRUS, J.; NETOPILÍK, M.; PEKÁREK, M.; WALTEROVÁ, Z.; KOPPOVÁ, I.; LENFELD, J., 2011. Low-molecular-weight chitosans: Preparation and characterization. *Carbohydr. Polym.*, 86: 1077–1081.
- TODASHI, I., 1990. Preparation of water-soluble chitosan. JP patent 02 041301.
- TOKORO, A.; TATEWAKI, N.; SUZUKI, K.; MIKAMI, T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, M., 1998. Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose and Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.*, 36: 784-790.
- TOMAYA, T.; YOSHICHI, A.; AKIRA, A., 1987. Manufacture of water-soluble low-molecular-weight chitosan with narrow molecular weight distribution. JP patent 62 184002.
- TØMMERAAS, K.; VÅRUM, K. M.; CHRISTENSEN, B. E.; SMIDSRØD, O., 2001. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. *Carbohydr. Res.*, 333: 137–144.
- TROMBOTTO, S.; LADAVIÈRE, C.; DELOLME, F.; DOMARD, A., 2008. Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers. *Biomacromolecules*, 9 (7): 1731–1738.
- TSAI, G. J.; SU, W.-H.; CHEN, H. C.; PAN, C. L., 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Sci.*, 68: 170-177.
- TSAI, G. J.; WU, Z.-Y.; SU, W.-H., 2000. Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J. Food Prot.*, 63 (6): 747-752.
- TSAIH, M. L.; CHEN, R. H., 2003. Effect of degree of deacetylation of chitosan on the kinetics of ultrasonic degradation of chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.*, 90: 3526–3531.

- TSUKADA K.; MATSUMOTO, T.; AIZAWA, K.; TOKORO, A.; NARUSE, R.-S.; SUZUKI, S.; SUZUKI, M., 1990. Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81: 259-265.
- UCHIDA, Y.; IZUME, M.; OHTAKARA, A., 1989. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. In: G. BRAEK, T. ANTHONSEN and P. SANDFORD (Eds.), *Chitin and Chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Elsevier Applied Science, Barking, UK, pp. 372-382.
- USUI, T.; HAYASHI, Y.; NANJO, F.; SAKAI, K.; ISHIDO, Y., 1987. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 923 (2): 302–309.
- USUI, T.; MATSUI, H.; ISOBE, K., 1990. Enzymic synthesis of useful chito-oligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate. *Carbohydr. Res.*, 203 (1): 65–77.
- VÅRUM, K. M.; HOLME, H. K.; IZUME, M.; STOKKE, B. T.; SMIDSRØD, O., 1996. Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. *Biochim. Biophys. Acta*, 1291: 5–15.
- VÅRUM, K. M.; OTTØY, M. H.; SMIDSØRD, O., 2001. Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydr. Polym.*, 46: 89-98.
- VÅRUM, K. M.; ROSENLUND, G.; SMIDSØRD, O., 1989. Enzymatic degradation of chitosan in Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: G. SKJAK-BREAK, T. ANTHONSEN, P. SANDFORD (Eds), *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*; Elsevier Applied Science, London, U.K., pp 299-308.
- VELÁSQUEZ, C. L.; MEDINA, D.; TORRES, C.; MILLÁN, E., 2007. Kinetic of the enzymatic degradation of chitosan using bromelain: a viscosimetric study. *Av. Quim.*, 2(2): 25-32.
- VO, T.-S.; KONG, C.-S.; KIM, S.-K., 2011. Inhibitory effects of chitoooligosaccharides on degranulation and cytokine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Carbohydr. Polym.*, 84: 649–655.
- WANG, G. H., 1992. Inhibition and inactivation of five species of food borne pathogens by chitosan. *J. Food Prot.*, 55: 916-925.
- WANG, J.; CHEN, Y.; DING, Y.; SHI, G.; WAN, C., 2008. Research of the degradation products of chitosan's angiogenic function. *Appl. Surf. Sci.*, 255: 260–262.

- WANG, L.-X.; LI, C.; WANG, Q.-W.; HUI, Y.-Z., 1994. Chemical synthesis of NodRm-I: the nodulation factor involved in *Rhizobium meliloti*-legume symbiosis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, 1 (6): 621-628.
- WANG, S.-L.; HSU, W.-H.; LIANG, T.-W., 2010. Conversion of squid pen by *Pseudomonas aeruginosa* K187 fermentation for the production of N-acetyl chitooligosaccharides and biofertilizers. *Carbohydr. Res.*, 345: 880–885.
- WANG, S.-L.; LIN, H.-T.; LIANG, T.-W.; CHEN, Y.-J.; YEN, Y.-H.; GUO, S.-P., 2008. Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *Bioresource Technol.*, 99: 4386–4393.
- WANG, S.-L.; LIU, C.-P.; LIANG, T.-W., 2012. Fermented and enzymatic production of chitin/chitosan oligosaccharides by extracellular chitinases from *Bacillus cereus* TKU027. *Carbohydr. Polym.*, 90: 1305–1313.
- WANG, S.-M.; HUANG, Q.-Z.; WANG, Q.-S., 2005. Study on the synergetic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Carbohydr. Res.*, 340: 1143-1147.
- WANG, W.; DUA, Y.; QIU, Y.; WANG, X.; HU, Y.; YANG, J.; CAI, J.; KENNEDY, J. F., 2008. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 74: 127–132.
- WANG, Z.; ZHENG, L.; YANG, S.; NIU, R.; CHU, E.; LIN, X., 2007. N-acetylchitooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 357(1): 26-31.
- WASIKIEWICZ, J. M.; YOSHII, F.; NAGASAWA, N.; WACH, R. A.; MITOMO, H., 2005. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. *Radiat. Phys. Chem.*, 73: 287-295.
- WEINER, M. L., 1992. An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients. In: C. J. BRINE, P. A. SANDFORD, and J. P. ZIKAKIS (Eds.), *Advances in Chitin and Chitosan*, Elsevier, London, pp. 663–670.
- WU, H.; AAM, B. B.; WANG, W.; NORBERG, A. L.; SØRLIE, M.; EIJSINK, V. G. H.; DU, Y., 2012. Inhibition of angiogenesis by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. *Carbohydr. Polym.*, 89: 511–518.
- WU, H.; YAO, Z.; BAI, X.; DU, Y.; LIN, B., 2008. Anti-angiogenic activities of chitooligosaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 73: 105–110.

- WU, H.; YAO, Z.; BAI, X.; DU, Y.; MA, X., 2010. Chitooligosaccharides inhibit nitric oxide mediated migration of endothelial cells in vitro and tumor angiogenesis in vivo. *Carbohydr. Polym.*, 82: 927–932.
- WU, S., 2011. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis with commercial  $\alpha$ -amylase containing chitosanase activity. *Food Chem.*, 128: 769–772.
- WU S., 2012. Preparation of chitooligosaccharides from *Clanis bilineata* larvae skin and their antibacterial activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 51: 1147– 1150.
- WU, T.; ZIVANOVIC, S.; HAYES, D.G.; WEISS, J., 2008. Efficient reduction of chitosan molecular weight by high-intensity ultrasound: Underlying mechanism and effect of process parameters. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 5112–5119.
- XIA, W.; LIU, P.; LIU, J., 2008. Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases. *Bioresource Technol.*, 99: 6751–6762.
- XIA, Z.; WU, S.; CHEN, J., 2013. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide. *In. J. Biol. Macromol.*, 59: 242– 245.
- XIE, Y.; HU, J.; WEI, Y.; HONG, X., 2009. Preparation of chitooligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Polym. Degrad. Stab.*, 94: 1895–1899.
- XIE, Y.; WEI, Y., HU, J., 2010. Depolymerization of chitosan with a crude cellulase preparation from *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160: 1074–1083.
- XING, R.; LIU, S.; YU, H.; GUO, Z.; WANG, P.; LI, C.; LI, Z.; LI, P., 2005. Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation. *Carbohydr. Res.*, 340: 2150-2153.
- XING, R.; LIU, S.; GUO, Z.; YU, H.; WANG, P.; LI, C.; LIA, Z.; LI, P., 2005. Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorg. Med. Chem.*, 13: 1573–1577.
- XIONG, C.; WU, H.; WEI, P.; PAN, M.; TUO, Y.; KUSAKABE, I.; DU, Y., 2009. Potent angiogenic inhibition effects of deacetylated chitohexaose separated from chitooligosaccharides and its mechanism of action in vitro. *Carbohydr. Res.*, 344: 1975–1983.
- XU, Q.; DOU, J.; WEI, P.; TAN, C.; YUN, X., WU, Y.; BAI, X.; MA, X.; DU, Y., 2008. Chitooligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of Bax. *Carbohydr. Polym.*, 71: 509–514.
- XU, J.; ZHAO, X.; HAN, X.; DU, Y., 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pestic. Biochem. Phys.*, 87: 220–228.

- YABUKI, M.; UCHIYAMA, A.; SUZUKI, A.; ANDO, A.; FUJII, T., 1998. Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34: 255-270.
- YALPANI, M.; PANTALEONE, D., 1994. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. Res.*, 256: 159-175.
- YAMASAKI, Y.; FUKUMOTO, I.; KUMAGAI, N.; OHTA, Y.; NAKAGAWA, T.; KAWAMUKAI, M.; MATSUDA, H., 1992. Continuous chitosan hydrolysate production by immobilized chitosanolytic enzyme from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (10): 1546-1551.
- YAN, Y.; WANSHUN, L.; BAOQIN, H.; CHANGHONG, W.; CHENWEI, F.; BING, L.; LIEHUAN, C., 2007. The antioxidative and immunostimulating properties of D-glucosamine. *Int. Immunopharmacol.*, 7: 29–35.
- YAO, D.-R.; ZHOU, M.-Q.; WU, S.-J.; PAN, S.-K., 2012. Depolymerization of chitosan by enzymes from the digestive tract of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Afr. J. Biotechnol.*, 11 (2): 423-428.
- YIN, X. Q.; LIN, Q.; ZHANG, Q.; YANG, L. C., 2002. O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging activity of chitosan and its metal complexes. *Chin. J. Appl. Chem.*, 19: 325-328.
- YOON, J. H., 2005. Enzymatic synthesis of chitoooligosaccharides in organic cosolvents. *Enzyme Microbial Technol.*, 37: 663–668.
- YOON, H. J.; MOON, M. E.; PARK, H. S.; IM, S. Y.; KIM, Y. H., 2007. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358: 954–959.
- YOKSAN, R.; AKASHI, M.; MIYATA, M.; CHIRACHANCHAI, S., 2004. Optimal gamma-ray dose and irradiation conditions for producing low-molecular-weight chitosan that retains its chemical structure. *Radiat. Res.*, 161: 471–480.
- YOUSEF, M.; PICHYANGKURA, R.; SOODVILAI, S.; CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C., 2012. Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: Therapeutic efficacy and possible mechanisms of action. *Pharmacol. Res.*, 66: 66–79.
- YUE, W.; YAO, P.; WEI, Y.; LI, S.; LAI, F.; LIU, X., 2008a. An innovative method for preparation of acid-free-water-soluble low-molecular-weight chitosan (AFWSLMWC). *Food Chem.*, 108: 1082–1087.
- YUE, W.; YAO, P.; WEI, Y.; MO, H., 2008b. Synergetic effect of ozone and ultrasonic radiation on degradation of chitosan. *Polym. Degrad. Stab.*, 93: 1814–1821.

- YUN, Y. S.; KIM, S. K.; LEE, Y. N., 1999. Antibacterial and antifungal effect of chitosan. *J. Chitin Chitosan*, 4: 8-14.
- ZHANG, H.; DU, Y.; YU, X.; MITSUTOMI, M.; AIBA, S., 1999. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. *Carbohydr. Res.*, 320: 257–260.
- ZHANG, H.; NEAU, S. H., 2001. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 22: 1653-1658.
- ZHANG, Z.; LI, C.; WANG, Q.; ZHAO, Z. K., 2009. Efficient hydrolysis of chitosan in ionic liquids. *Carbohydr. Polym.*, 78: 685–689.
- ZHAO, X.; KONG, A.; HOU, Y.; SHAN, C.; DING, H.; SHAN, Y., 2009. An innovative method for oxidative degradation of chitosan with molecular oxygen catalyzed by metal phthalocyanine in neutral ionic liquid. *Carbohydr. Res.*, 344: 2010-2013.
- ZHENG, L.-Y.; ZHU, J.-F., 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.*, 54: 527–530.

