



EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRIMARIA DE SAPONINAS DE *Quillaja brasiliensis*.

Br. MAURICIO MASTROGIOVANNI

**Tutores:
Dra. Silvia Soulé
Dr. Fernando Ferreira**

Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados

Tesina de grado – Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Montevideo, Uruguay
2012

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todos aquellos que de alguna forma u otra han colaborado en este trabajo y me han acompañado a lo largo de la carrera.

Al todo el equipo del LCG por dejarme formar parte del laboratorio y ayudarme todas las veces que necesité una mano. En particular, quisiera agradecer a mis tutores Silvia y Fernando de quienes además, aprendí muchísimo a lo largo de todo este trabajo. Gracias por las invaluable reuniones, por todo el tiempo dedicado en mí, con las discusiones de resultados, apoyo en la redacción, etc.

A la ANII por el apoyo económico con la beca de iniciación.

También debo agradecer la amabilidad de los guardaparques del Parque Batlle que me dejaron tomar muestras de los árboles sin problemas, y especialmente a Toma, Magda, Claudia y Lu quienes, sin demanda alguna, me ayudaron a picar los cientos y cientos de gramos de hojas!

A mi familia, por bancarme, en todos los sentidos, durante todos estos años de carrera. A Lu por acompañarme y aguantarme durante todo este tiempo, y a su familia, un segundo hogar. A Matilde, por su generosidad y por todos esos días de hospedaje en su casa.

Y por último quisiera agradecer a todos los gurices de Facultad de Ciencias con quienes he compartido mucho tiempo, cursos, grupos de estudio y muchos momentos disfrutables al cursar la licenciatura, a aquellos con quienes enfrenté el primer año de facultad y las jornadas enteras dentro de fcien, con quienes ya no nos vemos tan seguido como antes y principalmente a la barra de gurices que desde 2007 mantenemos un lindo grupo de amigos; Nadia, Flor, Chávez, Toma y Lu!

Índice

| | |
|--|-------------|
| AGRADECIMIENTOS | II |
| ÍNDICE DE FIGURAS | V |
| ABREVIATURAS | VII |
| RESUMEN | VIII |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| SAPONINAS..... | 1 |
| <i>Clasificación</i> | 1 |
| <i>Biosíntesis</i> | 2 |
| <i>Funciones y propiedades</i> | 5 |
| <i>Aislamiento y análisis</i> | 7 |
| <i>QUILLAJA SPP</i> | 9 |
| ADYUVANTES | 11 |
| ANTECEDENTES..... | 13 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| MATERIAL VEGETAL | 15 |
| EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SAPONINAS | 15 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Sistema I</i> | 15 |
| <i>Sistema II (escalado)</i> | 16 |
| ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS | 16 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 20 |
| ETAPA 1 | 20 |
| <i>Extracción y purificación</i> | 20 |
| <i>Análisis</i> | 26 |
| ETAPA 2 | 34 |
| <i>Extracción y análisis</i> | 34 |
| ESTRUCTURA..... | 41 |
| REFERENCIAS | 45 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. -Síntesis del 2,3-oxidoescualeno | 3 |
| Figura 2. -Diferentes formas de ciclación del oxidoescualeno..... | 4 |
| Figura 3. -Modelos de mecanismos de interacción saponina-membrana biológica | 7 |
| Figura 4. -Fraccionamiento con SPE..... | 20 |
| Figura 5. -Fraccionamiento por SPE..... | 23 |
| Figura 6. -Fraccionamiento por columna abierta de fase reversa | 23 |
| Figura 7. -Utilización de distintos reveladores para la caracterización de fracciones de saponinas ... | 25 |
| Figura 8. -Espectros de absorción de EXT, FA y FB | 26 |
| Figura 9. -Curvas de hemólisis para las muestras EXT, FA, FB y F5' | 27 |
| Figura 10. -Optimización de Fase móvil | 29 |
| Figura 11. -Análisis por HPLC de las fracciones FA y FB..... | 30 |
| Figura 12. -Análisis de azúcares totales en FB | 31 |
| Figura 13. -Análisis de azúcares por GC-FID | 32 |
| Figura 14. -Análisis de azúcares por GC-MS | 32 |
| Figura 15. - Análisis de masas de FB..... | 33 |
| Figura 16. -Fraccionamiento por MPLC..... | 35 |
| Figura 17. -Análisis de masas de las fracciones Qb21 y Qb22 | 36 |

| | |
|---|----|
| Figura 18.- Cromatogramas de las fracciones QB21 y Qb22 | 37 |
| Figura 19.- Análisis de masas de las fracciones purificadas..... | 39 |
| Figura 20.- Análisis de azúcares de Qb22 por GC-FID..... | 40 |
| Figura 21.- Saponinas presentes en <i>Quillaja saponaria</i> | 42 |
| Figura 22.- Estructuras propuestas..... | 42 |

Abreviaturas

| | |
|------------------------|---|
| Api..... | Apiosa |
| Ara..... | Arabinosa |
| CH ₅₀ | Concentración hemolítica al 50% |
| CMC..... | Concentración micelar crítica |
| DHB..... | Ácido 2,5-dihidroxibenzoico |
| DMAPP..... | Dimetilalil pirofosfato |
| ES..... | Escualeno sintasa |
| FAB..... | Bombardeo rápido de átomos |
| FID..... | Detector de ionización de llama |
| FM..... | Fase móvil |
| FPP..... | Farnesil pirofosfato |
| Fuc..... | Fucosa |
| Gal..... | Galactosa |
| GC..... | Cromatografía de gases |
| Glc..... | Glucosa |
| GlcA..... | Ácido glucurónico |
| GPP..... | Geranil pirofosfato |
| GT..... | Glicosil-transferasa |
| HPLC..... | Cromatografía líquida de alta presión |
| IPP..... | Isopentenil pirofosfato |
| ISCOM..... | Complejo inmunoestimulador |
| MALDI..... | Ionización/Desorción láser asistida por matriz |
| MPLC..... | Cromatografía líquida de media presión |
| MS..... | Espectrometría de masas |
| NADPH..... | Dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato |
| RBC..... | Glóbulos rojos |
| rbcl..... | Gen que codifica para subunidad grande de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa |
| Rf..... | Factor de retención |
| Rha..... | Ramnosa |
| RSV..... | Virus del sarcoma de Rous |
| SPE..... | Extracción en fase sólida |
| TLC..... | Cromatografía en capa fina |
| TOF..... | Tiempo de vuelo |
| t _R | Tiempo de retención |
| UV..... | Ultravioleta |
| Xyl..... | Xilosa |

Resumen

Quillaja brasiliensis, árbol nativo del sur de Brasil y Uruguay, es conocido como “palo de jabón” por su capacidad para formar espuma cuando sus hojas y corteza son agitadas en agua, propiedad debida a las saponinas presentes el vegetal. Las saponinas son metabolitos secundarios que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se caracterizan por estar constituidas por uno o más residuos oligosacáridicos unidos covalentemente a un residuo lipofílico conocido como aglicona. *Quillaja saponaria*, la especie mejor estudiada de éste género, presenta propiedades similares y su corteza es utilizada como fuente de saponinas de amplio uso industrial y en la preparación de productos biológicos. En particular, son utilizadas como adyuvantes en vacunas debido a su capacidad para incrementar la respuesta específica a antígenos co-administrados. Sin embargo, su uso se ve en cierto grado restringido debido a que en el vegetal se encuentran como complejas mezclas heterogéneas, en las que algunos componentes presentan efectos secundarios indeseables. Recientemente, se ha demostrado la capacidad adyuvante de una fracción definida de saponinas obtenida a partir de hojas de *Q. brasiliensis*, mediante un sistema de extracción en fase sólida. Dicha fracción, posee menor actividad hemolítica que saponinas comerciales de *Quillaja saponaria* utilizadas en vacunas de uso veterinario, así como capacidad de formar estructuras micelares nanoestructuras tipo ISCOM. El presente trabajo plantea como objetivo contribuir a la caracterización estructural de estos compuestos, como forma de ayudar a la comprensión de su actividad biológica y de sus propiedades fisicoquímicas. El material vegetal utilizado fue colectado de ejemplares de árboles cultivados de *Q. brasiliensis*, empleándose para todos los estudios posteriores extractos acuosos de hojas secas. El extracto de saponinas se fraccionó por distintas técnicas cromatográficas y las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta presión, y por espectrometría de masas MALDI-TOF. Con estos estudios se ha logrado obtener fracciones de distinto contenido de saponinas y se demostró la presencia del ácido quillájico como aglicona, unida al trisacárido D-Galactopiranosil- β -(1 \rightarrow 2)-[D-xilopiranosil- β -(1 \rightarrow 3)]-D-glucuronopiranosilo mediante un enlace acetal al hidroxilo en posición 3 de la aglicona.

Introducción

Saponinas

Las saponinas son una clase de compuestos estructuralmente diversos, que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se trata de glicósidos formados por uno o más residuos oligosacáridicos unidos covalentemente a una aglicona de carácter hidrofóbico (Hostettmann et al., 1995). Según el tipo de aglicona, se suelen clasificar en dos grupos, como glicósidos esteroidales o triterpénicos. El nombre *saponina* deriva del término en latín “*sapo*” que significa jabón. Esto se debe a que las saponinas son capaces de formar espuma al ser agitadas en soluciones acuosas. De modo general, algunas de las características de este amplio grupo de compuestos son sus propiedades emulsionantes, detergentes, deterrentes y hemolíticas. Históricamente se han definido a dichos compuestos en base a estas propiedades, pero en los últimos años se ha optado por una definición más precisa, en base a su estructura molecular, según su origen biosintético.

Clasificación

Como se mencionó antes, las saponinas tradicionalmente se clasifican según la aglicona en triterpénicas o esteroidales. Ambos núcleos hidrofóbicos poseen un precursor biosintético común de treinta átomos de carbono (30C), el escualeno, pero en la ruta biosintética de las esteroidales se pierden tres grupos metilo formando núcleos de 27C. Algunos autores (Hostettmann et al., 1995; Haralampidis et al., 2002) plantean otro grupo más, el de los glicoalcaloides esteroidales ya que éstos también se componen por residuos oligosacáridicos unidos a un núcleo esteroidal nitrogenado, sin embargo, otros

sostienen que deben ser tratados dentro del grupo de los alcaloides de manera separada. Recientemente Vincken *et al* (Vincken et al., 2007) realizaron un estudio analítico de muchas de las saponinas reportadas al momento y propusieron organizar a estos compuestos en once grupos diferentes basándose en el origen biosintético de las agliconas y sus modificaciones. De todas formas, antes de mencionar dichos grupos es necesario describir brevemente el origen biosintético de este amplio grupo de metabolitos secundarios.

Biosíntesis

La biosíntesis de las saponinas comienza con la ruta de isoprenoides en la que dos moléculas de isopentenil pirofosfato (IPP, 2x 5C) se condensan con una de dimetilalil pirofosfato (DMAPP, 5C) vía un enlace covalente tipo cola-cabeza para formar el farnesil pirofosfato (FPP, 15C). Luego la enzima escualeno sintasa (ES), a expensas de NADPH, cataliza la unión covalente de dos FPP mediante un enlace cola-cola para formar el escualeno (30C). Seguidamente la escualeno oxidasa (o escualeno epoxidasa) cataliza la oxidación del escualeno a 2,3-oxidoescualeno (o 2,3-epoxiescualeno, ver Fig. 1) y éste es el primer paso que lleva a las reacciones de ciclación en la biosíntesis de triterpenoides y esteroides (Hostettmann et al., 1995; Vincken et al., 2007; Yendo et al., 2010). Existen diferentes tipos de ciclasas y de ellas depende el tipo de compuesto policíclico que se forme. Para algunas, los mecanismos y la estereoespecificidad están bien determinados, mientras que otras todavía se encuentran en estudio. La ciclación del oxidoescualeno se puede dar de dos maneras principales, vía una conformación silla-silla-silla o silla-bote-silla, y la diferencia entre ellas radica en la estereoquímica de los compuestos policíclicos formados. Las que se forman a partir de la conformación silla-silla-silla sufren sucesivos rearrreglos para formar triterpenos tetra- o pentacíclicos mientras que la conformación silla-bote-silla se suceden rearrreglos 1,2 derivando en la

formación de cicloartenol o lanosterol que luego pueden dar lugar a la formación de colesterol y esteroides en general (Henry, 2005). La diferencia más importante entre estos dos esqueletos está en la estereoquímica, y se evidencia claramente en la configuración de los carbonos C8 y C14 (Fig. 2).

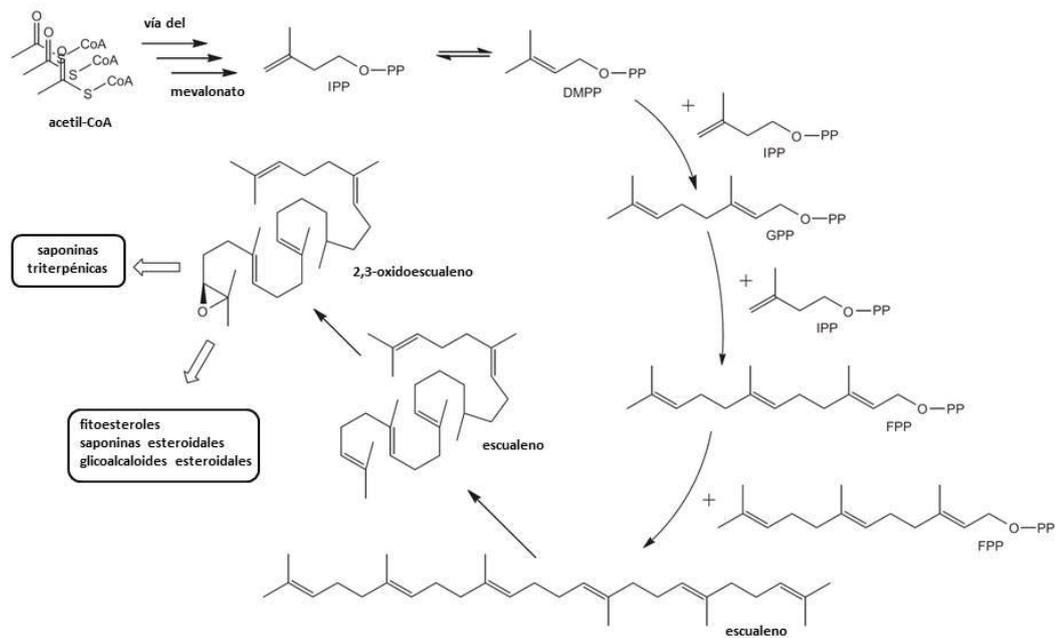


Figura 1.-Síntesis del 2,3-oxidoescualeno. Esquema de síntesis del precursor de las agliconas triterpénicas y esteroidales, el 2,3-oxidoescualeno. IPP: isopentenil pirofosfato, DMPP: dimetilalil pirofosfato, GPP: geranyl pirofosfato, FPP: farnesil pirofosfato. Adaptado de (Vincken et al., 2007).

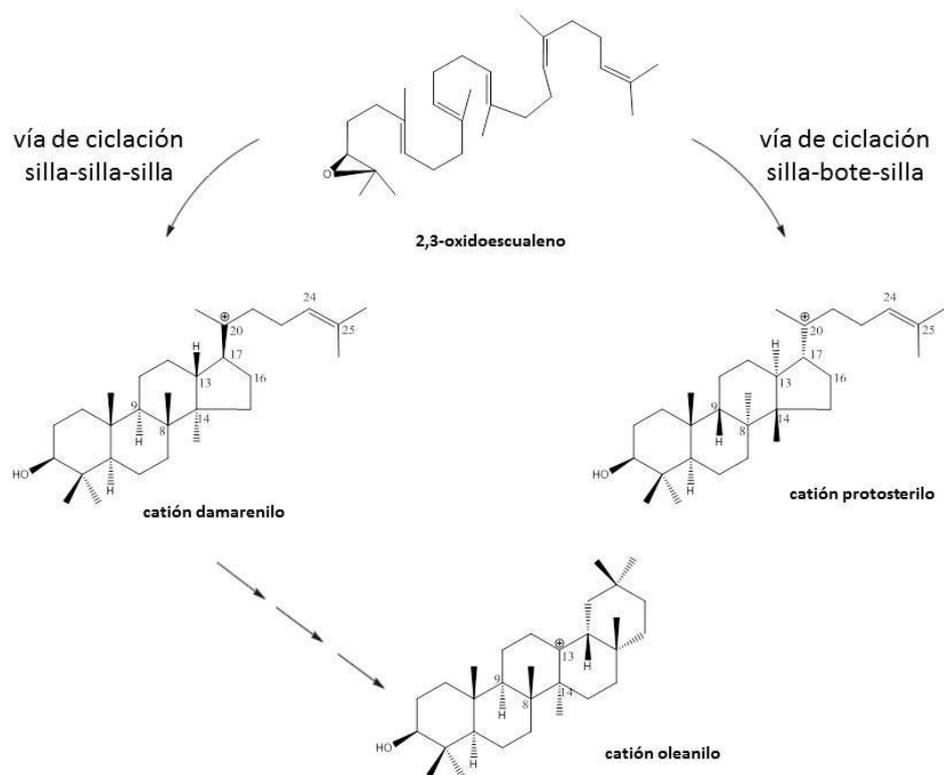


Figura 2.-Diferentes formas de ciclación del oxidosqualeno. Una diferencia importante entre las reacciones de ciclación es la estereoquímica de los productos, que se evidencia claramente en la configuración de los carbonos C8 y C14. En la conformación silla-silla-silla el metilo en C8 se posiciona hacia arriba y el metilo en C14 hacia abajo del plano de la molécula. En cambio, en la configuración silla-bote-silla dichos metilos están invertidos. En la figura se destaca uno de los productos, el catión oleanilo, que da origen a los oleananos, de gran relevancia para este trabajo.

Los once grupos en los que se clasifican las agliconas de las saponinas son: dammaranos, tirucallanos, lupanos, hopanos, oleananos, taraxasteranos, ursanos, cicloartanos, lanostanos, cucubitanos y esteroides (Vincken et al., 2007). Una vez formado el compuesto policíclico, sufre una serie de modificaciones hasta dar la aglicona final. Luego, ocurre su glicosilación catalizada por glicosil-transferasas (GT) específicas localizadas en diferentes compartimentos celulares. Se ha propuesto que aquellos azúcares que se adicionan en hidroxilos lo hacen uno en uno, mientras que los residuos oligosacáridos unidos a carboxilo son transferidos a la aglicona una vez

que el oligosacárido ha sido sintetizado (Heftmann, 1983; Valkonen et al., 1996). Acerca de la localización de la biosíntesis de saponinas no existen reglas generales ya que en diferentes especies la localización es diferente. En algunos casos son sintetizadas en partes verdes y luego transportadas hacia las raíces (*Calendula officinalis*), mientras que en otros casos son directamente sintetizadas en la raíz y se almacenan en la peridermis y corteza exterior (*Panax ginseng*) (Henry et al., 1991).

Las saponinas también se pueden separar en dos grupos según el número de cadenas oligosacáridicas unidas a la aglicona. La mayoría de las saponinas conocidas son monodesmosídicas, es decir, presentan un único sitio de glicosilación y comúnmente éste es el hidroxilo unido al C3 de la aglicona (Vincken et al., 2007). Generalmente aparecen 2-5 azúcares en esta cadena, pero existen reportes de saponinas con oligosacáridos con 11 residuos de monosacáridos (Hostettmann et al., 1995). Las saponinas que poseen dos cadenas oligosacáridicas se denominan bidesmosídicas y en el caso de las triterpénicas derivadas del oleanano, la segunda cadena suele aparecer unida a la aglicona vía un enlace éster en el carboxilo C28 de ésta.

Funciones y propiedades

La naturaleza anfifílica de las saponinas domina sus propiedades físicas en solución. Al ser compuestos tensoactivos, forman espuma estable en soluciones acuosas, actúan como emulsionantes y forman micelas con un comportamiento similar al de los detergentes (Hostettmann et al., 1995). Una de las características más sorprendentes de las saponinas, es la enorme diferencia entre las monodesmosídicas y las bidesmosídicas (Francis et al., 2007; Kaiser et al., 2010). Por lo general las propiedades que presentan los monodesmosídeos son atenuadas en sus bidesmosídeos análogos con excepción de actividad superficial, que es más pronunciada en las bidesmosídicas y

aumenta con el largo y ramificación de los oligosacáridos. A pesar de sus diferencias, los bidesmósidos inactivos pueden volverse activos mediante una hidrólisis alcalina (Hostettmann et al., 1995).

Por otra parte, se considera que las saponinas, como metabolitos secundarios, forman parte del sistema de defensa de las plantas contra patógenos y herbívoros. Numerosos reportes demuestran actividad fungicida, antimicrobiana, insecticida, molusquicida y alelopática de las saponinas, a pesar de que el mecanismo molecular por el cual actúan todavía no está dilucidado (Augustin et al., 2011).

Una de las propiedades de las saponinas que ha sido mejor estudiada, es su capacidad de formar complejos con colesterol y perturbar así membranas biológicas, lo que estaría asociado a su actividad hemolítica (Augustin et al., 2011). Desde el año 1962, cuando se evidenció la formación de poros en la envoltura viral del RSV (Rous Sarcoma Virus) al ser tratados con saponinas, se han realizado diversos estudios de interacción entre saponinas y membranas biológicas. Estos estudios demostraron que dicha interacción depende de la presencia de colesterol en las membranas, del tipo de aglicona que compone la saponina, y del número y largo de la/s cadenas glicosídicas. Por lo tanto, debido a la gran cantidad de factores a tener en cuenta y a la variabilidad estructural de las saponinas, aún no se ha demostrado un mecanismo general de hemólisis (Francis et al., 2007). Tres modelos planteados al momento se muestran en la Fig. 3 (Augustin et al., 2011).

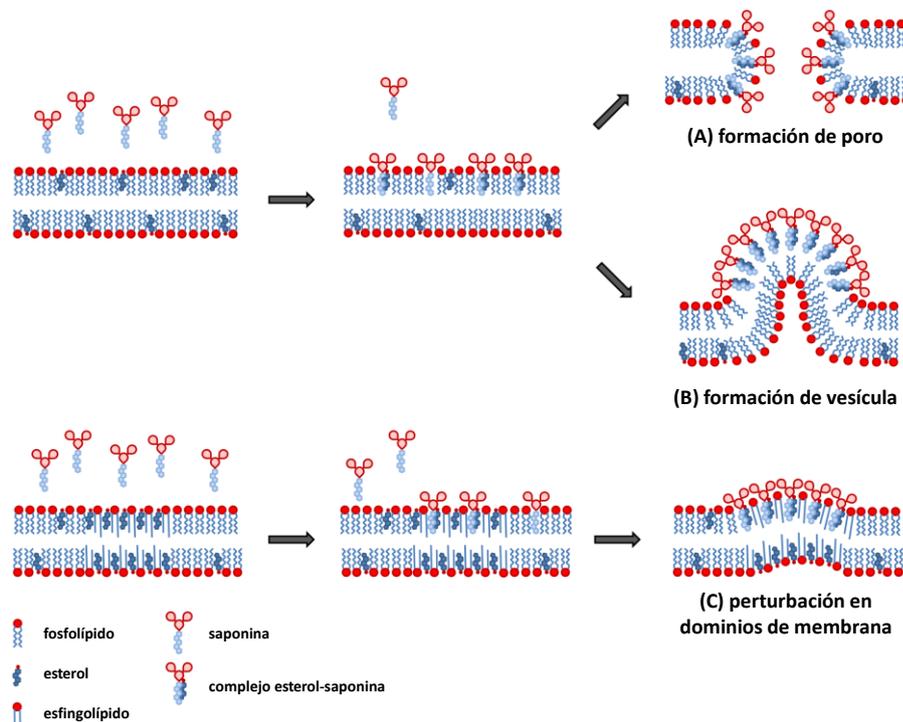


Figura 3.-Modelos de mecanismos de interacción saponina-membrana biológica. Las saponinas se introducen en la membrana a través de su región hidrofóbica (la aglicona). Luego forma complejos con los esterolos de membrana y a través de la interacción entre los azúcares, las saponinas se acumulan formando placas. La interferencia entre los residuos sacarídicos causa una curvatura en la membrana que lleva a la formación de un poro (A) o a la formación de vesículas que se desprenden de la membrana (B) causando así una extracción de colesterol. Otro modelo propone que las saponinas se integran a la membrana, difunden hasta balsas lipídicas interfiriendo con la funcionalidad de estos dominios y causan disrupción de la membrana.

Aislamiento y análisis

Las saponinas son compuestos polares, anfifílicos, de peso molecular relativamente elevado, que aparecen como mezclas heterogéneas en el vegetal, lo que hace que su aislamiento y elucidación estructural sean en general muy complejos. Es por eso, también, que el estudio de la química y las propiedades biológicas de estos compuestos han tenido un mayor desarrollo recientemente, junto con la evolución de las técnicas cromatográficas y espectroscópicas (Schenkel et al., 2000).

Aislamiento

Los métodos tradicionales de purificación de saponinas tales como cromatografía en columna y partición con solventes orgánicos, no alcanzan en general para obtener saponinas puras. El aislamiento de saponinas requiere de una o más técnicas cromatográficas para separarlas de otros compuestos polares que puedan obtenerse en extractos acuosos o alcohólicos. Un protocolo de purificación estándar (Majinda, 2012) es el siguiente: el extracto se somete a extracción lipídica con éter de petróleo y luego es macerado con MeOH a temperatura ambiente. Luego se evapora el MeOH a presión reducida y se realizan combinaciones de sucesivas particiones con hexano, acetato de etilo o butanol. Las fracciones acuosas y butanólicas son las que poseen mayor cantidad de saponinas. Luego se utilizan columnas Diaion HP-20 y se lava con H₂O-MeOH y finalmente con acetona. Las fracciones que tienen el mismo patrón se juntan para otra separación en columna de sílica gel con CHCl₃:MeOH:H₂O. Finalmente las saponinas se suelen separar por HPLC en columna de fase reversa usando MeOH:H₂O como fase móvil. Las saponinas se detectan por TLC revelando con ácido sulfúrico en etanol. Excepto algunos casos particulares, las saponinas no poseen grupos cromóforos por lo que la detección UV-vis no es una técnica ideal (Hostettmann et al., 1995; Schenkel et al., 2000; Bankefors, 2006; Francis et al., 2007).

Otros métodos de purificación incluyen formación de complejos con colesterol, diálisis, cromatografía de intercambio iónico o extracción selectiva cuando se trata de saponinas ácidas (Schenkel et al., 2000)

Elucidación

Para elucidar la estructura de una saponina determinada se debe resolver: la estructura de la aglicona, la composición y secuencia de los monosacáridos en la/las cadenas

oligosacarídicas, la unión de estos monosacáridos entre sí, la configuración de cada enlace glicosídico y la posición de la/las cadenas oligosacarídicas en la aglicona (Hostettmann et al., 1995). Para un análisis estructural completo se deben utilizar espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear, incluyendo sus respectivas técnicas bidimensionales. Para la espectrometría de masas se requieren métodos especiales si se analizan saponinas que poseen cadenas oligosacarídicas grandes, ya que la volatilización presenta dificultades con los métodos de ionización comúnmente usados para pequeños metabolitos secundarios (Schenkel et al., 2000).

Quillaja spp.

Las saponinas producidas por la especie del género *Quillaja* se encuentran entre las más estudiadas y las de mayor uso industrial. Este género fue originalmente incluido en la familia Rosaceae pero actualmente, tras análisis filogenéticos del gen *rbcL*, es incluido en una nueva familia, Quillajaceae, dentro del orden Fabales (Bello et al., 2007; Fleck, 2007).

La especie más estudiada de este género es *Quillaja saponaria*, un árbol autóctono de las regiones central y sur de Chile. La presencia de saponinas en la corteza de estos árboles se conoce desde mucho tiempo atrás, estando reportado que los Mapuches preparaban un extracto con la de corteza del Quillaja en agua hirviendo y lo dejaban reposar toda la noche para luego usarlo para lavar sus ropas (San Martín et al., 1999). De hecho, la palabra *Quillay* (nombre común con el que se conoce a este árbol en Chile) deriva de “*quillean*”, término mapuche que significa lavar. Hoy en día bosques vírgenes son encontrados únicamente en áreas inaccesibles, particularmente en la región

andina, debido a la explotación forestal para la obtención de saponinas de uso industrial (Copaja et al., 2003).

Con motivo de establecer métodos para el control de calidad de extractos vegetales comerciales, se han desarrollado protocolos de cuantificación de saponinas utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En particular, para el caso de saponinas de *Quillaja sp*, se ha propuesto un protocolo de cuantificación de saponinas mediante HPLC utilizando una columna de fase reversa C4 y un gradiente de MeCN en H₂O en presencia de ácido trifluoroacético, y utilizando la absorbancia a 220nm como método de detección (San Martín et al., 2000).

Se ha demostrado que ejemplares de *Quillaja saponaria* que se encuentran en suelos pobres, con sequías en verano y heladas en invierno, producen más saponinas que aquellos ejemplares situados en zonas más favorables para el crecimiento vegetal (Copaja et al., 2003). Esto sugiere que la síntesis de saponinas de esta especie es estimulada en respuesta a estrés, lo que sugiere también que estos compuestos estarían involucrados en la adaptación de las plantas a sobrevivir en suelos pobres y condiciones climatológicas adversas (Copaja et al., 2003; Szakiel et al., 2010).

En la literatura se encuentran diversos reportes de análisis estructural de saponinas de *Q. saponaria* utilizando resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. En cuanto al análisis por espectrometría de masas, se han reportado técnicas como FAB-MS (Soltysik et al., 1995; Nyberg et al., 2000; Kauffmann et al., 2004) y en trabajos más recientes se reportan técnicas de HPLC-MSⁿ utilizando un electrospray como fuente de ionización (Broberg et al., 2004; Bankefors, 2006; Wang et al., 2008; Bankefors et al., 2010). Para el análisis de masas de saponinas del presente trabajo, se utilizó un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Existen solo algunos reportes en los que se

analizan saponinas con esta clase de equipos, en particular solo un grupo de trabajo ha reportado análisis de masas de saponinas de Quillaja por MALDI-TOF (Guo et al., 1998; Nord et al., 1999)

San Martín y Briones (1997) resumen los usos industriales de las saponinas de Quillaja reportados hasta el momento. El uso de saponinas de Quillaja en la industria cosmética es tradicional, ya que los indígenas chilenos las utilizaban para el lavado del cabello. Hoy en día se producen extractos más puros y con reducidos componentes alergénicos con dicha función y para la formulación de cremas cosméticas, pero los componentes principales siguen siendo las saponinas. Son también utilizadas en la industria de alimentos como agente espumante en bebidas alcohólicas como la cerveza, como agente emulsionante en mayonesas, y gracias a su capacidad de complejarse con colesterol, las saponinas son utilizadas en el procesamiento de algunos alimentos formando complejos insolubles que son luego removidos por filtración, permitiendo así la obtención de alimentos con menor cantidad de colesterol. Por otra parte, extractos de Quillaja son utilizados como suplementos en ración del ganado, en agricultura se destaca su uso como biopesticidas en el control de nemátodos u hongos fitopatogénicos y su utilización como estimulante del crecimiento vegetal. Más allá de su extendido uso industrial, las saponinas de Quillaja como adyuvantes de vacunación presentan una notable actividad, lo que ha llevado al desarrollo de diversos productos y un extendido uso en productos inmunobiológicos de uso en medicina veterinaria (Rajput et al., 2007).

Adyuvantes

Con el fin de reducir los efectos adversos que presentan algunas vacunas, se han desarrollado nuevas generaciones de productos de composición más definida, por

ejemplo aquellas basadas en proteínas recombinantes purificadas, péptidos sintéticos o ADN plasmídico (Sun et al., 2009). Sin embargo, estos antígenos purificados poseen una menor inmunogenicidad en comparación con vacunas tradicionales, como aquellas formuladas con células completas o basadas en virus. Por lo tanto es hoy más necesaria la co-administración de antígenos con compuestos que aumenten o modulen su inmunogenicidad intrínseca, para así inducir una respuesta inmune más potente, persistente y específica. Esto también trae como beneficio, la reducción en el número de inyecciones y cantidad de antígeno necesarias para desarrollar inmunoprotección (Guy, 2007; Sun et al., 2009). Los adyuvantes fueron descritos por primera vez por Ramon en 1924 como “*sustancias usadas en combinación con un antígeno específico que producen una respuesta inmune más robusta que el antígeno solo*” (Ramon, 1924) y desde ese entonces se han desarrollado varios adyuvantes, incluyendo sales minerales, derivados de microorganismos, emulsiones, citoquinas, polisacáridos y adyuvantes basados en ácidos nucleicos. Sin embargo, la amplia mayoría no han sido aprobados para el uso en humanos, algunos por el elevado costo de elaboración, otros por poca efectividad o toxicidad local (Sun et al., 2009). Por eso es que solo los adyuvantes basados en sales de alúmina, estudiados por primera vez en 1926, son los que hoy en día siguen siendo los más utilizados en humanos.

Desde 1930 se sabe que *Quillaja saponaria* produce saponinas capaces de activar el sistema inmune, pero los extractos entonces disponibles eran mezclas muy complejas y heterogéneas, con marcadas diferencias entre lotes (Dalsgaard, 1974; Sun et al., 2009). En 1974 K. Dalsgaard desarrolló un método para la obtención de un extracto estándar de saponinas de la corteza de *Q. saponaria* mediante la utilización de una combinación de técnicas de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico. Dicho extracto es comercializado bajo el nombre de QuilA y ha sido utilizado desde entonces

como adyuvante de vacunas contra la fiebre aftosa en el ganado y en otras muchas vacunas de uso veterinario (Sun et al., 2009). En 1991 Kensil *et al* aislaron una serie de saponinas puras a partir de un extracto de corteza de *Q. saponaria* mediante cromatografía en fase reversa y de exclusión molecular, y evaluaron la actividad adyuvante de las mismas. Una de las saponinas aisladas por Kensil, denominada QS-21, forma parte de una nueva vacuna contra la malaria cuyos estudios de fase III acaban de terminar en enero 2011. Estos estudios concluyen que la vacuna provee protección contra la malaria en niños (Agnandji et al., 2011).

Antecedentes

En el Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados se trabaja en el desarrollo de nuevos adyuvantes de vacunación de origen vegetal y es por esta razón, que se ha comenzado a analizar saponinas de *Quillaja brasiliensis* como potenciales adyuvantes. *Quillaja brasiliensis* es una especie nativa del Uruguay y sur de Brasil, conocida vulgarmente como “palo jabón”, que ha comenzado a estudiarse recientemente. Al momento se ha demostrado la presencia de saponinas en extractos de hojas, conteniendo una prosapogenina formada por ácido glucurónico unido en posición C3 a ácido quillájico (Kauffmann et al., 2004). Mediante trabajos en conjunto con colegas de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul, se demostró la actividad adyuvante de extractos enriquecidos en saponinas al ser co-administrados con antígenos virales en modelos murinos, así como su menor toxicidad comparada con QuilA (Fleck et al., 2006; Silveira et al., 2011). Sin embargo, la estructura de las saponinas que se presentan en *Q. brasiliensis* no ha sido completamente elucidada.

Mediante un fraccionamiento por extracción en fase sólida se obtuvo una fracción enriquecida en saponinas para la cual, estudios preliminares demuestran la capacidad

de formar micelas tipo ISCOM, que serían capaces de disminuir posibles efectos tóxicos de las saponinas manteniendo la actividad adyuvante (Quirici, comunicación personal). Todos estos resultados alentaron, el desarrollo de mejores métodos de purificación y la caracterización estructural de las saponinas presentes en las hojas de *Q. brasiliensis*.

En el presente trabajo se propone obtener saponinas de *Quillaja brasiliensis* y caracterizarlas estructuralmente para contribuir a la comprensión de su actividad biológica y propiedades fisicoquímicas. Para ello se plantea optimizar métodos de extracción y purificación de saponinas a partir de las hojas del árbol, empleando sistemas cromatográficos en columna y capa fina, con distintas fases estacionarias y móviles. Se plantea también realizar la caracterización estructural parcial de las saponinas obtenidas empleando espectrometría de masas MALDI-TOF y sistemas cromatográficos de carácter analítico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron hojas de ejemplares de *Quillaja brasiliensis* Molina (A.St.-Hil. & Tul.) Mart. en el Parque Batlle, Montevideo, Uruguay. Las hojas se secaron en estufa a temperatura controlada (30–40 °C).

Extracción y Purificación de saponinas

Se cortaron las hojas secas en pequeños trozos de un tamaño promedio de 5x5mm y las saponinas se extrajeron con agua por maceración (10:1 volumen H₂O:peso seco de hoja) a temperatura ambiente y con agitación suave durante 4 h. El extracto obtenido, denominado EXT, se filtró por tela y conservó en cámara fría (4°C) hasta su posterior procesamiento. El EXT se procesó de dos maneras diferentes denominadas *Sistema I* y *Sistema II*.

Sistema I

El EXT se liofilizó, se retomó en agua destilada y se fraccionó utilizando un sistema de extracción en fase sólida con 6 columnas Strata® C-18 (Phenomenex, Inc.) dispuestas en paralelo en un sistema de vacío. Se sembró el equivalente a 100 mg de EXT seco por columna y la elución se realizó con un gradiente escalonado de MeOH (0 a 100%) en H₂O. El MeOH de cada fracción fue destilado a presión reducida (P=200 mbar, T=40 °C) y el agua remanente se eliminó por liofilización. Las fracciones secas se reservaron para su posterior análisis.

Sistema II (escalado)

El EXT acuoso de saponinas se centrifugó a 5000 rpm durante 30min, se descartó el precipitado y el sobrenadante se conservó en cámara fría a -20 °C hasta su procesamiento. El volumen de sobrenadante obtenido (1350 mL) se concentró empleando un sistema de filtración tangencial, con un filtro Pellicon XL (Millipore) de corte de 10 kDa hasta un volumen final de 350 mL de extracto enriquecido en saponinas, y se liofilizó quedando el extracto seco, denominado EXTc (6,13 g).

El EXTc (2 g) se fraccionó mediante cromatografía líquida de media presión (MPLC), en una columna de fase reversa C18 (26 x 230 mm), se eluyó con un gradiente escalonado MeOH:H₂O (0-100%) y las fracciones colectadas se conservaron a -20 °C. El MeOH se destiló a presión reducida (P=200 mbar, T=40 °C) y se liofilizó el H₂O remanente para obtener fracciones secas de saponinas.

Análisis de las fracciones obtenidas

Para el análisis de las fracciones obtenidas se emplearon métodos cromatográficos, espectroscópicos, espectrométricos y fisicoquímicos. Se utilizaron diferentes sistemas de cromatografía líquida de alta presión, empleando columnas de fase reversa y fase normal, y diferentes sistemas de elución.

Detección de saponinas por cromatografía en capa fina (TLC)

Se utilizaron placas de sílica gel (ALUGRAM, MACHEREY-NAGEL) con dos fases móviles diferentes según el objetivo del análisis. Para TLC analítica se utilizó como fase móvil la fase orgánica de la mezcla BuOH:H₂O:HAc (50:40:10)

Las placas de TLC se revelaron utilizando:

- a) p-anisaldehído:H₂SO₄:EtOH:AcOH (1:10:170:20) (como revelador de triterpenos y esteroides)
- b) FeCl₃ al 0,5% en H₂O (como revelador de compuestos fenólicos y taninos)
- c) H₂O (como revelador de tensoactivos, en particular, saponinas)

Actividad hemolítica

Para el ensayo se emplearon glóbulos rojos (RBC) de conejo y el ensayo de hemólisis se realizó en placa de 96 pocillos. La suspensión de RBC (al 1%, 180 µL) se incubó junto con las muestras a ensayar (20 µL) durante 30min a 37°C. La placa se centrifugó a 2500 rpm a 15 °C durante 5 min y se midió la absorbancia a 560 nm de los sobrenadantes (correspondiente a la hemoglobina liberada de los RBC lisados). Se utilizó suero fisiológico como control negativo y una muestra de 200 µg/mL de saponinas QP1000 (Natural Response, Chile) dializada como control de 100% hemólisis. El ensayo se realizó por triplicado para todas las muestras, y se graficó el promedio con la desviación estándar. Se determinó la concentración hemolítica al 50% (CH₅₀) mediante un ajuste sigmoideo utilizando el software SIGMAPLOT (Systat Software).

Absortividad UV

Se realizaron espectros UV de las fracciones disueltas en H₂O (50 µg/mL) empleando un espectrofotómetro (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech).

Perfiles cromatográficos de las fracciones

El análisis por HPLC se realizó en base a reportes previos. Se utilizó un cromatógrafo HP1200 series (Hewlett Packard) y una columna de fase reversa (LiChrospher® 100 RP-18 5µ).

Se utilizaron dos sistemas isocráticos de elución con la columna C18. En el primero se utilizó un buffer acetato de amonio 30 mM pH 6,4 o buffer fosfato de sodio 30 mM pH 6,6 y MeCN, mientras que en el segundo se utilizó un buffer fosfato de sodio 30mM pH 2,8 o pH 2,7 y MeCN. Se evaluaron diferentes proporciones buffer:MeCN como fase móvil para obtener una mejor separación. El monitoreo de la cromatografía en todos los casos fue realizado con un detector UV a 214 nm (acoplado a un detector IR). Un estándar de saponinas comerciales (QuilA, Biopharmaceuticals Inc) fue utilizado para comparar tiempos de retención. Se colectaron los picos de interés, correspondientes con saponinas, y se llevaron a sequedad para su posterior confirmación por TLC y MS.

Análisis por espectrometría de masas

Estos análisis fueron realizados con un espectrómetro de masas MALDI-TOF (Microflex, Bruker, USA). Las fracciones separadas por HPLC se retomaron en 200 µL de MeOH, y se mezclaron directamente con una solución de DHB en MeCN, que fue empleado como matriz. La adquisición y procesamiento de datos fue realizado utilizando procedimientos estándar, y el software FlexAnalysis (Bruker Daltoniks)

Análisis de azúcares

Los monosacáridos totales presentes en las muestras evaluadas (1-2 mg de cada muestra) se obtuvieron a partir de la hidrólisis ácida total con ácido trifluoroacético 2 M (0,1 mL) a 120 °C durante 60 min. Luego se fraccionó el producto de hidrólisis en 2 partes para los análisis por TLC y GC respectivamente. En ambos casos se utilizaron estándares de monosacáridos que están presentes en saponinas de *Quillaja saponaria* (Broberg et al., 2004).

Análisis de los monosacáridos obtenidos por TLC. Las muestras se sembraron en placa de TLC y la elución se realizó con la fase móvil MeOH:CHCl₃:Acetona:NH₄OH (42:17:25:17) y se revelaron los monosacáridos con Difenilamina:Anilina:H₃PO₄:Acetona.

Análisis por GC. Las muestras se llevaron a sequedad y se derivatizaron para su análisis por GC. Se agregó NH₄OH 1M (0,1mL) y los productos se redujeron con NaBH₄ (1mL, 2% en DMSO) a 40°C durante 90min. Luego de la reducción se agregó ácido acético para destruir el NaBH₄ en exceso y los alditoles producidos se acetilaron con N-metilimidazol y anhídrido acético, y se analizaron por cromatografía gaseosa (HP 6890 Series Plus+, Hewlett-Packard) y por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (cromatógrafo HP 5890 Series II Hewlett-Packard, detector de masas HP 5971 Series Hewlett-Packard) empleando en ambos casos una columna capilar HP-5 y programas de elución estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA 1

Extracción y purificación

La presencia de saponinas en el extracto acuoso de hojas de *Quillaja brasiliensis* es evidenciada por la formación de espuma durante el agitado suave. El extracto se filtró y liofilizó, y el rendimiento obtenido fue de un 20% (masa de EXT/masa hojas secas).

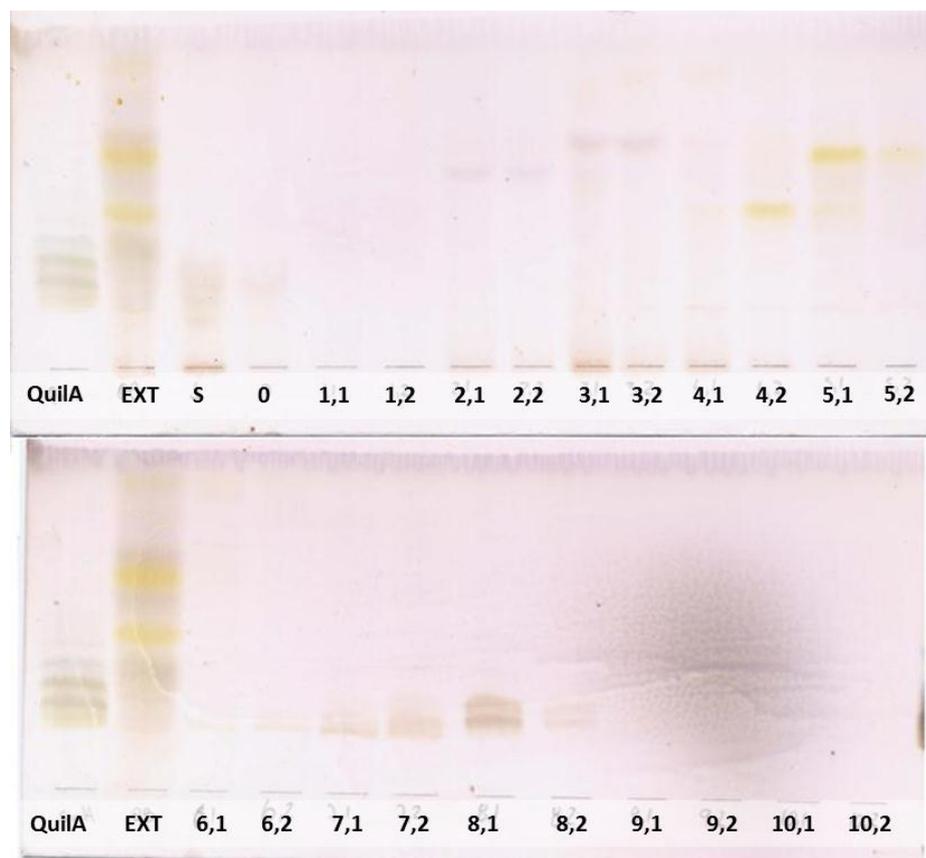


Figura 4.-Fraccionamiento con SPE. Capa fina revelada con anisaldehído-ácido sulfúrico, de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso de saponinas por extracción en fase sólida con columna C18 y utilizando un gradiente escalonado de 0 a 100% de MeOH en H₂O. **QuilA** estándar de saponinas comerciales, **EXT** extracto entero de saponinas, las siguientes bandas corresponden a las sucesivas fracciones obtenidas.

Del primer paso de separación realizado por extracción en fase sólida se obtuvieron 10 fracciones (denominadas 1,1; 1,2; 2,1; 2,2;... 10,2) que fueron analizadas por cromatografía en capa fina. En la Fig. 4 se muestra su análisis por TLC. En la TLC se sembró también el estándar comercial de saponinas de *Q. saponaria*, QuilA, como referencia. El revelador de anisaldehído-ácido sulfúrico es un revelador universal para productos naturales que produce diferentes colores según el compuesto con el que reacciona. El revelado es promovido por calor y los colores obtenidos dependen fuertemente de la temperatura lograda (Jork et al., 1990). Durante el revelado, inicialmente las saponinas triterpénicas de QuilA se revelan de color azul-violeta-morado y se observan varias bandas, lo que denota el alto grado de heterogeneidad de este producto comercial. El extracto (EXT) presenta compuestos con diferentes propiedades cromatográficas; hay componentes muy polares que se retienen en la sílica y permanecen en la línea de siembra mientras que otros poseen mayor afinidad por la fase móvil y por tanto presentan factores de retención (Rf) mayores. En la región de Rf's en las que migran las saponinas de QuilA, el EXT presenta una serie de bandas poco definidas pero demuestra la presencia de saponinas con alta concentración relativa en el extracto acuoso de hojas. También aparecen presentes pigmentos de color amarillo visibles luego de la corrida y cuyo color se intensifica durante el revelado, probablemente se trate de compuestos fenólicos. Las siguientes bandas corresponden con las fracciones obtenidas a partir de la purificación con SPE. Las fracciones que eluyen con menor proporción de MeOH presentan compuestos que tienen un Rf muy diferente al del estándar y revelan con colores violetas y amarillos. Las fracciones que eluyen de la columna de extracción con 60, 70 y 80% de MeOH (6,1; 6,2; 7,1; 7,2; 8,1 y 8,2), presentan las bandas de saponinas observadas en el extracto. Una observación a destacar es que el Rf de las saponinas es menor al de los compuestos que eluyen con

menor proporción de MeOH de las columnas de SPE-C18. Esto es particularmente interesante porque demuestra la anfipatía de estos compuestos, que se retienen con mayor afinidad en la matriz de fase reversa de las columnas, pero también se retienen en la matriz polar de la capa fina.

Posteriormente se emplearon diferentes métodos de fraccionamiento en pequeña escala, con los cuales se obtuvieron distintas fracciones que contienen saponinas. En particular, algunas de ellas presentan un patrón de migración y revelado por TLC, equivalente al de las fracciones 7,1 - 8,2 (obtenidas por el método de fraccionamiento descrito anteriormente). Por lo tanto, de aquí en más, todas las fracciones que presentan un patrón similar al de las fracciones 7,1 y 7,2 serán denominadas Fracción A (FA) y se estudiarán en forma conjunta, y análogamente, aquellas similares a 8,1 y 8,2 se denominarán Fracción B (FB) y también serán estudiadas en forma conjunta. En las siguientes figuras (Figs. 5 y 6) se muestra el perfil cromatográfico de capa fina de distintas fracciones obtenidas por diferentes métodos de fraccionamiento, realizado en las mismas condiciones cromatográficas que la capa fina anteriormente presentada (los detalles del fraccionamiento se comentan brevemente en sus correspondientes leyendas).

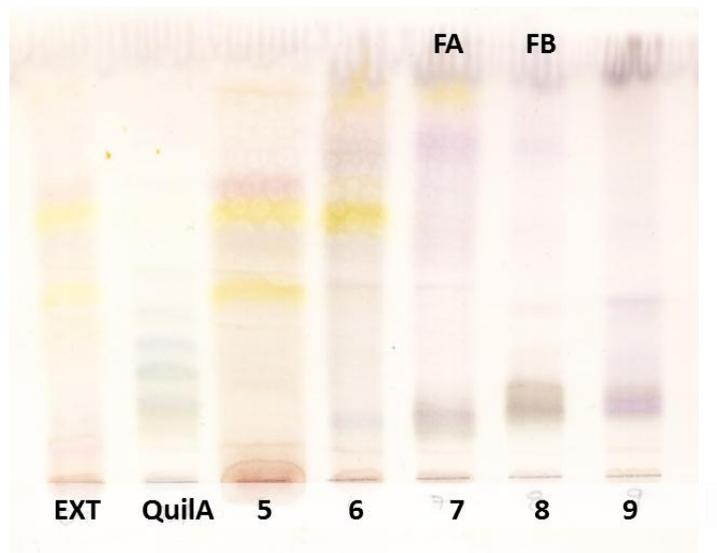


Figura 5.-Fraccionamiento por SPE. Capa fina revelada con anisaldehído-ácido sulfúrico, de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso de saponinas por extracción en fase sólida con columna C18 y utilizando un gradiente escalonado de 50 a 100% de MeOH en H₂O. **EXT** extracto entero de saponinas, **QuilA** estándar de saponinas comerciales, las siguientes bandas corresponden a las sucesivas fracciones obtenidas. En la parte superior de la figura se identifica con el patrón característico de FA o FB según corresponde.

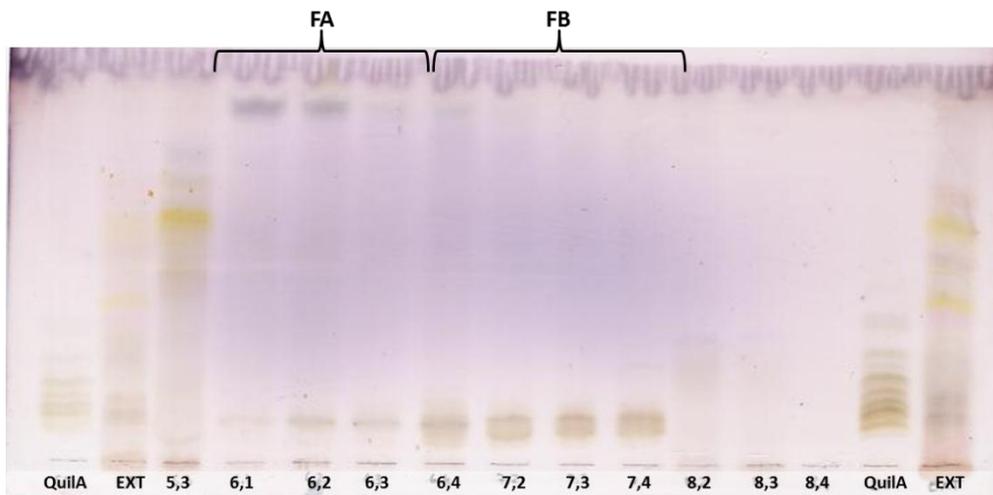


Figura 6.-Fraccionamiento por columna abierta de fase reversa. Capa fina revelada con anisaldehído-ácido sulfúrico, de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso de saponinas por cromatografía líquida con columna abierta de fase reversa C18 y utilizando un gradiente escalonado de 0 a 100% de MeOH en H₂O. **EXT** extracto entero de saponinas, **QuilA** estándar de saponinas comerciales, las siguientes bandas corresponden a las sucesivas fracciones obtenidas. En la parte superior de la figura se identifica con el patrón característico de FA o FB según corresponde.

Para obtener más información química sobre los compuestos que constituyen FA y FB se utilizaron distintos agentes reveladores. En la Fig 7 se muestra el revelado de tres placas de TLC realizadas en las mismas condiciones, con la misma fase móvil, la misma duración de la corrida y en forma simultánea, pero empleando diferentes agentes reveladores. En este ensayo se sembró una referencia de QuilA, el extracto entero y las fracciones FA y FB. En Fig. 7a se muestra el revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico en el que se aprecian los diferentes colores para diferentes bandas, lo que indica distinta naturaleza química de los compuestos presentes, y en Fig. 7b se muestra el resultado luego de un calentamiento a mayor temperatura, en la que todos los compuestos revelan en un color similar (se pierde la diferenciación por colores), pero se aumenta la sensibilidad de la detección. La mayoría de los compuestos revelan marrón, pero se pueden visualizar compuestos minoritarios presentes en las muestras. El revelado con FeCl_3 (Fig. 7c) demostró que los compuestos que se observan de color amarillo con anisaldehído se tratan de compuestos tipo fenólicos, ya que dan la coloración típica de estos compuestos con este revelador. Por último, se utilizó agua como revelador para mostrar que las bandas que hasta ahora se consideraron como saponinas son efectivamente compuestos tensoactivos capaces de disminuir la tensión superficial en la zona de la capa fina en la que se encuentran y promover la rápida “humectación” en dicha zona, distinguiéndose a simple vista del resto de la placa (Fig. 7d).

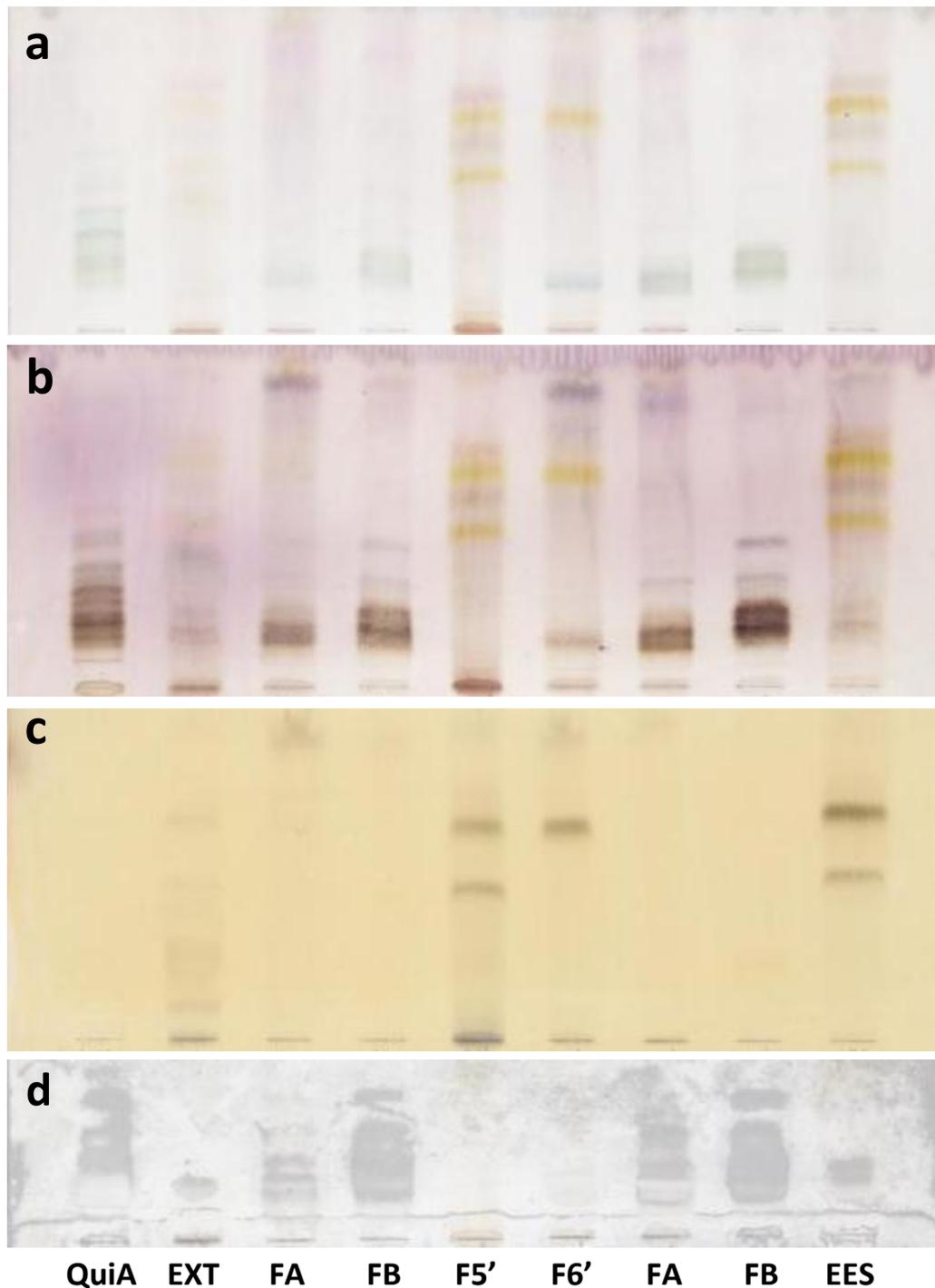


Figura 7.-Utilización de distintos reveladores para la caracterización de fracciones de saponinas. En los distintos paneles se observan distintas capas finas desarrolladas como se indica en el texto. En los carriles se sembró un estándar de QuilA (QuilA), el extracto entero (EXT) y distintas las fracciones de saponinas obtenidas por distintos métodos de fraccionamiento, entre las que se incluyen FA y FB. En cada panel se muestra el revelado con distintas técnicas. **a.** Anisaldehído:H₂SO₄. **b.** Anisaldehído:H₂SO₄ (quemada). **c.** FeCl₃. **d.** H₂O.

Análisis

Una vez demostrada la presencia de saponinas en las fracciones FA y FB se realizaron ensayos de espectroscopía UV, hemólisis y análisis por HPLC.

Espectros UV

Como forma de evaluar la presencia de contaminantes coloreados en las fracciones (como flavonoides) se realizaron espectros de absorción UV de las fracciones y del extracto entero en iguales concentraciones (Fig. 8). La relación Abs_{280}/Abs_{210} se utilizó como indicativo de pureza, ya que mientras la Abs_{280} puede en principio considerarse debida a la presencia de compuestos aromáticos, la Abs_{210} es una medida inespecífica que prácticamente todos los compuestos con heteroátomos son capaces de absorber luz a dicha longitud de onda.

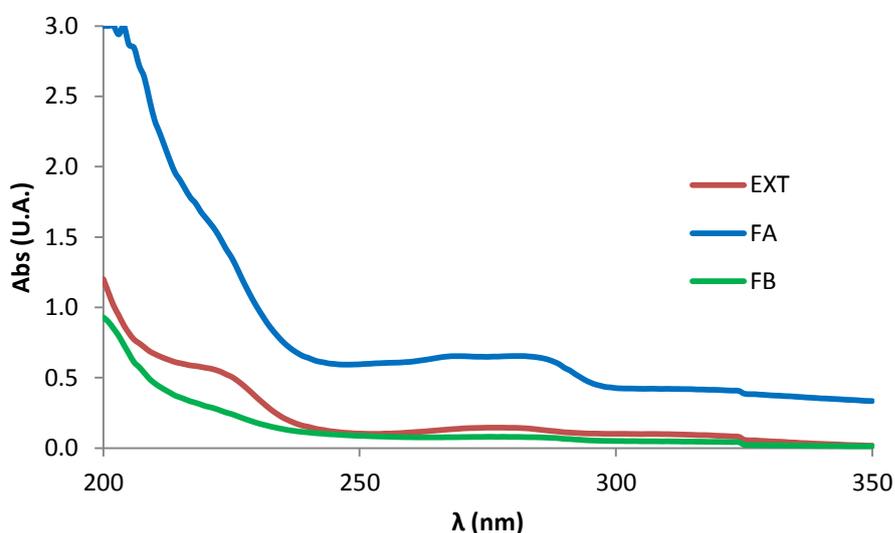


Figura 8.-Espectros de absorción de EXT, FA y FB. Se realizaron los espectros de las muestras en solución acuosa en concentración $50 \mu\text{g}/\text{mL}$. Los índices Abs_{280}/Abs_{210} para cada muestra son 0,215; 0,281 y 0,171 para EXT, FA y FB respectivamente

Los índices calculados demuestran que la fracción FB tiene menor cantidad de compuestos aromáticos que el extracto original y que la fracción FA.

Hemólisis

Se sabe que las saponinas triterpénicas, en particular las del género *Quillaja*, son altamente hemolíticas, por lo que los índices de actividad hemolítica se utilizan como una medida del grado de pureza de las preparaciones conteniendo saponinas. A los efectos de estimar el grado de pureza de las fracciones obtenidas se determinaron las concentraciones hemolíticas al 50% (CH₅₀) detectando hemoglobina liberada luego de una incubación de 30 min a 37 °C con distintas concentraciones de las muestras. A partir de los datos obtenidos se construyeron las curvas de hemólisis para las distintas muestras ensayadas y se determinó CH₅₀ utilizando una interpolación sigmoidea (Fig. 9).

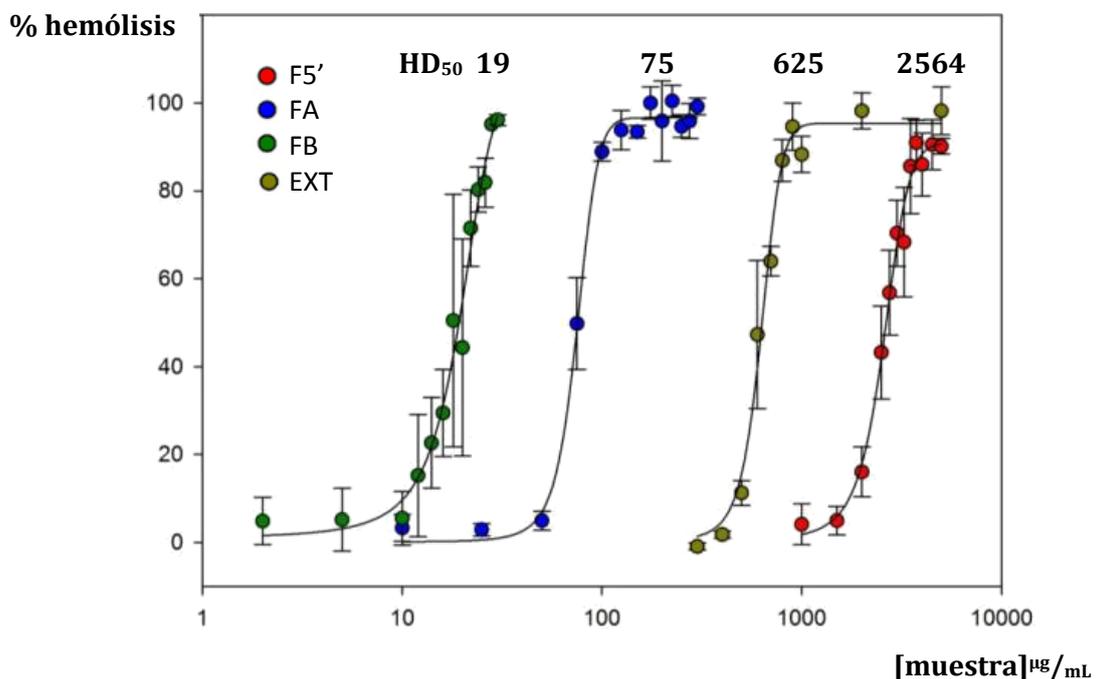


Figura 9.-Curvas de hemólisis para las muestras EXT, FA, FB y F5' . (Además se muestra la curva de hemólisis para la fracción F5' para la que no se detectaron saponinas por TLC). En todos los casos se calculó el porcentaje de hemólisis en relación a una muestra de 200 µg/mL de QP1000 que se considera como 100%. Los valores de HD₅₀ se obtuvieron a partir de un ajuste sigmoideo (SIGMAPLOT) y se muestran sobre cada curva.

La FA y FB muestran valores de HD_{50} mucho menores que el EXT mientras que el HD_{50} para la F5' es mayor que la del EXT. Los valores obtenidos confirman que las fracciones FA y FB están enriquecidas en las saponinas del extracto. En este punto, es significativo que algunas fracciones presentan mayor poder hemolítico y otras menor que el extracto original. En particular, FB es más hemolítica que FA lo que indica la presencia de una mayor proporción de saponinas en FB. En todos los casos se tomó como 100% de hemólisis, la causada por QP1000 a una concentración de $200 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Análisis por HPLC

En la literatura se describen diversos sistemas cromatográficos para análisis de saponinas tanto para control de calidad de productos comerciales como para aislamiento de saponinas de extractos vegetales. La mayor cantidad de reportes utilizan como soporte, fases estacionarias tipo reversa. En nuestro caso, ensayamos dos sistemas de cromatografía líquida diferentes basándonos en reportes previos (Nord et al., 1999). Se analizó por HPLC empleando una columna de fase reversa C18.

Primeramente se optimizó la fase móvil. Se utilizó un buffer NH_4OAc pH 6,4 30mM y MeCN en diferentes proporciones. En la Fig. 10 se muestran los cromatogramas correspondientes a la FB obtenidos con distintas proporciones de buffer y solvente orgánico. La resolución óptima para la separación de los componentes más abundantes de la mezcla, observados por TLC y que presentan R_f donde aparecen saponinas, se obtuvieron empleando una concentración de MeCN de entre 25% y 30% (v/v)

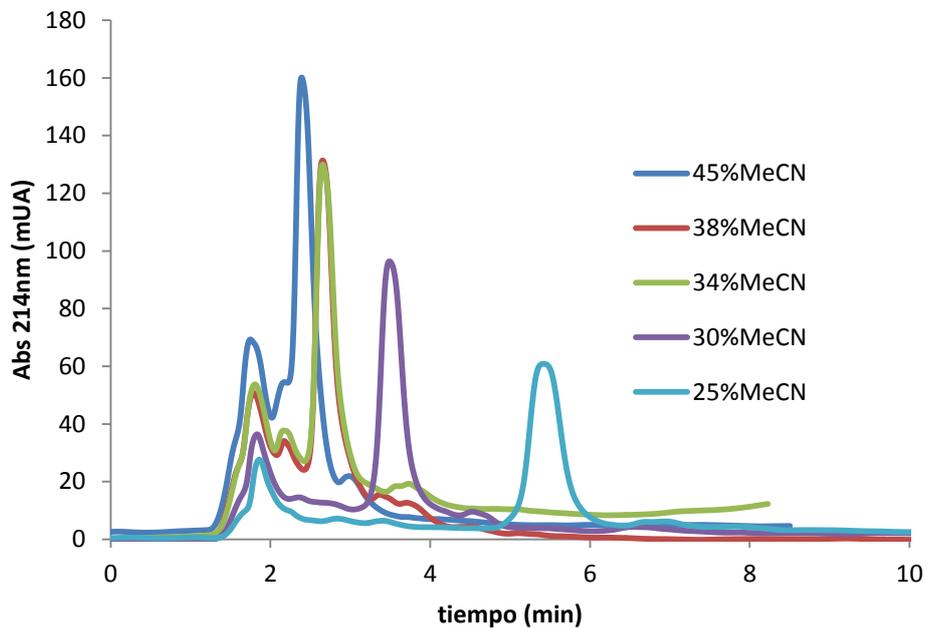


Figura 10.-Optimización de Fase móvil. Se muestran los cromatogramas de HPLC con una columna C18, empleando como fase móvil MeCN en distintas proporciones en buffer NH_4OAc 0,03M pH 6.4.

Una vez optimizadas las condiciones cromatográficas para la separación de los componentes de la mezcla se empleó dicho sistema para analizar las fracciones obtenidas de la purificación por SPE. En la Fig. 11 se representan los cromatogramas de todas las fracciones que contienen saponinas y del EXT obtenidas en las mismas condiciones cromatográficas. Una vez seleccionada la fase móvil, las muestras secas se diluyeron en la FM previo a su análisis por HPLC. El EXT posee una gran cantidad de compuestos con pequeños tiempos de elución, lo que era de esperar ya que se trata de un extracto acuoso analizado empleando una fase reversa. El compuesto(s) que eluye con tiempo de retención (t_R) cercano a los 8 min se colectó a la salida del detector y fue analizado por TLC (datos no mostrados) resultando en una banda con iguales características de R_f y color de revelado que las saponinas previamente detectadas, por lo que se identificó esta fracción como una mezcla saponinas. Las fracciones FA y FB

parecen estar enriquecidas en saponinas, en particular la FA que presenta además otro componente de mayor t_R que puede corresponder con los compuestos coloreados menos polares detectados por TLC, ya que se retienen más que las saponinas en la fase reversa. Las fracciones de HPLC donde se encontraron saponinas se colectaron para un posterior análisis con otra fase móvil (datos no mostrados).

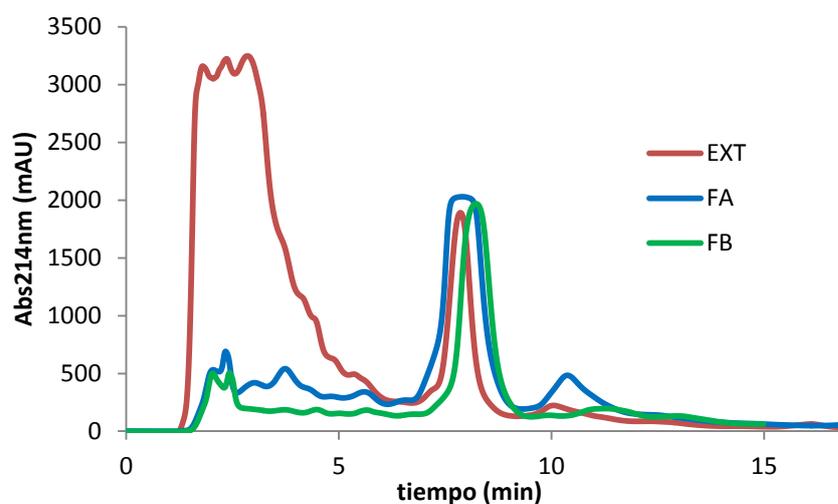


Figura 11.-Análisis por HPLC de las fracciones FA y FB. Se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC en fase reversa C18, utilizando una fase móvil isocrática de 25% MeCN en buffer NH₄OAc 30mM pH6,4.

Análisis de azúcares

Para profundizar en la caracterización de las saponinas se realizó una hidrólisis ácida de la FB para liberar los monosacáridos y proceder a su identificación. Como análisis preliminar se realizó un análisis por TLC para azúcares, incluyendo en la placa patrones de monosacáridos de *Q. saponaria* previamente reportados (Broberg et al., 2004) (Fig. 12)

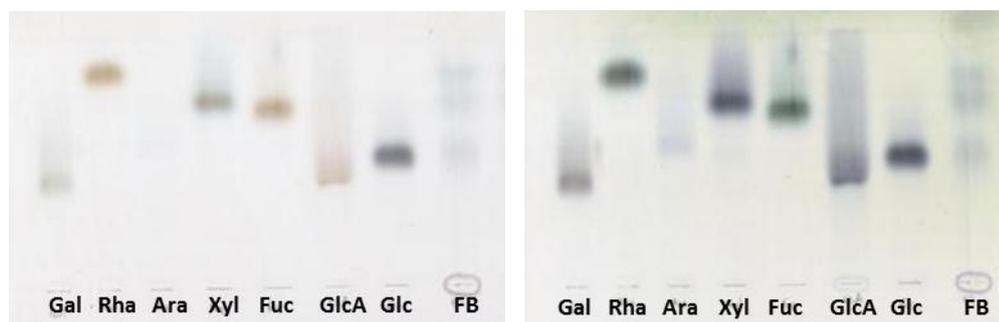


Figura 12.-Análisis de azúcares totales en FB. Análisis por TLC de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis de la fracción FB. Se sembraron también los estándares de azúcares **Gal**: galactosa, **Rha**: ramnosa, **Ara**: arabinosa, **Xyl**: xilosa, **Fuc**: fucosa, **GlcA**: ácido glucurónico y **Glc**: glucosa.

En el análisis preliminar por capa fina se detectó una banda con el mismo R_f que el de Glc y una serie de bandas con R_f similares a pentosas/desoxihexosas. Estos datos, si bien no son concluyentes, se tuvieron como indicativos para el posterior análisis por GC de los correspondientes acetatos de alditol.

Los acetatos de alditol derivados de los azúcares neutros obtenidos a partir de la hidrólisis de la FB fueron analizados por GC y GC-MS. Se utilizaron estándares de referencia externos de Rha, Ara, Xyl, Fuc, Gal y Glc para comparar los t_R (Fig. 13).

Por otra parte se realizó un análisis de GC-MS para confirmar que los picos observados en el análisis por GC-FID eran efectivamente acetatos de alditol. Para ello se analizó el espectro de masas para cada pico y se estudió el patrón de fragmentación. El espectro de masas obtenido para las hexosas se muestra como ejemplo en la Fig. 14. A partir de estos datos (t_R y espectros de masas) se demostró la presencia de Xyl, Rha, Fuc, Gal y Glc en el hidrolizado de FB.

La proporción relativa de azúcares en la FB fue determinada a partir de las áreas de los picos identificados obteniéndose una relación 1,4:1:2,4:1,6:1,1 (Rha:Fuc:Xyl:Glc:Gal, respectivamente). Los resultados de las proporciones relativas de los distintos

monosacáridos en la fracción FB no corresponde a relaciones estequiométricas enteras ya que dicha fracción consiste en una mezcla de varias saponinas.

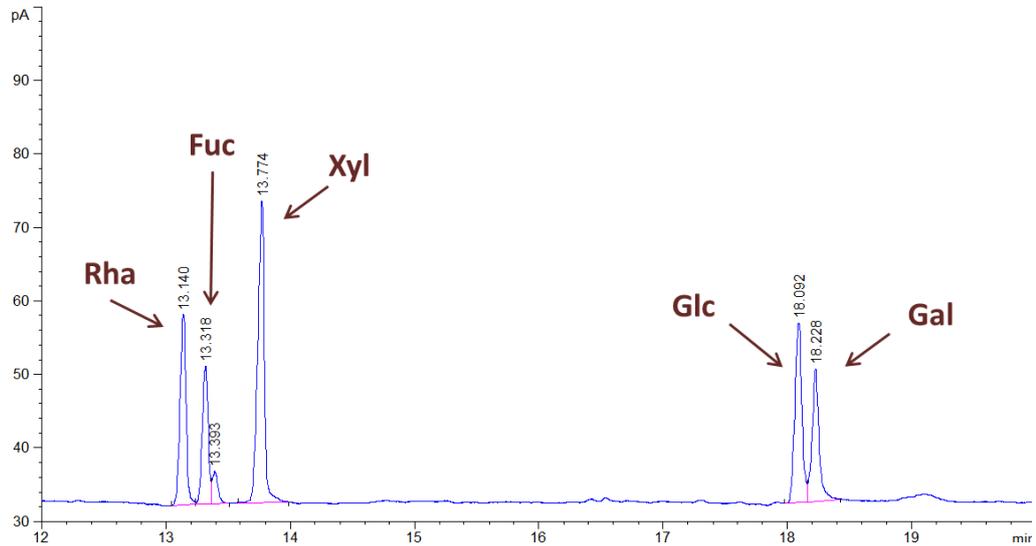


Figura 13.-Análisis de azúcares por GC-FID. Cromatograma GC-FID de los acetatos de alditol de los monosacáridos liberados por hidrólisis de FB. Los acetatos de alditol fueron identificados por comparación de los t_R de los mismos derivados obtenidos a partir de monosacáridos patrón.

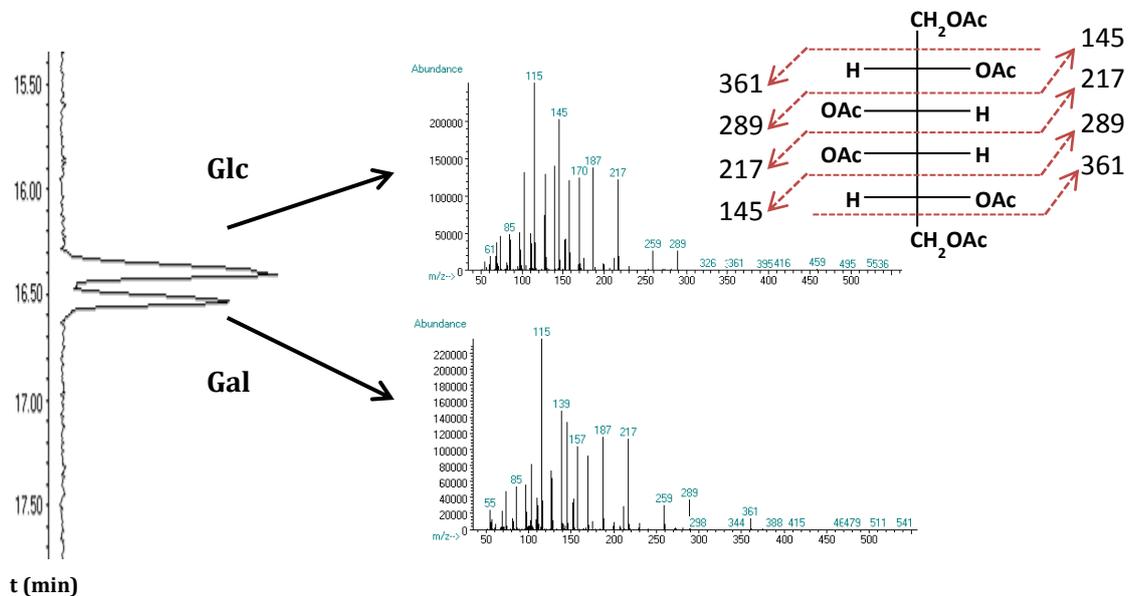


Figura 14.-Análisis de azúcares por GC-MS. Cromatograma obtenido por GC-MS de los acetatos de alditol derivados de FB. Se muestra la zona correspondiente a los derivados de hexosas (glucosa y galactosa) y los espectros de masa correspondientes a cada pico. Se detectan los iones característicos para acetatos de alditol y se muestran posibles fragmentaciones que explican los iones detectados.

Análisis de la fracción FB por espectrometría MALDI-TOF

La fracción FB fue analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF y su espectro de masas se muestra en la Fig. 15. La ionización por MALDI es una ionización suave que produce fundamentalmente los iones pseudomoleculares de los compuestos analizados. Por ello se puede concluir que la fracción FB está fundamentalmente constituida por tres componentes principales de m/z 1649,721, 1811,755 y 2016,869.

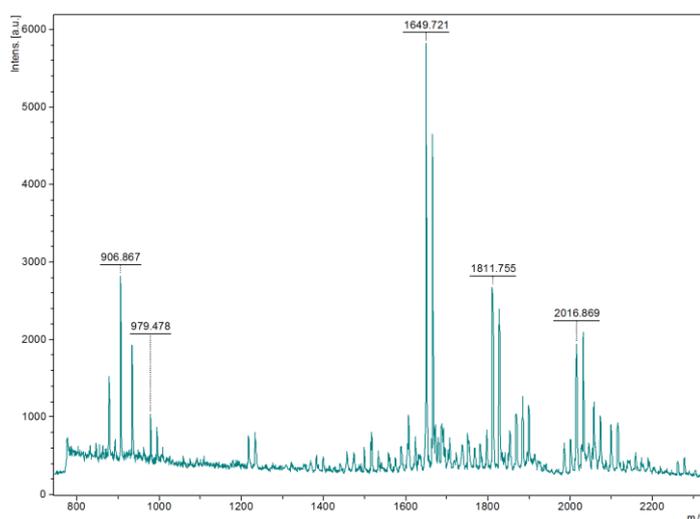


Figura 15.- Análisis de masas de FB. Espectro de masas de la FB obtenido por MALDI-TOF utilizando DHB como matriz. Se observan tres iones mayoritarios de m/z comparable con saponinas.

En paralelo a este trabajo se realizaron otros estudios por el grupo de trabajo del Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados que demostraron la capacidad adyuvante de la fracción FB (Silveira, comunicación personal) y la capacidad de formar micelas nanoestructuradas tipo ISCOM, al ser formuladas con fosfatidilcolina y colesterol (Quirici, comunicación personal). Estos resultados alentaron aún más el desarrollo de un protocolo de obtención de estas saponinas en mayor escala y la

caracterización de las mismas. Con este fin, se prosiguió con la Etapa 2 del presente trabajo.

ETAPA 2

Extracción y análisis

Para profundizar en el análisis estructural de la FB se implementó un sistema de extracción y fraccionamiento a mayor escala tal como se describe en la sección *Materiales y Métodos*.

Para fraccionar mayores cantidades de extracto, se utilizó un método de concentración distinto a la liofilización, que se adapta a una mayor escala. Teniendo en cuenta la capacidad de las saponinas para formar micelas a concentraciones mayores a la CMC, se implementó un sistema de concentración mediante filtración tangencial empleando una membrana de 10 KDa de corte. En este caso se trataron 1350 mL de extracto que fueron concentrados hasta un volumen final de 340 mL. Este extracto concentrado (EXTc) enriquecido en saponinas se liofilizó, obteniéndose finalmente un rendimiento de 3,3% (masa EXTc/masa hoja seca).

El fraccionamiento se realizó por cromatografía líquida en una columna preparativa de fase reversa C18. Se sembraron 2,0 g de EXTc disueltos en agua y se eluyó con un gradiente escalonado de MeOH (ver *Materiales y Métodos*). La separación se siguió por TLC (Fig. 16), y se detectaron saponinas en las fracciones denominadas Qb18, Qb19, Qb20, Qb21, Qb22, Qb23 y Qb24. En particular, se continuaron los estudios con la fracción Qb21 y Qb22, ya que Qb21 presenta un patrón de bandas similar a FB y que Qb22 presenta una única banda en capa fina, con el mismo Rf que los compuestos

presentes en Qb21. Es importante destacar que ninguna de éstas presenta compuestos fenólicos detectados por TLC en la ETAPA 1.

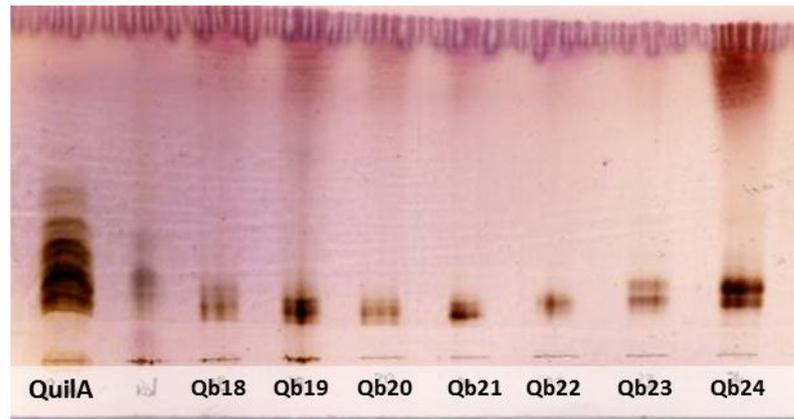


Figura 16.-Fraccionamiento por MPLC. Capa fina revelada con anisaldehído-ácido sulfúrico, de las fracciones que contienen saponinas obtenidas por MPLC a partir del extracto concentrado. Se observa la diferente composición de saponinas en cada fracción. En particular Qb22 parece ser la fracción más homogénea ya que presenta una única banda. *QuilA* estándar de saponinas comerciales, las siguientes bandas corresponden a fracciones obtenidas que contienen saponinas.

Para establecer con mayor certidumbre una relación entre la fracción FB y las fracciones obtenidas por este nuevo sistema se recurrió a la espectrometría de masas por MALDI-TOF (Fig. 17)

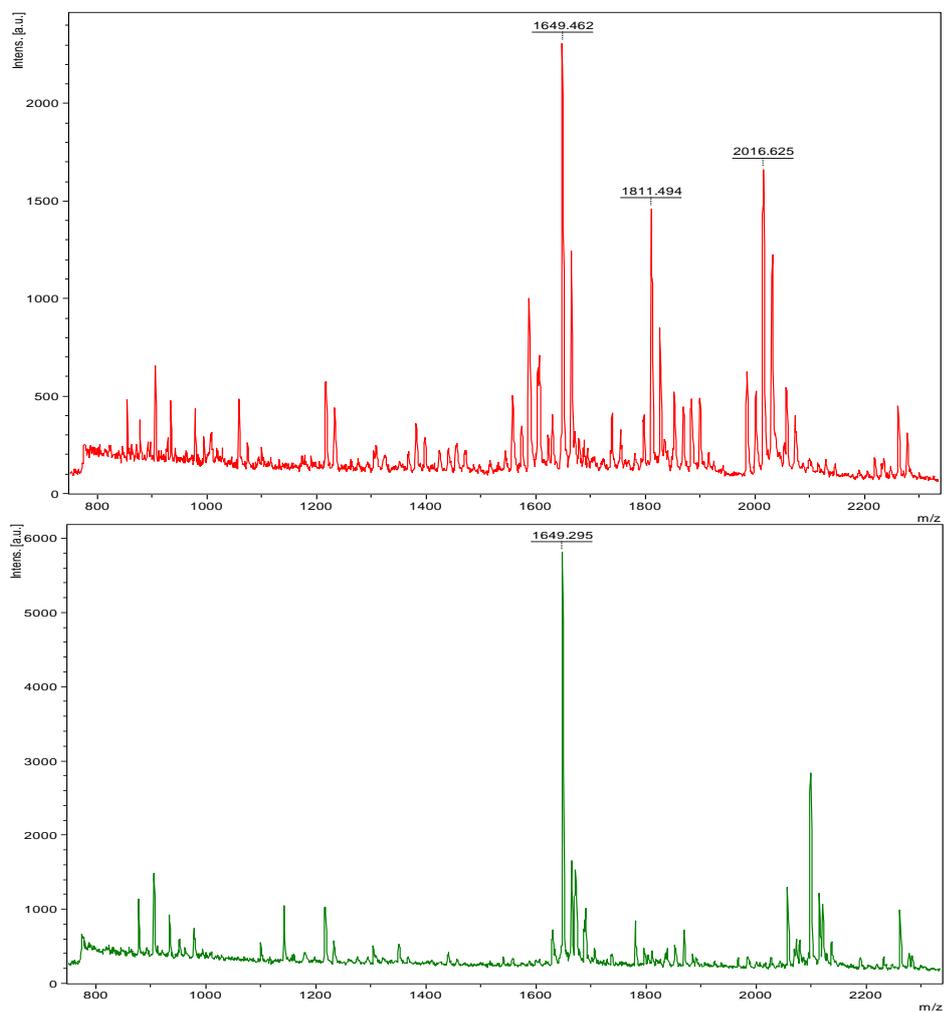


Figura 17.-Análisis de masas de las fracciones Qb21 y Qb22. Espectros de masas de Qb21 (superior) y Qb22 (inferior) obtenidos por MALDI-TOF utilizando DHB como matriz.

En el espectro de MS de Qb21 se detectaron tres componentes principales cuya relación m/z es la misma que para los componentes principales de FB. Con esos datos junto al análisis por TLC podemos asegurar que la composición de Qb21 es la misma que FB. En el caso de Qb22 se detectó principalmente uno solo de los componentes de FB ($m/z=1649$) lo que concuerda con la observación de una única banda en la TLC.

Análisis por HPLC de las fracciones Qb21 y Qb22.

Las fracciones separadas por HPLC que contienen saponinas se analizaron por HPLC en una columna C18 empleando dos fases móviles diferentes conteniendo 30% MeCN y 70% de un buffer fosfato de pH's 6,6 y 2,7 respectivamente. En la Fig. 18 se muestran los cromatogramas obtenidos para las fracciones Qb21 y Qb22 en ambos sistemas cromatográficos.

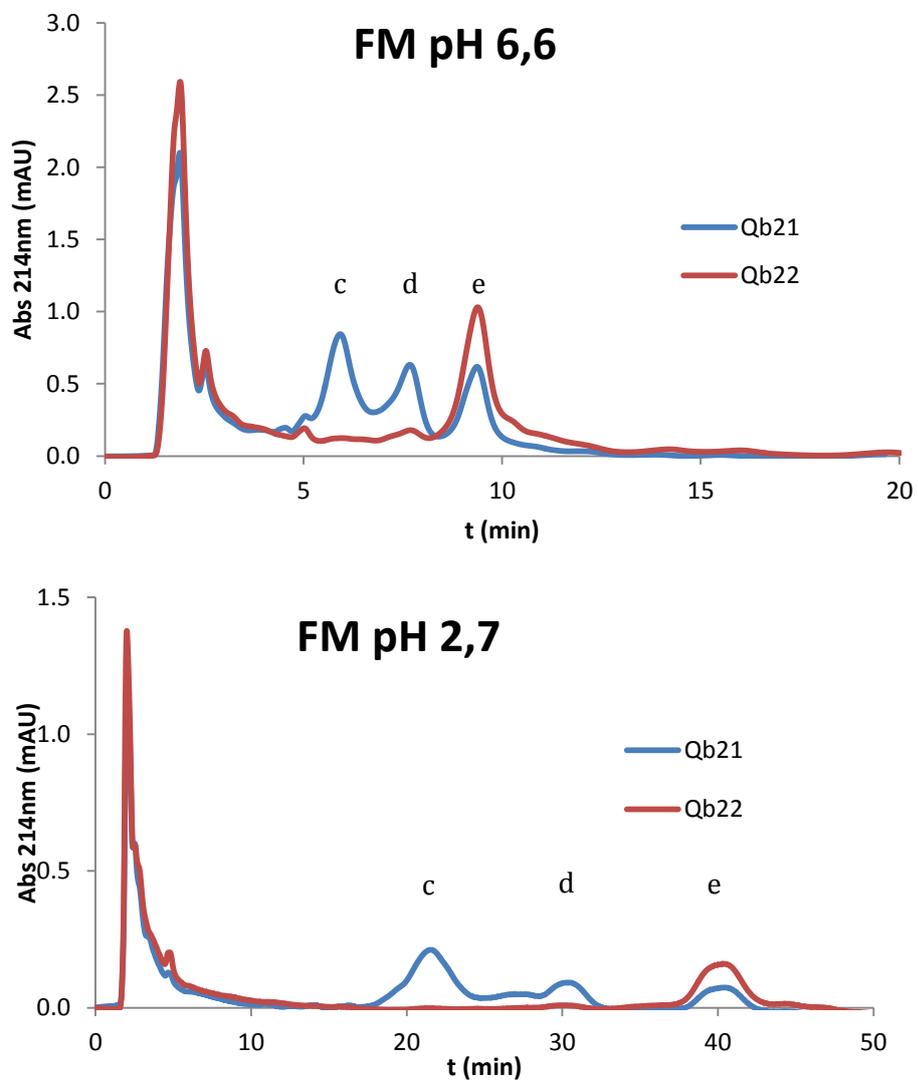


Figura 18.-Cromatogramas de las fracciones QB21 y Qb22. Corridas realizadas por HPLC en columna C18 utilizando 30%MeCN en buffer fosfatos 30mM pH 6,6 (superior) y pH 2,7 (inferior) En cada corrida se sembraron 50µg de cada muestra disuelta en la FM de pH 6,4.

Las fracciones presentan un pico intenso con el frente de corrida que se puede atribuir a variaciones en el contenido del solvente de la muestra o bien a componentes muy polares de la mezcla que no se retienen en la columna. La fracción Qb21 presenta tres picos entre los 5 y 10 minutos y el correspondiente al compuesto de menor polaridad (el de 9 min) coincide con el único pico observado en Qb22. Los compuestos que eluían a estos tiempos de retención fueron colectados, y se denominaron Qb21c, Qb21d, Qb21e y Qb22e (ver Fig. 18), y se analizaron por TLC para verificar su pureza y confirmar la presencia de saponinas.

Estudios publicados por Kauffmann *et al* (2004) en los que demostraron la presencia de una prosapogenina constituida por ácido quillájico unido a ácido glucurónico en extractos de hojas de *Q. brasiliensis*. En base a ello se consideró que las saponinas aisladas podrían ser de carácter ácido, por lo que fueron analizadas por HPLC empleando una fase móvil ácida como forma de cambiar la selectividad del sistema cromatográfico.

En los cromatogramas obtenidos con la fase móvil de pH 2,7 se observa un comportamiento similar al caso anterior pero con tiempos de retención mayores para cada uno de los 3 picos de Qb21 y el pico de Qb22. Esto confirma que el pH altera la selectividad de la columna frente a estos compuestos, y es consistente con los resultados de Kauffmann *et al*. Estos resultados sugieren la presencia de grupos ácidos con valor de pKa entre los pH utilizados en ambos sistemas cromatográficos, el grupo ácido se haya protonado, aumentando la hidrofobicidad del analito y la afinidad por la fase estacionaria, lo que conlleva a un mayor tiempo de retención. Todos los datos anteriores son compatibles con la presencia de una prosapogenina ácida en las saponinas componentes de Qb21 y Qb22. Los compuestos separados en el sistema

cromatográfico con FM ácida fueron colectados a la salida del detector y se reservaron para su posterior análisis.

Análisis por MALDI-TOF de las saponinas purificadas de Qb21 y Qb22.

Se realizaron los espectros de masa MALDI-TOF de las 8 muestras colectadas por HPLC en ambos sistemas cromatográficos, y se verificó que efectivamente los compuestos obtenidos a partir de Qb21 y Qb22, tanto empleando la fase móvil de pH 6,4 como la de pH 2,8 son los mismos compuestos. En la Fig. 19 se muestran los espectros de masas de los compuestos Qb21c-e separados por HPLC usando una fase móvil de pH 6,4.

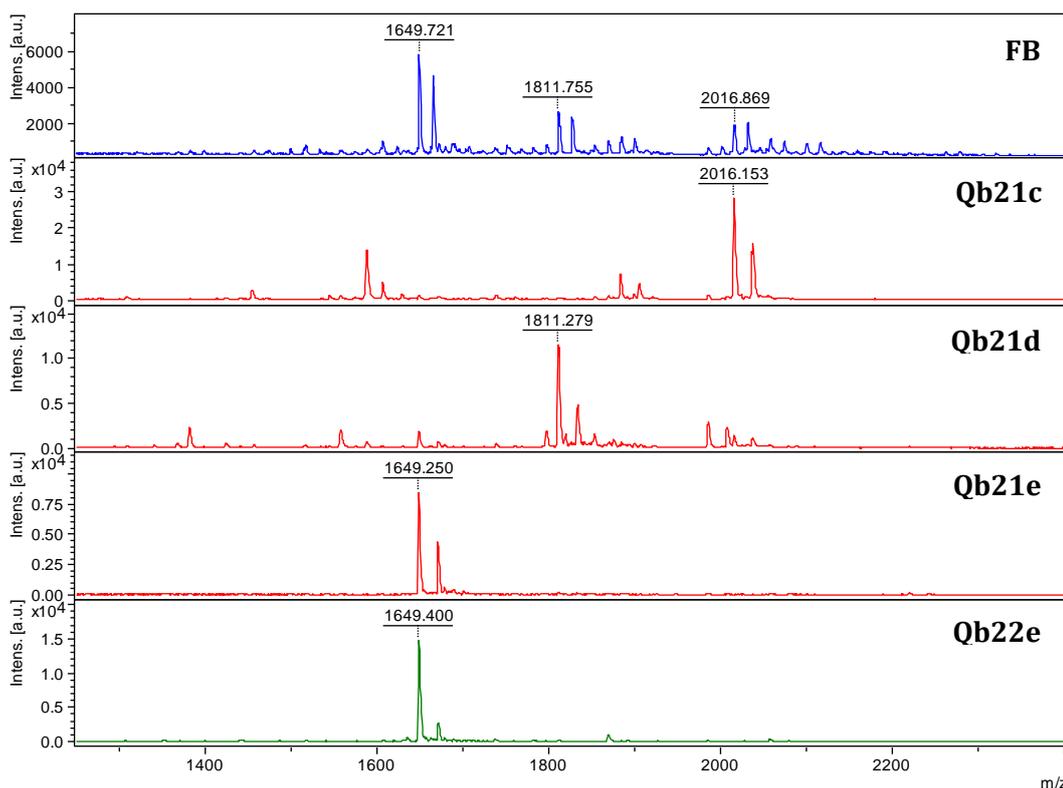


Figura 19.-Análisis de masas de las fracciones purificadas. Espectros de masa obtenidos por MALDI-TOF utilizando DHB como matriz. Se muestran los espectros representativos de cada fracción purificada. **FB:** fracción FB obtenida por métodos descritos en Etapa 1, **Qb21c, Qb21d, Qb21e y Qb22e** son las muestras correspondientes con los picos purificados por HPLC a partir de Qb21 y Qb22.

Como se puede observar en los espectros, cada fracción aislada por HPLC se corresponde con uno de los componentes principales de la fracción FB. Otra observación importante a destacar es la relación entre el t_R y m/z ; las muestras con menor t_R presentan m/z mayores lo que es consistente con estructuras de saponinas con cadenas oligosacáridicas más grandes que tienen mayor PM, y resultan en compuestos más polares que se retienen menos en la fase reversa.

Análisis de azúcares

Para que en el análisis de azúcares se pueda determinar la proporción relativa de cada monosacárido en el compuesto dado, se deben utilizar muestras puras. Por esa solo se realizó el análisis de azúcares para Qb22. Se realizó un análisis de azúcares en las mismas condiciones que para la fracción FB y se obtuvieron resultados similares (**Fig. 20**). Los azúcares presentes en la Qb22 son Xyl, Rha, Fuc, Gal y Glc en relación 2,7:2,1:3,4:1:1,5 respectivamente. Una causa posible por la que las proporciones relativas de los distintos monosacáridos no corresponden a relaciones estequiométricas, es que en el procesamiento de la muestra no se obtuvieron cantidades estequiométricas de los derivados.

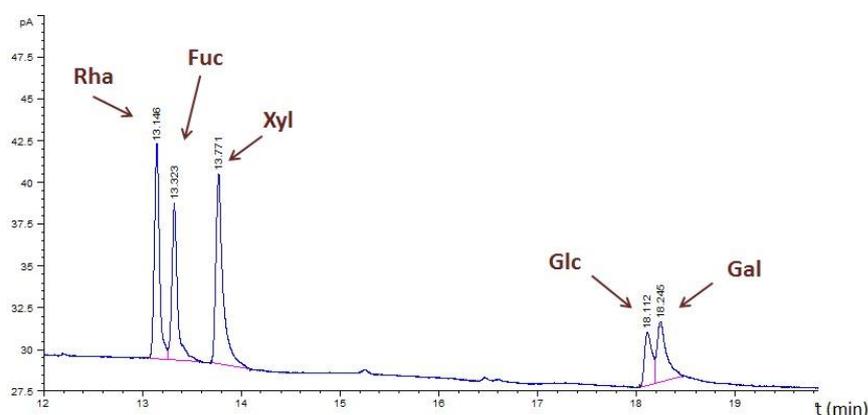


Figura 20.-Análisis de azúcares de Qb22 por GC-FID. Cromatograma GC-FID de los acetatos de alditol de los monosacáridos liberados por hidrólisis de Qb22. Los acetatos de alditol fueron identificados por comparación de los t_R de los mismos derivados obtenidos a partir de monosacáridos patrón.

Estructura

Hasta el momento son muy pocos los estudios estructurales sobre saponinas de *Quillaja brasiliensis* y no hay reportada ninguna estructura completa de saponinas presentes en dicha especie. Por eso se realizó una extensa revisión bibliográfica sobre saponinas de *Quillaja saponaria*, para las que existen numerosos estudios de elucidación estructural (Kensil et al., 1991; Nord et al., 1999; Broberg et al., 2004; Bankefors, 2006; Wang et al., 2008). Hasta el momento hay descritas cerca de 70 saponinas diferentes presentes en *Q. saponaria* y en base a ellas se elaboró un esquema que representa los motivos estructurales más recurrentes en estos compuestos (Fig. 21). Dicho esquema se utilizó como base para la propuesta de estructuras de las saponinas estudiadas en el presente trabajo, ya que debido a la proximidad taxonómica entre *Q. saponaria* y *Q. brasiliensis* es esperable encontrar similitudes desde un punto de vista fitoquímico.

Por tanto, en base a las estructuras presentes en la especie más estudiada del género y a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se proponen 3 estructuras posibles para las saponinas aisladas a partir de hojas de *Q. brasiliensis*, correspondientes con las fracciones purificadas Qb21c, Qb21d y Qb21e (Fig. 22).

Para la propuesta de estas estructuras se partió de la saponina detectada de la fracción Qb21e, para la cual se realizaron los análisis de azúcares y se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones:

- El PM de cada saponina es el calculado como (m/z del ion mayoritario para cada fracción) – (masa atómica del sodio)
- Todos los monosacáridos detectados por el análisis de azúcares deben estar presentes.
- Basados en la premisa de que especies filogenéticamente cercanas poseen un metabolismo secundario similar, se buscaron motivos estructurales similares a los descritos para saponinas de *Q. saponaria*.
- Las saponinas estudiadas deben tener un grupo ácido libre (no esterificado) con un pKa entre 6,6 y 2,8. Basándose en resultados de *Kauffmann et al* se propone la presencia de ácido quillájico unido a ácido glucurónico.

Existen diversos reportes con abordajes diferentes, acerca de la relación que hay entre la estructura y la actividad biológica de las saponinas, en particular, las actividades adyuvante y hemolítica (Soltysik et al., 1995; Oda et al., 2000; Kaiser et al., 2010). A pesar de esto, aún no hay un modelo claro y completo de cómo las saponinas ejercen su acción adyuvantes. Para el caso de las saponinas de Quillaja, se demostró que el grupo aldehído en posición C23 del ácido quillájico, y que el ácido glucurónico en C3 de la aglicona, en menor medida, son necesarios para mantener actividad adyuvante. Las saponinas descritas en este trabajo poseen estos motivos estructurales, lo que podría explicar la capacidad adyuvante observada por Silveira (comunicación personal) para la fracción FB. Por otra parte, la mayoría de las saponinas descritas para *Q. saponaria*,

presentan un grupo di-ácido unido a arabinosa en la fucosa unida al C28 de la aglicona (Fa. ver Fig. 21). Se ha demostrado que este grupo está asociado a la actividad hemolítica de las saponinas (Liu et al., 2002), y dado que no se encontró evidencia de la presencia de éste en las saponinas analizadas, se espera que la toxicidad de futuras formulaciones sea baja, haciendo así más alentador el trabajo en el desarrollo de adyuvantes de vacunación a partir de saponinas de *Q. brasiliensis*, y en particular en la caracterización química y biológica de estos compuestos.

Desde un enfoque fitoquímico, la obtención de un metabolito secundario con una metodología más sencilla y menos costosa que las metodologías actuales es sin duda un aporte significativo. Este trabajo busca, además, la valorización de esta especie nativa del Uruguay, y explorando su potencial en la fabricación de productos de química fina derivados hojas del árbol en vez de la corteza, promoviendo así la utilización sustentable de recursos biológicos. Aporta información estructural parcial para las saponinas aisladas y actualmente, con el fin de lograr una caracterización estructural completa, se están realizando análisis de masas en tándem para estudiar el patrón de fragmentación de estas saponinas y se está trabajando en el aislamiento y purificación de las saponinas Qb21c, Qb21d, Qb21e y Qb22e en mayor escala, por cromatografía líquida de alta presión, a los efectos de su análisis por resonancia magnética nuclear.

Referencias

Agnandji, S. T.; Lell, B., et al. 2011. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England Journal of Medicine* **365**: 1863-1875.

Augustin, J. M.; Kuzina, V.; Andersen, S. B. y Bak, S. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **72**: 435-457.

Bankefors, J. Structural classification of *Quillaja* saponins by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry in combination with multivariate analysis 2006 Tesis de Licenciatura Department of Chemistry, SLU Swedish University of Agricultural Sciences

Bankefors, J.; Nord, L. I. y Kenne, L. 2010. Multidimensional profiling of components in complex mixtures of natural products for metabolic analysis, proof of concept: Application to *Quillaja* saponins. *Journal of Chromatography B* **878**: 471-476.

Bello, M. A.; Hawkins, J. A. y Rudall, P. J. 2007. Floral Morphology and Development in Quillajaceae and Surianaceae (Fabales), the Species-poor Relatives of Leguminosae and Polygalaceae. *Annals of Botany* **100**: 1491-1505.

Broberg, S.; Nord, L. I. y Kenne, L. 2004. Oligosaccharide sequences in *Quillaja* saponins by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **39**: 691-701.

Copaja, S. V.; Blackburn, C. y Carmona, R. 2003. Variation of saponin contents in *Quillaja saponica* Molina. *Wood Science and Technology* **37**: 103-108.

Dalsgaard, K. 1974. Saponin Adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in Foot-and-Mouth disease vaccines. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **44**: 243-254.

Fleck, J. D. Constituição química, avaliação da atividade imunoadjuvante e estudos de propagação de *Quillaja brasiliensis* 2007 Tesis de Doctorado Faculdade de Farmacia UFRGS

Fleck, J. D.; Kauffmann, C.; Spilki, F.; Lencina, C. L.; Roehe, P. M. y Gosmann, G. 2006. Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine* **24**: 7129-7134.

Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. P. S. y Becker, K. 2007. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* **88**: 587.

Guo, S.; Kenne, L.; Lundgren, L. N.; Ronnberg, B. y Sundquist, B. G. 1998. Triterpenoid saponins from *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry* **48**: 175-180.

Guy, B. 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 505-517.

Haralampidis, K.; Trojanowska, M. y Osbourn, A. E. 2002. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **75**: 31-49.

Heftmann, E. 1983. Biogenesis of Steroids in Solanaceae. *Phytochemistry* **22**: 1843-1860.

Henry, M. 2005. Saponins and Phylogeny: Example of the "Gypsogenin group" Saponins. *Phytochemistry Reviews* **4**: 89-94.

Henry, M.; Rochd, M. y Bennini, B. 1991. Biosynthesis and accumulation of saponins in *Gypsophila paniculata*. *Phytochemistry* **30**: 1819-1821.

Hostettmann, K. y Marston, A. 1995. Saponins. Cambridge, 1er Ed. Cambridge University Press.

Jork, H.; Funk, W.; Fischer, W. y Wimmer, H. 1990. Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods. Weinheim, 1er Ed.

Kaiser, S.; Pavei, C. y Ortega, G. G. 2010. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **20**: 300-309.

Kauffmann, C.; Machado, A. M.; Fleck, J. D.; Provensi, G.; Pires, V. S.; Guillaume, D.; Sonnet, P.; Reginatto, F. H.; Schenkel, E. P. y Gosmann, G. 2004. Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Natural Product Research* **18**: 153-157.

Kensil, C. R.; Patel, U.; Lennick, M. y Marciani, D. 1991. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *The Journal of Immunology* **146**: 431-437.

Liu, G.; Anderson, C.; Scaltreto, H.; Barbon, J. y Kensil, C. R. 2002. QS-21 structure-function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine* **20**: 2808-2815.

Majinda, R. R. 2012. Extraction and isolation of saponins. *Methods in Molecular Biology* **864**: 415-426.

Nord, L. I. y Kenne, L. 1999. Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research* **320**: 70-81.

Nyberg, N. T.; Kenne, L.; Rönberg, B. y Sundquist, B. G. 2000. Separation and structural analysis of some saponins of *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research* **323**: 87-97.

Oda, K.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T. y Yoshikawa, M. 2000. Adjuvant and Haemolytic Activities of 47 Saponins derived from medicinal and food plants. *Biological Chemistry* **381**: 67-74.

Rajput, Z. I.; Hu, S.-h.; Xiao, C.-w. y Arijo, A. G. 2007. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University Science B* **8**: 153-161.

Ramon, G. 1924. Sur la toxine et sur l'anatoxine diphteriques. *Ann. Inst. Pasteur* **38**: 1-10.

San Martín, R. y Briones, R. 1999. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (Rosaceae) saponins. *Economic Botany* **53**: 302-311.

San Martín, R. y Briones, R. 2000. Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 2063-2068.

Schenkel, E. P.; Gosmann, G. y Athayde, M. L. 2000. Saponinas. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis, 2 Ed.: 597-622.

Silveira, F.; Cibulski, S. P.; Varela, A. P.; Marqués, J. M.; Chabalgoity, A.; de Costa, F.; Yendo, A. C. A.; Gosmann, G.; Roehe, P. M.; Fernández, C. y Ferreira, F. 2011. *Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. *Vaccine* **29**: 9177-9182.

Soltysik, S.; Wu, J.-Y.; Recchia, J.; Wheeler, D. A.; Newman, M. J.; Coughlin, R. T. y Kensil, C. R. 1995. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine* **13**: 1403-1410.

Sun, H.-X.; Xie, Y. y Ye, Y.-P. 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* **27**: 1787-1796.

Szakiel, A.; Pączkowski, C. y Henry, M. 2010. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews* **10**: 471-491.

Valkonen, J. P.; Keskitalo, M.; Versara, T. y Pietilä, L. 1996. Potato glycoalkaloids: A burden or a blessing. *CRC. Plant Sciences* **15**: 1-20.

Vincken, J.-P.; Heng, L.; de Groot, A. y Gruppen, H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **68**: 275-297.

Wang, Y.; Lu, X. y Xu, G. 2008. Development of a comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry system and its application in separation and identification of saponins from *Quillaja saponaria*. *Journal of Chromatography A* **1181**: 51-59.

Yendo, A. C. A.; Costa, F.; Gosmann, G. y Fett-Neto, A. G. 2010. Production of Plant Bioactive Triterpenoid Saponins: Elicitation Strategies and Target Genes to Improve Yields. *Molecular Biotechnology* **46**: 94-104.