

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FATORES QUE INFLUENCIAM O ACÚMULO DE SAPONINAS  
EM *Quillaja brasiliensis***

FERNANDA DE COSTA

PORTO ALEGRE, ABRIL DE 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FATORES QUE INFLUENCIAM O ACÚMULO DE SAPONINAS**  
**EM *Quillaja brasiliensis***

Dissertação apresentada por **Fernanda de Costa**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Grace Gosmann  
Co-orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto

Porto Alegre, 2009.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado - Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.04.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Lúcia Rebello Dillenburg  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

C837f Costa, Fernanda de  
Fatores que influenciam o acúmulo de saponinas em *Quillaja brasiliensis* / Fernanda de Costa. – Porto Alegre : UFRGS, 2009. – xvi, 79 p. : il., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Quillaja brasiliensis*. 2. Saponinas. I. Gosmann, Grace. II. Fett-Neto, Arthur Germano. III. Título.

CDU: 547.918:582.734

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Esta dissertação foi desenvolvida nas instalações do Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia e do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências e Centro de Biotecnologia, ambos desta Universidade. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

“O caminho mais seguro para chegar ao verdadeiro futuro  
é ir na direção em que teu medo cresce.”

Milorad Pávitch

## AGRADECIMENTOS

À Grace pela orientação, confiança e estímulo durante estes seis anos de trabalho e convivência.

Ao Arthur, por todas suas palavras de incentivo, pela orientação, conselhos e toda confiança.

À Juli, por ser uma amiga muito especial e por ter me mostrado o mundo de *Quillaja*. Juli, sem você, esse trabalho não seria possível, obrigada por tudo! És um exemplo de profissional e pessoa para mim.

À Anninha, minha querida amiga que me ajudou incansavelmente durante estes dois anos. Muuuuito obrigada por tudo, e principalmente pela tua amizade! Te adoro!

Às minhas colegas de mestrado, em especial à Cris e a Carol, que dividiram comigo alegrias e angústias nestes dois anos.

À toda velha guarda do Lab. de Fitoquímica, amigos para a vida toda: Sí Quintana, Gusti, Tinho, Gisele, Ingrid, Maurício e Andressa.

À todas amigas do Lab. de Fitoquímica: Sí Gnoatto, Luciana, Lucimara, Adri, Tábita, Melissa, Cíntia, Cris, Carol e Aline, pela amizade, colaboração e bons momentos nos happy hours.

Às florzinhas do Lab. de Fisiologia Vegetal, Márcia, Carina, Lívia, Kaka, Edi, Kelly e Carol, pela amizade e pelas risadas nos nossos famosos almoços.

Aos meus amigos e colegas do Lab. de Fisiologia Vegetal, por toda ajuda, amizade e por terem tornado o trabalho de bancada muito mais prazeroso!

À Marcinha e à Carina, por toda ajuda no experimento de doseamento de açúcares.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) que tornaram possível a realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Gilson Moreira, por permitir a coleta em sua propriedade e pela identificação botânica.

À Fundação Jardim Botânico, em especial à Dr. Andréia Maranhão Carneiro, pela permissão de coleta.

Ao Ari, por todo auxílio durante as coletas de *Quillaja* e toda a atenção e amabilidade com que sempre nos recebeu.

À minha família querida, em especial minha mana e dinda Fabi, meu cunhado Reni e meu afilhadinho Matheus, alegria da minha vida.

À minha mãezinha Elia, por sempre acreditar em mim, pelo apoio incondicional, pelo carinho e todo o amor.

Ao Malco, por todo amor, compreensão e incentivo. Obrigada por tudo!

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1. Estrutura da saponina QS-21, isolada de *Q. saponaria* ..... 45
- Figura 2. Parte do anel de fucose, mostrando o mecanismo de isomerização. 46
- Figura 3. Estrutura das substâncias QB-1 (a) e QB-H1 (b) ..... 47
- Figura 4. Síntese de GPI-0100 a partir de saponinas desaciladas ..... 48

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA = do inglês, ácido abscísico

AcOH= ácido acético

AE = do inglês, extrato aquoso

AIA = ácido indolacético

AIB = ácido indolbutírico

ANA = ácido naftalenoacético

AS02A = emulsão óleo em água contendo 3-O-desacil-4'-monofosforil-lipídio-A e QS-21

BHV-1 = do inglês, herpesvirus bovino tipo I

BSA = do inglês, albumina bovina sérica

C = carbono

CAA = célula apresentadora de antígeno

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

CSP = do inglês, proteína do circumsporozoíto

DS = do inglês, saponina desacilada

DW = do inglês, peso seco

ESI-ITMS = espectrometria de massas com ionização por eletronebulização e analisador de espectros seqüencial íon trap

FMP-1 = proteína recombinante de *Plasmodium falciparum*

GPI-0100 = mistura de análogos semi-sintéticos das saponinas nativas

H<sub>2</sub>O = água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

HBV = do inglês, vírus da hepatite B

HILIC = do inglês, cromatografia de interação hidrofílica

HIV = do inglês, vírus da imunodeficiência humana

HPLC = do inglês, cromatografia líquida de alta eficiência

HSV = herpes simplex vírus

IFN- $\gamma$  = interferon  $\gamma$

Ig = imunoglobulina

IL = interleucina

IRIV = do inglês, virossomas do vírus influenza imunopotentes

ISCOM = complexo imunoestimulante

ISCOMATRIX = matriz do complexo imunoestimulante

LTA1 = linfócito T auxiliar 1

LTA2 = linfócito T auxiliar 2

LTC = linfócito T citotóxico

MALDI-TOF MS = técnica de espectrometria de massas que utiliza Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser (MALDI) combinada a detecção por Tempo-de-Vôo (TOF)

MeOH = metanol

MF59<sup>TM</sup> = emulsão óleo em água de esqualeno, polisorbato 80 e trioleato de sorbitano

MHC = do inglês, complexo de histocompatibilidade principal

MPL = monofosforil lipídio A

MS = solução de sais Murashige & Skoog

*n*-BuOH = *n*-butanol

NaCl = cloreto de sódio

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> = ânion superóxido

OH• = radical hidroxila

OVA = do inglês, antígeno albumina de ovo

P.A.R. = do inglês, radiação fotossinteticamente ativa

PEG = polietilenoglicol

Pfr = do inglês, fitocromo vermelho-extremo

PLUSCOM = complexo imunoestimulante catiônico

Pr = do inglês, fitocromo vermelho

PSII = do inglês, fotossistema II

QB = *Quillaja brasiliensis*

QS = *Quillaja saponaria*

RDS-1 = análogo à QS-21, purificado a partir de GPI-0100

REA = relação estrutura atividade

R/FR = do inglês, luz vermelha / luz vermelha-extrema

RMN de <sup>13</sup>C = ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de <sup>1</sup>H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNA = do inglês, ácido ribonucléico

ROS = do inglês, espécies reativas de oxigênio

RP18-1 = fração de saponinas desaciladas obtida de GPI-0100

RP18-2 = fração de derivados reacilados de desacilssaponinas obtida de GPI-0100

RTS,S = proteína recombinante de *P. falciparum*, contendo porções da proteína do circumsporozoíto fundida ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B

TCR = do inglês, receptor de células T

TLC = do inglês, cromatografia em camada delgada

UV = radiação ultravioleta

VLP =do inglês, partícula semelhante a vírus modificada

## RESUMO

As saponinas de *Quillaja brasiliensis*, espécie nativa do sul do Brasil, apresentam notáveis semelhanças com as de *Quillaja saponaria*, conhecidas pela atividade adjuvante em formulações de vacinas. A potencial atividade adjuvante da fração de saponinas denominada QB-90, isolada das folhas de *Q. brasiliensis*, foi demonstrada em modelo murino. Neste estudo, o efeito de fatores abióticos e procedimentos pós-colheita foram investigados em relação ao acúmulo de QB-90. O estresse osmótico em discos foliares aumentou o conteúdo de QB-90 em duas vezes, quando tratados com sorbitol 100 mM após 4 dias. Experimentos com qualidade e intensidade de luz indicaram um aumento nos teores de QB-90 com luz vermelha e aumento da irradiância de luz branca, sem diferenças significativas na concentração de açúcares solúveis totais. Procedimentos pós-colheita demonstraram uma diferença na susceptibilidade de degradação de QB-90 entre cascas e folhas. Folhas mantiveram o teor de QB-90 em todos os experimentos realizados: armazenagem a temperatura ambiente (25°C); armazenagem a temperatura ambiente sob vácuo; armazenagem a -12°C, armazenagem a 40°C e armazenagem a 60°C. Entretanto, resultados obtidos com os mesmos tratamentos para cascas, indicaram degradação de QB-90 nas temperaturas mais elevadas. Estes resultados indicam que a fração bioativa de saponinas de *Q. brasiliensis* pode ter seu rendimento aumentado por estresse hídrico e por condições de luz.

**Palavras-chave:** *Quillaja brasiliensis*, saponinas, QB-90, estresse osmótico, estresse luminoso, pós-colheita.

## ABSTRACT

The saponins of *Quillaja brasiliensis*, a native species from Southern Brazil, show remarkable similarities to those of *Q. saponaria* which are used as adjuvants in vaccine formulations. Potential adjuvant activity of a saponin fraction (QB-90) from leaves of *Q. brasiliensis* was reported in murine model. In this study, we investigated the effect of some abiotic factors and post harvest procedures on QB-90 contents. Osmotic stress in leaf discs yielded a doubling on the content of QB-90 by treatment with sorbitol 100mM after four days. Experiments with light quality and intensity treatments indicated a significant increase in QB-90 yields with red light enrichment and higher white light irradiance, without significant changes in the concentration of total soluble carbohydrates. Post harvest procedures showed a differential susceptibility of QB-90 degradation in barks and leaves. Leaves maintained stable QB-90 contents in all treatments examined: storage at room temperature (25 °C); storage at room temperature under vacuum; storage at -12 °C; storage at 40 °C and storage at 60 °C. However, results obtained with the same treatments for barks showed QB-90 degradation at the higher temperatures. The results indicated that the bioactive saponin fraction of *Q. brasiliensis* may be increased by water stress and light conditions.

**Keywords:** *Quillaja brasiliensis*, saponins, QB-90, osmotic stress, light, post-harvest

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
REFERÊNCIAS .....	6
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>9</b>
Constituição Química e Atividade Imunoadjuvante de <i>Quillaja saponaria</i> e <i>Quillaja brasiliensis</i> .....	10
1. Introdução .....	12
2. Constituição Química de <i>Q. saponaria</i> .....	14
3. Constituição Química de <i>Q. brasiliensis</i> .....	18
4. Atividade imunoadjuvante de <i>Q. saponaria</i> .....	20
4.1 Mecanismos de ação da atividade imunoadjuvante de <i>Q. saponaria</i> e estudos de relação estrutura-atividade (REA).....	21
4.2 Toxicidade .....	26
4.3 Aplicações em Vacinas .....	27
5. Atividade imunoadjuvante de <i>Q. brasiliensis</i> .....	35
6. Considerações Finais .....	36
7. Agradecimentos .....	37
8. Referências.....	37
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>49</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>77</b>

## **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

Saponinas compreendem um grupo de glicosídeos de alto peso molecular, cujos açúcares estão ligados a uma aglicona triterpênica ou esteróide. Estes compostos são considerados agentes tensoativos e caracterizados por suas duas principais características: ação hemolítica e a formação de espuma (Hostettmann e Marston, 1995). Pertencem à classe de metabólitos secundários de células vegetais e seu acúmulo está normalmente relacionado como responsivo a fatores de estresse biótico ou abiótico (Wu et al., 2005, Abreu e Mazzafera et al., 2005), sendo distribuídas diferencialmente entre grupos taxonômicos dentro do reino vegetal. Nos últimos anos, saponinas vêm sendo utilizadas em diversos setores industriais, possuindo considerável valor econômico (Hostettmann e Marston, 1995).

Dentre as diversas atividades farmacológicas que estas moléculas apresentam, a utilização como adjuvantes em vacinas apresenta resultados promissores. As principais fontes de saponinas com esta finalidade são as raízes de *Panax ginseng*, *Panax notoginseng*, *Platycodon grandiflorum* e *Polygala senega*, além das cascas de *Quillaja saponaria*, espécie arbórea nativa sul-americana, encontrada no Chile, Bolívia e Peru (Hostettmann e Marston, 1995; Sun et al., 2009).

As saponinas de *Q. saponaria* destacam-se por apresentarem pronunciada atividade imunoadjuvante, isto é, são capazes de estimular resposta imune humoral e mediada por células, quando administradas com diversos antígenos e em diversas espécies animais (Campbell e Peerbaye, 1992). Esta importância é comprovada por diversos ensaios pré-clínicos e

clínicos publicados (Coughlin et al., 1995; Hancock et al., 1995; Borja-cabrera et al., 1997; Foon et al., 2000; Stittelaar et al., 2000; Evans et al., 2001; Friede et al., 2005; Thera et al., 2006).

Entretanto, a utilização de saponinas de *Q. saponaria* para fins industriais e experimentais tem levado a uma intensa exploração das florestas chilenas, gerando um importante prejuízo ecológico e a diminuição desta matéria-prima (San Martín e Briones, 1999).

*Quillaja brasiliensis*, espécie congênere à chilena, é uma planta nativa do Rio Grande do Sul, com ocorrência até o estado de São Paulo. A espécie era utilizada, antigamente, como detergente, denotando um teor elevado de saponinas (Reitz, 1996).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado a possibilidade de utilização de saponinas de folhas de *Q. brasiliensis* como alternativa à utilização de cascas de *Q. saponaria*. Como folhas são uma fonte renovável de matéria-prima, a exploração auto-sustentável pode ser realizada com maior facilidade, não havendo a necessidade da derrubada das árvores.

Segundo estudos realizados por nosso grupo de pesquisa (Kauffmann et al., 2004; Fleck et al., 2006), a espécie brasileira apresenta saponinas estruturalmente semelhantes às encontradas em *Q. saponaria*. Além disso, foi relatada atividade imunoadjuvante dos extratos de cascas, folhas e ramos de *Q. brasiliensis*, bem como de uma fração purificada em saponinas (codificada como QB-90), em vacinas contra herpes simplex vírus (HSV) bovino tipo 1, em camundongos. Os resultados demonstraram que os extratos e a fração QB-90, nas doses empregadas, foram capazes de potencializar a resposta imune ao

antígeno HSV-1 de modo comparável ao obtido com a fração saponosídica da espécie chilena (Fleck et al., 2006).

Assim, está demonstrada a potencial utilização de saponinas da espécie brasileira como substituta à chilena. No entanto, estudos que conduzam ao conhecimento detalhado dos fatores que afetam a produção de saponinas são necessários, de modo a produzir matéria-prima com máximo rendimento para utilização industrial.

Protocolos de propagação de *Q. brasiliensis* através de experimentos de germinação de sementes e enraizamento de explantes provenientes de culturas de meristema apical foram estudados por nosso grupo (Fleck et al., 2009). Resultados demonstraram que há uma diferença na taxa de germinação de acordo com o substrato utilizado e que germinações em meio asséptico empregando sais de Murashige e Skoog (1962) (0,1X) não suplementadas com sacarose apresentam a melhor relação germinação/contaminação de sementes.

Neste mesmo trabalho foram realizados estudos de enraizamento avaliando-se o papel das auxinas: ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA), na concentração de 10 mg/L. Os resultados demonstraram que o emprego de AIA mostrou-se mais adequado para a propagação desta espécie, uma vez que aumentou o número de raízes por explante enraizado, sem afetar negativamente o alongamento das raízes, como ocorreu com AIB e ANA.

Fleck (2007) analisou os efeitos de fatores de estresses bióticos (como ataque por patógenos e herbivoria, simulados pelo uso de moléculas sinalizadoras e dano mecânico controlado) e abióticos (exposição à luz branca

e ultravioleta) na produção de saponinas. O conteúdo de QB-90 não foi afetado pela aplicação de ácido salicílico exógeno (5mM). No entanto, foi aumentado pela aplicação exógena de ácido jasmônico (40µM e 400µM), bem como pela exposição à radiação UV-C.

A distribuição órgão-específica de QB-90 foi avaliada, detectando-se maior concentração em folhas, em relação a raízes e caules. A importância das folhas foi reforçada através da análise do conteúdo desta ao longo do desenvolvimento de sementes germinadas, visto que a quantidade encontrada em plântulas com dois pares de folhas é significativamente maior que nos demais estágios. O teor de QB-90 foi analisado através de estudos sazonais ao longo de dois anos, indicando que redução da insolação, associada a períodos de baixa pluviosidade, estão relacionados a um aumento da produção de QB-90.

Este último estudo foi tomado como evidência de que saponinas podem responder ao estresse luminoso e osmótico. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo estudar os efeitos destes fatores de estresse no acúmulo de saponinas em *Q. brasiliensis*, a fim de continuar estudos de utilização racional desta espécie. Além disso, este trabalho visa analisar a estabilidade pós-colheita destas saponinas frente a diferentes temperaturas de estocagem.

## REFERÊNCIAS

ABREU, I.N.; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, p. 241-248, 2005.

BORJA-CABRERA, G.P.; BERNARDO, R.R.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. Vaccination against experimental canine Kala-azar with the FML antigen of *Leishmania donovani* and the Quil-A saponin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 209, 1997.

CAMPBELL, J.B.; PEERBAYE, Y.A. Saponin. *Research Immunology*, v. 143, p. 526-530, 1992.

COUGHLIN, R.T.; FATTOM, A.; CHU, C.; WHITE, A.C.; WINSTON, S. Adjuvant activity of QS-21 for experimental *E. coli* 018 polysaccharide vaccines. *Vaccine*, v. 13, p. 17-21, 1995.

EVANS, T.G.; McELRATH, M.J.; MATTHEWS, T.; MONTEFIORI, D.; WEINHOLD, K.; WOLFF, M.; KEEFER, M.C.; KALLAS, E.G.; COREY, L.; GORSE, G.J.; BELSHE, R.; GRAHAM, B.S.; SPEARMAN, P.W.; SCHWARTZ, D.; MULLIGAN, M.J.; GOEPFERT, P.; FAST, P.; BERMAN, P.; POWELL, M.; FRANCIS, D.; NIAID AIDS VACCINE EVALUATION GROUP. QS-21 promotes an adjuvant effect allowing for reduced antigen dose during HIV-1 envelope subunit immunization in humans. *Vaccine*, v. 19, p. 2080-2091, 2001.

FLECK, J.D.; KAUFFMANN, C.; SPILKI, F.; LENCINA, C.L.; ROEHE, P. M.; GOSMANN, G. Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine*, v. 24, p. 7129-7134, 2006.

FLECK, J.D. Constituição química, avaliação da atividade imunoadjuvante e estudos de propagação de *Quillaja brasiliensis*. Programa de Pós-Graduação

em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Tese. 2007.

FLECK, J.; SCHWAMBACH, J.; ALMEIDA, M.E.; YENDO, A.C.A.; DE COSTA, F.; GOSMANN, G.; FETT-NETO, A.G. Immunoadjuvant saponin production in seedlings and micropropagated plants of *Quillaja brasiliensis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2009 (aceito para publicação).

FOON, K.A.; LUTZKY, J.; BARAL, R.N.; YANNELLI, J.R.; HUTCHINS, L.; TEITELBAUM, A.; KASHALA, O.L.; DAS, R.; GARRISON, J.; REISFELD, R.A.; BHATTACHARYA-CHATTERJEE, M. Clinical and immune responses in advanced melanoma patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking disialoganglioside GD2. *Journal of Clinical Oncology*, v. 18, p. 376-384, 2000.

FRIEDE, M.; AGUADO, M.T. Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 325-331, 2005.

HANCOCK, G.E.; SPEELMAN, D.J.; FRENCHICK, P.J.; MINEO-KUHN, M.M.; BAGGS, R.B.; HAHN, D.J. Formulation of the purified fusion protein of respiratory syncytial virus with the saponin QS-21 induces protective immune responses in Balb/c mice that are similar to those generated by experimental infection. *Vaccine*, v. 13, p. 391-400, 1995.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. *Saponins*. New York: Cambridge University Press, 1995, p. 327-329.

KAUFFMANN, C.; MACHADO, A.M.; FLECK, J.D.; PROVENSÍ, G.; PIRES, V.S.; GUILLAUME, D.; SONNET, P.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Natural Product Research*, v. 18, p. 153-157, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays

- with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- REITZ, R. (Ed.). *Flora ilustrada catarinense – Rosáceas*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1996, p. 113-116.
- SAN MARTÍN, R.; BRIONES, R. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (ROSACEAE) saponins. *Economic Botany*, v. 53, p. 302-311, 1999.
- STITTELAAR, K.J.; BOES, J.; KERSTEN, G.F.A.; SPIEKSTRA, A.; MULDER, P.G.H.; DE VRIES, P.; ROHOLL, P.J.M.; DALSGAARD, K.; DOBBELSTEEN, G.V.D.; ALPHEN, L.V.; OSTERHAUS, A.D.M.E. In vivo antibody response and in vitro CTL activation induced by selected measles vaccine candidates, prepared with purified Quil A components. *Vaccine*, v. 18, p. 2482-2493, 2000.
- SUN, H-X.; XIE, Y.; YE, Y-P. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, v. 27, p. 1787-1796, 2009.
- THERA, M.A.; DOUMBO, O.K.; COULIBALY, D.; DIALLO, D.A.; SAGARA, I.; DICKO, A.; DIEMERT, D.J.; HEPPNER JR, D.G.; STEWART, V.A.; ANGOV, E.; SOISSON, L.; LEACH, A.; TUCKER, K.; LYKE, K.E.; PLOWE, C.V. Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in Malian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS Clinical Trials*, v.1, e34, 2006.
- WU, J.Y.; WONG, K.; HO, K.P.; ZHOU, L.G. Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 133-138, 2005.

## **CAPÍTULO 1**

**Constituição Química e Atividade Imunoadjuvante de *Quillaja saponaria* e  
*Quillaja brasiliensis***

Artigo de revisão a ser submetido

**Constituição Química e Atividade Imunoadjuvante de *Quillaja saponaria* e  
*Quillaja brasiliensis***

Fernanda de Costa, Anna Carolina Alves Yendo, Juliane D. Fleck e Grace  
Gosmann\*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av.  
Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre - RS, Brasil

\*[grace.gosmann@ufrgs.br](mailto:grace.gosmann@ufrgs.br)

## **Chemical constituents and immunoadjuvant activity of *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis***

### **Abstract**

Particular chemical attention has been paid to the Chilean species *Quillaja saponaria*, which furnishes saponins that are used as immunoadjuvant in vaccine formulations. Recently, the potential adjuvant activity of saponins from *Q. brasiliensis*, a native tree to Southern Brazil, was described. This review discusses the recent knowledge about the (i) chemical studies conducted with both species, (ii) immunoadjuvant activity of *Q. saponaria* saponins (iii) chemical structural aspects of these saponins to the adjuvant activity and toxicity, (iv) the potential use of saponins from *Q. brasiliensis* as a substitute of the Chilean species.

Keywords: *Quillaja*, saponin, immunoadjuvant activity

## 1. Introdução

Saponinas compreendem um grupo de glicosídeos de alto peso molecular, cujos açúcares estão ligados a uma aglicona triterpênica ou esteróide. Estes compostos são considerados agentes tensoativos e podem apresentar como características a ação hemolítica e a formação de espuma. Além disso, acredita-se que estejam entre os principais componentes de plantas utilizadas na medicina popular e em drogas de origem vegetal, sendo responsáveis por numerosos efeitos farmacológicos, como, por exemplo, antimicrobiano, antifúngico, antiparasitário, citotóxico, antiviral, entre outros.<sup>1,2,3</sup>

Esta classe de metabólitos pode ser classificada em dois subgrupos conforme a natureza do núcleo fundamental, conhecida por aglicona, genina ou sapogenina. O primeiro grupo consiste de saponinas esteróides, que estão presentes em maior número nas angiospermas monocotiledôneas. O segundo grupo são as saponinas triterpênicas, mais comuns em dicotiledôneas e que compreendem um grupo de mais de 750 glicosídeos triterpênicos e 360 sapogeninas.

As saponinas são, ainda, classificadas quanto ao número de resíduos de açúcar ligados à aglicona, sendo chamadas monodesmosídicas quando possuem apenas um resíduo de açúcar, freqüentemente ligado ao C-3; bidesmosídicas quando apresentam duas cadeias de açúcares, geralmente em C-3 por uma ligação éter e em C-28 por uma ligação éster e tridesmosídicas, quando apresentam três resíduos de açúcar, sendo mais raramente encontradas na natureza.<sup>2,4</sup>

As cascas de *Quillaja saponaria* (Quillajaceae) são uma das principais fontes industriais de saponinas. Estas saponinas são amplamente utilizadas como estabilizantes de suspensões, aditivos de xampus e tônicos capilares, além de serem empregadas na indústria alimentícia e têxtil.<sup>5</sup> Na indústria farmacêutica, as saponinas de *Q. saponaria* são utilizadas como adjuvantes em vacinas, na produção de reagentes clínico-laboratorial e na produção de cosméticos.<sup>4,6</sup>

O primeiro extrato bruto de saponinas de *Q. saponaria* foi obtido em 1887, sendo que a elucidação estrutural de uma saponina ocorreu apenas em 1988.<sup>5</sup> Devido à natureza anfifílica das saponinas, tendência de formar micelas e sua complexidade estrutural, há uma grande dificuldade para separá-las utilizando solventes aquosos. É necessário, portanto, a utilização de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa e a adsorção em solventes orgânicos, em combinação com Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas.<sup>1,7</sup> Apesar da complexidade estrutural, mais de sessenta saponinas foram isoladas e elucidadas.<sup>7,8,9,10,11,12,13,14,15</sup>

Estas saponinas destacam-se por apresentarem pronunciada atividade imunoadjuvante, isto é, são capazes de estimular resposta imune humoral e mediada por células quando administradas com diversos antígenos.<sup>1</sup> A importância atribuída a essa atividade é indicada por diversos estudos em fase pré-clínica e clínica, em que saponinas de *Q. saponaria* são utilizadas como adjuvantes em vacinas.<sup>16,17,18,19,20,21,22,23</sup>

No Brasil, é encontrada a espécie *Quillaja brasiliensis* (A. St-Hil. et Tul.) Mart (Quillajaceae), espécie congênera à chilena, nativa do Rio Grande do Sul e com ocorrência até o estado de São Paulo. É conhecida popularmente como

pau-sabão, devido à capacidade espumógena de suas cascas e folhas. Esta espécie era utilizada, antigamente, como detergente, denotando um teor elevado de saponinas. Em um estudo comparativo entre as espécies, foi constatado um perfil cromatográfico semelhante de saponinas.<sup>24</sup> Além disso, foi relatado que os extratos aquosos de folhas, ramos e cascas de *Q. brasiliensis*, bem como uma fração de saponinas purificada, apresentaram atividade imunoadjuvante contra herpes simplex vírus (HSV) bovino tipo 1 em camundongos.<sup>25,26</sup>

Sendo assim, esta revisão tem por objetivo apresentar a composição química de *Q. saponaria* e *Q. brasiliensis* e relacioná-las com a atividade imunoadjuvante e a utilização em vacinas, salientando a importância destas espécies em âmbito farmacêutico.

## **2. Constituição Química de *Q. saponaria***

As cascas de *Q. saponaria* contém 9-10% de saponinas, tendo sido detectado por espectrometria de massas a presença de mais de 60 estruturas químicas. No entanto, não há relatos de ocorrência deste metabólito nas folhas, sendo verificada neste órgão a presença de delphinidina, quercetina, cianidina, canferol, ácido caféico e ácido ascórbico.<sup>5,6,27</sup>

Em 1974, Dalsgaard e colaboradores purificaram um extrato de saponinas através de diálise, cromatografia de troca iônica e cromatografia de gel filtração, dando origem a uma fração com atividade imunoadjuvante expressiva e poucos efeitos adversos quando comparada ao extrato bruto. Esta mistura, conhecida por Quil-A<sup>®</sup>, serviu de base para estudos posteriores.

Através de CLAE de fase reversa, foi possível diferenciar 23 sub-frações nesta fração ativa.<sup>1,5</sup>

As saponinas de *Q. saponaria* caracterizam-se por serem triterpênicas bidesmosídicas. Há duas diferenças estruturais que distinguem estas saponinas da maioria das outras: um domínio de ácido graxo e um grupamento aldeído ligado à posição 4 da aglicona.<sup>4,5</sup>

A aglicona majoritária de saponinas de *Q. saponaria* é o ácido quiláico (ácido 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diidróxi-23-oxo-olean-12-en-28-óico) e se caracteriza pela presença de um grupamento aldeído em C-4. Além desta genina, foi demonstrada a presença de gipsogenina, o ácido 22 $\beta$ -hidróxi-quiláico, ácido fitolacagênico e ácido equinocístico (Tabela 1). Estas duas últimas agliconas se diferenciam do ácido quiláico, visto que não apresentam o grupamento aldeído ligado em C-4. O ácido fitolacagênico possui um grupamento hidróxi-metileno em C-4 e o ácido equinocístico apresenta uma metila nesta posição.<sup>4,8,9,12,15,27</sup>

#### TABELA 1

A estrutura triterpênica mais comum dessas saponinas consiste de ácido quiláico substituído em C-3 por um di ou trissacarídeo e em C-28 por um oligossacarídeo através de um resíduo fucosila (Figura 1). A fucose é usualmente substituída por um grupamento acila consistindo de um resíduo de ácido graxo em C-3 ou C-4. Este grupamento acila pode migrar entre as duas hidroxilas adjacentes formando estruturas regioisômeras, como demonstrado na Figura 2.<sup>9,11,15</sup>

#### FIGURA 1

#### FIGURA 2

Em 1991, Kensil e colaboradores<sup>28</sup> purificaram quatro saponinas da fração Quil-A<sup>®</sup> através de gel de sílica e cromatografia de fase reversa. Estas saponinas foram denominadas QS-7, QS-17, QS-18 e QS-21 (o número indica o tempo de retenção de acordo com o sistema cromatográfico utilizado). Entretanto, estudos posteriores demonstraram que QS-21 é, na verdade, a mistura de duas saponinas diferentes, QS-21A e QS-21B, que se diferenciam apenas no ponto de ligação do resíduo de ácido graxo no anel de fucose. O isômero majoritário apresenta o resíduo de ácido graxo ligado a hidroxila da posição 4, enquanto que o isômero minoritário apresenta o resíduo na hidroxila da posição 3 (Figura 2).<sup>9,29</sup> O equilíbrio entre os dois regioisômeros é atingido em pH 5,5 e mais rapidamente com o aumento de pH. Os dois isômeros apresentam atividade imunoadjuvante semelhante, mas a possibilidade de interconversão dos isômeros *in vivo* ainda é desconhecida.

Nord e Kenne<sup>14</sup>, em 2000, isolaram saponinas com um grupamento acetila em C-3 da fucose além do grupamento acila em C-4. Esta acetila impede o grupamento acila de migrar entre C-3 e C-4 e, portanto, não há a formação de regioisômeros.

A variação desses substituintes no resíduo de fucose, bem como variações na cadeia de açúcares em C-3 e na estrutura triterpênica da aglicona, são responsáveis pela complexidade do extrato de cascas de *Q. saponaria*.

Dentre as técnicas utilizadas para o isolamento dessas saponinas, foram empregadas cromatografia em coluna com gel de sílica de fase normal e fase reversa, e CLAE, sendo esta última a mais utilizada. Assim, empregaram-se colunas de fase reversa e sistemas eluentes com variações de pH. Por

exemplo, em pH 6,8 contendo acetato de amônio como tampão, foi possível realizar a separação de estruturas que diferem no oligossacarídeo em C-28. Através de uma segunda separação por fase reversa em meio mais ácido (pH 2,8) e utilizando tampão fosfato foi possível o isolamento de estruturas de acordo com a cadeia de açúcares em C-3.<sup>7</sup>

Para a elucidação estrutural, os compostos isolados foram caracterizados pela análise de seus monossacarídeos. Sendo assim, RMN de <sup>1</sup>H e espectrometria de massas foram utilizadas (MALDI-TOF MS).<sup>7,8,9,10,11,13,14,15</sup> Recentemente, a técnica de espectrometria de massas com ionização por eletronebulização e analisador de espectros seqüencial íon trap (ESI-ITMS) se mostrou útil na caracterização de saponinas em extratos comerciais, identificando fragmentos de íons-chave importantes para a elucidação estrutural.<sup>30</sup> Além disso, a utilização de HILIC (cromatografia líquida de interação hidrofílica) acoplada com espectrometria de massas possibilitou a separação de misturas de saponinas de *Q. saponaria*, inclusive de isômeros.<sup>31</sup>

Em adição à análise instrumental das saponinas, a análise química de fragmentos também é uma necessidade, visto que a estrutura destes compostos é muito complexa. Através de hidrólise ácida é possível a obtenção da aglicona e dos açúcares. A hidrólise alcalina branda possibilita a identificação da saponina sem o resíduo de ácido graxo (desacilssaponina). Esta reação é realizada utilizando 6% de bicarbonato em solução contendo 50% de metanol. A hidrólise alcalina forte possibilita a clivagem da ligação éster presente em C-28, resultando em uma saponina monodesmosídica. Outro método de análise química utilizado para a elucidação estrutural é a

degradação das saponinas com diazometano, reação que possibilita a obtenção da saponina sem a cadeia de açúcares ligados ao C-3.<sup>4,5</sup>

Ainda objetivando a elucidação estrutural destes compostos, uma técnica que combina extração em fase sólida com RMN na análise de frações cromatográficas foi empregada. Segundo os autores, este método apresenta vantagens quando comparado aos métodos convencionais, como a simplicidade de manuseio da amostra e a possibilidade de analisar componentes em uma ampla faixa de concentração.<sup>32</sup>

San Martín e Briones<sup>6</sup> estudaram a possibilidade de emprego de madeira e pequenos galhos em substituição às cascas de *Q. saponaria* na obtenção de extratos e obtenção de saponinas, uma vez que as florestas chilenas têm sido intensamente exploradas. Em seus estudos através de CLAE de fase reversa, verificaram que a madeira contém 1,6% de saponinas. Foi ainda demonstrado que, em 1999, a demanda mundial era de 50000 árvores/ano, e, utilizando madeiras e galhos, a demanda poderia ser suprida com 10000 árvores/ano.

### **3. Constituição Química de *Q. brasiliensis***

Segundo estudos anteriormente realizados por nosso grupo de pesquisa,<sup>24,25</sup> a análise da constituição química da fração *n*-butanólica de folhas de *Q. brasiliensis* resultou no isolamento e identificação de 3 compostos, os flavonóides quercetina e rutina, sendo que o primeiro já havia sido relatado em folhas de *Q. saponaria*<sup>27</sup>, e o diterpeno glicosilado éster 19-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo do ácido 16-hidróxi-lambértico (QB-1) (Figura 3a), um dos

principais constituintes das folhas da espécie brasileira. Além disso, estudos demonstraram que este composto não pode ser detectado por cromatografia em camada delgada nas folhas de *Q. saponaria*.<sup>24</sup> Assim, este diterpeno poderia ser utilizado como marcador químico para diferenciar a espécie brasileira de *Q. saponaria*.

Em continuação, o extrato aquoso de folhas de *Q. brasiliensis* foi submetido à hidrólise ácida e cromatografia em coluna, resultando no isolamento da substância QB-H1 (Figura 3b), identificada como a pró-sapogenina do ácido 3-O-β-D-glicuronopiranosil-quiláico através de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Além disso, foram obtidas frações enriquecidas em saponinas de *Q. brasiliensis* (denominadas QB-80 e QB-90), que, através de RMN de <sup>1</sup>H, apresentaram estrutura química semelhante às misturas comerciais de saponinas de *Q. saponaria*, Sigma<sup>®</sup> e Quil-A<sup>®</sup> (Brenntag Biosector<sup>®</sup>), demonstrando, assim, a similaridade estrutural deste metabólito entre as duas espécies congêneres.<sup>24,25</sup>

Neste mesmo estudo, foi realizada a comparação cromatográfica da hidrólise ácida dos extratos aquosos de cascas, folhas e ramos de *Q. brasiliensis*, bem como das frações QB-80 e QB-90 e as amostras de *Q. saponaria*, Quil-A<sup>®</sup> e a mistura de saponinas Sigma<sup>®</sup>. Foi possível concluir que nos extratos aquosos de folhas e ramos de *Q. brasiliensis*, bem como nas frações QB-80 e QB-90, existem saponinas com perfil cromatográfico similar àquelas da espécie chilena.

#### **4. Atividade imunoadjuvante de *Q. saponaria***

Pela definição original, qualquer material que possibilite o aumento da resposta imune frente a um antígeno é conhecido por imunoadjuvante. Estes podem ser classificados em dois grupos, de acordo com seu mecanismo de ação. O primeiro grupo é conhecido por adjuvante imunoestimulante, por possuir a capacidade de agir diretamente sobre o sistema imune e aumentar a resposta aos antígenos, como, por exemplo, pode-se citar: receptores toll-like, citocinas, saponinas e exotoxinas bacterianas. O outro grupo tem a propriedade de agir como veículo, apresentando o antígeno ao sistema imune através de liberação controlada e de sistemas de depósito. Exemplos incluem: sais minerais, emulsões, lipossomas, virossomas e complexos ISCOM e ISCOMATRIX.<sup>33,34</sup>

A maioria dos adjuvantes empregados em vacinas apresenta vários problemas de toxicidade, efeitos adversos consideráveis e atividade limitada para antígenos específicos. Atualmente, os adjuvantes aprovados para vacinas humanas são: sais de alumínio, MF59<sup>TM</sup> (emulsão óleo em água de esqualeno, polisorbato 80 e trioleato de sorbitano), MPL<sup>®</sup> (monofosforil lipídio A), VLP (partícula semelhante a vírus modificada), IRIV (virossomas do vírus influenza imunopotentes) e toxina da cólera. Destes, os sais de alumínio – hidróxi-fosfato de alumínio e hidróxido de alumínio – são os adjuvantes mais utilizados por apresentarem baixa toxicidade, custo baixo e formulação relativamente simples para uso em larga-escala. Por outro lado, apresentam limitações por não induzirem respostas do tipo linfócito T auxiliar 1 (LTA1) e linfócito T citotóxico (LTC), necessárias para controlar patógenos intracelulares como os que

causam tuberculose, malária, leishmaniose, lepra e vírus da imunodeficiência adquirida (HIV).<sup>35</sup>

Dessa forma, tornou-se importante a pesquisa de alternativas de adjuvantes capazes de aumentar a resposta imune em vacinas contra patógenos intracelulares.

As saponinas de *Q. saponaria*, quando comparadas com imunoadjuvantes que são apenas veículos de liberação de antígenos, mostraram-se capazes de ativar um estado de sensibilidade generalizada, estimulando a resposta humoral e celular do sistema imune e podendo assim ser utilizadas com uma ampla gama de antígenos.<sup>36</sup> Esta atividade imunoadjuvante foi observada tanto para administração oral quanto por via parenteral.<sup>1</sup>

#### 4.1 Mecanismos de ação da atividade imunoadjuvante de *Q. saponaria* e estudos de relação estrutura-atividade (REA)

O mecanismo de ação das saponinas de *Q. saponaria* ainda não está totalmente esclarecido. Entretanto, a habilidade destes compostos em induzir uma forte resposta celular tipo LTA1 está bem estabelecida, e a produção de interleucina 2 (IL 2) e interferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) já foi demonstrada para um vasto número de antígenos. Além disso, um aumento de anticorpos da subclasse imunoglobulina 2 (IgG2a e IgG2b), dependente de IFN- $\gamma$  também deve ser destacado.<sup>37,38,39,40</sup>

A resposta do tipo linfócito T auxiliar 2 (LTA2) é menos clara e varia de acordo com o antígeno usado e de quais citocinas são analisadas. Além disso,

essas saponinas estimulam a produção de LTC que reconhecem o MHC de classe I. Sendo assim, as saponinas apresentam um mecanismo de ação por indução de anticorpos (resposta humoral) e resposta celular.<sup>37,39</sup>

Estudos de relação estrutura-atividade demonstraram que o aldeído presente na posição 4 da aglicona é responsável pela resposta imune LTA1. Soltisyyk e colaboradores<sup>29</sup> conjugaram o aldeído com pequenos blocos (etilamina, glicina e etilenodiamina) e avaliaram a atividade imunoadjuvante desses compostos modificados, verificando que essas alterações resultaram na perda da atividade adjuvante. Resultados de Palatnik de Sousa<sup>41</sup> sugerem que a proporção de isômeros conformacionais do aldeído triterpênico pode influenciar na totalidade da resposta LTA1. Aldeídos axiais são mais relevantes para a resposta imune humoral, enquanto que aldeídos equatoriais são mais importantes para a resposta imune celular.

A partir desses resultados, foram propostos dois mecanismos para a estimulação da resposta imune: **(a)** saponinas atuam como mediadores da entrega de antígenos exógenos diretamente no citosol das células apresentadoras de antígeno (CAAs) para processamento e apresentação ao receptor de células T (TCR).<sup>42</sup> A entrada das saponinas no citosol das CAAs ocorre devido provavelmente às características tensoativas destas moléculas. A saponina pode intercalar-se com o colesterol da membrana celular formando poros, através dos quais o complexo saponina-antígeno chega ao citoplasma<sup>39</sup> e **(b)** saponinas contendo aldeído em C-4 reagem com grupos amino do TCR, ocorrendo a formação de um grupo imino e gerando a co-estimulação necessária para ativação das células T.<sup>42</sup>

Além do grupamento aldeído, foi demonstrado que modificações no grupamento carboxílico presente no ácido glicurônico, localizado no C-3 da aglicona de várias saponinas como QS-7, QS-17, QS-18 e QS-21, mantiveram a atividade adjuvante para estimulação de anticorpos, induzindo aumento do título de anticorpos semelhantemente ao induzido por QS-21, entretanto, a dose necessária para estimular a resposta foi muito maior.<sup>29</sup> Por outro lado, a presença do resíduo de ácido graxo ligado à fucose em C-28, parece ser responsável pela produção de LTC contra proteínas exógenas, além de estar envolvido com a toxicidade e instabilidade química das saponinas.<sup>43</sup>

Kensil e colaboradores<sup>44</sup> verificaram que a saponina desacilada DS-1 (saponina QS-21 sem o resíduo de ácido graxo) não estimula elevados níveis de anticorpos contra o antígeno experimental albumina de ovo (OVA), nem resposta do tipo LTC.

Marciani e colaboradores<sup>43</sup> também avaliaram a atividade adjuvante de saponinas desaciladas, produtos de hidrólise de saponinas em condições fisiológicas, concluindo que estas não estimularam fortemente uma resposta imune primária. Estas saponinas não apresentaram capacidade de estimular resposta LTA1 e de aumentar os níveis de IgG2a e IgG2b, bem como de estimular resposta do tipo LTC. Ao invés disso, houve estimulação de resposta LTA2 e aumento dos índices de IgG1. Esta inversão da propriedade adjuvante do tipo LTA1 para LTA2 pode ocorrer, por exemplo, durante a armazenagem das vacinas, sendo dependente da temperatura. Os autores também demonstraram que as formas desaciladas são significativamente menos tóxicas que suas precursoras.

Baseando-se nestes resultados, foram propostos mecanismos de ação para saponinas aciladas e desaciladas. O resíduo lipofílico parece aumentar a disponibilidade de aldeído para as células T e permite a entrega de antígenos exógenos às CAAs para processamento por via endógena, gerando, assim, resposta imune LTA1 e produção de LTCs. Já saponinas desaciladas parecem se ligar às lectinas presentes nas CAAs, sendo endocitadas, gerando anticorpos via LTA2.<sup>42</sup>

Marciani e colaboradores<sup>45</sup>, em 2000, desenvolveram uma mistura de derivados semi-sintéticos de saponinas de *Q. saponaria* (GPI-0100) com o objetivo de estudar a estabilidade em soluções aquosas e a atividade adjuvante (Figura 4). Para isso, promoveram a desacilação e posterior acoplamento de uma cadeia hidrofóbica (dodecilamina) através de uma ligação amida ao grupamento carboxílico do ácido glicurônico presente na posição 3 da aglicona. GPI-0100 mostrou-se estável quimicamente e com toxicidade negligenciável. Em relação à resposta imune, GPI-0100 aumentou a resposta LTA1, especialmente os níveis de IgG2a. Além disso, estimulou a produção de LTC, mostrando um perfil semelhante às saponinas naturais. Entretanto, a dose necessária para estimulação desta resposta foi 20 vezes maior que a requerida para saponinas nativas.

O mecanismo de ação proposto para GPI-0100 indica que esta molécula age em ambas CAA e TCR, permitindo a entrega do antígeno para CAAs a fim de que ocorra o processamento endógeno.<sup>42</sup> Atualmente, GPI-0100 está sendo empregado em um estudo para formulação de vacina contra HSV tipo 1, em camundongos. Estudos demonstraram que este adjuvante, juntamente com o

antígeno glicoproteína D de HSV tipo 1, diminuíram a mortalidade, número de lesões e títulos virais dos animais.<sup>46</sup>

#### FIGURA 4

Em outro estudo com a finalidade de esclarecer os efeitos da acilação na atividade adjuvante das saponinas de *Q. saponaria*, Liu e colaboradores<sup>47</sup> compararam, em camundongos, um extrato bruto de saponinas desaciladas, com DS-1, com GPI-0100 e com RDS-1 (purificado a partir de GPI-0100, análogo à QS-21). Neste estudo, foi demonstrado que DS-1 estimulou IgG1 em altas doses, porém não houve estímulo de IgG2, sugerindo que a acilação é crítica para resposta LTA1 e menos crítica para LTA2. Também foi avaliado se a reacilação poderia restaurar o efeito adjuvante de IgG1, IgG2a e por LTC, em comparação com QS-21. Os resultados mostraram maior estímulo na resposta de IgG2a por QS-21 do que por RDS-1 e GPI-0100 e que não há diferenças significativas entre GPI-0100 e saponinas desaciladas para a estimulação de IgG1a, IgG2a e de LTC. Sendo assim, a reacilação de desacilssaponinas não aumentou a atividade adjuvante das saponinas desaciladas. Também foi sugerida a hipótese de que a estimulação residual de IgG2a e LTC por GPI-0100 e com as desacilssaponinas pode ser devido a presença de QS-7 e outras saponinas nativas minoritárias, que, por apresentarem uma menor cadeia de ácidos graxos, podem não ter sido desaciladas como o previsto pela metodologia.

A fim de esclarecer a hipótese, Marciani e colaboradores<sup>48</sup> dividiram a fração GPI-0100 em duas sub-frações: RP18-1 e RP18-2 e testaram as mesmas em camundongos. A fração RP18-1 continha apenas saponinas desaciladas, enquanto que a fração RP18-2 continha os derivados reacilados

das desacilssaponinas. A atividade adjuvante foi comparada com alumínio e com as saponinas de *Q. saponaria* e testadas com o antígeno OVA. A fração RP18-1 estimulou a resposta LTA2 (produção de IgG1) e a RP18-2 estimulou resposta LTA1 (produção de IgG2a, IFN- $\gamma$ , IL-2) e LTC. A atividade imunoadjuvante obtida por RP18-2 foi cinco vezes menor que das saponinas nativas, porém sua baixa toxicidade permite sua utilização em altas doses. A elucidação estrutural de RP18-2 mostrou que os componentes são derivados de QS-7, QS-17, QS-18 e QS-21 dessaciladas e que QS-7 não está presente na fração, não podendo, portanto, ser a responsável pela atividade observada.

#### 4.2 Toxicidade

O emprego de saponinas de *Q. saponaria* em formulações de vacinas apresenta dois inconvenientes: sua toxicidade e sua instabilidade em soluções aquosas. Como mencionado anteriormente, algumas apresentam atividade hemolítica significativa, além de causarem reações locais e dor após a inoculação. Assim, tentativas de reduzir a toxicidade destas moléculas foram realizadas.

Em 1997, Rönnerberg e colaboradores<sup>49</sup> testaram os efeitos da modificação no resíduo de carboidratos da fração QH-B sobre a atividade adjuvante e a toxicidade. O tratamento do açúcar com periodato de sódio provocou a clivagem da ligação carbono-carbono entre hidroxilas vicinais e subsequente formação de dois grupamentos aldeído. Esta modificação promoveu a diminuição da toxicidade; entretanto, a atividade adjuvante de QH-B também foi reduzida.

Waite e colaboradores<sup>50</sup> avaliaram diferentes formulações contendo QS-21 a fim de determinar a influência de características da formulação, como pH e excipientes (hidróxido de alumínio, álcool benzílico, ciclodextrina, polissorbato 80), na incidência de dor aguda no local da injeção, efeito adverso comumente relatado. As formulações foram avaliadas em ensaios clínicos fase I com pacientes saudáveis, em que cada indivíduo era seu próprio controle. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que QS-21 está associada à dor na injeção em formulações contendo apenas tampão, independente do pH empregado, mas que é possível aumentar a aceitabilidade das formulações com a utilização de álcool benzílico, ciclodextrinas e polissorbato 80.

### 4.3 Aplicações em Vacinas

#### 4.3.1 Extratos purificados

Quil-A<sup>®</sup> é o extrato padronizado de saponinas de *Q. saponaria* mais investigado pela atividade imunoadjuvante. Atualmente, é comercializado pela empresa Brenntag Biosector<sup>®</sup> (Dinamarca). Embora sua composição química ainda não tenha sido completamente determinada, tem sido empregado na produção de vacinas veterinárias; um exemplo comercial é a vacina Leucogen<sup>®</sup>, produzida pela indústria francesa Virbac<sup>®</sup> e utilizada para prevenir leucemia felina.<sup>5,40,51</sup>

Em 2000, Stittelaar e colaboradores<sup>20</sup> compararam a atividade imunoadjuvante de Quil-A<sup>®</sup> e frações purificadas a partir deste extrato, na formulação de uma vacina contra sarampo, empregando como antígeno uma

proteína isolada do vírus. Foram selecionadas três formulações diferentes, com o objetivo de serem testadas em fase pré-clínica em ratos.<sup>52</sup> Deste modo, verificou-se que os três candidatos à vacina protegiam os animais no desafio com o vírus do sarampo tipo selvagem. Assim, estes resultados conduziram à avaliação da duração de níveis protetores de anticorpos neutralizantes, em macacos, induzidos por administração em regime único destas formulações. Os resultados obtidos demonstraram que os candidatos testados induziram níveis longos e duradouros de anticorpos neutralizantes nestes animais.<sup>53</sup> Em outra pesquisa envolvendo vacina antiviral, foi analisada uma vacina oleosa suplementada com Quil-A<sup>®</sup> contra a febre aftosa, em camundongos e porcos. Foi observado um aumento significativo nos anticorpos IgG testados, demonstrando uma ação sinérgica entre os componentes Quil-A<sup>®</sup> e óleo mineral presente na vacina.<sup>54</sup>

Além de vacinas antivirais, Quil-A<sup>®</sup> é empregado em formulações de vacinas contra protozoários e bactérias. Peeters e colaboradores<sup>55</sup> avaliaram diferentes formulações de vacinas contra *Neisseria meningitidis* em camundongos utilizando como antígeno proteína de membrana. Vacinas contra *Mycobacterium tuberculosis* também foram avaliadas em camundongos e demonstraram a atividade imunoestimulante de Quil-A<sup>®</sup>.<sup>56</sup>

Quil-A<sup>®</sup> se mostrou eficiente em vacinas contra parasitas, como por exemplo, *Taenia ovis*<sup>57</sup>, *Taenia solium* e *Echinococcus granulosus*.<sup>58</sup> Recentemente, foi demonstrado o papel de Quil-A<sup>®</sup> como adjuvante de uma vacina contra *Fasciola hepatica*, em ovelhas. Pode ser verificada uma diminuição significativa de ovos fecais do parasita e um aumento de anticorpos específicos ao parasita no soro dos animais.<sup>59</sup>

Além de Quil-A<sup>®</sup>, outros extratos purificados de *Q. saponaria* estão sendo empregados na produção de vacinas. Spikoside<sup>®</sup> é um desses extratos, sendo, a partir dele, purificadas as frações QH-A, QH-B e QH-C e a combinação de QH-A e QH-C na proporção 7:3 (ISCOPREP<sup>™</sup> 703).<sup>40</sup> Outro exemplo é o extrato S-4521 produzido pela empresa Sigma<sup>®</sup>, o qual apresentou atividade adjuvante em vacina contra o sarampo, administrada por via oral.<sup>60</sup>

#### 4.3.2 Saponinas isoladas

Além de extratos purificados, foram estudadas as saponinas QS-7, QS-17, QS-18 e QS-21, que foram isoladas por Kensil e colaboradores<sup>28</sup> através de cromatografia de fase reversa da fração Quil-A<sup>®</sup>. Estas saponinas foram testadas em camundongos em comparação com outros adjuvantes, como hidróxido de alumínio. Foram empregados como antígenos albumina bovina sérica (BSA) e citocromo b5. Estas frações induziram um aumento de até 100 vezes do título de anticorpos, principalmente nos níveis de IgG, quando comparados com o grupo controle. Entretanto, apresentaram diferenças no índice hemolítico e toxicidade. A saponina QS-7 não apresentou atividade hemolítica, ao contrário das outras três frações. Em relação à toxicidade, a saponina QS-18 mostrou-se a mais tóxica, sendo letal na dose de 25 µg; enquanto que QS-21 apenas levou à letalidade em doses de 500 µg. Este resultado estimulou a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas contendo QS-21.

A saponina QS-21 (Figura 1), por apresentar elevada atividade adjuvante e baixo nível de toxicidade, tem sido utilizada na formulação de várias vacinas, aumentando a resposta imune de antígenos protéicos, glicoprotéicos e polissacarídeos.

Três ensaios clínicos fase I avaliaram um candidato à vacina contra malária<sup>61,62,63</sup> empregando como antígeno uma proteína recombinante de *Plasmodium falciparum*, codificada como FMP1, e como adjuvante, AS02A (GSK Biologicals), o qual consiste em uma emulsão óleo em água contendo 3-O-desacil-4'-monofosforil-lipídio-A (MPL) e QS-21. Withers e colaboradores<sup>62</sup> avaliaram a segurança, os efeitos adversos e a imunogenicidade da vacina FMP1/AS02A em crianças de 12 a 47 meses de idade. Foram empregadas diferentes doses de antígeno:adjuvante (10:100; 25:250; 50:500 µg/µL). Os autores verificaram que as crianças que receberam a vacina apresentaram significativamente maior dor e inchaço no local da injeção, quando comparadas com outra vacina – Imovax<sup>®</sup> (anti-rábica). Após 12 meses, FMP1/AS02A mostrou-se segura e imunogênica para as crianças em estudo expostas à malária. Outro estudo foi realizado com a mesma vacina, na dose de 50:500 µg/µL (FMP1:AS02A) em quarenta africanos adultos saudáveis, com idade entre 18 e 55 anos. Os autores concluíram que a vacina foi bem tolerada e altamente imunogênica para os indivíduos em estudo, e que foi capaz de estimular resposta imune em clones parasitários geneticamente diferentes.<sup>61</sup>

Um ensaio clínico fase II está sendo conduzido com outro candidato à vacina contra malária. O antígeno empregado foi RTS,S (proteína recombinante de *Plasmodium falciparum*, que contém uma porção terminal da proteína do circumsporozoítio (CSP) fundida com o antígeno de superfície do

vírus da hepatite B) e como adjuvante, AS02A. Este candidato foi testado em 60 crianças, com idade entre 1 e 4 anos. A dose utilizada foi de 25:250 µg/µL (RTS,S/AS02A). Os autores consideraram a vacina em estudo segura e bem tolerada, nas condições testadas.<sup>64</sup> Em 2008, a vacina foi testada em 894 crianças africanas de 5-17 meses, mostrando eficácia de 56% contra episódios de malária.<sup>65</sup>

Outro estudo, realizado em 340 bebês, testou o candidato em três doses, que foram administradas em 8, 12 e 16 semanas de idade. A vacina mostrou 65,2% de eficácia contra a primeira infecção de malária seis meses após a terceira dose da vacina. Um total de 98,6% dos pacientes que receberam a vacina apresentou anticorpos anticircunsporozoíto um mês após a vacinação. Os autores concluíram que a vacina apresentou um perfil seguro, além de apresentar alta imunogenicidade.<sup>66</sup>

A vacina sintética contra malária SPf66 foi o alvo de estudo de Bermúdez e colaboradores.<sup>67</sup> Dentre os diversos ensaios realizados, a utilização de QS-21 foi comparada ao hidróxido de alumínio, em humanos. Os autores observaram um aumento significativo nos títulos de anticorpos contra Spf66 (até 150x) na formulação com QS-21 em comparação com os resultados obtidos com hidróxido de alumínio.

A saponina QS-21 tem sido ainda utilizada em vacinas contra o vírus da hepatite B (HBV). Em um ensaio clínico fase I, foram avaliadas diferentes formulações de vacinas, empregando um antígeno de superfície recombinante. Foram testadas formulações contendo MPL e QS-21 formuladas em emulsão óleo em água ou em lipossomas. Foi demonstrado que a formulação contendo

lipossomas resultou na resposta imune celular mais forte e durável após duas doses da vacina, sendo, assim, escolhida para continuação dos estudos.<sup>68</sup>

Uma vacina contra HIV utilizando como antígeno uma proteína recombinante do envelope viral suplementada com QS-21 foi utilizada em estudos clínicos fase I. Foi demonstrado um aumento significativo de resposta imune celular e humoral nos voluntários testados.<sup>69</sup> Entretanto, foram demonstradas reações locais que não foram observadas em estudos pré-clínicos, incluindo reações de hipersensibilidade tardia tipo IV e vasculite sistêmica temporária.<sup>70</sup>

A atividade imunoadjuvante de QS-21 tem sido avaliada ainda em vacinas para tratamento de influenza<sup>71</sup>, HSV<sup>72</sup>, vírus sincicial respiratório<sup>73</sup>, rotavirus<sup>74</sup> e diversos tipos de câncer, como por exemplo, melanoma<sup>75</sup>, câncer de mama, ovário e trompas de falópio<sup>76</sup>, demonstrando ser ativa.

#### 4.3.3 ISCOMs

As saponinas de *Q. saponaria* e seus extratos purificados podem ser utilizados em sua forma livre ou na forma de um complexo imunoestimulante, conhecido como ISCOM. Este é constituído por saponinas de *Quillaja*, colesterol e fosfolipídios como fosfatidilcolina ou etanolamina, que, através de interações hidrofóbicas com moléculas anfipáticas, formam uma partícula rígida, esférica e oca, de aproximadamente 30-40nm de diâmetro. Estas moléculas anfipáticas presentes no ISCOM são derivadas de paredes de células e membranas de uma variedade de vírus, bactérias e parasitas, e são incorporadas através do fosfolipídio. As saponinas apresentam alta afinidade

pelo colesterol, facilitando assim, a estabilidade do complexo. Se a mistura não apresentar proteína (antígeno), o complexo é conhecido por ISCOMATRIX.<sup>39,40,77</sup>

O mecanismo de ação demonstrado pelos ISCOMs ocorre através da ativação de CAAs, sendo que essas partículas são internalizadas através de células dendríticas, macrófagos e células B.<sup>42</sup> Foi demonstrada a habilidade destas moléculas gerarem resposta imune LTA1 e LTA2.<sup>78</sup>

As vantagens do ISCOM em relação ao uso de saponinas em forma livre são a redução de antígeno necessário e da dose de adjuvante, resultando no aumento da resposta imune, visto que a utilização de moléculas monoméricas torna o antígeno pouco imunogênico. Quando os antígenos são incorporados em partículas de forma multimérica, ocorre uma mimetização das partículas do patógeno como um todo, com conseqüente aumento de eficiência.<sup>79</sup> Um efeito adverso significativo de saponinas é sua propriedade de lisar células, relacionado principalmente com a grande afinidade das mesmas pelo colesterol das membranas celulares. Conseqüentemente, na forma de ISCOMs, as interações das saponinas ficam bloqueadas em nível de colesterol, e a lise das células é praticamente nula. Em razão disso, ISCOMs produzem mínimos efeitos adversos.<sup>40,77</sup>

É relevante destacar que o emprego de ISCOM é capaz de induzir resposta imune local e sistêmica após administração por via oral ou intranasal.<sup>80,81</sup> Quando antígenos derivados de organismos purificados ou membranas celulares são incorporados em ISCOMs, estas moléculas são normalmente ancoradas por uma ligação hidrofóbica transmembrana celular ou

viral. O antígeno é extraído por tratamento com detergentes e são integrados ao ISCOMATRIX. Quando o detergente é removido, o ISCOM é formado.

A incorporação de moléculas hidrofílicas em ISCOMs é um pouco mais complexa. Modificações estruturais como desnaturações das proteínas, diminuição de pH ou aumento da temperatura, podem auxiliar a descobrir regiões hidrofóbicas das proteínas; entretanto, estas modificações podem modificar o epítipo dos antígenos impedindo o reconhecimento por células B dependentes. Uma alternativa para este problema é a ligação covalente com ácidos graxos para solubilizar estas proteínas. Um vasto número de proteínas solúveis como OVA, citocromo C, glicoproteína recombinante de HIV-1, foram incorporadas com sucesso em ISCOMs devido à ligação com ácido palmítico ou ácido mirístico.<sup>39</sup> Outras abordagens possíveis incluem a ligação covalente do antígeno em grupos funcionais dos fosfolipídios, gerando um peptídeo recombinante com um “alvo” hidrofóbico; ou a ligação de peptídeos através de carga eletrostática; isto é, gerar um ISCOM com carga positiva, para facilitar a ligação de antígenos aniônicos.

Recentemente, Lendemans e colaboradores<sup>82</sup> desenvolveram um sistema em que o componente da formulação, colesterol, foi substituído por um derivado de colesterol catiônico (3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]-colesterol. Estas partículas foram denominadas de “PLUSCOMs”. McBurney e colaboradores<sup>78</sup> compararam a eficiência dessas partículas em relação aos ISCOMs “clássicos” pela habilidade de produzir resposta imune contra o antígeno OVA. Ambos se mostraram igualmente efetivos na indução de resposta celular, porém PLUSCOMs apresentaram a vantagem de incorporar a proteína antigênica sem modificações, ao contrário dos ISCOMs.

Um estudo pré-clínico foi realizado utilizando ISCOMATRIX e ISCOMs, na produção de vacina contra *Helicobacter pylori*, em camundongos. A imunização com estas partículas produziu imunização equivalente à induzida pelo adjuvante da toxina da cólera e se mostrou efetiva por via intranasal e subcutânea.<sup>83</sup> Vacinas contra o vírus influenza utilizando ISCOMATRIX foram avaliadas por administração intranasal em camundongos e demonstraram maior eficiência na indução de anticorpos do que vacinas testadas sem adjuvantes.<sup>84</sup>

A primeira vacina comercial contendo ISCOMs foi produzida em 1989 pela indústria ISCOTEC AB<sup>®</sup> (Suécia) contra Influenza eqüina. Seu nome comercial é ISCOVAC FLU vet<sup>TM®</sup>. Esta vacina foi formulada com Quil-A<sup>®</sup> e contém as proteínas neuraminidase e hemaglutinina do envelope viral, induzindo uma resposta imune por aproximadamente 15 meses.<sup>39</sup> A indústria ISCONOVA<sup>®</sup> (Suécia) também possui no mercado vacinas veterinárias formuladas com ISCOMs: Equip<sup>®</sup> está no mercado desde 1997 e é utilizada contra influenza eqüina; Bovine Viral Diarrhea Vírus Vaccine<sup>®</sup>, disponível no mercado desde 2003, é utilizada contra diarreia viral bovina.<sup>85</sup>

## **5. Atividade imunoadjuvante de *Q. brasiliensis***

A atividade imunoadjuvante dos extratos de cascas, folhas e ramos de *Q. brasiliensis*, bem como da fração purificada em saponinas QB-90 (doses de 100, 400, 400 e 100 µg, respectivamente) foi testada numa vacina experimental contra HSV-1 bovino em camundongos.<sup>26</sup> Os resultados demonstraram que os extratos e a fração QB-90 foram capazes de potencializar a resposta imune ao

antígeno HSV-1 bovino de modo comparável ao obtido com a fração Quil-A<sup>®</sup> (100 µg) da espécie chilena.

Além disso, foram realizados estudos em relação à toxicidade dos extratos aquosos e da fração purificada QB-90 quando administradas pela via subcutânea. Foram demonstrados que o intervalo de doses de 50-1600 µg para o extrato aquoso e 50-400 µg para QB-90 não induziram letalidade nos animais. Também foi observada a ausência de um perfil dose-dependente para a atividade imunoadjuvante de QB-90, nas doses testadas, empregando-se o antígeno HSV-1 bovino.

## **6. Considerações Finais**

Conforme relatado nesta revisão, as saponinas de *Q. saponaria* apresentam alta complexidade estrutural, e, para possibilitar a elucidação, é necessária a utilização de CLAE, RMN e espectrometria de massas. Duas diferenças estruturais são peculiares às saponinas desta espécie: um domínio de ácido graxo e um grupamento aldeído ligado à posição 4 da aglicona.

Estas saponinas apresentam importância industrial, e, além disso, possuem potencial para serem utilizadas em vacinas veterinárias e humanas, destacando-se os ensaios clínicos contra diversas doenças infecciosas e câncer contendo a saponina QS-21, os resultados promissores da fração Quil-A<sup>®</sup> em vacinas contra vírus, bactérias e protozoários e a indução de resposta protetora em diferentes famílias de vírus e espécies bacterianas pelo complexo imunestimulante ISCOM.

As saponinas de *Q. brasiliensis* ainda não foram tão vastamente estudadas em comparação à espécie chilena. Estudos realizados relataram a presença, em folhas, de saponinas funcional e estruturalmente semelhantes às encontradas nas cascas de *Q. saponaria*. A fração enriquecida em saponinas, QB-90, obtida a partir do extrato aquoso de folhas da espécie brasileira, demonstrou potencial atividade como adjuvante em vacina contra HSV-1 bovino.

As florestas chilenas estão sendo amplamente devastadas para a exploração de cascas de *Q. saponaria* visando à obtenção de saponinas, gerando um importante prejuízo ecológico e diminuição desta matéria-prima. Sendo assim, a utilização de folhas da espécie brasileira se torna uma alternativa interessante para a exploração sustentável desta matéria-prima.

## 7. Agradecimentos

Ao CNPq e à FAPERGS pelo apoio financeiro.

## 8. Referências

1. Campbell, J. B.; Peerbaye, Y. A.; *Res. Immunol.* **1992**, 143, 526.
2. Sparg, S. G.; Light, M. E.; Van Staden, J.; *J Ethnopharmacol.* **2004**, 94, 219.
3. Vincken, J-P.; Heng, L.; de Groot, A., Gruppen, H.; *Phytochemistry* **2007**, 68, 275.
4. Hostettmann, K.; Marston, A.; *Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins*, Cambridge University Press: New York, 1995.

5. Van Setten, D. C.; Van De Werken, G. *Em Saponins used in traditional and modern medicine*; Waller, G. R.; Yamasaki, K., eds.; Plenum Press: New York, 1996.
6. San Martín, R.; Briones, R.; *Econ. Bot.* **1999**, *53*, 302.
7. Guo, S.; Kenne, L.; *Phytochemistry* **2000**, *54*, 615.
8. Higuchi, R.; Tokimitsu, Y.; Komori, T.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1165.
9. Jacobsen, N. E.; Fairbrother, W. J.; Kensil, C. R.; Lim, A.; Wheeler, D. A.; Powell, M. F.; *Carbohydr. Res.* **1996**, *280*, 1.
10. Guo, S.; Kenne, L.; Lundgren, L. N.; Rönnerberg, B.; Sundquist, B. G.; *Phytochemistry* **1998**, *48*, 175.
11. Nord, L. I.; Kenne, L.; *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 70.
12. Guo, S.; Falk, E.; Kenne, L.; Rönnerberg, B.; Sundquist, B. G.; *Phytochemistry* **2000**, *53*, 861.
13. Guo, S.; Kenne, L.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 419.
14. Nord, L. I.; Kenne, L.; *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 817.
15. Nyberg, N. T.; Kenne, L.; Rönnerberg, B.; Sundquist, B. G.; *Carbohydr. Res.* **2000**, *323*, 87.
16. Coughlin, R. T.; Fattom, A.; Chu, C.; White, A. C.; Winston, S.; *Vaccine* **1995**, *13*, 17.
17. Hancock, G. E.; Speelman, D. J.; Frenchick, P. J.; Mineo-Kuhn, M. M.; Baggs, R. B.; Hahn, D. J.; *Vaccine* **1995**, *13*, 391.
18. Borja-Cabrera, G. P.; Bernardo, R. R.; Paraguai De Souza, E.; Palatnik, M.; Palatnik De Sousa, C. B.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1997**, *92*, 209.
19. Foon, K. A.; Lutzky, J.; Baral, R. N.; Yannelli, J. R.; Hutchins, L.; Teitelbaum, A.; Kashala, O. L.; Das, R.; Garrison, J.; Reifeld, R. A.; Bhattacharya-Chatterjee, M.; *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 376.
20. Stittelaar, K. J.; Boes, J.; Kersten, G. F. A.; Spiekstra, A.; Mulder, P. G. H.; De Vries, P.; Roholl, P. J. M.; Dalsgaard, K.; Dobbela, G. V. D.; Alphen, L. V.; Osterhaus, A. D. M. E.; *Vaccine* **2000**, *18*, 2482.
21. Moreno, C. A.; Rodriguez, R.; Oliveira, G. A.; Ferreira, V.; Nussenzweig, R. S.; Castro, Z. R. M.; Calvo-Calle, J. M.; Nardin, E.; *Vaccine* **2000**, *18*, 89.
22. Evans, T. G.; Mcelrath, M. J.; Matthews, T.; Montefiori, D.; Weinhold, K.; Wolff, M.; Keefer, M. C.; Kallas, E. G.; Corey, L.; Gorse, G. J.; Belshe, R.; Graham, B. S.; Spearman, P. W.; Schwartz, D.; Mulligan, M. J.; Goepfert, P.;

Fast, P.; Berman, P.; Powell, M.; Francis, D.; Niaid Aids Vaccine Evaluation Group; *Vaccine* **2001**, *19*, 2080.

23. Friede, M.; Aguado, M. T.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 325.

24. Kauffmann, C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.

25. Kauffmann, C.; Machado, A. M.; Fleck, J. D.; Provensi, G.; Pires, V. S.; Guillaume, D.; Sonnet, P.; Reginatto, F. H.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; *Nat. Prod. Res.* **2004**, *18*, 153.

26. Fleck, J. D.; Kauffmann, C.; Spilki, F.; Lencina, C. L.; Roehe, P. M.; Gosmann, G.; *Vaccine* **2006**, *24*, 7129.

27. Varshney, I. P.; Beg, M. F. A.; Sankaram, A. V. B.; *Fitoterapia* **1985**, *56*, 254.

28. Kensil, C. R.; Patel, U.; Lennick, M.; Marciani, D.; *J. Immunol.* **1991**, *146*, 431.

29. Soltysik, S.; Wu, J. Y.; Recchia, J.; Wheeler, D. A.; Newman, M. J.; Coughlin, R. T.; Kensil, C. R.; *Vaccine* **1995**, *13*, 1403.

30. Bankefors, J.; Nord, L. I.; Kenne, L.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2008**, *90*, 178.

31. Wang, Y.; Lu, X.; Xu, G.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1181*, 51.

32. Nyberg, N. T.; Kenne, L.; Rönnerberg, B.; Sundquist, B. G.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 268.

33. Aguillar, J. C.; Rodríguez, E. G.; *Vaccine* **2007**, *25*, 3752.

34. Reed, S. G.; Bertholet, S.; Coler, R. N.; Friede, M.; *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 23.

35. Edelman, R.; *Mol. Biotechnol.* **2002**, *21*, 129.

36. Kirk, D. D.; Rempel, R.; Pinkhasov, J.; Walmsley, A. M.; *Expert Opin Biol Ther* **2004**, *4*, 947.

37. Gupta, R. K.; Siber, G. R.; *Vaccine* **1995**, *13*, 1263.

38. Cox, J. C.; Coulter, A. R.; *Vaccine* **1997**, *15*, 248.

39. Barr, I. G.; Sjölander, A.; Cox, J. C.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **1998**, *32*, 247.

40. Lacaille-Dubois, M. A. Em: *Immunomodulatory Agents from Plants*; Wagner, H., ed.; Birkhäuser Verlag: Basel, 1999.

41. Palatnik de Sousa, C. B.; Santos, W. R.; Casas, C. P.; Paraguai de Souza, E.; Tinoco, L. W.; Da Silva, B. P.; Palatnik, M.; Parente, J. P.; *Vaccine* **2004**, *22*, 2470.
42. Marciani, D. J.; *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 934.
43. Marciani, D. J.; Pathak, A. K.; Reynolds, R. C.; Seitz, L.; May, R. D.; *Int. Immunopharmacol.* **2001**, *1*, 813.
44. Kensil, C. R.; Soltysik, S.; Wheeler, D. A.; Wu, J. Y. Em: *Saponins used in traditional and modern medicine*; Waller, G. R.; Yamazaki, K., eds.; Plenum Press: New York, 1996.
45. Marciani, D. J.; Press, J. B.; Reynolds, R. C.; Pathak, A. K.; Pathak, V.; Gundy, L. E.; Farmer, J. T.; Koratich, M. S.; May, R. D.; *Vaccine* **2000**, *18*, 3141.
46. Quenelle, D. C.; Collins, D. J.; Marciani, D. J.; Kern, E. R.; *Vaccine* **2006**, *24*, 1515.
47. Liu, G.; Anderson, C.; Scaltreto, H.; Barbon, J.; Kensil, C. R.; *Vaccine* **2002**, *20*, 2808.
48. Marciani, D. J.; Reynolds, R. C.; Pathak, A. K.; Finley-Woodman, K.; May, R. D.; *Vaccine* **2003**, *21*, 3961.
49. Rönnerberg, B.; Fekadu, M.; Behboudi, S.; Kenne, L.; Morein, B.; *Vaccine* **1997**, *15*, 1820.
50. Waite, D. C.; Jacobson, E. W.; Ennis, F. A.; Edelman, R.; White, B.; Kammer, R.; Anderson, C.; Kensil, C. R.; *Vaccine* **2001**, *19*, 3957.
51. <http://www.virbac.com>, acessada em Fevereiro 2009.
52. Wide, P. R.; Stittelaar, K. J.; Osterhaus, A. D. M. E.; Guzman, E.; Gilbert, B. E.; *Vaccine* **2000**, *19*, 42.
53. Stittelaar, K. J.; Vos, H. W.; Van Amerongen, G.; Kersten, G. F. A.; Osterhaus, A. D. M. E.; De Swart, R. L.; *Vaccine* **2002**, *21*, 155.
54. Xiao, C.; Rajput, Z. I.; Hu, S.; *Vaccine* **2007**, *25*, 4795.
55. Peeters, C. C. A. M.; Claassen, I. J. T. M.; Schuller, M.; Kersten, G. F. A.; Van der Voort, E. M. R.; Poolman, J. T.; *Vaccine* **1999**, *17*, 2702.
56. Fonseca, D. P. A. J.; Frerichs, J.; Singh, M.; Snippe, H.; Verheul, A. F. M.; *Vaccine* **2001**, *19*, 122.
57. Lightowers, M. W.; Waterkeyn, J. G.; Rothel, J. S.; Gauci, C. G.; Harrison, G. B.; *Parasite Immunol.* **1996**, *18*, 507.
58. Lightowers, M. W.; *Parasitology* **2006**, *133*, S27.

59. Haçariz, O.; Sayers, G.; McCullough, M.; Garrett, M.; O'Donovan, J.; Mulcahy, G.; *Vaccine* **2009**, *27*, 45.
60. Pickering, R. J.; Smith, S. D.; Strugnell, R. A.; Wesselingh, S. L.; Webster, D. E.; *Vaccine* **2006**, *24*, 144.
61. Thera, M. A.; Doumbo, O. K.; Coulibaly, D.; Diallo, D. A.; Sagara, I.; Dicko, A.; Diemert, D. J.; Heppner, D. G. Jr.; Stewart, V. A.; Angov, E.; Soisson, L.; Leach, A.; Tucker, K.; Lyke, K. E.; Plowe, C. V.; Mali FMP1 Working Group; *PLoS Clin Trials* **2006**, *1*, e34.
62. Withers, M. R.; McKinney, D.; Ogutu, B. R.; Waitumbi, J. N.; Milman, J. B.; Apollo, O. J.; Allen, O. G.; Tucker, K.; Soisson, L. A.; Diggs, C.; Leach, A.; Wittes, J.; Dubovsky, F.; Stewart, V. A.; Remich, S. A.; Cohen, J.; Ballou, W. R.; Holland, C. A.; Lyon, J. A.; Angov, E.; Stoute, J. A.; Martin, S. K.; Heppner, D. G. Jr.; MSP-1 Malaria Vaccine Working Group; *PLoS Clin Trials* **2006**, *1*, e32.
63. Stoute, J. A.; Gombe, J.; Withers, M. R.; Siangla, J.; McKinney, D.; Onyango, M.; Cummings, J. F.; Milman, J.; Tucker, K.; Soisson, L.; Stewart, V. A.; Lyon, J. A.; Angov, E.; Leach, A.; Cohen, J.; Kester, K. E.; Ockenhouse, C. F.; Holland, C. A.; Diggs, C. L.; Wittes, J.; Heppner, D. G. Jr.; MSP-1 Malaria Vaccine Working Group; *Vaccine* **2007**, *25*, 176.
64. Macete, E.; Aponte, J. J.; Guinovart, C.; Sacarlal, J.; Ofori-Anyinam, O.; Mandomando, I.; Espasa, M.; Bevilacqua, C.; Leach, A.; Dubois, M. C.; Heppner, D. G.; Tello, L.; Milman, J.; Cohen, J.; Dubovsky, F.; Tornieporth, N.; Thompson, R.; Alonso, P. L.; *Trop. Med. Int. Health* **2007**, *12*, 37.
65. Bejon, P.; Lusingu, J.; Olotu, A.; Leach, A.; Lievens, M.; Vekemans, J.; Mshamu, S.; Lang, T.; Gould, J.; Dubois, M. C.; Demoitié, M. A.; Stallaert, J. F.; Vansadia, P.; Carter, T.; Njuguna, P.; Awuondo, K. O.; Malabeja, A.; Abdul, O.; Gesase, S.; Mturi, N.; Drakeley, C. J.; Savarese, B.; Villafana, T.; Ballou, W. R.; Cohen, J.; Riley, E. M.; Lemnge, M. M.; Marsh, K.; von Seidlein, L.; *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2521.
66. Abdulla, S.; Oberholzer, R.; Juma, O.; Kubhoja, S.; Machera, F.; Membi, C.; Omari, S.; Urassa, A.; Mshinda, H.; Jumanne, A.; Salim, N.; Shomari, M.; Aebi, T.; Schellenberg, D. M.; Carter, T.; Villafana, T.; Demoitié, M. A.; Dubois, M. C.; Leach, A.; Lievens, M.; Vekemans, J.; Cohen, J.; Ballou, W. R.; Tanner, M.; *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2533.
67. Bermúdez, A.; Reyes, C.; Guzmán, F.; Vanegas, M.; Rosas, J.; Amador, R.; Rodríguez, R.; Patarroyo, M. A.; Patarroyo, M. E.; *Vaccine* **2007**, *25*, 4487.
68. Vandepapelière, P.; Horsmans, Y.; Moris, P.; Van Mechelen, M.; Janssens, M.; Koutsoukos, M.; Van Belle, P.; Clement, F.; Hanon, E.; Wettendorff, M.; Garçon, N.; Leroux-Roels, G.; *Vaccine* **2008**, *26*, 1375.

69. Wang, S.; Kennedy, J. S.; West, K.; Montefiori, D. C.; Coley, S.; Lawrence, J.; Shen, S.; Green, S.; Rothman, A. L.; Ennis, F. A.; Arthos, J.; Pal, R.; Markham, P.; Lu, S.; *Vaccine* **2008**, *26*, 3947.
70. Kennedy, J. S.; Co, M.; Green, S.; Longtine, K.; Longtine, J.; O'Neill, M. A.; Adams, J. P.; Rothman, A. L.; Yu, Q.; Johnson-Leva, R.; Pal, R.; Wang, S.; Lu, S.; Markham, P.; *Vaccine* **2008**, *26*, 4420.
71. Mbawuike, I.; Zang, Y.; Couch, R. B.; *Vaccine* **2007**, *25*, 3263.
72. Mikloska, Z.; Rückholdt, M.; Ghadiminejad, I.; Dunckley, H.; Denis, M.; Cunningham, A. L.; *J. Immunol.* **2000**, *164*, 5167.
73. Hancock, G. E.; Speelman, D. J.; Frenchick, P. J.; Mineo-Kuhn, M. M.; Baggs, R. B.; Hahn, D.J.; *Vaccine* **1995**, *13*, 391.
74. Madore, H. P.; Estes, M. K.; Zarley, C. D.; Hu, B.; Parsons, S.; Digravio, D.; Greiner, S.; Smith, R.; Jiang, B.; Corsaro, B.; Barniak, V.; Crawford, S.; Conner, M. E.; *Vaccine* **1999**, *17*, 2461.
75. Foon, K. A.; Lutzky, J.; Baral, R. N.; Yannelli, J. R.; Hutchins, L.; Teitelbaum, A.; Kashala, O. L.; Das, R.; Garrison, J.; Reisfeld, R. A.; Bhattacharya-Chatterjee, M.; *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 376.
76. Sabbatini, P. J.; Ragupathi, G.; Hood, C.; Aghajanian, C. A.; Juretzka, M.; Isonos, A.; Hensley, M. L.; Spassova, M. K.; Ouerfelli, O.; Spriggs, D. R.; Tew, W. P.; Konner, J.; Clausen, H.; Abu Rustum, N.; Dansihefsky, S. J.; Livingston, P. O.; *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4170.
77. Morein, B.; Hu, K. F.; Abusugra, I.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1367.
78. McBurney, W. T.; Lendemans, D. G.; Myschik, J.; Hennessy, T.; Rades, T.; Hook, S.; *Vaccine* **2008**, *26*, 4549.
79. Behboudi, S.; Morein, B.; Rönberg, B.; *Vaccine* **1995**, *13*, 1690.
80. Morein, B.; Bengtsson, K. L.; *Immunol. Cell Biol.* **1998**, *76*, 295.
81. Mohamedi, S. A.; Heath, A. W.; Jennings, R.; *Antiviral Res.* **2001**, *49*, 83.
82. Lendemans, D. G.; Myschik, J.; Hook, S.; Rades, T.; *J Pharm Sci.* **2005**, *94*, 1794.
83. Skene, C. D.; Doidge, C.; Sutton, P.; *Vaccine* **2008**, *26*, 3880.
84. Coulter, A.; Harris, R.; Davis, R.; Drane, D.; Cox, J.; Ryan, D.; Sutton, P.; Rockman, S.; Pearse, M.; *Vaccine* **2003**, *21*, 946.
85. <http://www.isconova.se>, acessada em Fevereiro 2009.

Legendas das figuras:

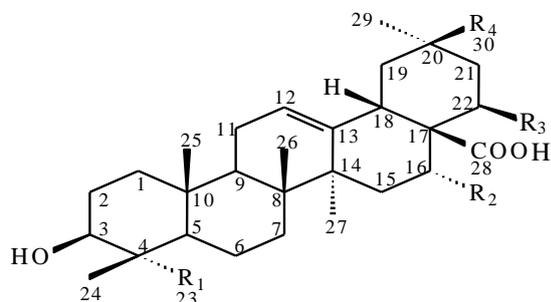
Figura 1: Estrutura da saponina QS-21, isolada de *Q. saponaria*.

Figura 2: Parte do anel de fucose, mostrando o mecanismo de isomerização.

Figura 3: Estrutura das substâncias QB-1 (a) e QB-H1 (b).

Figura 4: Síntese de GPI-0100 a partir de saponinas desaciladas.

TABELA 1: Variações estruturais observadas nas saponinas de *Q. saponaria*: agliconas e cadeias de açúcares ligadas a C-3 e a C-28.



#### AGLICONAS

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
ÁCIDO QUILÁICO	CHO	OH	H	CH <sub>3</sub>
ÁCIDO 22β-HIDRÓXI-QUILÁICO	CHO	OH	OH	CH <sub>3</sub>
ÁCIDO EQUINOCÍSTICO	CH <sub>3</sub>	OH	H	CH <sub>3</sub>
ÁCIDO FITOLACAGÊNICO	CH <sub>2</sub> OH	H	H	COOCH <sub>3</sub>

#### □ CADEIAS SACARÍDICAS LIGADAS AO C-3 DA AGLICONA:

- β-D-galactopiranosil-(1→2)- β-D-glicuronopiranosil
- β-D-galactopiranosil-(1→2)- [α-L-ramnopiranosil-(1→3)]-β-D-glicuronopiranosil
- β-D-galactopiranosil-(1→2)- [β-D -xilopiranosil-(1→3)]-β-D-glicuronopiranosil

#### □ CADEIAS SACARÍDICAS LIGADAS AO C-28 DA AGLICONA:

- β-D-xilopiranosil-(1→4)-[β-D-glicopiranosil-(1→3)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-fucopiranosil
- β-D-apifuranosil-(1→3)-β-D-xilopiranosil-(1→4)-[β-D-glicopiranosil-(1→3)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-fucopiranosil
- β-D-apifuranosil-(1→3)-β-D-xilopiranosil-(1→4)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-fucopiranosil

#### □ ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA CADEIA OLIGOSSACARÍDICA LIGADA AO C-28 DA AGLICONA:

- ácido (S)-2-metilbutanóico
- ácido (3S, 4S)-3-hidróxi-4-metilexanóico
- ácido 3,5-diidróxi-6-metiloctanóico

Figura 1

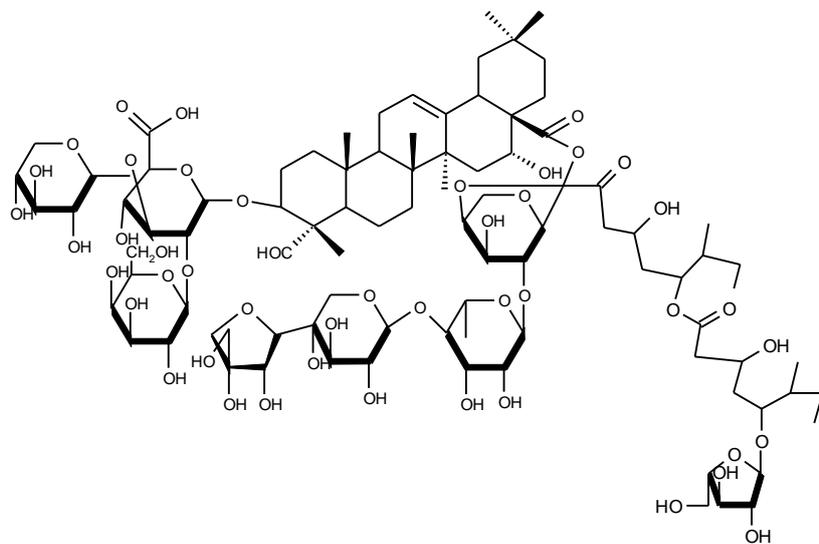


Figura 2

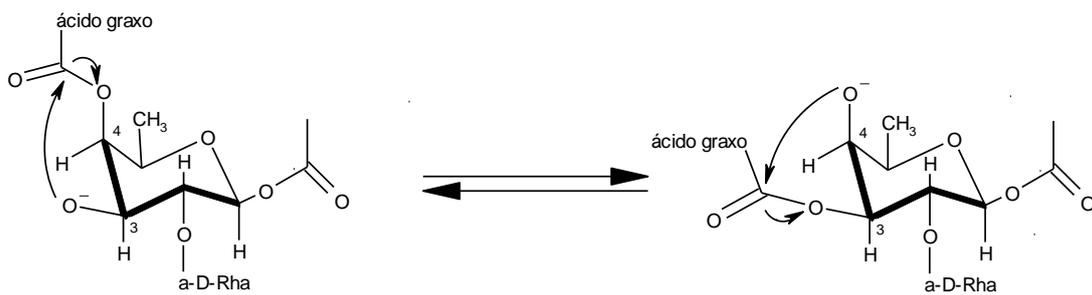


Figura 3

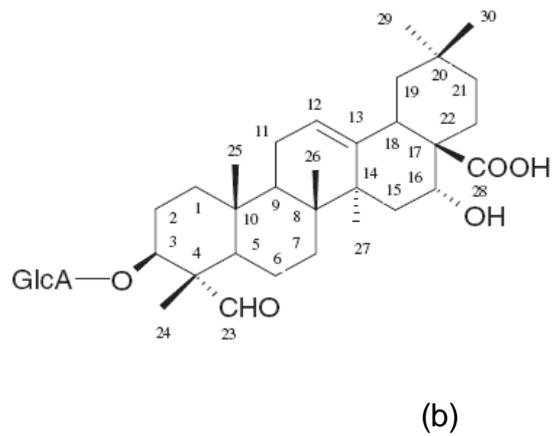
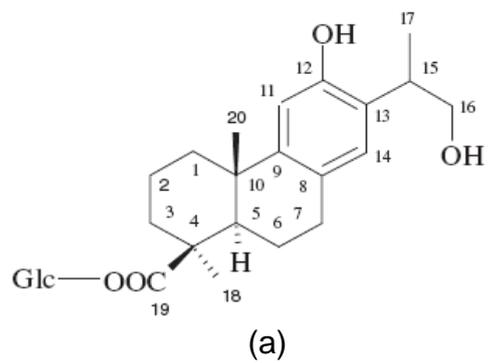
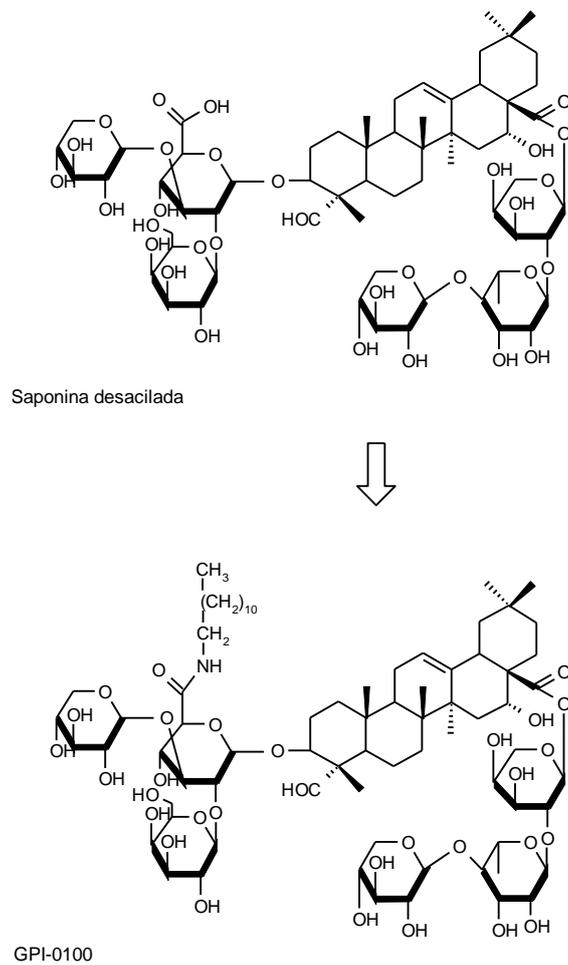


Figura 4



## **CAPÍTULO 2**

**Influence of light, osmotic stress and post harvest procedures on the content of an immunoadjuvant saponin fraction of *Quillaja brasiliensis***

Este capítulo não está incluso pois será submetido à publicação no periódico científico Plant Science

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O acúmulo da fração imunoadjuvante QB-90 de *Q. brasiliensis* é responsivo ao estresse osmótico provocado por sorbitol 0,1M, demonstrando o possível papel de defesa destes terpenos. Este resultado corrobora os estudos sazonais anteriormente realizados por nosso grupo de pesquisa, sugerindo que períodos de menor precipitação estão associados a um maior teor de QB-90.

A faixa de luz vermelha e o aumento de intensidade luminosa regulam positivamente a produção de saponinas de *Q. brasiliensis*, havendo uma aparente atuação do fotorreceptor fitocromo. Não foram observadas mudanças significativas no teor de açúcares nas plantas expostas às diferentes intensidade / qualidade luminosas, demonstrando um efeito genuíno deste fator no metabolismo secundário, e não um efeito indireto, causado por modificações no metabolismo do carbono.

O conteúdo de QB-90 de folhas colhidas é mais estável em altas temperaturas quando comparado com cascas sob mesmas condições. Este resultado pode ser devido a perfis diferenciados de expressão de enzimas nos dois tipos de tecidos, como relatado, por exemplo, para peroxidases. São necessários cuidados adicionais para manter os níveis deste metabólito nas cascas, visto que elevadas temperaturas podem causar a degradação desta fração ativa. Este resultado pode auxiliar na busca de um rendimento de extração otimizado em *Q. brasiliensis*.

Além dos estudos de regulação de produção para otimização de manejo e processamento de biomassa produtora de matéria-prima, através do conhecimento do perfil de acúmulo de saponinas é possível identificar

indivíduos “elite”, e, a partir deles, produzir uma população clonal a fim de ser utilizada como fonte deste metabólito. Para estudos futuros, se torna interessante a busca de marcadores moleculares para seleção destes indivíduos.