

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

**Obtenção e caracterização de frações purificadas de saponinas de
Chenopodium quinoa e avaliação da formação de complexos do tipo ISCOM
– atividades biológicas das frações e dos complexos formados**

SIMONE GASPARIN VERZA

PORTO ALEGRE, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Obtenção e caracterização de frações purificadas de saponinas de
Chenopodium quinoa e avaliação da formação de complexos do tipo ISCOM
– atividades biológicas das frações e dos complexos formados**

Tese apresentada por **SIMONE
GASPARIN VERZA** para obtenção do
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

PORTO ALEGRE, 2011

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 11.11.2011 pela Banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cabral Pavel
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Valquíria Linck Bassani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Verza, Simone Gasparin

Obtenção e caracterização de frações purificadas de saponinas de *Chenopodium quinoa* e avaliação da formação de complexos do tipo ISCOM - atividades biológicas das frações e dos complexos formados / Simone Gasparin Verza. -- 2011.
114 f.

Orientador: George González Ortega.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. *Chenopodium quinoa*. 2. Saponinas. 3. Imunoadjuvante. 4. ISCOM. 5. Antifúngico. I. Ortega, George González, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG). Análises complementares foram realizadas na Central Analítica do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas; no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Farmácia UFRGS; no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS; na Universidade da República UDELAR (Uruguai) e no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) em Eldorado do Sul

Dedico esse trabalho aos meus pais

Severino e Lourdes

Minha fonte de inspiração e carinho

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. George Ortega pelo profissionalismo, competência, durante os oito anos de nossa convivência, qualidades que me inspiraram. Agradeço pela oportunidade e pela confiança na execução de todos os experimentos.

Ao Professor Dr. Alexandre Fuentefria pelo auxílio na parte experimental, disponibilidade e discussões.

A Professora Dra. Grace Gosmann, coordenadora do projeto PROSUL, pelo auxílio financeiro e incentivo.

Aos colegas e professores do LDG, em especial Samuel e Pedrinho, pela ajuda nos experimentos, discussões, pelo convívio e pelos momentos de lazer. A ausência de vocês vai deixar saudades!!!

Às amigas, mais do que colegas, Ana Paula, Bárbara, Cintia, Greice, Juliana Carini e Regina. Obrigada pelo carinho de vocês e por sempre me ouvirem!!!

Aos colegas do IVPDF, em especial Samuel Cibulski, Ana Paula e Fernando Silveira por todo o auxílio na parte experimental.

Ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF), na pessoa do Professor Paulo Mayorga, pela oportunidade de crescimento científico e profissional; e ao colega Cabral Pavei, pela parceria durante os anos de trabalho.

À todos os meus amigos, que longe ou perto, sempre torceram por mim. Aos meus colegas professores e às minhas alunas também, que sempre me incentivaram.

À Janine, minha amiga de casa, por sempre me ouvir, chorar e rir junto comigo.

Ao Ugo por ter tornado os meus dias mais coloridos, obrigada pelo cuidado, apoio, companheirismo, amor e amizade que trouxeste para minha vida.

À minha família, em especial meu pai Severino e minha mãe Lourdes, que me ensinaram sobre a vida o que sei e sempre torceram por mim. Amo vocês!

RESUMO

As sementes de *Chenopodium quinoa* (quinoa) são conhecidas pelo seu elevado teor de proteína bem como de saponinas. Quimicamente as saponinas de quinoa são triterpenos sendo ácido fitolacagênico, hederagenina, ácido oleanólico e ácido serjânico, as agliconas mais comumente encontradas. Para as saponinas de quinoa existem relatos contraditórios de atividade imunoadjuvante. Complexos imunoestimulantes têm sido bastante estudados nos últimos anos por atuarem como carreadores de antígenos. Esses complexos são constituídos, de saponinas, colesterol, fosfolipídios e um antígeno (ISCOM); na ausência de um antígeno são denominados de matrizes ISCOM. Para as saponinas de quinoa a possibilidade de formação de matrizes ISCOM não está completamente elucidada. Esse trabalho teve como objetivo a caracterização química das principais saponinas presentes nas sementes de *C. quinoa* bem como a avaliação das atividades antifúngica e imunoadjuvante. Agregados micelares formados por auto-associação das saponinas, bem como os complexos formados quando da formulação com colesterol e fosfatidilcolina também foram avaliados. O método de purificação das saponinas de quinoa utilizando resina poliaromática permitiu a obtenção de duas frações saponosídicas principais denominadas FQ70 e FQ90. Nessas frações foram caracterizadas dez saponinas triterpênicas bidesmosídicas pela técnica de UPLC/Q-TOF-MS. Um método por CLAE foi desenvolvido e validado para a determinação do conteúdo de saponinas nas frações de quinoa. A atividade antifúngica das frações de quinoa foi avaliada pelo método da microdiluição em placa para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As frações foram inativas frente a todas as leveduras avaliadas. No entanto, todos os fungos dermatófitos testados foram suscetíveis às frações de quinoa. Os agregados formados por auto-associação das saponinas em solução aquosa bem como as nanoestruturas formadas após a complexação das saponinas de quinoa com colesterol (CHOL) e fosfatidilcolina (PC) foram estudados em diferentes proporções. As técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstraram estruturas esféricas e micelas filiformes. Em condições experimentais similares àquelas relatadas para a formação de matrizes ISCOM de saponinas de *Quillaja saponaria*, foram observadas estruturas tubulares e

micelas anelares. A composição de saponinas das frações de quinoa parece determinar o tipo de nanoestrutura observada por MET. A toxicidade das frações de quinoa foi avaliada pela determinação da atividade hemolítica, toxicidade frente à *Artemia salina* e toxicidade aguda em camundongos. FQ70 foi praticamente atóxica frente à *A. salina*, no entanto, FQ90 apresentou toxicidade. Ambas as frações de quinoa foram menos hemolíticas quando comparadas com Quil A (extrato purificado *Q. saponaria*). Para avaliar a atividade imunoadjuvante camundongos foram imunizados somente com ovoalbumina (OVA) ou com OVA e os adjuvantes Quil A (adjuvante controle), FQ70 ou FQ90. Hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) foi avaliada 28 dias após o *priming*. A proliferação de esplenócitos com os mitógenos Concanavalina A (Con A)-, lipopolissacarídeo e OVA, foi avaliada 28 dias pós *priming*. Ambas as frações de quinoa promoveram um estímulo da resposta imune humoral e celular, porém de forma diferenciada.

Palavras-chave: *Chenopodium quinoa*, saponinas, antifúngico, UPLC/Q-TOF-MS, colesterol, fosfatidilcolina, imunoadjuvante, toxicidade

ABSTRACT

Chenopodium quinoa (quinoa) seeds are a rich protein source and well-known for their high saponin content. Chemically, quinoa saponins are triterpene glycosides being phytolaccagenin, hederagenin, oleanolic and serjanic acids the most common aglycones found in seeds. Its immunoadjuvant properties have been examined and the results obtained were conflicting. Mixed micelles composed of saponin, cholesterol and phospholipids, either containing antigen (ISCOM) or not (ISCOM matrix), have been under intensive development in recent years due to their ability to act as antigen presenting-carriers with remarkable immunostimulating properties. The formation of ISCOM or other clearly defined micellar structures with quinoa saponins remained uncorroborated. The objectives of this study were the chemical structure characterization of main saponins present in *C. quinoa* seeds and the evaluation of antifungal and immunoadjuvant properties related to them. Also, micellar aggregates formed by self-association in aqueous solutions by quinoa saponins as well as nanostructures formed after their complexation with cholesterol (CHOL) and phosphatidylcholine (PC) were evaluated. The separation method of quinoa saponins using a polyaromatic resin allowed the preparation of two purified and enriched fractions, FQ70 and FQ90. Ten triterpenic saponins were chemically characterized by UPLC/Q-TOF-MS in quinoa saponin fractions. A LC-method was developed and validated aiming the saponin content assay in quinoa saponin fractions. The antifungal activity of quinoa fractions was evaluated by broth microdilution method for the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC). Both fractions were inactive against all yeasts tested. However all dermatophyte fungi were susceptible to quinoa saponin fractions. The aggregates formed by self-association in aqueous solutions by two quinoa saponin fractions, as well as several distinctive nanostructures formed after their complexation with cholesterol and phosphatidylcholine at different ratios were studied. Dynamic Light Scattering (DLS) and Transmission Electron Microscopy (TEM) showed novel nanosized spherical vesicles formed by self-association and worm-like micelles in quinoa saponin fractions. When experimental conditions, similar to those reported for the preparation of *Quillaja saponaria* ISCOM matrices, tubular and ring-like micelles arose from quinoa saponin fractions. The

saponin composition of quinoa fractions seems determines the nanosized structures viewed by TEM. The toxicity of quinoa fractions were assayed by haemolytic, toxicity to brine shrimps, and acute toxicity in mice tests. FQ70 was almost atoxic however, for FQ90 presented toxicity against shrimps. The quinoa saponin fractions were less haemolytic than Quil A (purified extract from *Q. saponaria*). To evaluate immunoadjuvant activity, mice were immunized subcutaneously with ovoalbumin (OVA) alone or adjuvanted with Quil A (adjuvant control), FQ70 or FQ90. Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) were assayed 28 days post-priming and Concanavalin A (Con A)-, Lipopolysaccharide-, and OVA-stimulated splenocyte proliferation were also measured 28 days post-priming. The results suggested that the two quinoa saponin fractions enhanced significantly the production of humoral and cellular immune responses to OVA in mice.

Keywords: *Chenopodium quinoa*, saponins, antifungal, UPLC/Q-TOF-MS, cholesterol, phosphatidylcholine, immunoadjuvant, toxicity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1a.** Estrutura geral das principais saponinas relatadas para *C. quinoa* e as respectivas agliconas. 30
- Figura 1.1** Cromatograma por CLAE do extrato de *C. quinoa* liofilizado (EXQ). 53
- Figura 1.2** Cromatogramas por CLAE das frações de *C. quinoa* obtidas por fracionamento utilizando metanol e resina Diaion HP-20. 54
- Figura 1.3** Cromatogramas por CLAE das frações FQ30 (A) e FQ50 (B) de *C. quinoa* após purificação com PVP. 55
- Figura 1.4** Cromatogramas por CLAE das frações de *C. quinoa* obtidas por fracionamento utilizando etanol e resina Diaion HP-20. 56
- Figura 1.5** Cromatogramas por CLAE das frações FQ30 (A) e FQ50 (B) de *C. quinoa* após fracionamento em fase sólida e ultrafiltração tangencial. 56
- Figura 3.1a** Absorbância das soluções de FQ70-1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN). 75
- Figura 3.2a** Absorbância das soluções de FQ90-1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN). 75
- Figura 3.3a** Fotomicrografia obtida por MET dos cristais de colesterol, quando do excesso de colesterol. 76
- Figura 3.4a** Fotomicrografias obtidas por MET da formulação contendo QuilA: colesterol e fosfatidilcolina (2,7:1:1) obtida pelo método da diálise. 78
- Figura 3.5a** Fotomicrografia obtida por MET da formulação contendo QuilA: colesterol e fosfatidilcolina (4:1:1) obtida pelo método da diálise. 79
- Figura 3.6a** Fotomicrografias obtidas por MET das formulações contendo extrato de *C. quinoa*: colesterol e fosfatidilcolina nas proporções 4:1:1 (A) e 6:1:1 (B) obtidas pelo método da diálise. 80
- Figura 4.1a.** Anticorpos IgG OVA-específicos no soro de camundongos imunizados com OVA. 90

LISTA DE ABREVIATURAS

CHOL – colesterol; cholesterol

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

ConA – Concanavalin A

CMC – Concentração micelar crítica; Critical micelle concentration

DAD – Diode array detector; detector arranjo de diodos

DLS – Dynamic Light scattering; Espalhamento de luz dinâmico

DMSO – Dimetilsulfóxido; Dimethylsulphoxide

DTH – Delayed type hypersensitivity; Hipersensibilidade do tipo tardia

FQ30 – Fração quinoa obtida com 30 % metanol

FQ50 - Fração quinoa obtida com 50 % metanol

FQ70 - Fração quinoa obtida com 70 % metanol

FQ90 - Fração quinoa obtida com 90 % metanol

ISCOM – complexo imunoestimulante com presença de antígeno

LPS - lypopolysaccharide

Matrizes ISCOM – complexo imunoestimulante sem a presença de antígeno

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

OVA – Ovoalbumina

PAN – 1-(2-pyridylazo)-naphtol

PC – phosphatidylcholine; fosfatidilcolina

PVP - polivinilpolipirrolidona

Quil A – Fração purificada das saponinas de *Quillaja saponaria*

TEM – Transmission Electron Microscopy

UPLC/Q-TOF-MS – Ultra performance liquid chromatography/Quadrupole-Time of flight-mass spectrometry

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	19
OBJETIVOS	23
REFERENCIAL TEÓRICO	27
Capítulo 1 Obtenção da solução extrativa e de frações purificadas em saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i>	43
1. INTRODUÇÃO	45
2. REFERENCIAL TEÓRICO	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5. CONCLUSÕES	59
Capítulo 2 Avaliação da atividade antifúngica das saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i> , desenvolvimento de método analítico de quantificação por CLAE-DAD e caracterização estrutural por MALDI/TOF das principais saponinas presentes	61
Artigo 1. Antifungal activity against dermatophytes of <i>Chenopodium quinoa</i> saponins	63
Capítulo 3 Caracterização das saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i> presentes nas frações purificadas e dos agregados micelares formados	67
Artigo 2. Micellar Aggregates of Saponins from <i>Chenopodium quinoa</i> : Characterization by Dynamic Light Scattering and Transmission Electron Microscopy	69
ANEXOS	73
Capítulo 4 Caracterização estrutural por UPLC/Q-TOF-MS, avaliação da toxicidade e atividade imunoadjuvante das saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i>	81
Artigo 3. Immunoadjuvant activity, toxicity assays and characterization by UPLC/Q-TOF-MS of triterpenic saponins from <i>Chenopodium quinoa</i> seeds	83
ANEXOS	87
DISCUSSÃO GERAL	93
CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese de doutorado foi redigida na forma de capítulos e encontra-se organizada da seguinte forma:

- Introdução e Relevância do Tema
- Objetivos: geral e específicos
- Referencial teórico
- Capítulos 1 a 4: artigos submetidos ou aceitos para publicação, a exceção do capítulo 1; acompanhados dos anexos pertinentes
- Discussão Geral
- Conclusões
- Referências Bibliográficas

**INTRODUÇÃO E
RELEVÂNCIA DO TEMA**

A busca de novas matérias primas como fonte de compostos bioativos não-tóxicos, bem como a implementação de processos tecnológicos que visem à obtenção de produtos de qualidade assegurada e maior valor agregado, são objetivos amplamente incentivados nas Ciências Farmacêuticas. No âmbito de produtos naturais, um exemplo disso é a obtenção de frações purificadas de composição definida e padronizada, que garantam uma maior constância biológica, o incremento do teor dos constituintes de interesse, associado a redução de compostos indesejáveis.

As saponinas constituem um grupo de substâncias caracterizado pelas propriedades anfifílicas, responsáveis em grande parte pela sua utilização como adjuvante farmacêutico na formulação de medicamentos, vacinas veterinárias, cosméticos e na preparação de reagentes para análises clínico-laboratoriais. Também encontram emprego no segmento alimentício e na produção de bebidas (MITRA; DUNGAN, 1997; KAUFFMANN, 2002).

A espécie selecionada para este trabalho, *Chenopodium quinoa* Willd ou quinoa, é cultivada sistematicamente em vários países andinos; no Brasil há relatos de introdução para a espécie via EMBRAPA (SPEHAR; SANTOS, 2002). As sementes são utilizadas na alimentação humana como fonte de proteínas e carboidratos, ao mesmo tempo que apresentam elevado teor de saponinas (MADL *et al.*, 2006), sobre as quais existem estudos, alguns controversos, quanto às propriedades imunoadjuvantes. Por outro lado, existem estudos sobre sua potencial atividade antifúngica (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; STUARDO; SAN MARTIN, 2008).

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos e antifúngicos, apresenta-se como uma perspectiva devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas associadas à AIDS, à quimioterapia anti-neoplásica e a transplantes de órgãos (FRITZ *et al.*, 2007; OSTROSKY *et al.*, 2008). Com relação a patógenos humanos, existe relato de atividade antifúngica das saponinas *C. quinoa* somente contra *Candida albicans*, revelando o potencial da pesquisa de tal atividade biológica para saponinas da espécie vegetal em questão.

A importância de fontes alternativas de saponinas com atividades imunoadjuvantes vem ao encontro à obtenção de um produto com valor agregado no desenvolvimento de vacinas. A avaliação do potencial imunoadjuvante de saponinas de outras espécies vegetais, além de *Quillaja saponaria*, se justifica tendo em vista as limitações atreladas às saponinas dessa espécie, em particular, a complexidade estrutural, toxicidade, efeito hemolítico e instabilidade em meio aquoso. Fatos esses que restringem a sua utilização em vacinas para uso humano (SUN *et al.*, 2005; RAJPUT *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007). Nesse sentido, surgem como perspectiva de investigação as saponinas de *C. quinoa*, para as quais há um único relato da formação de estruturas porosas quando em associação com colesterol e fosfolipídios, dando indícios da formação de ISCOMs (complexos imunoestimulantes) (BOMFORD *et al.*, 1992). Afora essa referência, nenhum estudo foi realizado visando aprofundar o tema.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Obter e caracterizar frações purificadas de saponinas de *C. quinoa* e avaliar a formação de matrizes do tipo ISCOM com colesterol e fosfatidilcolina, bem como avaliar a atividade antifúngica e imunoadjuvante das frações obtidas.

Objetivos Específicos

- i) Estabelecer técnicas padronizadas para a extração e caracterização tecnológica do extrato bruto de sementes de quinoa;
- ii) Desenvolver processos de purificação em fase sólida e por ultrafiltração tangencial, para obtenção de frações purificadas de saponinas;
- iii) Desenvolver e otimizar método analítico por CLAE visando a caracterização e quantificação das principais saponinas presentes no extrato bruto e nas frações purificadas de quinoa;
- iv) Avaliar a atividade antifúngica das frações purificadas em saponinas de *C. quinoa*;
- v) Caracterizar físico-quimicamente as frações purificadas mediante técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e determinação da concentração micelar crítica (CMC);
- vi) Avaliar a formação de complexos tipo ISCOM das frações de saponinas com colesterol e fosfatidilcolina;
- vii) Avaliar e caracterizar as estruturas coloidais formadas, comparando-as com as obtidas com saponinas de *Quillaja saponaria* (Quil A);
- viii) Desenvolver método analítico por UPLC/Q-TOF-MS para caracterizar as estruturas das principais saponinas presentes nas frações purificadas;

- ix) Avaliar a atividade imunoadjuvante das frações saponosídicas purificadas, bem como das formulações obtidas por complexação com colesterol e fosfatidilcolina e comparar com a atividade imunoadjuvante das saponinas de *Quillaja saponaria* (Quil A);
- x) Avaliar a toxicidade das frações de quinoa obtidas mediante avaliação da atividade hemolítica, toxicidade frente a *A. salina* e toxicidade aguda *in vivo*.

REFERENCIAL TEÓRICO

***CHENOPODIUM QUINOA* - ASPECTOS BOTÂNICOS E FITOQUÍMICOS**

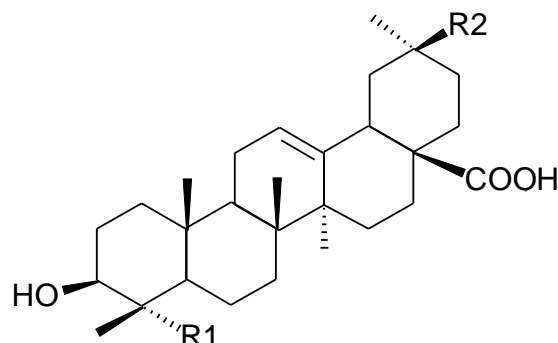
Chenopodium quinoa Willd é uma planta da família *Chenopodiaceae*, originária dos Andes, onde tem sido cultivada com fins alimentícios há pelo menos cinco mil anos. A região andina em 2009 foi responsável pela produção de aproximadamente 70.000 toneladas de quinoa (FAO, 2011).

A espécie é herbácea, anual, com ciclo variável entre 80 e 150 dias e as variedades mais tardias atingem cerca de 2,0 m de altura. Os frutos, do tipo aquênio; são pequenos, achatados e sem dormência. Por constituírem o material colhido são denominados sementes (SPEHAR; SANTOS, 2002).

Atualmente as sementes de quinoa são utilizadas como cereal no preparo de farinha e de ração animal, sendo destacado o seu elevado teor de proteína, aminoácidos, fibras e minerais (ZHU *et al.*, 2002; MADL *et al.*, 2006; NSIMBA *et al.*, 2008). O gosto amargo das sementes é atribuído às saponinas, que obriga à aplicação de um tratamento prévio de desaponificação por lixiviação com água ou remoção mecânica do farelo (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; ZHU *et al.*, 2002; MADL *et al.*, 2006).

O *pool* de saponinas de sementes de quinoa é bastante complexo, incluindo mais de 70 estruturas isoladas, identificadas ou apenas detectadas (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; ZHU *et al.*, 2002; MADL *et al.*, 2006; KULJANABHAGAVAD *et al.*, 2008). De maneira geral, as saponinas de quinoa são triterpenos, mono ou bidesmosídicos, derivados da β -amirina, que apresentam como principais agliconas a hederagenina e os ácidos oleanólico, fitolacagênico e serjânico (figura 1). Como agliconas minoritárias foram identificados os ácidos 3β -hidroxi-23-oxo-olean-12-ano-28-oico, 3β -hidroxi-27-oxo-olean-12-ano-28-oico, e 3β , 23α , 30β -triidroxi-olean-12-ano-28-oico. Os açúcares encontram-se ligados normalmente às posições C-3 e C-28, sendo os mais comuns glicose, galactose e arabinose, no entanto, ácido glicurônico e xilose foram também relatados (MIZUI *et al.*, 1988; 1990; MADL

et al., 2006; KULJANABHAGAVAD *et al.*, 2008; KULJANABHAGAVAD; WINK, 2009).



	R1	R2
Ácido oleanólico	CH ₃	CH ₃
Hederagenina	CH ₂ OH	CH ₃
Ácido fitolacagênico	CH ₂ OH	COOCH ₃
Ácido serjânico	CH ₃	COOCH ₃

Figura 1a. Estrutura geral das principais sapogeninas relatadas para *C. quinoa*.

SAPONINAS - ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS

Entre as atividades atribuídas às saponinas em geral, cabe destacar a antiviral, antitumoral, antiinflamatória, hipocolesterolêmica, antifúngica, sedativa, alelopática, inseticida entre outras, considerando as mesmas na forma isolada, em frações enriquecidas ou extratos brutos (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995; KENSIL, 1996; SCHENKEL *et al.*, 2003; AUGUSTIN *et al.*, 2011).

No que tange à **atividade antifúngica**, essa tem sido demonstrada para espécies do gênero *Phytolacca*, especificamente, para saponinas derivadas do ácido oleanólico presentes em *P. tetramera*, que mostraram atividade frente a leveduras e fungos

filamentosos (ESCALANTE *et al.*, 2002). Atividade antifúngica frente à *Aspergillus niger* e *Botrytis cinerea* também tem sido demonstrada para o extrato bruto e saponinas isoladas de *Astragalus verrucosus* (PISTELLI *et al.*, 2002).

Saponinas isoladas de *Panax notoginseng* apresentaram efeito inibitório frente a *Aphanomyces cochlioides*, e saponinas de *Hedera colchica*, derivadas da hederagenina, demonstraram maior atividade antifúngica quando comparadas a outras saponinas com núcleo triterpênico distinto (SPARG *et al.*, 2004).

Zhang *et al.* (2005) isolaram e identificaram oito saponinas esteroidais de *Tribulus terrestris* que foram ativas frente a cepas de fungos resistentes a fluconazol. De modo similar, saponinas esteroidais de *Solanum chrysotrichum* demonstraram atividade frente a *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Trychophyllum rubrum* (SPARG *et al.*, 2004). Em particular, a saponina SC-2, obtida de *S. chrysotrichum* tem demonstrado atividade distinta contra os dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* (LÓPEZ-VILLEGAS *et al.*, 2009).

No caso específico de *C. quinoa*, Woldemichael e Wink (2001) relataram efeito inibitório no crescimento de *Candida albicans* para a fração de saponinas totais, na concentração de 50 µg/mL. No entanto, as saponinas isoladamente apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) superiores a 500 µg/mL, sugerindo um possível efeito sinérgico entre as saponinas.

Stuardo e San Martín (2008) detectaram atividade significativa contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea*, responsável por doenças em parreirais, para as saponinas de *C. quinoa*. San Martín *et al.* (2008) também relatam uma intensa atividade moluscicida de frações de saponinas de quinoa contra *Pomacea canaliculata*, doença comum que afeta arrozais.

As saponinas de *Quillaja saponaria* têm sido extensivamente estudadas em função do **efeito imunoadjuvante**, antiviral e como promotores da absorção de fármacos (KENSIL, 1996; KAUFFMANN, 2002). A atividade mais pesquisada de *Q.*

saponaria, é a imunoadjuvante, em função da capacidade de estimular uma resposta imune humoral e mediada por células, o que permite sua utilização como adjuvantes em vacinas (KENSIL, 1996; RAJPUT *et al.*, 2007; RIOS, 2010).

O melhor exemplo de desenvolvimento de um produto com valor agregado à base de saponinas é a otimização de frações purificadas do extrato de *Q. saponaria* com atividade imunoadjuvante. Além de Quil A, um extrato padronizado de saponinas empregado na produção de vacinas para animais, foram desenvolvidas três diferentes frações (QH-A, QH-B e QH-C), das quais deriva a fração denominada ISCOPREPTM703, composta das frações QH-A e QH-C na proporção de 7:1 (BARR *et al.*, 1998; SJOLANDER *et al.*, 2001; PEARSE; DRANE, 2005; RAJPUT *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2009a; RIOS, 2010).

Saponinas isoladas de *Q. saponaria*, como a QS-7, QS-17, QS-18 e, principalmente, a saponina denominada QS-21, foram avaliadas quanto à atividade imunoadjuvante. Atualmente QS-21 tem sido considerada aceitável para uso em voluntários humanos, no entanto, alguns estudos demonstram uma atividade de lise residual no local da aplicação (LEROUX-ROELS, 2010).

Como imunoadjuvante, QS-21 foi testada na fase I no tratamento do melanoma, em vacinas virais como HIV-1 e citomegalovírus e de parasitoses como a malária (SOLTYSIK *et al.*, 1995; KENSIL, 1996; LIU *et al.*, 2002; BERMÚDEZ *et al.*, 2007; PATTNAIK *et al.*, 2007). Vários estudos clínicos têm sido realizados com QS-21, que tem mostrado resultados satisfatórios em pacientes com diversos tipos de tumores (DUBENSKY; REED, 2010). Recentemente, a síntese química de QS-21, constituída por dois isômeros de xilose ou apiose, têm sido proposta visando obter saponinas com grau de pureza elevado, quando comparadas às de origem vegetal (RAGUPATHI *et al.*, 2010).

Fleck *et al.* (2006) avaliaram a atividade adjuvante das saponinas de *Quillaja brasiliensis* na resposta imune ao vírus bovino *Herpes* tipo 1 em camundongos. O extrato aquoso e uma fração purificada de saponinas foram capazes de aumentar a

resposta imune de maneira comparável ao observado para *Q. saponaria*, sendo observada baixa toxicidade subcutânea.

A atividade imunoadjuvante das saponinas depende da sua estrutura química anfifílica, caracterizada por uma porção hidrofílica (cadeia de açúcar) e outra hidrofóbica (aglicona). No entanto, as características estruturais responsáveis pela atividade imunoadjuvante ainda não foram claramente estabelecidas. Assim, no caso das saponinas de *Quillaja* o grupamento aldeído ligado à aglicona na posição C4, assim como os resíduos de fucose, parecem exercer uma papel fundamental no estímulo das respostas imune humoral e celular (SOLTYSIK *et al.*, 1995; KENSIL, 1996; MARCIANI *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002; OLIVEIRA-FREITAS *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2009a). Contudo, saponinas de outras espécies vegetais, que não apresentam o grupamento aldeído nem fucose, também têm demonstrado forte atividade imunoadjuvante (SUN *et al.*, 2009a). Saponinas de *Panax ginseng*, por exemplo, que são de estrutura esteróide, mostraram-se ativas, ainda que diferentes estruturalmente daquelas da *Quillaja* (SUN *et al.*, 2005; RAJPUT *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007). Adicionalmente, Riveira *et al.* (2003) observaram que uma vacina contendo ginseng e hidróxido de alumínio induziu maior produção de anticorpos ao antígeno parvovírus, quando comparada à utilização dos adjuvantes utilizados separadamente. As frações de *P. ginseng* e *P. notoginseng* contendo ginsenosídeos apresentaram uma resposta imune superior quando co-administradas com albumina bovina em camundongos. Os autores atribuíram as diferenças na atividade imunoadjuvante às distintas conformações das saponinas, determinadas pela posição e tamanho das cadeias osídicas (SUN *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2007). Nesse sentido, o número, comprimento e a posição das cadeias de açúcar parecem exercer um papel importante na atividade imunoadjuvante (SUN *et al.*, 2009a)

Ainda nessa perspectiva, as saponinas de *Glycine max* têm sido separadas em seis ou oito frações de sojassaponinas, e sojassapogenóis, a última contendo portanto somente agliconas. Para as sojassaponinas se observou elevada atividade

imunoadjuvante, sendo que o grupo de sojassapogenóis apresentou menor atividade (ODA *et al.*, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que não existe uma relação direta entre a atividade hemolítica das saponinas e o efeito imunoadjuvante (SUN *et al.*, 2009a). Saponinas pouco hemolíticas, quando comparadas com Quil A, apresentam forte atividade imunoadjuvante. A exemplo pode-se citar as saponinas de *Glycine max*, *Panax notoginseng*, *Astragalus membranaceus*, *Bupleurum chinense* e *Anemone raddeana* (ODA *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; SUN, 2006; SUN *et al.*, 2008).

As saponinas de *C. quinoa* têm sido estudadas quanto às suas propriedades de incremento da resposta imunológica. Bomford *et al.* (1992) avaliaram a atividade imunoadjuvante e a formação de complexos imunoadjuvante (ISCOM) para saponinas de diversas espécies, dentre elas, *Q. saponaria*, *Gypsophila officinalis*, *Saponaria officinalis*, *Medicago sativa*, *Glycine max* e *C. quinoa*. Os autores observaram atividade imunoadjuvante somente para as saponinas de *Q. saponaria*, *G. officinalis* e *S. officinalis*. No entanto verificaram a formação de estruturas porosas para as saponinas de *M. sativa* e *C. quinoa*.

Estrada *et al.* (1998) avaliaram a atividade imunoadjuvante de saponinas de quinoa, após administração intragástrica ou intranasal, na indução de anticorpos específicos para a toxina de cólera e ovoalbumina. Os autores constataram um incremento nos níveis de anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgA, quando comparados ao grupo controle e sugerem que as saponinas de quinoa podem ser empregadas como imunoadjuvantes em vacinas. Os autores relatam ainda que as doses de saponinas administradas foram bem toleradas pelos camundongos, que não apresentaram estresse ou lesões na mucosa.

SAPONINAS - PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO E MÉTODOS DE ANÁLISE

A obtenção de frações de saponinas ou saponinas isoladas mediante utilização de partição líquido-líquido é um método de purificação e isolamento clássico na química de produtos naturais. No entanto, esse apresenta desvantagens, como a perda de compostos mais polares, impacto ambiental e a presença residual de solventes orgânicos na fração de interesse, sendo esse último aspecto problemático para a realização de estudos biológicos ou farmacológicos (PAVEI, 2004; GÜÇLU-ÜSTÜNDAG; MAZZA, 2007).

Técnicas de purificação de saponinas, diferentes das que empregam a partição líquido-líquido, também são relatadas na literatura, dentre elas, o fracionamento em fase sólida utilizando resinas e métodos cromatográficos (GÜÇLU-ÜSTÜNDAG; MAZZA, 2007).

São descritos ainda para purificação de saponinas os processos que se utilizam de membranas filtrantes, como microfiltração, ultrafiltração e nanofiltração. A diferença entre eles reside nos *limites de corte* das membranas. A ultrafiltração (UF) é o processo adequado para macromoléculas, sendo aplicado na separação de proteínas, beneficiamento/clarificação de sucos de frutas, remoção de enzimas, taninos e polissacarídeos (CARVALHO *et al.*, 1998; YOUN *et al.*, 2004; CASSANO *et al.*, 2007).

Inicialmente, os métodos de análise para determinação de saponinas em extratos vegetais foram métodos gravimétricos baseados nas características físico-químicas ou biológicas, como a capacidade de formação de espuma e a determinação do índice de hemólise. No entanto, muitas saponinas, não formam espumas estáveis e resistentes, e as propriedades hemolíticas dessas estão relacionadas à características estruturais das moléculas, mas não necessariamente à sua concentração (OLESZEK, 2002). Atualmente, são preferidos os métodos por CLAE, utilizando colunas de fase reversa C8 ou C18. O principal problema na análise de saponinas consiste na detecção, uma vez que a grande maioria delas não possuem grupos cromóforos que absorvem acima

de 210 nm, limitando assim o uso de detectores UV. Do mesmo modo, a detecção em baixos comprimentos de onda é afetada pela pureza dos solventes e por sistemas gradientes, que comprometem a linha-base (OLESZEK, 2002; OLESZEK; BIALY; 2006). Apesar das limitações apresentadas pela técnica, a mesma continua sendo a de escolha para análise de saponinas.

Mais recentemente, a utilização da espectrometria de massas acoplada à métodos por CLAE tem sido empregada para confirmar e caracterizar a presença de saponinas em extratos vegetais (OLESZEK, 2002; OLESZEK; BIALY; 2006). Nesse sentido, trabalhos têm relatado a utilização de técnicas mais avançadas na detecção e quantificação de saponinas, como a UPLC/MS (GUAN *et al.*, 2007; FOUBERT *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2010). A técnica de UPLC proporciona maior eficiência e resolução na separação dos sinais, diminuindo consideravelmente o tempo de análise. Quanto acoplada à espectrometria de massas permite a caracterização estrutural e identificação das saponinas presentes (GUILLARME *et al.*, 2008).

ISCOMS E MATRIZES ISCOM

Aspectos gerais

Os complexos imuno-estimulantes, denominados ISCOMs, são estruturas coloidais formadas por saponinas, colesterol, fosfolipídios e um antígeno, mantidos unidos por ligações hidrofóbicas, fatores estéricos e ligações de hidrogênio. Quando são formulados sem a presença de antígeno, são denominados de matrizes ISCOM (SUN *et al.*, 2009b).

A formação de ISCOMs foi relatada para as saponinas de *Quillaja saponaria*. Os primeiros estudos de vacinas com ISCOMs utilizaram Quil A, uma fração purificada de *Quillaja*. No entanto, para o desenvolvimento de vacinas de uso humano frações mais purificadas precisaram ser desenvolvidas, a saber, QH-A, QH-B e QH-C

e ISCOPREP™703 (RÖNNBERG *et al.*, 1997; BARR *et al.*, 1998; SJÖLANDER *et al.*, 2001; PEARSE; DRANE, 2005; RAJPUT *et al.*, 2007).

A estrutura da matriz ISCOM depende da proporção utilizada de saponinas, colesterol e fosfolipídio. Estruturas esféricas tipo gaiola (*cage-like*), com diâmetro em torno de 40 nm, são as mais usuais e são aquelas associadas aos termos ISCOMs e matrizes ISCOM. As características estruturais dependem da forma assumida pelas subunidades e localização dos poros dentro das estruturas (MYSCHIK *et al.*, 2006).

A contribuição da morfologia específica dos ISCOMs na atividade imunoadjuvante ainda não está esclarecida, uma vez que a capacidade de formar estruturas tipo gaiola é bastante peculiar das saponinas da *Quillaja*. No entanto, saponinas de *Medicago*, imunologicamente inativas, formam estruturas porosas similares e, por outro lado, saponinas de *Gypsophila* e de *Saponaria* não formam matrizes ISCOM típicas, mas apresentam atividade imunoadjuvante. Esses fatos indicam indiretamente que a morfologia não é pré-requisito para a atividade imunoadjuvante (MYSCHIK *et al.*, 2006).

Song *et al.* (2009) relatam a formação de nanoestruturas denominadas ginsomas a partir de saponinas de *Panax ginseng*. Os ginsomas são obtidos mediante a utilização da tecnologia de obtenção dos ISCOMs e são descritos como estruturas esféricas (87-100 nm) apresentando, no entanto, morfologia distinta das matrizes ISCOM tradicionais. Contudo, estes foram capazes de aumentar a resposta imune humoral e celular em camundongos imunizados com ovoalbumina (OVA).

Métodos de preparação

Os métodos para preparação dos ISCOMs e matrizes ISCOM diferem geralmente na pré-dispersão dos constituintes lipídicos e na utilização de solubilizantes adicionais. Basicamente, são adaptações dos métodos de obtenção de lipossomas (MYSCHIK *et al.*, 2006; PHAM *et al.*, 2006). Na literatura, seis métodos têm sido

descritos (LIANG *et al.*, 2008), sendo o da diálise o mais comumente empregado na preparação dos ISCOMs. Esse método envolve a solubilização prévia de colesterol e fosfolipídios com a ajuda de tensoativos não-iônicos (COPLAND *et al.*, 2000; DEMANA *et al.*, 2004; MYSCHIK *et al.*, 2006; PHAM *et al.*, 2006).

No método da centrifugação, as proteínas, colesterol e os fosfolipídios são solubilizados usando um tensoativo, na ausência de saponinas. Na seqüência, a solução micelar é centrifugada através de um gradiente de sacarose, contendo saponinas (COPLAND *et al.*, 2000; MYSCHIK *et al.*, 2006; PHAM *et al.*, 2006).

A hidratação do filme lipídico é uma adaptação do método para a preparação de lipossomas, onde colesterol e fosfolipídios são dissolvidos em clorofórmio, que ao ser evaporado forma um filme fino, posteriormente hidratado com uma solução aquosa de saponinas (COPLAND *et al.*, 2000; MYSCHIK *et al.*, 2006; PHAM *et al.*, 2006).

O método da injeção de etanol utilizado para a produção de matrizes ISCOM é uma adaptação daquele empregado na obtenção de lipossomas unilamelares. Neste, soluções etanólicas de colesterol e fosfolipídios são injetadas, sob pressão, em soluções aquosas de saponinas. O método constitui a forma mais rápida para obtenção das matrizes ISCOM. É simples e eficiente além de oferecer possibilidades para produção em larga escala. No entanto, as estruturas formadas não são homogêneas como as originadas na técnica de diálise, apresentando grandes agregados, estruturas na forma de micelas circulares e hélices. Outra limitação da técnica é a concentração residual de etanol, que não pode ser superior a 7,5 % uma vez que os constituintes dos ISCOMs estão associados por ligações hidrofóbicas (LENDEMANS *et al.*, 2005; MYSCHIK *et al.*, 2006; PHAM *et al.*, 2006).

Análogo ao método da injeção de etanol, o da injeção de éter oferece como vantagens a possibilidade de dissolução de quantidades maiores de lipídios e a utilização de uma temperatura mais branda para a remoção do solvente (MYSCHIK *et al.*, 2006; PHAM *et al.*, 2006).

O método mais recentemente relatado na literatura para formação de ISCOMs é o da hidratação da matriz lipídica liofilizada. O método objetiva a formação de matrizes ISCOM com maior estabilidade, uma vez que o produto pode ser liofilizado e hidratado no momento da utilização, com uma solução tamponada contendo saponinas (LIANG *et al.*, 2008).

Embora todos os métodos se utilizem de fosfolipídios para a produção das matrizes ISCOM, a necessidade desse constituinte para a formação das estruturas tipo gaiola, tem sido questionada (COPLAND *et al.*, 2000). Estudos complementares afirmam que a necessidade desse constituinte está associada ao método. Aqueles onde há presença de tensoativos, como no método da diálise, a utilização de fosfolipídios pode não ser necessária (COPLAND *et al.*, 2000; DEMANA *et al.*, 2004).

Além das estruturas na forma de gaiolas típicas, outras são observadas, como hélices, micelas circulares e lamelares. As diferenças nas estruturas formadas estão relacionadas às proporções de saponina, fosfolipídio e colesterol empregadas, bem como aos diferentes métodos de preparação das matrizes ISCOM (MYSCHIK *et al.*, 2006). O tempo de repouso após o preparo e a presença de sais de tampão são fatores que influenciam no tipo de estrutura formada (DEMANA *et al.*, 2004; MYSCHIK *et al.*, 2006).

Resposta imune obtida com ISCOMS

Muitos estudos têm demonstrado a capacidade dos ISCOMs ou matrizes ISCOM em induzir resposta imune humoral e celular e vacinas contendo tais estruturas particuladas são aprovadas para utilização em animais e estão sendo testadas em ensaios clínicos para uso em humanos (SKENE; SUTTON, 2006; SUN *et al.*, 2009b).

Vacinas ISCOM têm sido extensivamente estudadas com relação à sua imunogenicidade. Os antígenos utilizados com maior frequência são os virais, no entanto, antígenos de bactérias e parasitos também têm sido testados e demonstram

originar uma resposta imunológica quando preparados juntamente com ISCOMs ou matrizes ISCOMs. Nesse sentido pode-se citar *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia trachomatis* e *Toxoplasma gondii* (SUN *et al.*, 2009b). Um resumo dos principais resultados positivos consta a seguir:

a) Indução das respostas mediadas por células (Th1) e resposta imune humoral (Th2) (HU *et al.*, 2001; MYSCHIK *et al.*, 2006; REED *et al.*, 2009).

b) Indução da resposta imune em diversas espécies animais, incluindo primatas e humanos (MOREIN; BENGTSSON, 1999; SJOLANDER *et al.*, 2001; PEARSE; DRANE, 2004; SUN *et al.* 2009b).

c) Ativação das células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e células B com aumento da expressão de moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC)). Indução da produção de linfócitos T citotóxicos (CD8) e um número de interleucinas, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e γ -interferon (MOREIN; BENGTSSON, 1999; HU *et al.*, 2001; SJOLANDER *et al.*, 2001; REED *et al.*, 2009).

d) Indução da imunização intranasal com ISCOM em mucosas de ratos e ovelhas com antígenos do vírus influenza (MOREIN; BENGTSSON, 1999; HU *et al.*, 2001; SJOLANDER *et al.*, 2001; COULTER *et al.*, 2003; PEARSE; DRANE, 2004; PANDEY *et al.*, 2010).

e) Potente atividade imunoadjuvante em vacinas contendo antígenos do vírus influenza, vírus do sarampo, HIV, rotavírus, toxóide tetânico e *Plasmodium falciparum* para várias espécies, como, peru, porquinho-da-índia, gato, cachorro, coelho, ovelha, vaca e cavalo (MOREIN; BENGTSSON, 1999; SJOLANDER *et al.*, 2001; PEARSE; DRANE, 2005; REED *et al.*, 2009; DAS NEVES *et al.*, 2010; HELDENS *et al.*, 2010).

f) Tratamento eficaz de zoonoses como a toxoplasmose e leishmaniose em suínos e cachorros (BARR *et al.*, 1998; FREIRE *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2009b).

Uma importante característica das vacinas ISCOM é a utilização de baixas doses de antígenos e adjuvantes além de uma resposta humoral duradoura (SJOLANDER *et al.*, 2001; PEARSE; DRANE, 2005).

Devido à habilidade de rapidamente gerar resposta imune humoral e celular, vacinas contendo ISCOM ou matrizes ISCOM têm sido testadas no tratamento de câncer, a exemplo do papiloma vírus humano tipo 16 (HPV16) (STEWART *et al.* 2004). Nesse contexto, NY-ESO-1 é um dos antígenos expressos por diferentes tipos de tumores e a eficácia de proteínas ESO formuladas com matrizes ISCOM na indução da resposta imune tem sido testada e os resultados satisfatórios (SUN *et al.*, 2009b).

O mecanismo pelo qual matrizes ISCOM induzem uma resposta imune ainda não é completamente esclarecido, no entanto, existem algumas conjecturas, uma vez que as saponinas isoladas apresentam atividade imunoadjuvante (BARR *et al.*, 1998; PEARSE; DRANE, 2005; RAJPUT *et al.*, 2007). Em função das propriedades de superfície, as saponinas se intercalam com o colesterol na membrana celular originando poros, através dos quais saponina e antígeno penetrariam no citoplasma da célula, o que permite a apresentação do antígeno, originando a resposta T-linfocitária. Uma melhora na resposta imunológica ocorre com a utilização de matrizes ISCOM, quando comparada à utilização de saponinas isoladas, sendo esse fato atribuído à natureza particulada do complexo, que permite um reconhecimento facilitado por parte das células apresentadoras de antígenos (BARR *et al.*, 1998; PEARSE; DRANE, 2005; RAJPUT *et al.*, 2007, SUN *et al.*, 2009b).

Capítulo 1. Obtenção da solução extrativa e de frações purificadas em saponinas de *Chenopodium quinoa*

1. INTRODUÇÃO

As saponinas têm sido exploradas em várias aplicações comerciais por suas propriedades biológicas e físico-químicas. Nesse sentido, é reconhecida a importância da pesquisa e desenvolvimento para a produção em escala comercial de frações saponosídicas e saponinas isoladas oriundas de fontes vegetais ou animais. Atualmente, a maior fonte de saponinas procede de várias espécies vegetais, como *quiluaia*, *gipsófila*, *soja*, *ginseng*, entre outras (SPARG *et al.*, 2004; GÜÇLU-ÜSTÜNDAG; MAZZA, 2007).

A espécie selecionada para este trabalho, *C. quinoa* é cultivada sistematicamente em vários países andinos, rica em saponinas, substâncias que para fins alimentícios precisam ser removidas das sementes (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; MADL *et al.*, 2006; KULJANABHAGAVAD *et al.*, 2008).

Embora amplamente estudadas, as pesquisas estritamente tecnológicas de fracionamento/purificação das saponinas de quinoa são ainda incipientes. Nesse contexto, o presente capítulo aborda a obtenção das frações purificadas de saponinas obtidas das sementes de *C. quinoa*, fazendo uso de separação e fracionamento em fase sólida, a partir de extrato seco liofilizado. Os principais tópicos envolvidos nesse capítulo compreendem a caracterização da matéria-prima, processo de extração empregado e fracionamento/purificação das saponinas

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os principais métodos de fracionamento e de purificação de saponinas compreendem a partição líquido-líquido, fracionamento em fase sólida utilizando resinas de permuta iônica e poliméricas e métodos cromatográficos (camada delgada, contracorrente, cromatografia líquida de média e alta pressão, entre outros) (GÜÇLU-ÜSTÜNDAG; MAZZA, 2007). Os processos cromatográficos e por partição líquido-líquido apresentam a desvantagem do uso de solventes orgânicos de elevado impacto ambiental ou toxicidade, que permanecem como resíduos de processo. Em decorrência disso e pelo fato de permitir a obtenção de frações purificadas em quantidades apropriadas, para estudos biológicos ou farmacológicos, os processos em fase sólida utilizando resinas de permuta iônica e poliméricas tem demonstrado maior viabilidade (PAVEI, 2004; GÜÇLU-ÜSTÜNDAG; MAZZA, 2007). A associação destes dois últimos métodos à purificação mediante membranas ultrafiltrantes, além de contornar as desvantagens acima mencionadas, evita a formação de emulsões na interface líquido-líquido, utiliza exclusivamente água ou misturas hidroalcoólicas e permite a fácil transposição de escala (PAVEI, 2004; GÜÇLU-ÜSTÜNDAG; MAZZA, 2007).

Os processos de separação por membranas filtrantes podem ser divididos em microfiltração, ultrafiltração e nanofiltração. A diferença entre eles reside no limite de corte das membranas utilizadas.

A técnica de ultrafiltração pode ocorrer de duas formas distintas em relação ao plano de filtração: com fluxo perpendicular ou fluxo tangencial. Nesse último caso as moléculas maiores, que não atravessam a membrana, não ficam retidas na superfície desta, sendo arrastadas ao longo do fluxo tangencial, evitando a saturação por adsorção e deposição de material na superfície da membrana. Essa característica confere uma maior vida útil à membrana, sendo, portanto, a técnica de escolha para escala industrial (JORNITZ; MELTZER, 2007).

Especificamente, métodos de fracionamento empregando resina polimérica e ultrafiltração tangencial já foram descritos com o intuito de obter as saponinas de *C.*

quinoa de forma isolada (MIZUI *et al.*, 1990; MUIR *et al.*, 2002). No entanto, a obtenção e utilização de frações com características de composição e pureza definidas, não foi identificada em literatura especializada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Aparelhos, equipamentos

Agitador magnético Fisatom 725 A; balança analítica semi-micro (AND, Estados Unidos); banho de ultra-som com aquecimento (UNIQUE, Brasil); banho de água Biomatic modelo 869; coluna cromatográfica Phenomenex Gemini NX RP C18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size); coluna de vidro sinterizado (600 x 10 mm d.i); coluna de vidro sinterizado (50 x 2,8 cm d.i); evaporador rotatório R-144 (Büchi, Suíça); estufa de ar circulante Heraeus RVT 360; evaporador rotatório Büchi R114; liofilizador Modulyo® 4k (Edwards, Inglaterra); módulo de ultrafiltração tangencial Minimate® (Pall Corporation, USA), provido de módulos filtrantes com membranas de 5.000 a 10.000 D de massa molecular de corte; potenciômetro pH-metro B374 Micronal; sistema de CLAE Shimadzu LC-20 AT (Kyoto, Japan) composto por bomba de alta pressão duplo pistão LC-20 AD, amostrador automático SIL-20A, detector espectrofotométrico por arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e software de gerenciamento de dados LC-Solution Multi-DAD.

3.1.2 Solventes e reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentam grau de pureza pró-análise (p.a), exceto quando haja especificação contrária. Acetonitrila grau CLAE (Tedia); ácido perclórico (Synth), álcool etílico (Nuclear), álcool metílico (Nuclear).

Polivinilpirrolidona cruzada PVP-P6755 (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA), resina adsorvente polimérica Diaion HP 20 (Supelco, Estados Unidos)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Caracterização da droga vegetal

3.2.1.1 Secagem da droga vegetal

As sementes de *C. quinoa* de plantas cultivadas na região de Cochabamba (Bolívia) foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Fernando Ferreira. As sementes foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 40 ± 3 °C por 72 h.

3.2.1.2. Determinação da perda por dessecação (Farmacopéia Brasileira, 1988)

O teor de umidade residual foi determinado em balança de infravermelho. Para tanto, cerca de 2,0 g de material vegetal foi pesado e submetido à secagem durante 15 min com temperatura de 105 °C. Os resultados foram expressos como teor de umidade residual, em percentagem, pela média de 5 determinações.

3.2.2 Obtenção e caracterização da solução extrativa

3.2.2.1 Obtenção da solução extrativa

Uma solução hidroetanólica contendo 40% (v/v) de etanol foi adicionada à matéria-prima vegetal na proporção droga-solvente 1:10 e submetida à decocção a 50 °C durante 60 min, sob agitação constante. A solução extrativa foi filtrada sob pressão reduzida utilizando papel filtro Whatmann nº2. Após redução do volume a um terço do original em evaporador rotatório a 55 ± 3 °C a fração aquosa residual foi congelada a -4°C e liofilizada. O extrato bruto liofilizado foi codificado como EXQ.

3.2.2.2 Determinação do resíduo seco

Uma amostra de 20,0 g da solução extrativa concentrada foi pesada em pesa-filtro e concentrada em banho de água, a 90 °C, até resíduo. Em seguida, o pesa-filtro foi mantido em temperatura de 105 °C, em estufa, durante 2 h, resfriado em dessecador por 30 min e pesado. Esse procedimento foi repetido até obter uma variação inferior a 1% entre dois procedimentos sucessivos. Os resultados foram expressos em percentagem de resíduo seco (% , m/m) pela média de três determinações.

3.2.2.3 Determinação do pH (Farmacopéia Brasileira, 1988)

O pH da solução extrativa foi determinado em potenciômetro, previamente calibrado, a 25 °C e o resultado expresso pela média de três determinações.

3.2.2.4 Determinação do perfil cromatográfico por CLAE

O EXQ foi retomado e diluído em solução de acetonitrila:água (50:50 v/v) até a concentração final de 1mg/mL. Para determinação do perfil cromatográfico foi empregado método por CLAE-DAD desenvolvido porém não validado nessa etapa do trabalho. As condições cromatográficas empregadas para análise compreendem coluna Gemini® NX RP C18 (Phenomenex, 250 x 4.6 mm) e como fase móvel solução de ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B) em sistema gradiente linear: 25% B (0-3 min.), 25-30% B (3-8 min.), 30-50% B (8-18 min.), 50% B (18-32 min.), 50-25% B (32-42 min.), 25% B (42-55 min.). O fluxo de eluição foi de 1,0 mL/min. em temperatura ambiente. A detecção foi realizada em 210 nm.

3.2.3 Obtenção das frações purificadas em saponinas

Para essa finalidade, o extrato EXQ foi submetido a fracionamento em fase sólida utilizando resina poliaromática hidrofóbica e uma purificação adicional utilizando PVP e ultrafiltração tangencial foi avaliada. Alterações no gradiente de eluição e substituição do líquido de eluição também foram testados.

3.2.3.1 Desenvolvimento do processo de fracionamento em fase sólida

O fracionamento em resina hidrofóbica Diaion HP-20 baseou-se no empregado por Pavei (2004) para os frutos de *Ilex paraguariensis*. Para tanto, aproximadamente 30,0 mL de resina Diaion HP-20 foram dispersos em 100 mL de metanol e mantidos sob agitação ocasional durante 24 h. O material foi acondicionado em coluna de vidro (600 x 10 mm d.i), gerando um leito de resina de aproximadamente 15 cm de altura, e lavado sucessivamente com 100,0 mL de metanol e 200,0 mL de água, empregando fluxo de 5,0 mL/min. Em seguida, no topo da coluna, verteu-se 20,0 ml de solução aquosa contendo 200 mg de EXQ previamente preparada. O fluxo foi reduzido para 2,0 mL/min e assim mantido durante o resto do experimento. Os sistemas de eluição testados consistiram de misturas hidrometanólicas a 30, 50, 70 e 90 % de metanol segundo um regime de eluição em gradiente linear de polaridade decrescente. Para o fracionamento foram empregados 200,0 mL de cada mistura hidrometanólica. As frações foram recolhidas, concentradas em evaporador rotatório a 40 °C, até remoção completa do metanol, congeladas e liofilizadas seguindo procedimento-padrão descrito no item 3.2.2.1. As frações liofilizadas foram denominadas FQ30, FQ50, FQ70 e FQ90, e guardadas em frascos de vidro âmbar até seu uso.

3.2.3.2 Métodos de purificação adicionais

Os procedimentos de purificação das frações obtidas contemplaram:

a) adsorção de interferentes sobre PVP (polivinilpirrolidona cruzada), aplicado às frações FQ30 e FQ50, com o intuito de eliminar substâncias não-saponosídicas, sobretudo polifenóis presentes em ambas frações. Separadamente, 6,0 mg de FQ30 e FQ50 foram retomados com 3,0 mL de água, adicionando-se 30 mg de PVP a cada uma delas. As soluções foram mantidas sob agitação magnética vigorosa durante 60 min, filtradas em papel filtro e analisadas por CLAE, segundo item 3.2.2.4.

b) inclusão de uma eluição adicional com mistura hidrometanólica a 20%, em relação ao método desenvolvido por Pavei (2004). As demais condições

experimentais, como volume de eluição de cada fase, fluxo e proporção de resina, não foram alteradas.

c) substituição de metanol por etanol, mantendo as mesmas condições experimentais descritas em 3.2.3.1, utilizando EXQ;

d) tratamento das frações FQ30 e FQ50 com processo de ultrafiltração tangencial, após retomada dessas em água, conforme descrito a seguir.

As frações FQ30 e FQ50 foram submetidas à ultrafiltração utilizando membranas de polietileno com limites de corte de 5 e 10 kD. A pressão do sistema foi mantida constante em 25 psi e o fluxo de trabalho foi de 15 mL/min, estabelecidas em função da pressão suportada pelo sistema definida pelo fabricante. O volume utilizado no processo de ultrafiltração, definido em função do tempo de demanda para a análise, corresponde ao dobro daquele obtido para cada fração após o processo de concentração, a saber, 120 e 200 mL, para as frações FQ30 e FQ50, respectivamente. Após o processo de ultrafiltração, o filtrado e o retentado correspondente a cada fração foram congelados e liofilizados de acordo com o procedimento descrito em 3.2.2.1.

A eficiência da inserção de uma etapa complementar por ultrafiltração foi avaliada para as frações FQ30 e FQ50 tratadas e não-tratadas. Para tanto, amostras de cada uma delas foram retomadas em solução de acetonitrila:água (50:50 v/v), diluídas até uma concentração de 1mg/mL e analisadas por CLAE, segundo item 3.2.2.4.

3.2.3.3 Aumento da escala dos processos de fracionamento

Após definição do método de fracionamento, o processo foi incrementado para uma escala maior. Para tanto se utilizou cerca de 70 mL de resina Diaion HP-20, 300 mg de EXQ, 500 mL de volume em cada fração e um fluxo de eluição de 5,0 mL/min. As amostras foram concentradas, liofilizadas e analisadas por CLAE em concentração de 1mg/mL.

Quanto ao aumento de escala para o método de ultrafiltração tangencial, empregou-se como volume de diafiltração duas vezes o volume obtido para cada fração após a etapa de concentração, a ser submetida ao processo, a saber, 700 mL para a FQ30 e 500 mL para FQ50. Os demais parâmetros, como pressão e fluxo de trabalho, foram os mesmos descritos anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da droga vegetal

A caracterização da matéria-prima vegetal e as etapas referentes à padronização do material vegetal são imprescindíveis para estabelecer parâmetros de qualidade e obter reprodutibilidade em lotes de produção distintos (ALBERTON *et al.*, 2001). Nesse sentido, a determinação do teor de umidade é importante, pois está diretamente relacionada com a conservação da matéria-prima vegetal (FARIAS, 2003).

A matéria-prima vegetal, constituída pelas sementes de quinoa providas de casca apresentou um teor de umidade de $5,66 \% \pm 3,38 \%$, que se encontra dentro dos limites máximos, de 8 a 14 %, preconizado nas diferentes Farmacopéias (FARIAS, 2003).

4.2 Caracterização da solução extrativa

O pH da solução extrativa obtida por decocção foi de $5,3 \pm 0,4$. O resíduo seco determinado na amostra foi de $0,51 \pm 0,03\%$. Objetivando uma maior estabilidade, a solução extrativa foi liofilizada (EXQ) e, durante essa etapa o rendimento do processo foi de 94%.

O EXQ foi caracterizado por CLAE (figura 1) segundo item 3.2.2.4. Os picos caracterizados preliminarmente por CLAE-DAD em 210 nm como sendo saponinas no cromatograma de EXQ se concentraram na faixa de tempo de retenção acima de 10 min. As saponinas são substâncias que não apresentam grupamentos cromóforos conseqüentemente não possuem absorvidade acima de 210 nm. Sendo assim, nesse trabalho foram consideradas como possíveis saponinas as substâncias com ausência de

absorção acima de 210 nm. Em análises posteriores a confirmação das saponinas presentes foi realizada mediante o emprego da técnica de UPLC-Q-TOF/MS (ver capítulo 4).

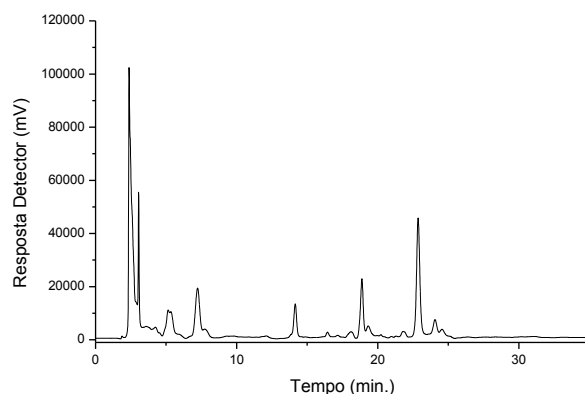


Figura 1. Cromatograma por CLAE do extrato de *C. quinoa* liofilizado (EXQ). Detecção em 210 nm.

4.3 Obtenção das frações purificadas em saponinas

A utilização da resina Diaion HP-20 na purificação de saponinas de quinoa foi anteriormente relatada objetivando o isolamento e identificação estrutural das mesmas (MIZUI *et al.*, 1988; MIZUI *et al.*, 1990). O método baseado na técnica de fracionamento/purificação da fração saponosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* (mate) (PAVEI, 2004) quando aplicado com modificações às sementes de quinoa permitiu a obtenção de frações de saponinas diferenciadas quanto à composição e pureza. Os cromatogramas por CLAE referentes às frações FQ30, FQ50, FQ70 e FQ90 são apresentados na figura 2.

Uma análise comparativa dos cromatogramas da figura 2, revelou para a FQ30 e FQ50 a presença no início do cromatograma (tempo retenção <10 min.) de substâncias com absorção acima de 215 nm (provavelmente polifenólicas a julgar pelos espectros por DAD), que não foram evidenciadas nas frações FQ70 e FQ90. Em contrapartida, todos os picos presentes nos cromatogramas obtidos para a FQ70 e FQ90 foram tidos como possíveis saponinas, dada a ausência de absorção acima de 210 nm. Na figura 2 evidencia-se ainda um pico com tempo de retenção em torno de

15 min nas frações FQ70 e FQ90, que é ausente nas frações FQ30 e FQ50. Como método de purificação adicional ao fracionamento em fase sólida das frações FQ30 e FQ50 optou-se pelo tratamento com PVP, reconhecido adsorvente de polifenóis (figura 3).

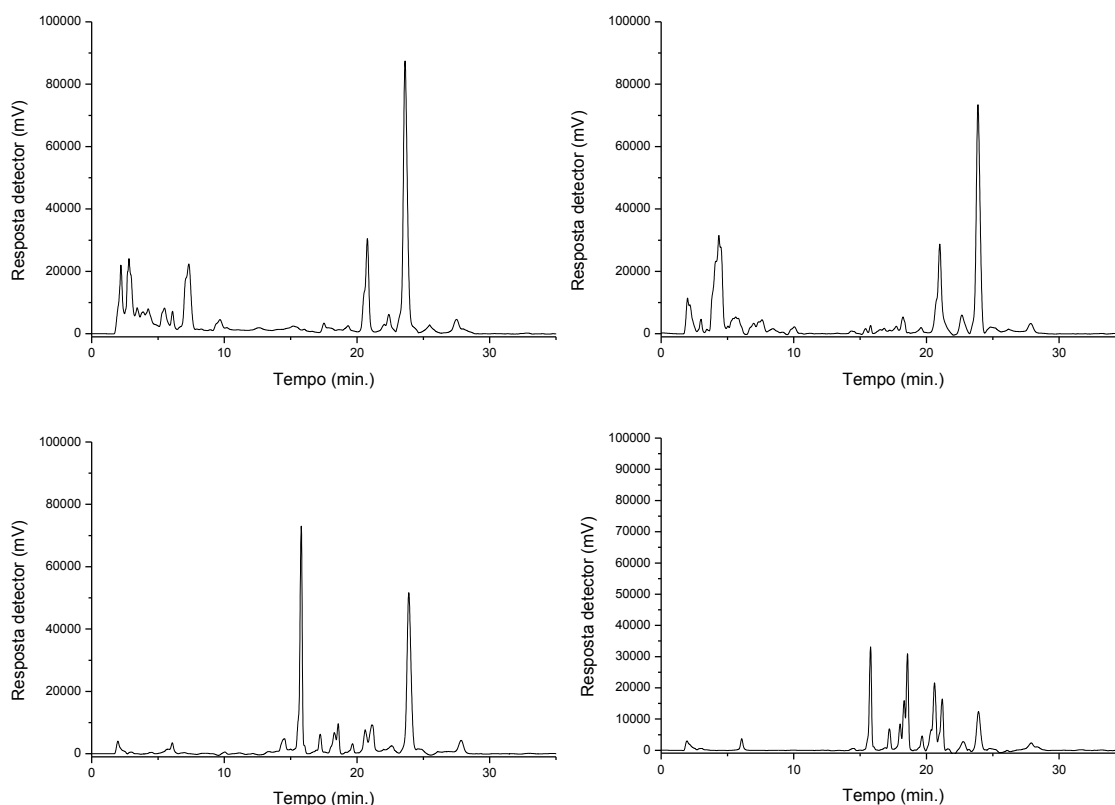


Figura 2. Cromatogramas por CLAE das frações de *C. quinoa* obtidas por fracionamento utilizando metanol e resina Diaion HP-20. (A) FQ30; (B) FQ50; (C) FQ70; (D) FQ90. Detecção em 210 nm.

A utilização de PVP para purificação e remoção de substâncias não-saponosídicas, principalmente polifenóis, encontra aplicação na indústria de bebidas e alimentos (YOUN *et al.*, 2004; FERNÁNDEZ *et al.*, 2005), bem como na área farmacêutica para remoção ou quantificação de taninos (SIEBERT, 1999; SOARES *et al.*, 2006; VERZA *et al.*, 2008).

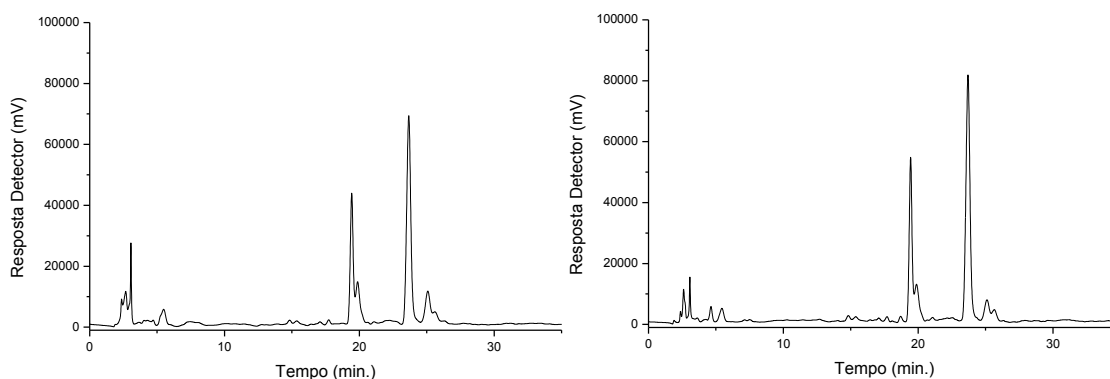


Figura 3. Cromatogramas por CLAE das frações FQ30 (A) e FQ50 (B) de *C. quinoa* após purificação com PVP. Detecção em 210 nm.

A comparação entre os cromatogramas referentes às frações FQ30 e FQ50 ilustrados na figura 2, com aqueles apresentados na figura 3, indica claramente que a purificação com PVP não foi efetiva para a remoção de substâncias interferentes, sobretudo polifenóis, das frações mais polares de quinoa.

Face ao resultado anterior, optou-se por adicionar uma etapa de eluição utilizando solução hidrometanólica 20%, antes da obtenção da FQ30. A adição dessa nova etapa de fracionamento também não se mostrou eficaz na eliminação de substâncias não-saponosídicas presentes em FQ30 e FQ50, constatando-se uma sobreposição quase completa entre os perfis das frações antes (Figura 3) e após o tratamento (dados não apresentados).

De igual forma, a substituição do metanol por etanol no processo de fracionamento com a manutenção das demais condições experimentais adotadas no método descrito por Pavei (2004), também não foi eficaz na remoção das substâncias não-saponosídicas (figura 4). Pelo contrário, a análise das frações obtidas com etanol mostra, para todas as frações, a presença das substâncias polifenólicas. Cabe destacar o fato de a FQ90 obtida utilizando etanol como eluente não apresentar sinal algum referente às saponinas anteriormente observadas quando do fracionamento com metanol.

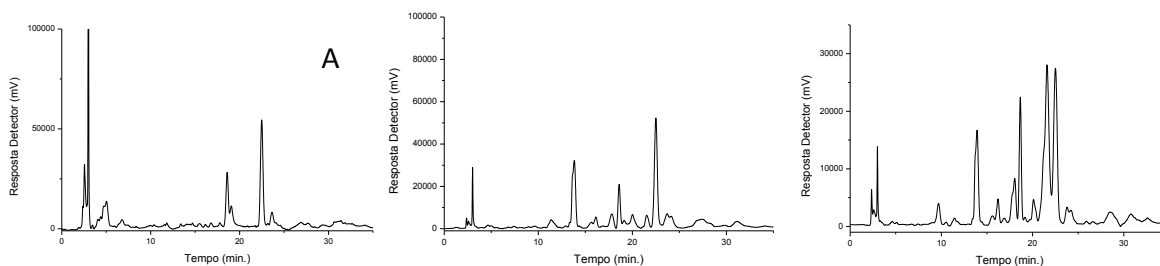


Figura 4. Cromatogramas por CLAE das frações de *C. quinoa* obtidas por fracionamento utilizando etanol e resina Diaion HP-20. (A) FQ30; (B) FQ50; (C) FQ70. Detecção em 210 nm.

A aplicação da técnica de ultrafiltração às frações FQ30 e FQ50 associada ao método de filtração em fase sólida, empregando membranas de 5 e 10 kD mostrou resultados satisfatórios. Os cromatogramas obtidos quando da análise do retentado, utilizando membrana de 10 kD, estão representados na figura 5.

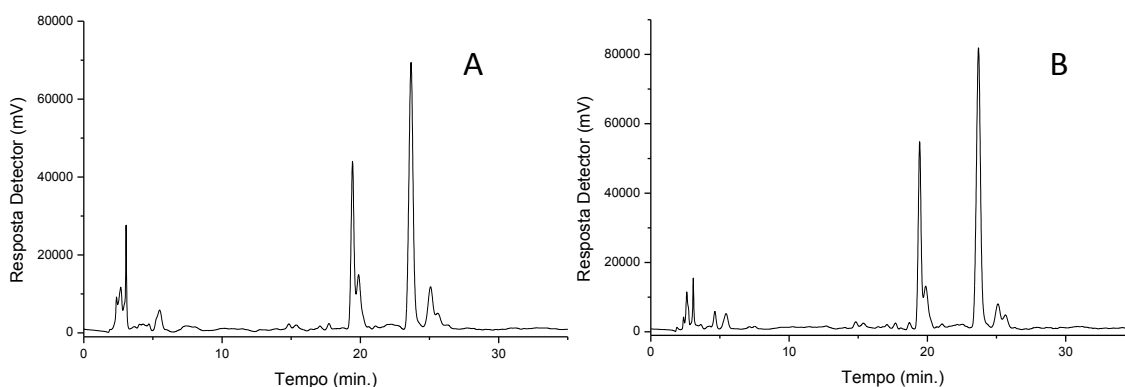


Figura 5. Cromatogramas por CLAE das frações FQ30 (A) e FQ50 (B) de *C. quinoa* obtidas após fracionamento em fase sólida e ultrafiltração tangencial. Detecção em 210 nm.

Comparando os perfis cromatográficos obtidos para a FQ30 e FQ50 antes (figura 2) e após acoplamento da ultrafiltração tangencial (figura 5) observa-se uma redução na intensidade dos sinais compreendidos até 10 min., indicando uma maior eficiência em termos de purificação.

O perfil cromatográfico quando da utilização de membranas de ultrafiltração de 5kD foi idêntico ao representado na figura 5, para as frações FQ30 e FQ50 (dados não

apresentados). Em função do menor tempo necessário para a purificação empregando-se a membrana de 10 kD, optou-se pela utilização desta no processo de fracionamento.

Processos similares relatados na literatura e destinados a remover impurezas de baixa massa molecular de produtos saponosídicos (JOSHI *et al.* , 2008; SAN MARTÍN *et al.*, 2008) mostraram-se igualmente eficientes mediante utilização de membranas de ultrafiltração de 10 kD, porém utilizando o equivalente a oito volumes de água, ao invés de apenas dois volumes, como aplicado no presente trabalho.

Objetivando averiguar a perda de saponinas mediante aplicação do processo de ultrafiltração, além do retido, também foi analisado por CLAE o filtrado resultante do uso de membranas de 10 kD. Os cromatogramas obtidos quando da análise dos filtrados, correspondentes às FQ30 e FQ50, demonstraram presença insignificante, quase não detectável, dos sinais de saponinas (dados não mostrados). Esses resultados estão em concordância com os relatados na literatura, onde os autores afirmam que as saponinas são retidas por membranas de ultrafiltração devido à sua capacidade de formar micelas quando em concentração acima da concentração micelar crítica (CMC) (MUIR *et al.*, 2002; JOSHI *et al.*, 2008; SAN MARTÍN *et al.* 2008).

4.4 Aumento de escala dos processos de fracionamento

O resultado obtido durante os ensaios de fracionamento para obtenção de saponinas de quinoa permitiu a seleção do processo de purificação em fase sólida com Diaion HP-20 e as condições experimentais preconizadas por Pavei (2004). De forma satisfatória, o processo de ultrafiltração tangencial utilizando membrana de 10 kD pode ser utilizado como purificação adicional das FQ30 e FQ50 para eliminação dos constituintes interferentes não-saponosídeos e de baixa massa molecular.

Com o intuito de viabilizar o trabalho, uma escala maior para o processo de fracionamento foi proposta. Para avaliação desse incremento no processo, o valor de

área do sinal majoritário, bem como a proporção entre os dois principais sinais foi considerada (tabela 1) nas análises por CLAE.

Tabela 1. Valores de área obtidos para os principais sinais de saponinas no aumento de escala do processo de fracionamento

	Área sinal TR ^a 15 min. – fracionamento 200 mg EXQ; DPR%	Área sinal TR 15min. – fracionamento 700 mg EXQ; DPR%	Área sinal TR 23 min. – fracionamento 200 mg EXQ; DPR%	Área sinal TR 23 min. – fracionamento 700 mg EXQ; DPR%
FQ30	-	-	1270444; 0,73	1336269; 0,47
FQ50	-	-	1201984; 0,64	1204389; 0,65
FQ70	712441; 0,55	795505; 1,48	1053397; 0,60	1104069; 0,31
FQ90	391407; 1,87	312044; 1,38	684728; 0,69	725837; 1,48

^aTR – tempo de retenção

Analisando os dados da tabela 1 se observam pequenas variações na área dos dois principais sinais das frações de quinoa quando do aumento de escala do processo de fracionamento de 200 mg para 700 mg de EXQ. Aliado a isso, a proporção entre os dois principais sinais nas FQ70 e FQ90 sofre pequenas variações durante o aumento de escala do processo de fracionamento. Na FQ70 e FQ90 a proporção entre os referidos sinais com tempo de retenção de 15 e 23 min. é de 1:1,47 e 1:1,75, respectivamente considerando o fracionamento de 200 mg de EXQ; e de 1:1,38 para FQ70 e 1:2,32 para FQ90 no fracionamento de 700 mg de EXQ. Tendo como base os resultados obtidos se considerou satisfatório o aumento na escala do processo de fracionamento, mantendo-se constantes parâmetros de processo como temperatura, dimensões de coluna e polaridade de gradiente.

Face aos resultados obtidos durante os processos de fracionamento, foram considerados satisfatórios aqueles obtidos para as frações FQ50, FQ70 e FQ90. As frações FQ30 e FQ50 apresentam perfil cromatográfico semelhante, no entanto, a

FQ50 apresenta maior pureza, já que os sinais com tempo de retenção inferior a 10 min. estão minimizados nessa fração.

Inicialmente as frações FQ50, FQ70 e FQ90 foram selecionadas para dar seguimento aos demais experimentos da tese. No entanto, em função do volume de trabalho que seria gerado pela utilização de três frações purificadas e levando-se em conta o menor número de saponinas presentes na FQ50 se optou por prosseguir os ensaios somente com FQ70 e FQ90

5. CONCLUSÕES

- A separação em fase sólida empregando Diaion HP-20 e as condições experimentais, a saber, 700 mg EXQ, misturas hidrometanólicas nas proporções 30, 50, 70 e 90 % de metanol, com volumes de fração de 500 mL e fluxo de 5-6 mL/min, mostraram-se satisfatórias na obtenção efetiva de frações purificada de saponinas de sementes de quinoa.
- Acoplado ao processo de fracionamento em fase sólida a ultrafiltração tangencial se mostrou efetiva, nas seguintes condições experimentais: pressão 25 psi, 15 mL/min fluxo de eluição, membrana de 10 kD, volume de diafiltração equivalente a 2 vezes o volume obtido em cada fração a ser ultrafiltrada, a saber FQ30 e FQ50.

Capítulo 2 Avaliação da atividade antifúngica das saponinas de *Chenopodium quinoa*, desenvolvimento de método analítico de quantificação por CLAE-DAD e caracterização estrutural por MALDI/TOF das principais saponinas presentes

Artigo 1- Antifungal activity against dermatophytes of *Chenopodium quinoa* saponins

Submetido ao periódico Fitoterapia

Para que uma fração de compostos possa ter aplicação em ensaios biológicos, métodos de fracionamento, bem como métodos de controle de qualidade precisam ser desenvolvidos de forma a permitir análise dos constituintes de interesse e garantir a qualidade do processo de obtenção do produto em questão (GUÇLU-ÜSTUNDAG; MAZZA, 2007). Nesse contexto, um método analítico por CLAE-DAD capaz de quantificar a saponina majoritária presente tanto no extrato liofilizado, quanto nas frações purificadas de quinoa, foi desenvolvido e validado. O método desenvolvido e validado foi considerado amplamente satisfatório e permitiu a determinação do teor de saponinas totais no extrato de *C. quinoa* (13 g %) e em ambas as frações, FQ70 (84 g%) e em FQ90 (69 g%). Os resultados de quantificação obtidos permitem inferir também sobre a eficiência do método de fracionamento, uma vez que o teor das substâncias de interesse é superior nas frações purificadas, quando comparadas ao extrato bruto.

Nesse capítulo foi realizada ainda, a caracterização das saponinas presentes nas frações pela técnica de MALDI/TOF-TOF. Mediante a realização dessa técnica a estrutura de 4 saponinas foi proposta, sendo duas delas derivadas do ácido fitolacagênico, uma derivada da hederagenina e outra derivada do ácido serjânico.

No que tange à atividade antifúngica das saponinas de quinoa, dois relatos são encontrados na literatura. O primeiro avalia a atividade antifúngica frente à *Candida albicans* (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001) e o segundo frente à *Botrytis cinerea*, de importância na agricultura pelas doenças provocadas em parrerais (STUARDO; SAN MARTÍN, 2008). No entanto, estudos avaliando o potencial antifúngico das saponinas de quinoa frente a outros microrganismos permanecem ainda em aberto.

Nesse contexto, além do desenvolvimento de metodologia analítica, também foi avaliada a atividade antifúngica das saponinas das frações de quinoa frente à leveduras e fungos filamentosos, especialmente dermatófitos. Para tanto, foram avaliadas 21 cepas, todas provenientes de isolados clínicos. A avaliação da atividade antifúngica foi

realizada mediante o emprego da técnica de difusão em ágar (screening de atividade) e microdiluição em placa de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As saponinas das frações de quinoa foram ensaiadas em concentrações que variaram de 0,9 a 500 µg/mL. Como controles antifúngicos foram utilizados terbinafina, anfotericina B, miconazol e anidulafungina. Ambas as frações de quinoa foram inativas frente a todas as cepas de leveduras avaliadas, mas as frações de quinoa foram capazes de inibir o crescimento de todos os dermatófitos testados. Dependendo dos microrganismos testados, os valores de CIM variaram de 62-250 µg/mL, comprovando a atividade antifúngica para as saponinas presentes nas frações de quinoa.

Capítulo 3. Caracterização das saponinas de *Chenopodium quinoa* presentes nas frações purificadas e dos agregados micelares formados

**Artigo 2 - Micellar Aggregates of Saponins from *Chenopodium quinoa*:
Characterization by Dynamic Light Scattering and Transmission Electron
Microscopy**

Aceito para publicação no periódico Die Pharmazie

ISCOM são complexos imunoestimulantes constituídos por saponinas, colesterol, fosfolipídios e um antígeno, quando o antígeno não está presente na formulação do complexo o mesmo é denominado de matriz ISCOM. Tais estruturas na sua forma clássica somente foram descritas quando da utilização de saponinas de *Quillaja saponaria* (SUN *et al.*, 2009).

Em literatura específica, foi encontrado somente um relato descrevendo a possibilidade de formação de complexos do tipo ISCOM utilizando-se as saponinas de *Chenopodium quinoa*. Na ocasião, foi relatada a formação de estruturas porosas empregando as substâncias em questão (BOMFORD *et al.*, 1992), estruturas essas que seriam indícios da formação de matrizes ISCOM típicas.

Face ao exposto, após a obtenção das frações purificadas, em saponinas descritas anteriormente, esse capítulo têm por objetivo avaliar a formação de complexos do tipo ISCOM utilizando as saponinas de quinoa. Esse capítulo objetiva ainda abordar a caracterização físico-química dos agregados micelares das saponinas e que podem influenciar nas propriedades biológicas desses compostos e determinam sua utilização na área farmacêutica.

A caracterização das frações de saponinas de quinoa teve início na determinação da concentração micelar crítica (CMC), utilizando-se um corante insolúvel, a saber, 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN). Para ambas as frações de quinoa o valor de CMC ficou próximo a 0,4 mg/mL. Após a determinação da CMC as frações de quinoa foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando-se acetate de uranila 2% como reagent de contraste; e por espalhamento de luz dinâmico. Com a utilização destas técnicas foi possível evidenciar a presença de micelas esféricas e filiformes presentes nas frações de quinoa, quando em concentração acima da CMC.

Com o intuito de avaliar a formação de matrizes ISCOM, a técnica de injeção de etanol, foi selecionada. As frações de quinoa foram formuladas com colesterol e

fosfatidilcolina e os agregados micelares formados foram avaliados por MET. Não foi possível evidenciar a formação de matrizes ISCOM para as saponinas de quinoa, nas condições testadas. Por outro lado, foram evidenciadas a formação de micelas tubulares e micelas anelares, quando as frações de quinoa foram complexadas com colesterol e fosfatidilcolina.

ANEXOS

Curvas obtidas durante a determinação da concentração micelar crítica (CMC) das frações de quinoa

Abaixo são apresentadas as curvas obtidas durante a determinação de CMC para as frações de quinoa FQ70 e FQ90. Por interpolação das curvas foi determinado o valor de CMC para as frações FQ70 e FQ90.

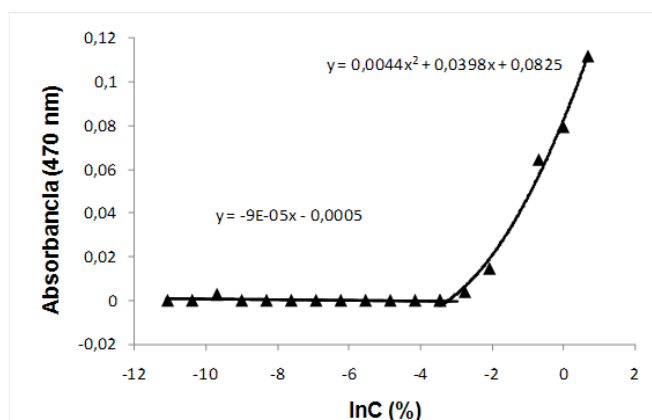


Figura 3.1a. Absorbância das soluções de FQ70-1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) a uma concentração fixa de PAN e concentrações crescentes de FQ70 ($1,53 \times 10^{-5}$ a 2%).

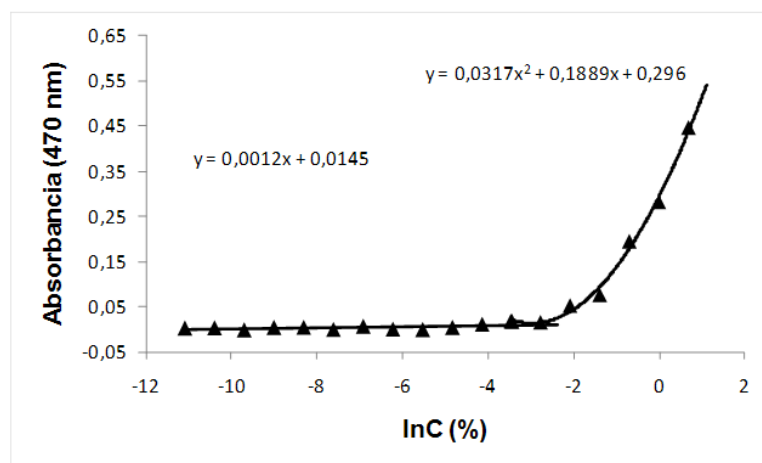


Figura 3.2a. Absorbância das soluções de FQ90-1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) a uma concentração fixa de PAN e concentrações crescentes de FQ90 ($1,53 \times 10^{-5}$ a 2%).

**Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) –
formulações obtidas pelo método da injeção de etanol**

Para as formulações contendo quantidades elevadas de colesterol, cristais de colesterol puderem ser evidenciados por MET, conforme ilustrado na figura 3.3a.

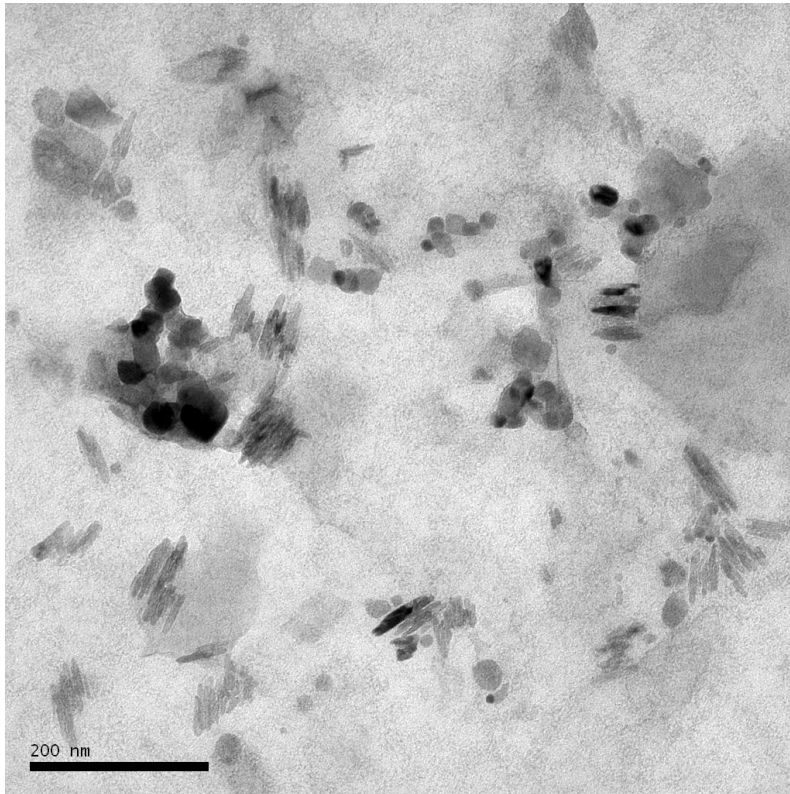


Figura 3.3a. Fotomicrografia obtida por MET dos cristais de colesterol, quando do excesso de colesterol nas formulações (formulações 10 e 20). Aumento: 150.000 x.

Avaliação da formação de matrizes ISCOM com as saponinas de *C. quinoa* e *Q. saponaria* pelo método da diálise

Em função da simplicidade do método e facilidade de execução foi selecionado nessa tese o método da injeção de etanol para a avaliação da formação de matrizes ISCOM com as saponinas de quinoa. No entanto, o método da diálise corresponde à metodologia clássica para obtenção das matrizes ISCOM de *Q. saponaria*. Dessa forma, com o intuito de avaliar a influência do método de preparo na não formação de matrizes ISCOM com saponinas de quinoa, o método da diálise foi também testado.

MATERIAIS E MÉTODOS

A técnica de diálise foi adaptada segundo o descrito por Lendemans *et al.* (2005). A proporção ótima de saponinas: colesterol: fosfolipídios relatada na literatura para a formação de ISCOM com as saponinas de *Q. saponaria* pelo método da diálise é 4:1:1 (Quil A: colesterol: fosfatidilcolina). Em função de a massa molecular das saponinas de *C. quinoa* estar na faixa de 1000 m/z e das de *Q. saponaria* estar em torno de 1500 m/z, foram testadas proporções inferiores e superiores a essa. Na realização desse ensaio foi testado o extrato bruto de *C. quinoa* nas seguintes proporções de saponina: colesterol: fosfatidilcolina: 1,5:1:1; 2,7:1:1; 4:1:1 e 6:1:1 e uma fração purificada das saponinas de *Q. saponaria* (Quil A) nas mesmas proporções testadas para *C. quinoa*.

Para realização do método da diálise colesterol e fosfatidilcolina foram pesados, dissolvidos em clorofórmio sendo o último evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Separadamente, Quil A, ou o extrato de *C. quinoa* e 40 mg de *n*-octilglicosídeo foram dissolvidos em 3,0 mL de tampão TBS. A mistura de saponinas, tensoativo e tampão foi então transferida para o recipiente contendo colesterol e fosfatidilcolina. A solução resultante foi mantida sob agitação durante 2 horas para completa solubilização dos constituintes. Após esse período a amostra em questão foi transferida para uma membrana de diálise com 1000 Da (tamanho de corte). As amostras foram dialisadas a

temperatura de 4°C com 1,0 L de TBS, durante 48 horas, sendo o tampão trocado a cada 12 horas. A avaliação da formação de matrizes ISCOM foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), empregando as mesmas condições experimentais já mencionadas no artigo referente a esse capítulo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As formulações obtidas para a fração de Quil A e *C. quinoa* foram avaliadas por MET. A presença de matrizes ISCOM foi evidenciada para as formulações contendo Quil A nas proporções: 2,7:1:1 (fig. 3.4a) e 4:1:1 (fig. 3.5a). Na proporção 4:1:1 (figura 3.5a) estruturas do tipo hélice foram evidenciadas juntamente com as matrizes ISCOM.

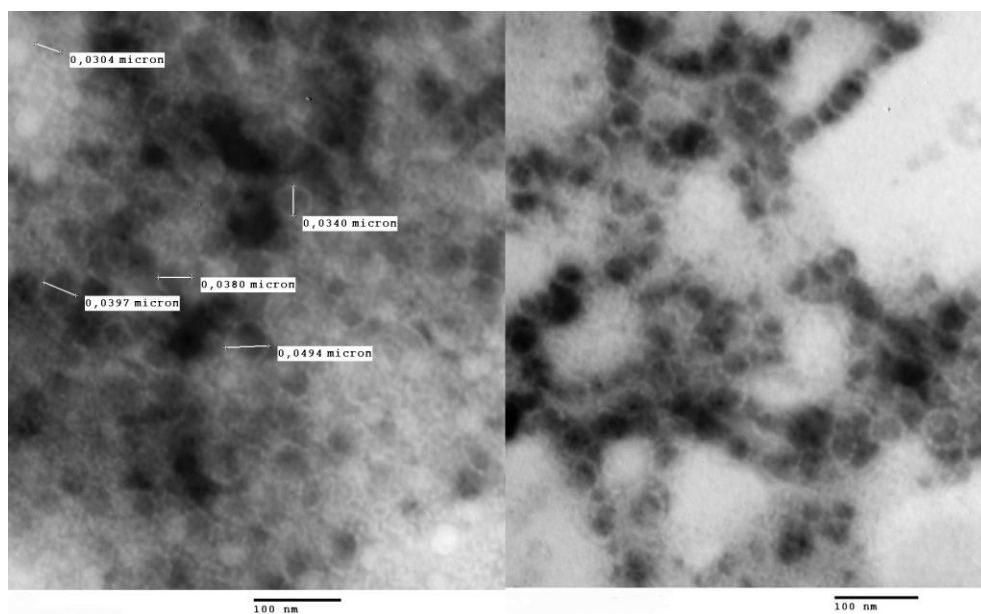


Figura 3.4a. Fotomicrografias obtidas por MET da formulação contendo QuilA: colesterol e fosfatidilcolina (2,7:1:1) obtida pelo método da diálise. Matrizes ISCOM são observadas em ambas as fotomicrografias. Aumento: 150.000x.

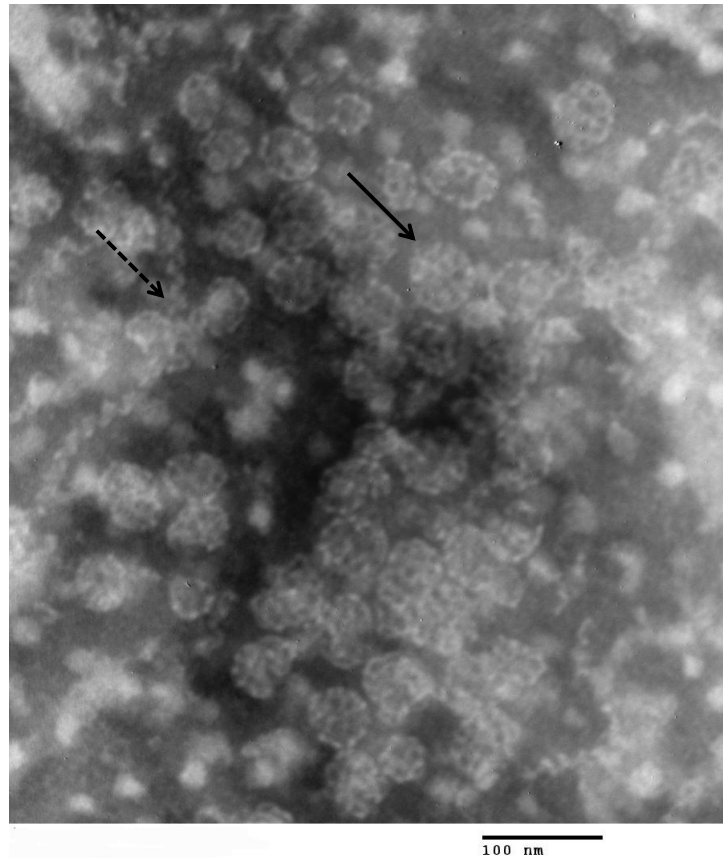


Figura 3.5a. Fotomicrografia obtida por MET da formulação contendo QuilA: colesterol e fosfatidilcolina (4:1:1) obtida pelo método da diálise. Matrizes ISCOM são observadas (linha cheia) e estruturas do tipo hélice (linha pontilhada). Aumento: 150.000 x.

Para as formulações obtidas utilizando o extrato de *C. quinoa*, não foram evidenciadas matrizes ISCOM típicas, apenas agregados tubulares e estruturas lipídicas, nas formulações com proporções de extrato de *C. quinoa*: colesterol: fosfatidilcolina 4:1:1 e 6:1:1 (figura 3.6a). Com o incremento da proporção de extrato de quinoa observa-se um discreto aumento das estruturas tubulares (figura 3.6aB).

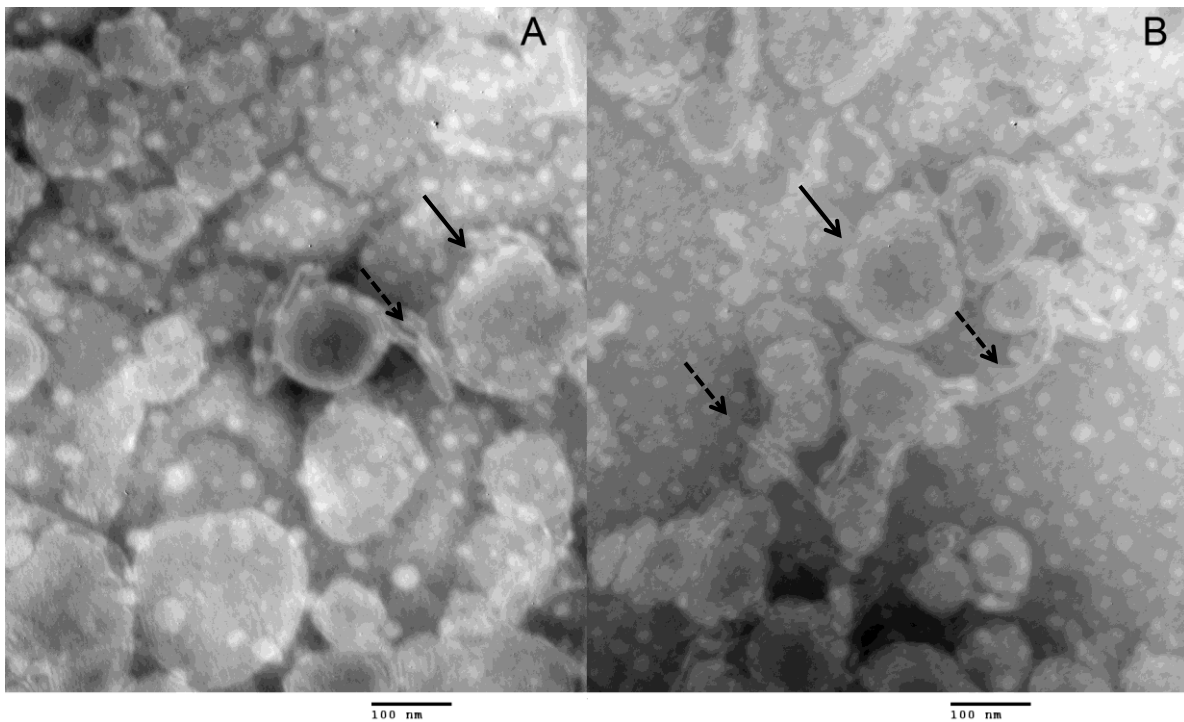


Figura 3.6a. Fotomicrografias obtidas por MET das formulações contendo extrato de *C. quinoa*: colesterol e fosfatidilcolina nas proporções 4:1:1 (A) e 6:1:1 (B) obtidas pelo método da diálise. Estruturas lipídicas são evidenciadas (linha cheia) e estruturas tubulares (linha pontilhada). Aumento: 120.000 x.

Capítulo 4. Caracterização estrutural por UPLC/Q-TOF-MS, avaliação da toxicidade e atividade imunoadjuvante das saponinas de *Chenopodium quinoa*

Artigo 3- Immunoadjuvant activity, toxicity assays and characterization by UPLC/Q-TOF-MS of triterpenic saponins from *Chenopodium quinoa* seeds

Submetido ao periódico Journal of Agricultural and Food Chemistry

Visando estabelecer uma relação entre a estrutura química das saponinas e as atividades biológicas, a caracterização estrutural das principais saponinas presentes nas frações foi realizada, utilizando a técnica de UPLC/Q-TOF-MS. O desenvolvimento da metodologia de UPLC teve como base o método previamente desenvolvido por CLAE. Mediante a técnica de UPLC/Q-TOF-MS a estrutura química de dez saponinas presentes nas frações de quinoa foi proposta. Na fração FQ90 foram evidenciadas a presença de saponinas mais apolares derivadas do ácido oleanólico e da hederagenina.

Inúmeros estudos relatam a atividade imunoadjuvante das saponinas de *Q. saponaria*, no entanto, em função da elevada toxicidade e efeito hemolítico, seu emprego fica restrito a vacinas de uso veterinário. Nesse contexto, saponinas de diversas espécies vegetais têm sido testadas quanto à sua capacidade de estimular o sistema imune de mamíferos e especial interesse têm sido dedicado àquelas saponinas que não apresentam toxicidade considerável (SUN *et al.*, 2009). Particularmente, para as saponinas de *C. quinoa* foram encontrados na literatura dois relatos de avaliação da atividade imunoadjuvante, que apresentam resultados controversos (BONFORD *et al.*, 1992; ESTRADA *et al.*, 1998).

Face ao exposto, as frações purificadas em saponinas de quinoa foram avaliadas quanto à capacidade de estimulação do sistema imune (avaliação da resposta imune humoral e celular) e comparadas frente à Quil A (fração purificada das saponinas de *Q. saponaria*). Para ambas as frações de saponinas de quinoa foi evidenciada estimulação da resposta imune humoral, pelo incremento nos níveis de anticorpos. Para FQ90 se evidenciou estímulo da resposta imune celular, mediante os testes de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e proliferação de esplenócitos.

Com o intuito de complementar o trabalho, ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina*, de toxicidade aguda *in vivo* e determinação da atividade hemolítica foram realizados para as frações de saponinas de quinoa. De forma geral, se evidenciou Q FQ70 é atóxica enquanto FQ90 apresentou alguns sinais de toxicidade quando

administrada à camundongos. Ambas as frações de quinoa testadas são menos hemolíticas quando comparadas a Quil A.

ANEXOS

Avaliação da atividade imunoadjuvante das formulações contendo saponinas de *C. quinoa*, colesterol e fosfatidilcolina

Embora não tenha se evidenciado a formação de matrizes ISCOM para ambas as frações de quinoa, FQ70 e FQ90, a avaliação da atividade imunoadjuvante das formulações também foi realizada. Isso porque na literatura estão disponíveis dados demonstrando que nanopartículas contendo saponinas de ginseng (que não formam as matrizes ISCOM típicas) promoveram um incremento da resposta imunológica, quando comparadas com as saponinas de ginseng de forma isolada (que não foram formuladas com colesterol e fosfatidilcolina) (SONG *et al.*, 2009)

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o preparo das formulações se selecionou a técnica de injeção de etanol, segundo procedimento descrito no artigo aceito para publicação (capítulo 3). Nas formulações selecionadas para avaliação da atividade imunoadjuvante a concentração das frações de quinoa foi equivalente a 1,33 mg/mL. Formulações contendo 2,66 mg/mL das frações em questão, foram também avaliadas.

Para avaliação da atividade imunoadjuvante das formulações contendo as frações de saponinas de quinoa, foi avaliada o incremento na produção de anticorpos IgG total, mediante a técnica de ELISA, descrita no artigo submetido para publicação (capítulo 4).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a figura 1 pode-se observar que as formulações contendo as frações de quinoa acrescidas de colesterol e fosfatidilcolina não exerceram um incremento na produção de anticorpos em camundongos imunizados com OVA, quando comparados ao grupo controle imunizado unicamente com OVA.

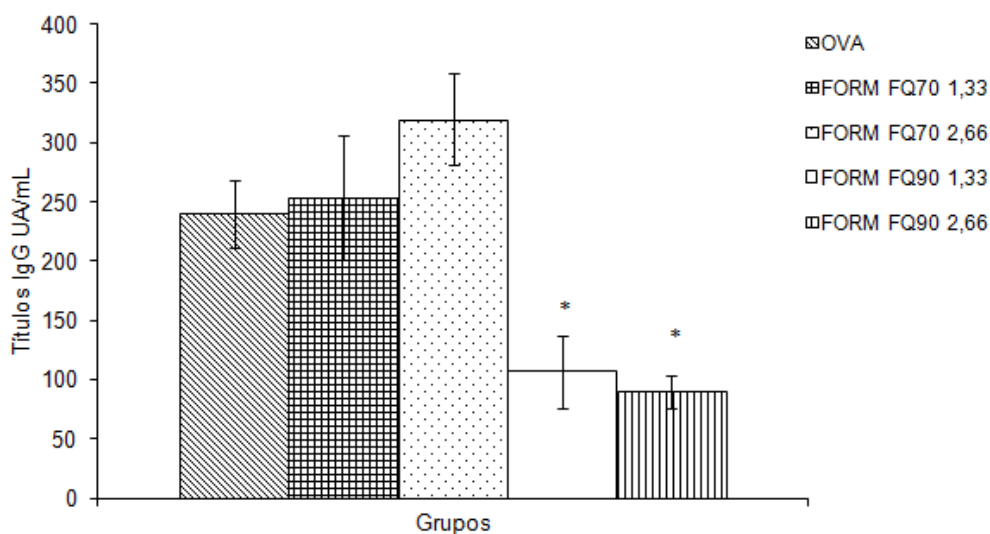


Figura 4.1a. Anticorpos IgG OVA-específicos no soro de camundongos imunizados com OVA. Grupos de seis camundongos machos imunizados nos dias 1 e 14 com 100 μ L de antígeno (OVA) adicionados de 100 μ L de solução salina contendo formulações FQ70 e FQ90 nas concentrações de 133 ou 266 μ g. Um grupo foi imunizado somente com OVA em salina (controle). O soro foi coletado no dia 28 e os níveis de anticorpos medidos pela técnica de ELISA. Os valores são apresentados como médias \pm DPR. Diferenças significativas com o grupo OVA são indicadas como * $P < 0.05$.

A menor resposta imune evidenciada para as formulações contendo frações de quinoa:colesterol:fosfatidilcolina, quando comparada à resposta observada na administração somente das saponinas (artigo submetido à publicação capítulo 4) pode estar relacionada ao fato de as saponinas de quinoa associarem-se ao colesterol, diminuindo o percentual de saponina livre, o que promoveria uma diminuição da atividade sobre o sistema imunológico. Sabe-se ainda que durante o processo de reconhecimento pelas células apresentadoras de antígenos é importante o tamanho das estruturas particuladas. Tais estruturas não podem apresentar um tamanho muito diminuto, como também não muito elevado, o que dificulta o processo de reconhecimento. Nesse sentido cabe salientar que as estruturas obtidas para as formulações de frações de quinoa: colesterol: fosfatidilcolina apresentam muitas vezes, um tamanho considerável, que pode estar influenciando nesse processo.

Analisando a figura 4.1a se evidencia ainda níveis de anticorpos mais baixos para os grupos referentes às formulações elaboradas utilizando FQ90, quando comparados ao grupo somente imunizado com OVA. Esse fato pode estar associado às características tecnológicas da preparação. No momento da preparação das formulações contendo FQ90 observou-se turbidez aliada à dificuldade do processo de filtração das amostras com filtro de 0,22 μm para esterilização das mesmas. Em função dessas características, e também, devido às estruturas com mais de 400 nm evidenciadas durante a preparação das amostras contendo FQ90, acredita-se que uma parcela da formulação, possa ter ficado retida no filtro no momento da esterilização.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2008211

Título : Obtenção e caracterização de frações purificadas de saponinas de *Chenopodium quinoa* e avaliação da potencial formação de complexos do tipo ISCOM - atividades biológicas das frações e dos complexos for

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
GEORGE GONZALEZ ORTEGA	PESQ RESPONSÁVEL	ortega@farmacia.ufrgs.br	33085218
PEDRO ERNESTO DE RESENDE	PESQUISADOR	pedroderesende@gmail.com	
SIMONE GASPARIN VERZA	PESQUISADOR	simofar@gmail.com	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 62 , ata nº 142 , de 17/12/2009 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, sexta-feira, 18 de dezembro de 2009


JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador do CEP-UFRGS

DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho foi delineado tendo como referência os relatos da presença, de saponinas triterpênicas em *C. quinoa*, assim como das atividades biológicas atribuídas a essa classe de substâncias, em especial a atividade imunoadjuvante (ESTRADA *et al.*, 1998) acrescida dos indícios de formação de complexos do tipo ISCOM (BOMFORD *et al.*, 1992), bem como seu potencial efeito antifúngico (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; STUARDO; SAN MARTÍN, 2008).

Dessa forma, a etapa inicial do trabalho destinou-se à obtenção de um extrato bruto liofilizado e de frações purificadas em saponinas empregando processos de fracionamento em fase sólida e ultrafiltração tangencial. Em função da presença de menos saponinas na fração FQ50, assim como da maior presença de substâncias interferentes, determinada mediante análise do espectro obtido por CLAE-DAD, foram selecionadas duas frações, a fração 70 (FQ70) e a fração 90 (FQ90) para o prosseguimento do trabalho.

Com o intuito de estabelecer parâmetros de controle de qualidade do processo de fracionamento e objetivando ainda a quantificação da saponina majoritária presente nas frações purificadas de quinoa, foi desenvolvido e validado um método por CLAE-DAD. O método em questão pôde ser validado de forma satisfatória e aplicado tanto ao extrato de quinoa quanto às frações, para quantificação da saponina majoritária. O teor da saponina majoritária, derivada do ácido fitolacagênico, foi expresso em alfa-hederina, padrão externo utilizado para fins de quantificação, uma vez que não estão disponíveis comercialmente padrões de saponinas de quinoa. Empregando-se o método desenvolvido e validado, o maior teor do sinal majoritário foi obtido para FQ70 (83%), em comparação com FQ90 (69%).

A ação das frações FQ70 e FQ90 sobre leveduras e fungos filamentosos, especialmente os dermatófitos foi avaliada. O *screening* para investigação da atividade antifúngica foi realizado pela medida do halo de inibição e se observou para ambas as frações de quinoa ausência de atividade frente à todas as cepas de leveduras testadas nesse trabalho. Esses resultados são contraditórios aos observados por Woldemichael e Wink (2001) que observaram atividade das saponinas de quinoa frente à cepas de *C.*

albicans. Cabe no entanto ressaltar que as cepas utilizadas nesse trabalho são provenientes de isolados clínicos sendo provavelmente mais resistentes do que cepas ATCC, como as utilizadas pelos autores supracitados na ocasião.

Por outro lado, as frações de quinoa, FQ70 e FQ90, apresentaram atividade frente à todos os dermatófitos testados. A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada mediante a técnica de microdiluição em placa de 96 poços e se observou valores de CIM que variaram de 62 µg/mL a 250 µg/mL, dependendo da fração utilizada e da cepa fúngica testada. A fração FQ70 apresentou maior atividade antifúngica quando comparada a fração FQ90 e tais diferenças podem estar relacionada com a constituição química das frações em questão.

Quando comparadas à agentes antimicóticos como anidulafungina, terbinafina, anfotericina B e miconazol, as frações de quinoa demonstraram um resultado promissor. Os valores de CIM foram superiores para FQ70 e FQ90 quando comparados aos controles em questão, no entanto, vale salientar que as frações de quinoa correspondem à um grupo de substâncias e não compostos isolados como os fármacos utilizados como controle nesse trabalho.

Adicionalmente a obtenção de frações purificadas, metodologia analítica utilizando UPLC/Q-TOF-MS, foi desenvolvida com o intuito de caracterizar estruturalmente as saponinas presentes nas frações purificadas. As principais saponinas presentes nas frações purificadas, FQ70 e FQ90, foram previamente descritas na literatura e caracterizadas como derivados da hederagenina, do ácido fitolacagênico, ácido serjânico e do ácido oleanólico (MIZUI *et al.*, 1988; MIZUI *et al.* 1990; DINI *et al.*, 2001; MADL *et al.*, 2006; KULJANABHAGAVAD *et al.*, 2008; KULJANABHAGAVAD; WINK, 2009). De acordo com os resultados obtidos mediante as análises CLAE e UPLC/Q-TOF-MS, embora as frações apresentem perfis cromatográficos bastante semelhantes, FQ90 apresenta saponinas adicionais, derivadas do ácido oleanólico e da hederagenina, que não estão presentes em FQ70. Tais diferenças na constituição, bem como na proporção dos constituintes majoritários das frações, permitem a obtenção de produtos com características distintas, a exemplo da

solubilidade, sendo FQ70 solúvel em água e FQ90, pouco solúvel no solvente hidrofílico.

As diferenças evidenciadas na constituição química serviram de suporte para o entendimento dos demais resultados obtidos. As saponinas presentes nas frações, FQ70 e FQ90, quando em concentração acima da CMC (concentração micelar crítica) originam estruturas micelares distintas, observadas e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espalhamento de luz dinâmico (DLS).

As estruturas formadas quando da complexação das frações, FQ70 e FQ90, com colesterol e fosfatidilcolina também foram distintas e não se evidenciou a formação de complexos do tipo ISCOM para quaisquer das frações de quinoa avaliadas. Foram observadas estruturas tubulares, semelhantes às obtidas com saponinas de *Quillaja* (DEMANA *et al.*, 2004; LENDEMANS *et al.*, 2005). Também foram observadas micelas anelares, semelhantes às obtidas por Bomford *et al.* (1992) para saponinas de quinoa e que na ocasião foram considerados indícios da formação de matrizes ISCOM. As micelas anelares obtidas nesse trabalho são semelhantes às aquelas observadas por Daines *et al.* (2009) quando da complexação de saponinas monodesmósídicas derivadas do ácido oleanólico com colesterol e fosfatidilcolina.

Embora a formação de matrizes ISCOM não tenha sido evidenciada para as saponinas das frações de quinoa, a atividade imunoadjuvante das mesmas foi avaliada em função de resultados controversos encontrados em literatura específica (BOMFORD *et al.*, 1992; ESTRADA *et al.*, 1998).

As frações, FQ70 e FQ90, apresentaram atividades de estimulação do sistema imune. Camundongos imunizados com vacinas contendo FQ70/OVA e FQ90/OVA apresentaram uma resposta imune humoral mais elevada do que aqueles imunizados com OVA. Os resultados obtidos nesse trabalho vêm ao encontro daqueles publicados por Estrada *et al.* (1998) que observaram um incremento nos níveis de IgG, IgG1 e IgA em camundongos imunizados com saponinas de quinoa e toxina de cólera ou ovoalbumina (OVA).

A resposta imune celular, avaliada no presente trabalho, pelos ensaios de hipersensibilidade tardia (DTH) e pelo efeito na proliferação de esplenócitos, foi mais estimulada quando da administração de FQ90/OVA, em comparação a FQ70/OVA. Esses resultados indicam que as frações de saponinas de quinoa estimulam de forma diferenciada o sistema imunológico. Enquanto FQ70 induz a estimulação fundamentalmente de resposta imune humoral, FQ90 mostrou-se mais efetiva no estímulo à resposta imune celular, estando essas diferenças relacionadas provavelmente aos constituintes presentes nas frações.

Cabe destacar no entanto, que Quil A (fração purificada das saponinas de *Quillaja*), quando comparada às frações de quinoa foi capaz de induzir de forma mais efetiva as respostas imune humoral e celular. A limitação da utilização de Quil A, em vacinas para uso em humanos, está relacionada com a elevada toxicidade e efeito hemolítico dessas saponinas. Em relação à toxicidade das frações de quinoa, alguns ensaios foram realizados e demonstraram que tanto FQ70 quanto FQ90 apresentam menor efeito hemolítico e toxicidade quando comparadas com Quil A, indicando o potencial da utilização das saponinas de quinoa como imunoadjuvante.

Especificamente, com relação ao efeito hemolítico e toxicidade, as frações de quinoa apresentaram diferenças. Enquanto FQ70 demonstrou ser atóxica FQ90 apresentou sinais de toxicidade quando administrada em camundongos. FQ90 foi também mais hemolítica do que FQ70. Cabe ressaltar no entanto que ambas as frações de quinoa são menos hemolíticas quando comparadas à Quil A.

CONCLUSÕES

- A separação em fase sólida empregando Diaion HP-20 e misturas hidrometanólicas em diferentes proporções permitiu a obtenção de frações purificadas de saponinas de sementes de *C. quinoa*.
- O método analítico desenvolvido, por CLAE-DAD, é aplicável para o controle de qualidade das frações de saponinas de quinoa, permitindo a quantificação satisfatória da saponina majoritária presente tanto no extrato bruto quanto nas frações de saponinas de quinoa.
- As frações de quinoa não apresentam atividade antifúngica frente às cepas de leveduras testadas, no entanto, apresentaram atividade frente à dermatófitos, sendo FQ70 a fração que apresentou maior atividade.
- As frações de quinoa, FQ70 e FQ90, quando em concentrações acima da CMC originam agregados micelares distintos, na forma de micelas esféricas e filiformes.
- FQ70 e FQ90 quando complexadas com colesterol e fosfatidilcolina não originam complexos do tipo ISCOM.
- FQ70 e FQ90 em formulações contendo colesterol e fosfatidilcolina originam basicamente estruturas tubulares e micelas anelares.
- As estruturas químicas das principais saponinas presentes nas frações de quinoa puderam ser caracterizadas pela técnica de UPLC/Q-TOF-MS desenvolvida nesse trabalho.
- As frações de quinoa estimulam o sistema imunológico de forma diferenciada: FQ70 estimula basicamente a resposta imune humoral enquanto FQ90 promove o estímulo principalmente da resposta imune celular.
- FQ90 apresenta atividade hemolítica e toxicidade frente à *A. salina* superior quando comparada com FQ70.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S; FRANCO, S. L. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 11, p. 37-50, 2001.

AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S. B.; BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, p. 435-457, 2011.

BARR, I. G.; SJÖLANDER, A.; COX, J. C. ISCOMs and other saponin based adjuvants. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 32, p. 247-271, 1998.

BERMÚDEZ, A.; REYES, C.; GUZMÁN, F.; VANEGAS, M.; ROSAS, J.; AMADOR, R.; RODRÍGUEZ, R.; PATARROYO, M. A.; PARARROYO, M. E. Synthetic vaccine update: applying lessons learned from recent SPf66 malaria vaccine physicochemical, structural and immunological characterization. **Vaccine**, v. 25, p. 4487-4501, 2007.

BOMFORD, R.; STAPLETON, M.; WINSOR, S.; BEESLEY, J. E.; JESSUP, E. A.; PRICE, K. R.; FENWICK, G. R. Adjuvanticity and ISCOM formation by structurally diverse saponins. **Vaccine**, v. 10, p. 572-577, 1992.

CARVALHO, L. M. J.; SILVA, C. A. B.; PIERUCCI, A. P. T. R. Clarification of Pineapple Juice (*Ananas comosus* L.Merryl) by Ultrafiltration and Microfiltration: Physicochemical Evaluation of Clarified Juices, SoftDrink Formulation, and Sensorial Evaluation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 2185-2189, 1998.

CASSANO, A.; MARCHIO, M.; DRIOLI, E. Clarification of blood orange juice by ultrafiltration: analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. **Desalinization**, v. 212, p.15-27, 2007.

COPLAND, M. J.; RADES, T.; DAVIES, N. M. Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: a simple method for the preparation of immune-stimulating complexes. **Int. J. Pharm.**, v. 196, p. 135-139, 2000.

COULTER, A.; HARRIS, R.; DAVIS, R.; DRANE, D.; COX, J.; RYAN, D.; SUTTON, P.; ROCKMAN, S.; PEARSE, M. Intranasal vaccination with ISCOMATRIX® adjuvanted influenza vaccine. **Vaccine**, v. 21, p. 946-949, 2003.

DAS NEVES, J.; AMIJI, M. M.; BAHIA, M. F.; SARMENTO, B. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 62, p. 458-477, 2010.

DEMANA, P. H.; DAVIES, N. M.; VOSGERAU, U.; RADES, T. Pseudo-ternary phase diagrams of aqueous mixtures of Quil A, cholesterol and phospholipid prepared by the lipid-film hydration method. **Int. J. Pharm.**, v. 270, p. 229-239, 2004.

DUBENSKY, T. W.; REED, S. G. Adjuvants for cancer vaccines. **Semin Immunol.**, v. 22, p. 155-161, 2010.

ESCALANTE, A. M.; SANTECCHIA, C. B.; LÓPEZ, S. N.; GATTUSO, M. A.; RAVELO, A. G.; MONACHE, F. D.; SIERRA, M. G.; ZACCHINO, S. A. Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinian species in critic risk. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 29-34, 2002.

ESTRADA, A.; LI, B.; LAARVELD, B. Adjuvant action of *Chenopodium quinoa* saponins on the induction of antibody responses to intragastric and intranasal administered antigens in mice. **Com. Immun. Microbiol. & Infect. Dis.**, v. 21, p. 225-236, 1998.

FAO/IEA – Food and Agricultural Organization of the United States. **Proposal of the government of Bolívia for an International Year of Quinoa.** Rome, 2001.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 263-288, 2003.

FARMACOPEIA Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Pt. 1.

FERNÁNDEZ, M. J.; BARBA, A.; CÁMARA, M. Effects of clarification and filtration processes on the removal of fungicide residues in red wines (var. Monastrel). **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 6156-6161, 2005.

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.

FOUBERT, K.; CUYCKENS, F.; VLEESCHOUWER, K.; THEUNIS, M.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L.; APERS, S. Rapid quantification of 14 saponins of *Maesa lanceolata* by UPLC-MS/MS. **Talanta**, v. 81, p. 1258-1263, 2010.

FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; GENNARI, S. M. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulating complexes (ISCOMs). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, p. 1-11, 2003.

GUAN, J.; LAI, C. M.; LI, S. P. A rapid method for the simultaneous determination of 11 saponins in *Panax notoginseng* using ultra performance liquid chromatography. **J. Pharmaceut. Biomed.**, v. 44, p. 996-1000, 2007.

GÜÇLU-ÜSTÜNDAG, Ö.; MAZZA, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. **Crit. Rev. Food Sci. and Nutrit.**, v. 47, p. 231-258, 2007.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, p. 430-440, 2008.

HELDENS, J. G. M.; POUWELS, H. G. W.; DERKS, C. G. G.; VAN de ZANDE, S. M. A.; HOEIJMAKERS, M. J. H. Duration of immunity induced by an equine influenza and tetanus combination vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix. **Vaccine**, v. 28, p. 6989-6996, 2010.

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

HU, K.; LÖVGREN-BENGTSSON, K.; MOREIN, B. Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 51, p. 149-159, 2001.

JORNITZ, M.W.; MELTZER, T. H. **Filtration and Purification in the Biopharmaceutical Industry**. CRC Press, 2007.

JOSHI, R. C.; SAN MARTÍN, R.; SAEZ-NAVARRETE, C.; ALARCON, J.; SAINZ, R.; ANTOLIN, M. M.; MARTIN, A. R.; SEBASTINA, L. S. Efficacy of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins against golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in the Philippines under laboratory conditions. **Crop prot.**, v. 27, p. 553-557, 2008.

KAUFFMANN, C. **Constituição Química e Avaliação da Atividade Imunoadjuvante de *Quillaja brasiliensis***. Porto Alegre: UFRGS, 2002. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, 2002.

KENSIL, C. R. Saponins as vaccine adjuvants. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 13, p. 1-55, 1996.

KULJANABHAGAVAD, T.; THONGPHASUK, P.; CHAMULITRAT, W.; WINK, M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1919-1926, 2008.

KULJANABHAGAVAD, T.; WINK, M. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. **Phytochem. Rev.**, v. 8, p. 473-490, 2009.

LENDEMANS, D. G.; MYSCHIK, J.; HOOK, S.; TADES, T. Immuno-stimulating complexes prepared by ethanol injection. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 729-733, 2005.

LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology adjuvants to improve the immune response. **Vaccine**, v. 28S, p. C25-C26, 2010.

LI, L.; LUO, G.-A.; LIANG, Q.-L.; HU, P.; WANG, Y.-M. Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q-TOF-MS. **J. Pharmaceut. Biomed.**, v. 52, p. 66-72, 2010.

LIANG, M.; TOTH, I.; DAVIES, N. M. A novel method for preparing immune stimulating complexes (ISCOMs) by hydration of freeze-dried lipid matrix. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 69, p. 840-845, 2008.

LIU, G. ANDERSON, C.; SCALTRETO, H.; BARBON, J.; KENSIL, C. R. QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. **Vaccine**, v. 20, p. 2808-2815, 2002.

LÓPEZ-VILLEGAS, E. O.; HERRERA-ARELLANO, A.; MARTÍNEZ-RIVERA, M. de los A.; ÁLVAREZ, L.; CANO-NEUPAUSENO, M.; MARQUINA, S.; RODRÍGUEZ-TOVAR, A. V.; TORTORIELLO, J. Ultrastructural Changes on Clinical Isolates of *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum* caused by *Solanum chrysotrichum* Saponin SC-2. **Planta Med.**, v. 75, p. 1517-1520.

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. Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity. **Vaccine**, v. 18, p. 3141-3151, 2000.

MADL, T.; STERK, H.; MITTELBAACH, M. Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 17, p. 795-806, 2006.

MIZUI, F.; KAZAY, R.; OTHANI, K.; TANAKA, O. Saponins from brans of Quinoa, *Chenopodium quinoa* Willd. I. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 36, p. 1415-1418, 1988.

MIZUI, F.; KASAY, R.; OHTANI, K.; TANAKA, O. Saponins from brans of Quinoa, *Chenopodium quinoa* Willd. II. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 38, p. 375-377, 1990.

MOREIN, B.; BENGTSSON, K. L. Immunomodulation by ISCOMs, immune stimulating complexes. **Methods**, v. 19, p. 94-102, 1999.

MUIR, A.; PATON, D.; BALLATYNE, K.; AUBIN, A. **Process for recovery and purification of saponins and sapogenins from quinoa (*Chenopodium quinoa*)**. US Patent No. 6,355,249.

MYSCHIK, J.; LENDEMANS, D. G.; McBURNEY, W. T.; DEMANA, P. H.; HOOK, S.; RADES, T. On the preparation, microscopic investigation and application of ISCOMs. **Micron**, v. 37, p. 724-734, 2006.

NSIMBA, R. Y.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. **Food chem.**, v. 106, p. 760-766, 2008.

ODA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, T.; KATAYAMA, S.; OHGITANI, T.; YOSHIKAWA, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. **Biol. Chem.**, v. 381, p. 67-74, 2000.

ODA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, T.; KATAYAMA, S.; OHGITANI, T.; YOSHIKAWA, M. Relationship between adjuvant activity and amphipathic structure of soyasaponins. **Vaccine**, v. 21, p. 2145-2151, 2003.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **J. Chromatogr. A**, v. 967, p. 147-162, 2002.

OLESZEK, W.; BIALY, Z. Chromatographic determination of plant saponins – An update (2002-2005). **J. Chromatogr. A**, v. 1112, p. 78-91, 2006.

OLIVEIRA-FREITAS, E.; CASAS, C. P.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; NICO, D.; SOUZA, L. O. Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 24, p. 3909-3920, 2006.

PANDEY, R. S.; BABBAR, A. K.; KAUL, A.; MISHRA, A. K.; DIXIT, V. K. Evaluation of ISCOM matrices clearance from rabbit nasal cavity by gamma scintigraphy. **Int. J. Pharm.**, v. 398, p. 231-236, 2010.

PATTNAIK, P. SHAKRI, A. R.; SINGH, S.; GOEL, S.; MUKHERJEE, P.; CHITNIS, C. E. Immunogenicity of a recombinant malaria vaccine based on receptor binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175. **Vaccine**, v. 25, p. 806-813, 2007.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de Métodos Analíticos e Tecnológicos Aplicados à Fração Saponosídica Presente nos Frutos de *Ilex paraguariensis*** A. St. Hill. Porto Alegre: UFRGS, 2004. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, 2004.

PEARSE, M. J.; DRANE, D. ISCOMATRIX™ adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune response. **Vaccine**, v. 22, p. 2391-2395, 2004.

PEARSE, M. J.; DRANE, D. ISCOMATRIX® adjuvant for antigen delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 57, p. 465-474, 2005.

PHAM, H. L.; SHAW, P. N.; DAVIES, N. M. Preparation of immune-stimulating complexes (ISCOMs) by ether injection. **Int. J. Pharm.**, v. 310, p. 196-202, 2006.

PISTELLI, L.; BERTOLI, A.; LEPORI, E.; MORELLI, I.; PANIZZI, L. Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 336-339, 2002.

RAGUPATHI, G.; DAMANI, P.; DENG, K.; ADAMS, M. M.; HANG, J.; GORGE, C.; LIVINGSTON, P. O.; GIN, D. Y. Preclinical evaluation of the synthetic adjuvant QS-21 and its constituent isomeric saponins. **Vaccine**, v. 28, p.4260-4267, 2010.

RAJPUT, Z. I.; HU, S.-H.; XIAO, C.-W.; ARIJO, A. G. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **J. Zhejiang Univ-Sc B.**, v. 8, p. 153-161, 2007.

REED, S. G.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Cell press**, v. 30, p. 23-32, 2009.

RIOS, J.-L. Effects of triterpenes on the immune system. **J. Ethnopharmacol.**, v. 128, p. 1-14, 2010.

RÖNNBERG, B.; FEKADU, M.; BEHBOUDI, S.; KENNE, L.; MOREIN, B. Effects of carbohydrate modification of *Quillaja saponaria* Molina QH-B fraction on adjuvant activity, cholesterol-binding capacity and toxicity. **Vaccine**, v. 15, p. 1820-1826, 1997.

SAN MARTIN, R.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. **Crop prot.**, v. 27, 310-319, 2008.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENT, L. A.; PETROVICK, P. R. (org). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, p. 711-740, 2003.

SIEBERT, K. J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage-haze, stabilization and analysis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, 1999.

SKENE, C. D.; SUTTON, P. Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use. **Methods**, v. 40, p. 53-59, 2006.

SJÖLANDER, A.; DRANE, D.; MARASKOVSKY, E.; SCHEERLINCK, J.-P.; SUHRBIER, A.; TENNENT, J.; PEARSE, M. Immune responses to ISCOM® formulations in animal and primate models. **Vaccine**, v. 19, p. 2661-2665, 2001.

SOARES, L. A. L.; MAIA, A.; OLIVEIRA, A. L.; PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G. G. Avaliação dos complexos formados por catequina e macromoléculas. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, p. 10-16, 2006.

SOLTYSIK, S.; WU, J-Y.; RECCHIA, J.; WHEELER, D. A.; NEWMAN, M. J.; COUGHLIN, R. T.; KENSIL, C. R. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. **Vaccine**, v. 13 p. 1403-1410, 1995.

SONG, X.; ZANG, L.; HU, S. Amplified immune response by ginsenoside-based nanoparticles (ginsomes). **Vaccine**, v. 27, p. 2306-2311, 2009.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. V. Biological activities and distribution of plant saponins. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 219-243, 2004.

SPEHAR, R. C.; SANTOS, R. L.B. Quinoa BRS Piaburu: alternativas para diversificar o sistema da produção de grãos. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 37, p. 889-893, 2002.

STEWART, T. J.; DRANE, D.; MALLIAROS, J.; ELMER, H.; MALCOLM, K. M. COX, J. C. ISCOMATRIXTM adjuvant: an adjuvant suitable for use in anticancer vaccines. **Vaccine**, v. 22, p. 3738-3743, 2004.

STUARDO, M.; SAN MARTIN, R. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. **Ind. Crop Prod.**, v. 27, p. 296-302, 2008.

SUN, J.; HU, S.; SONG, X. Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice. **Vaccine**, v. 25, p. 1114-1120, 2007.

SUN, H.-X.; QIN, F.; YE, Y.-P. Relationship between haemolytic and adjuvant activity and structure of protopanaxadiol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng*. **Vaccine**, v. 23, p. 5533-5542, 2005.

SUN, H.-X.; XIE, Y.; YE, Y.-P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 27, p. 1787-1796, 2009a.

SUN, H.-X.; XIE, Y.; YE, Y.-P. ISCOMs and ISCOMATRIXTM. **Vaccine**, v. 27, p. 4388-4401, 2009b.

SUN, H.-X.; YANG, Z.; YE, Y. Structure and biological activity of protopanaxatriol – type saponins from the roots of *Panax notoginseng*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, p. 14-25, 2006.

SUN, H.-X. Adjuvant effect of *Achyranthes bidentata* saponins on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 3432-3439, 2006.

SUN, Y.; LI, M.; LIU, J. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Anemone raddeana* saponins (ARS) on the immune responses to ovalbumin in mice. **Int. Immunopharm.**, v. 8, p. 1095-1102, 2008.

VERZA, S. G.; PAVEI, C.; ORTEGA, G. G. Study of the specificity of cross-povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of the polyphenolic compounds. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, p. 1627-1633, 2008.

WOLDEMICHAEL, G. M.; WINK, M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 2327-2332, 2001.

YANG, Z.-G.; SUN, H.-X.; FANG, W.-H. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. **Vaccine**, v. 23, p. 5196-5203, 2005.

YOUN, K. S.; HONG, J. H.; BAE, D. H.; KIM, S. J.; Kim, S. D. Effective clarifying process of reconstituted apple juice using membrane filtration with filter-aid pretreatment. **J. Mem. Sci.**, v.228, p.179–186, 2004.

ZHANG, J.-D.; CAO, Y.-B.; XU, Z.; SUN, H.-H.; AN, M.-M.; YAN, L.; CHEN, H.-S.; GAO, P.-H.; WANG, Y.; JIA, X.-M.; JIANG, Y.-Y. In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 2211-2215, 2005.

ZHU, J.; GUO, X.; FU, S.; ZHANG, X.; LIANG, X. Characterization of steroidal saponins in crude extracts of *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **J. Pharmaceut. Biomed.**, v. 53, p. 462-474, 2010.

ZHU, N.; SHENG, S.; SANG, S.; JHOO, J.-W.; BAI, N.; KARWE, M. V.; ROSEN, R. T.; HO, C.-T. Triterpene saponins from debittered Quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 865-867, 2002.