

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

**CONSTITUIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOADJUVANTE E
ESTUDOS DE PROPAGAÇÃO DE *QUILLAJA BRASILIENSIS***

Juliane Deise Fleck

Porto Alegre, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**CONSTITUIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOADJUVANTE E
ESTUDOS DE PROPAGAÇÃO DE *QUILLAJA BRASILIENSIS***

Tese apresentada por **Juliane Deise Fleck**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Grace Gosmann
Co-orientadores: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto
Prof. Dr. Paulo Michel Roehe

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Pesquisa e Desenvolvimento de Matérias-Primas Farmacêuticas – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.07.2007, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Giancarlo Pasquali
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Jarbas Alves Montanha
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Mazzafera
Universidade de Campinas

F593c Fleck, Juliane Deise
Constituição química, avaliação da atividade imunoadjuvante e estudos de propagação de quillaja brasiliensis / Fleck, Juliane Deise – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xxii, 121 p.: il.

Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Quillaja brasiliensis : Saponinas. 2. Pau-sabão. 3. Rosaceae. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Atividade adjuvante. 5. Micropropagação. I. Gosmann, Grace. II. Fett-Neto, Arthur Germano. III. Roehe, Paulo Michel. IV. Título.

CDU: 615.2.011:582.972

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

Esta tese foi realizada por meio de promoção antecipada e diretamente do mestrado para o doutorado.

O projeto foi desenvolvido no laboratório de Fitoquímica (105) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; no laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, em Eldorado do Sul, e no laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica e Centro de Biotecnologia da UFRGS.

O suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho foi obtido junto à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

À Grace pela orientação, apoio, confiança e constante incentivo pessoal e profissional desde a iniciação científica.

Ao Arthur por abrir as portas do laboratório para mim, tornando-me parte da equipe. Pela orientação, dedicação, confiança e estímulo.

Ao Professor Paulo Roehle e toda equipe do laboratório de Virologia do IPVDF pela acolhida no laboratório, confiança e colaboração.

À amiga Simone Quintana de Oliveira pela amizade no completo e verdadeiro sentido da palavra. Si, obrigado por estar sempre presente em todos os momentos, compartilhando alegrias e dificuldades. Ao Flávio, pelo exemplo de dedicação e amor à pesquisa, pela colaboração e ensinamentos desde a iniciação científica.

À amiga Simone Gnoatto pelo carinho e sincera amizade, compartilhando alegrias e angústias, sempre com uma palavra de estímulo. Si e Edlus obrigado pela confiança e pela moradia durante boa parte deste Doutorado.

Ao Claiton, meu amigo de sempre, pelo companheirismo, amizade, apoio e incentivo.

Às minhas pupilas, Anna Carolina e Fernanda, pelo incansável auxílio, pela amizade, alegria, dedicação e paciência.

Aos colegas e ex-colegas do laboratório de Fitoquímica, em especial Everton, Gisele, Gustavo, Luciana, Andressa, Franciele, Letícia, Luana, Manuela e Mariana Cardoso, pela colaboração, amizade e bons momentos.

À Carla, por termos dividido expectativas, angústias e alegrias no início deste trabalho, durante a iniciação científica.

À Joséli, minha grande amiga, obrigado pela paciência em me ensinar tudo no laboratório de Fisiologia Vegetal, pelo carinho, companheirismo e sincera amizade.

À Professora Janete Palma Fett e aos colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial Carol, Daniel, Denílson, Denise, Diogo, Felipe, Guilherme, Kelly, Luciano, Márcia, Marta, Naíla, Paloma, Raul, Ricardo, Tati Boff e Vari, por terem me recebido de braços abertos, tornando-me parte do grupo. Obrigado por estarem sempre prontos para me ajudar e ensinar. Vari, Dani, Denílson e Diogo obrigado

pelo incansável auxílio nas coletas. Joséli, Carol e Márcia obrigado pela imensa ajuda nos experimentos.

À Professora Dr. Teresa Dalla Costa e ao seu grupo de pesquisa pelo empréstimo do equipamento de CLAE e da centrífuga de Eppendorf[®], sem os quais não seria possível realizar este estudo.

Ao Professor Dr. Gilson Moreira por permitir os dois anos de coleta em sua propriedade, pela identificação botânica e pela atenção e amabilidade com as quais sempre nos recebeu.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao seu Nelson e à dona Sônia por sempre me estimularem e apoiarem, vocês são como pais para mim.

Aos meus pais, Liane e Moacir, pelo amor, carinho, apoio e estímulo em todos os momentos. Mãe e pai, obrigado por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

Ao Xandi, pelo amor, carinho, dedicação, apoio e incentivo em todos os momentos. Por estar sempre ao meu lado, por me compreender, enfim obrigado por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL	01
1. INTRODUÇÃO	03
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
2.1 <i>Quillaja brasiliensis</i>	06
2.1.1 Aspectos botânicos de <i>Q. brasiliensis</i>	06
2.1.2 Constituição Química de <i>Q. brasiliensis</i>	07
2.1.3 Ensaio Biológico com <i>Q. brasiliensis</i>	08
2.2 <i>Quillaja saponaria</i>	08
2.2.1 Constituição Química de <i>Q. saponaria</i>	08
2.2.2 Atividades Farmacológicas de <i>Q. saponaria</i>	11
2.2.2.1 Quil-A [®]	12
2.2.2.2 QS-21	13
2.2.2.3 ISCOM.....	15
2.2.2.4 Mecanismo de Ação	16
2.2.2.5 Estudos de Relação Estrutura-Atividade	17
2.2.2.6 Vacinas Comerciais Contendo ISCOMs	19
2.3 REFERÊNCIAS	20

3. OBJETIVOS	27
4. CONTEÚDOS ABORDADOS.....	28
CAPÍTULO II. ESTUDO QUÍMICO DE <i>QUILLAJA BRASILIENSIS</i>.....	29
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.1 Procedimentos Gerais	34
2.2 Material Vegetal.....	34
2.3 Obtenção do Extrato Aquoso e da Fração Purificada.....	35
2.4 Análise Cromatográfica do Extrato Bruto e da Fração QB-90	35
2.5 Obtenção do Extrato Aquoso para Análises por CLAE	36
2.6 Desenvolvimento do Método de Análise Quantitativa da Fração QB-90 por CLAE.	36
2.6.1 Condições Cromatográficas	36
2.6.2 Validação.....	36
2.6.2.1 Avaliação da Linearidade e Intervalo de Variação.....	37
2.6.2.1.1 Curvas de Calibração	37
2.6.2.2 Avaliação da Precisão	37
2.6.2.3 Avaliação da Exatidão	38
2.6.2.4 Determinação dos Limites de Detecção e Quantificação	38
2.6.2.5 Avaliação da Robustez	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1 Obtenção e Análise Cromatográfica do Extrato Aquoso de Folhas de <i>Q. brasiliensis</i> e da Fração QB-90	39
3.2 Obtenção do Extrato Aquoso para Análises por CLAE	40
3.3 Desenvolvimento do Método de Análise Quantitativa da Fração QB-90 por CLAE.	40

3.3.1 Linearidade e Intervalo de Variação	42
3.3.2 Precisão.....	46
3.3.3 Exatidão.....	48
3.3.4 Limites de Detecção e Quantificação	49
3.3.5 Robustez	49
4. REFERÊNCIAS	51

CAPÍTULO III. ADJUVANT ACTIVITY OF <i>QUILLAJA BRASILIENSIS</i> SAPONINS ON THE IMMUNE RESPONSES TO BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 IN MICE VACCINE 24: 7129-7134, 2006.....	53
---	-----------

CAPÍTULO IV. ESTUDOS DE PROPAGAÇÃO DE <i>QUILLAJA BRASILIENSIS</i>	61
---	-----------

1. INTRODUÇÃO	63
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
2.1 Material Vegetal.....	68
2.2 Protocolos de Propagação	68
2.3 Estabelecimento de Culturas de Partes Aéreas	69
2.4 Experimentos de Enraizamento.....	69
2.5 Identificação de Fatores que Afetam a Produção e Acúmulo da Fração QB-90 em <i>Q. brasiliensis</i>	70
2.5.1 Ácido Salicílico	71
2.5.2 Ácido Jasmônico	71
2.5.3 Dano Mecânico.....	72
2.5.4 Exposição à luz UVC	72
2.5.5 Exposição à luz UVB	73
2.6 Análise Sazonal de QB-90 em <i>Q. brasiliensis</i>	73
2.7 Análise da Distribuição Órgão–específica e Ontogenética de QB-90 em <i>Q. brasiliensis</i>	73

2.8 Extração e Análise das Saponinas	74
2.9 Análise Estatística	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1 Protocolos de Propagação	75
3.2 Estabelecimento de Cultivos de Partes Aéreas.....	76
3.3 Experimentos de Enraizamento.....	77
3.4 Identificação de Fatores que Afetam a Produção e Acúmulo da Fração QB-90 em <i>Q. brasiliensis</i>	79
3.4.1 Ácido Salicílico	81
3.4.2 Ácido Jasmônico	82
3.4.3 Dano Mecânico.....	84
3.4.4 Exposição à luz UVC	85
3.4.5 Exposição à luz UVB	86
3.5 Análise Sazonal de QB-90 em <i>Q. brasiliensis</i>	88
3.6 Análise da Distribuição Órgão–específica e Ontogenética de QB-90 em <i>Q. brasiliensis</i>	89
4. REFERÊNCIAS	93
CAPÍTULO V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
VI. ANEXOS	105
1. Parecer do Comitê de Ética.....	107
2. Coordenadas geográficas da plantas coletadas na propriedade do Prof. Dr. Gilson Moreira, município de Canguçu – RS.....	108
VII. BIOGRAFIA	109
VIII. PARECERES	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variações estruturais observadas nas saponinas de <i>Q. saponaria</i>	10
Tabela 2.1: Análise de regressão linear da curva de calibração da fração QB-90.....	43
Tabela 2.2: Análise de variância da regressão linear para as áreas dos picos determinadas para a curva de calibração da fração QB-90	44
Tabela 2.3: Áreas dos picos da fração QB-90 analisadas por CLAE	44
Tabela 2.4: Análise de regressão linear da curva de calibração para o extrato aquoso de <i>Q. brasiliensis</i>	45
Tabela 2.5: Análise de variância da regressão linear para as áreas dos picos determinadas para a curva de calibração do extrato aquoso de <i>Q. brasiliensis</i>	45
Tabela 2.6: Áreas dos picos correspondentes a QB-90 no extrato aquoso de <i>Q. brasiliensis</i> , obtidas por CLAE.....	46
Tabela 2.7: Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade para o extrato aquoso de <i>Q. brasiliensis</i> por CLAE.....	47
Tabela 2.8: Valores experimentais obtidos na determinação da precisão intermediária para o extrato aquoso de <i>Q. brasiliensis</i> por CLAE	48
Tabela 2.9: Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o extrato aquoso de <i>Q. brasiliensis</i> por CLAE	48
Tabela 2.10: Resultados obtidos para o teste de robustez aplicado ao método desenvolvido por CLAE	49
Table 1: Toxicity <i>in vivo</i> of aqueous extracts from the barks, leaves and branches of <i>Quillaja brasiliensis</i>	58
Tabela 4.1: Relação entre as condições climáticas no período de coleta e a produção de QB-90 em folhas de <i>Q. brasiliensis</i> , coletadas sazonalmente durante dois anos	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Exemplar nativo de <i>Q. brasiliensis</i> , Canguçu, RS	06
Figura 1.2: Flores (A) e frutos (B e C) de <i>Q. brasiliensis</i>	06
Figura 2.1: Análise cromatográfica do extrato aquoso de <i>Q. brasiliensis</i> , QB-90 e frações comerciais de <i>Q. saponaria</i> , por CCD	39
Figura 2.2: Perfis cromatográficos para injeções em triplicata da fração QB-90 (A) e do extrato aquoso de <i>Q. brasiliensis</i> (B), obtidos por CLAE.....	41
Figura 2.3: Representação gráfica da curva de calibração da fração QB-90 obtida por CLAE	42
Figura 2.4: Representação gráfica da curva de calibração do extrato aquoso de <i>Q. brasiliensis</i> obtida por CLAE.....	45
Figure 1: Compound 3-O-β-D-glucuronopyranosyl-quillaic acid	56
Figure 2: BHV-1 specific serum IgG, IgG1 and IgG2a antibodies in mice immunized s.c. on days 0 and 28 with vaccines prepared with: (i) inactivated BoHV-1 antigen without adjuvant (control); antigen adjuvanted with <i>Quillaja brasiliensis</i> extracts from: (ii) barks (100 μg); (iii) leaves (400 μg); (iv) branches (400 μg); (v) QB-90 (100 μg) and (vi) Quil-A [®] (100 μg). The values are presented as mean ± S.E. (n=6)	58
Figure 3: BHV-1 specific serum of total IgG antibody in mice immunized s.c. on days 0 and 28 with vaccines prepared with inactivated BHV-1 antigen without adjuvant (control) or either in combination with QB-90 (50, 100, 150 and 200 μg/dose) or Quil-A [®] (100 μg). The values are presented as mean ± S.E. (n=8).....	59
Figura 4.1: Plantas tratadas com soluções de ácido jasmônico (A) e com solução controle (B).....	72
Figura 4.2: Sementes germinadas sob condições assépticas.....	75
Figura 4.3: Percentuais de germinação e contaminação de sementes de <i>Q. brasiliensis</i> germinadas <i>in vitro</i> na luz em meio sem sacarose (LS), na luz em meio	

com sacarose (LC), no escuro em meio sem sacarose (ES) e no escuro em meio com sacarose (EC), quatro dias após a inoculação nos respectivos meios de germinação.....	76
Figura 4.4: Culturas meristemáticas de <i>Q. brasiliensis</i> com 45 dias	76
Figura 4.5: Explantes de <i>Q. brasiliensis</i> enraizados nos tratamentos (a) controle, (b) AIA 10 mg/l, (c) AIB 10 mg/l e ANA 10 mg/l (d), 50 dias após a inoculação em meio de enraizamento.....	77
Figura 4.6: Número (A) e comprimento (B) médio de raízes por explante de <i>Q. brasiliensis</i> , expostos continuamente a AIA, AIB, ANA ou controle sem auxina, por 50 dias.....	78
Figura 4.7: Número (A) e comprimento (B) médio de raízes por explante de <i>Q. brasiliensis</i> , expostos aos tratamentos, AIB 1 mg/l, AIB 10 mg/l e AIA 10 mg/l, em sistema contínuo, e AIB 50 mg/l em sistema de pulso, com seus respectivos controles.....	80
Figura 4.8: Efeito da aplicação exógena de ácido salicílico sobre o conteúdo de QB-90 (% peso seco).....	81
Figura 4.9: Plantas tratadas com solução controle (A), solução de ácido jasmônico 40 µM (B) e 400 µM (C) no último dia de experimento (dia 6).....	83
Figura 4.10: Efeito da aplicação de ácido jasmônico exógeno sobre a produção e acúmulo de QB-90 em plantas de <i>Q. brasiliensis</i>	84
Figura 4.11: Efeito da aplicação de dano mecânico sobre a concentração de QB-90 (% peso seco) em <i>Q. brasiliensis</i>	85
Figura 4.12: Efeito da exposição à luz UVC sobre o conteúdo de QB-90 (% peso seco).....	86
Figura 4.13: Plantas expostas à luz branca (A) e à luz UVB (B), no último dia de experimento (dia 14).....	86

Figura 4.14: Efeito da exposição à luz UVB sobre o conteúdo de QB-90 (% peso seco).....	87
Figura 4.15: Análise sazonal da concentração média de QB-90 em folhas de <i>Q. brasiliensis</i> , coletadas no município de Canguçu, RS, (A) entre o inverno de 2004 e o outono de 2005 (primeiro ano de coleta) e (B) entre o inverno de 2005 e o outono de 2006 (segundo ano de coleta)	90
Figura 4.16: Distribuição de QB-90 nas diferentes partes vegetais (raiz, caule e folhas) de plantas propagadas em laboratório (n = 5)	91
Figura 4.17: Distribuição de QB-90 nas diferentes partes vegetais (cascas, folhas e ramos) de indivíduos adultos, coletados no inverno de 2004 no município de Canguçu - RS	92
Figura 4.18: Distribuição de QB-90 ao longo do desenvolvimento ontogenético em <i>Q. brasiliensis</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOH	ácido acético
AE	extrato aquoso, do inglês “aqueous extract”
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenoacético
ANOVA	análise de variância
BAP	benzilaminopurina
BoHV-1	herpesvírus bovino tipo 1, do inglês “bovine herpesvirus type 1”
CAA	célula apresentadora de antígeno
CCD	cromatografia em camada delgada
CHCl ₃	clorofórmio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	concentração micelar crítica
CSP	proteína do circumsporozoíto, do inglês “circumsporozoite protein”
DPa	desvio padrão médio do intercepto
DPR	desvio padrão relativo
DS	saponina desacilada
EC	escuro em meio com sacarose
ELISA	ensaio imunoenzimático, do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
ES	escuro em meio sem sacarose
EtOH	etanol
FDA	“Food and Drug Administration”
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
FMP1	proteína recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> , do inglês “falciparum malaria protein 1”
GPI-0100	mistura de análogos semi-sintéticos das saponinas nativas
H ₂ O	água
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HIV	vírus da imunodeficiência humana, do inglês “human immunodeficiency virus”
IC	inclinação média das curvas de calibração

ICH	“ <i>International Conference on Harmonisation</i> ”
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
ISCOM	complexo imunoestimulante, do inglês “immuno-stimulating complex”
LC	limite de confiança
LC	luz em meio com sacarose
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
LS	luz em meio sem sacarose
MeOH	metanol
MS	Murashige & Skoog
n-BuOH	n-butanol
NMR	espectroscopia de ressonância magnética nuclear, do inglês “nuclear magnetic resonance”
OD	densidade óptica do inglês “optical density”
OVA	antígeno experimental albumina de ovo ou ovalbumina
PAR	radiação fotossinteticamente ativa
PBS	solução de salina tamponada com fosfato, do inglês “phosphate buffered sterile saline”
PBS-T	solução de salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween 20
r	coeficiente de correlação
r ²	coeficiente de determinação
RDS-1	análogo à QS-21, purificado a partir de GPI-0100
RE	Resolução
RMN	espectroscopia de ressonância magnética nuclear
RST,S	proteína recombinante de <i>P. falciparum</i> , contendo porções da CSP fundida ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B
TFA	ácido trifluoracético, do inglês “trifluoroacetic acid”
Th	linfócito T auxiliar, do inglês “helper T cells”
TLC	cromatografia em camada delgada, do inglês “thin-layer chromatography”
UV	ultravioleta

RESUMO

Quillaja brasiliensis (A. St.-Hil. & Tul.) Mart. é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, conhecida popularmente como pau-sabão, devido à capacidade de suas folhas e cascas formarem abundante espuma em água. A espécie congênere chilena, *Q. saponaria*, é uma das principais fontes industriais de saponinas, as quais são utilizadas, entre outros, como adjuvantes em vacinas. Tendo em vista a presença de saponinas em *Q. brasiliensis*, métodos por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram desenvolvidos para a caracterização e o doseamento de fração purificada de saponinas, a partir do extrato aquoso de folhas, denominada QB-90. Ensaio para verificar a toxicidade subcutânea e o perfil dose-dependente para atividade adjuvante também foram realizados com esta fração. Para o doseamento de QB-90 no extrato aquoso foi desenvolvido e validado um método por CLAE empregando coluna de fase reversa C₈, sistema isocrático acetonitrila:água, fluxo de 0,8 ml/min e detecção a 214 nm. Na validação do método, foram avaliados os parâmetros de linearidade e intervalo de variação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Em relação à toxicidade subcutânea de QB-90 em camundongos, não foram observados efeitos sistêmicos no intervalo de doses de 50 a 400 µg. Vacinas experimentais preparadas com herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) como antígeno e QB-90 (50-200 µg) foram capazes de aumentar a resposta imunológica em camundongos de modo comparável às saponinas de *Q. saponaria* (QUIL-A[®], 100 µg). Com vistas à potencial utilização sustentável da espécie brasileira na obtenção de saponinas de interesse industrial, protocolos básicos de obtenção de plantas de *Q. brasiliensis* por micropropagação e por germinação de sementes foram desenvolvidos. Para melhor compreender o perfil de acúmulo de QB-90, seu conteúdo foi investigado em diferentes órgãos vegetais, em diferentes estações do ano e durante o desenvolvimento de plântulas, assim como em resposta a fatores de estresses bióticos e abióticos. O conteúdo de QB-90 não foi afetado pela aplicação de ácido salicílico exógeno (5 mM). No entanto, foi aumentado pela aplicação exógena de ácido jasmônico (40 µM e 400 µM), bem como pela exposição à radiação UVC. Tendência de aumento no teor de QB-90 foi observada com a aplicação de dano mecânico controlado e com a exposição à radiação UVB. A distribuição órgão-específica de QB-90 foi avaliada, detectando-se maior

concentração nas folhas do que em raízes e caules de plantas propagadas em laboratório. O teor de QB-90 também foi analisado nas diferentes estações climáticas ao longo de dois anos, indicando que a redução da insolação, geralmente associada a períodos de baixa pluviosidade, está associada à maior produção de QB-90.

Palavras-chave: *Quillaja brasiliensis*; saponina; QB-90; HPLC; atividade adjuvante; BoHV-1; micropropagação; germinação; enraizamento; ácido jasmônico; dano mecânico; UV.

ABSTRACT

CHEMICAL COMPOSITION, ADJUVANT ACTIVITY EVALUATION AND PROPAGATION STUDIES OF *QUILLAJA BRASILIENSIS*

Quillaja brasiliensis (A. St.-Hil. & Tul.) Mart. is a native tree of Rio Grande do Sul, the Southern state of Brazil, commonly known as soap tree due to the capacity of their leaves and barks to produce abundant foam in water. The related Chilean species, *Q. saponaria*, is one of the main sources of industrial saponins which are used as adjuvant formulation for vaccines. Considering the presence of saponins in *Q. brasiliensis*, thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) methods were developed to characterize and quantify the purified saponin fraction named QB-90, obtained from the aqueous extract of leaves. Additionally, the subcutaneous toxicity and dose-response profile to adjuvant activity of QB-90 were evaluated in mice. An HPLC method was developed and validated to quantify QB-90 content in aqueous extract, employing RP-8 column, mobile phase acetonitrile:water, flow rate of 0.8 ml/min and detection at 214 nm. The validation parameters evaluated were linearity and range, precision, accuracy, detection limit, quantitation limit and robustness. In relation to QB-90 subcutaneous toxicity in mice, systemic effects were not observed in doses ranging from 50-400 μ g. Experimental vaccines prepared with bovine herpesvirus type I (BoHV-1) antigen and QB-90 (50-200 μ g) were able to enhance the immune responses of mice in a comparable manner to saponins from *Q. saponaria* (QuilA, 100 μ g). Considering the potential sustainable utilization of the Brazilian species as a source of saponins of industrial use, basic protocols for obtaining *Q. brasiliensis* plants by micropropagation and seed germination were developed. To better understand the accumulation patterns of QB-90, we investigated its content in different plant organs; throughout the seasons and during seedling development, as well as in response to potential biotic and abiotic stress factors. Content of QB-90 wasn't affected by exogenous application of salicylic acid (5mM). However, it was increased by exogenous application of jasmonic acid (40 μ M and 400 μ M), as well as by exposure to UVC. Trends toward increase in QB-90 content were observed with exposure to UVB and wounding. The organ-specific QB-90 distribution was evaluated and higher amounts were observed in leaves than roots and stems of plants propagated in the laboratory. Variations in

QB-90 content in different seasons for two years showed that lower insolation, generally combined with low precipitation periods, were associated with higher QB-90 content.

Keywords: *Quillaja brasiliensis*; saponin; QB-90; HPLC; adjuvant activity; BoHV-1; micropropagation; propagation studies, rooting, jasmonic acid; wounding; UV.

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

Saponinas são uma classe de metabólitos secundários de alto peso molecular, estruturalmente diversos, que ocorrem em muitas espécies de plantas. São caracterizadas por um esqueleto derivado do óxido de esqualeno, precursor de 30 carbonos, ao qual resíduos de açúcares estão ligados (VINCKEN et al., 2007).

A biossíntese dos metabólitos secundários é distinta e não está restrita a rotas metabólicas clássicas (WINK, 1999). Muitas dessas moléculas possuem considerável valor econômico, sendo utilizadas por diversos setores industriais. Dentre estes compostos, as saponinas merecem destaque, pois são utilizadas por setores como o farmacêutico, na preparação de medicamentos, vacinas, cosméticos e reagentes para análises clínico-laboratoriais; alimentício, como emulsificante e espumante; têxtil, na lavagem de tecidos finos; entre outros

Uma das principais fontes de saponinas industriais são as cascas de *Quillaja saponaria* Molina, espécie arbórea nativa da América do Sul, encontrada no Chile, Bolívia e Peru (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995; BALANDRIN, 1996).

As saponinas de *Q. saponaria* têm sido investigadas quanto às atividades hipocolesterêmica, estimulante da absorção de antibióticos e peptídeos por via nasal e ocular, larvicida, e imunoadjuvante, sendo essa última a mais pesquisada. Devido à sua capacidade de estimular resposta imune humoral e mediada por células, quando administradas com diversos antígenos e em várias espécies de animais, têm sido empregadas como adjuvantes em vacinas. É observada atividade quando administradas tanto por via oral como por via parenteral (CAMPBEEL e PEERBAYE, 1992; JENKINS e ATWAL, 1994; PILLION et al., 1995; RECCHIA et al., 1995; PELAH et al., 2002; PICKERING et al., 2006).

A utilização comercial e experimental das cascas de *Q. saponaria* para a obtenção de saponinas tem levado à intensa exploração das florestas chilenas, sendo necessárias, em 1999, cerca de 50.000 árvores/ano para suprir a demanda mundial (SAN MARTÍN e BRIONES, 1999).

No Brasil é encontrada *Quillaja brasiliensis* (A. St.-Hil. Et Tul.) Mart., espécie congênere à chilena (REITZ, 1996), nativa do Rio Grande do Sul, com ocorrência

natural até o estado de São Paulo. É conhecida popularmente como pau-sabão, dada à capacidade das folhas e cascas do tronco de formação abundante de espuma em água (REITZ, 1996).

Q. brasiliensis pertence à família Rosaceae, entretanto, foi sugerido, pela análise filogenética por seqüenciamento do gene *rbcL* em Rosaceae, que o gênero *Quillaja* não faz parte desta família, sendo proposto o reconhecimento da família Quillajaceae, dentro da ordem Fabales Bromhead (MORGAN et al., 1994; BREMER et al., 1998).

Em trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa foi realizada a comparação qualitativa da composição química de folhas, ramos e cascas do tronco de *Q. brasiliensis*, através de análise cromatográfica. Foi constatado que folhas e ramos possuem perfil cromatográfico semelhante para saponinas, nos sistemas cromatográficos utilizados. Ainda, foi relatado que vacinas experimentais preparadas com extratos aquosos de folhas, ramos e cascas de *Q. brasiliensis* apresentaram atividade imunoadjuvante contra *herpesvírus bovino* tipo 1 em camundongos (KAUFFMANN, 2002, KAUFFMANN et al., 2004).

Um aspecto a destacar é a presença de saponinas em folhas de *Q. brasiliensis*. Esse resultado é importante sob o ponto de vista de um possível aproveitamento industrial, visto que esta é uma fonte renovável, não sendo necessária a derrubada das árvores. Além disso, a retirada das cascas de *Q. saponaria* ocorre em indivíduos com idade entre 30 e 50 anos, o que denota o crescimento lento da espécie, e a dificuldade de cultivos para fins industriais de modo sustentado frente à crescente demanda deste produto.

As diversas atividades biológicas já relatadas para as saponinas de *Quillaja* atestam o grande interesse por essa classe de compostos. Apesar da potencial utilização dessas saponinas, a sua aplicação tem sido limitada pela dificuldade no desenvolvimento de métodos de purificação e caracterização específicos da matéria-prima obtida a partir de *Quillaja*, enfim, pela dificuldade de isolamento dessas saponinas devido a sua complexidade estrutural.

Portanto, é importante, para validar a utilização das saponinas de *Q. brasiliensis* como substitutivo de *Q. saponaria*, realizar o estudo químico e biológico

da espécie brasileira, assim como, há necessidade de desenvolver estratégias para uma exploração racional e sustentada dos recursos naturais, de modo a preservar o ambiente natural e produzir matéria-prima com máximo rendimento em saponinas para utilização industrial.

Neste contexto, tornam-se essenciais estudos que conduzam ao conhecimento detalhado dos fatores que afetam o rendimento de saponinas de valor terapêutico, bem como a análise fisiológica de acúmulo destes compostos.

A proposta geral do grupo de pesquisa inclui a detecção da(s) fração (ões) ativa(s) de *Q. brasiliensis* e o seu estudo químico, assim como o estabelecimento de protocolos de propagação de *Q. brasiliensis* e a análise dos fatores que interferem na produção de saponinas visando a obtenção de matéria-prima nacional química e farmacologicamente caracterizada.

Desses resultados são esperados conhecimentos necessários à pesquisa e ao desenvolvimento de vacinas, à utilização racional da biodiversidade, com enfoque no uso medicinal de compostos ativos de origem natural de forma sustentável e preservando áreas naturais de ocorrência da espécie-alvo. É esperado que em futuro próximo seja possível a interação com o setor.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *QUILLAJA BRASILIENSIS*

2.1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DE *Q. BRASILIENSIS*

Q. brasiliensis é uma árvore de 7 a 15 metros de altura, com 30 a 40 cm de diâmetro, de casca escura e folhagem persistente (Figura 1.1). Suas folhas são lanceoladas a oblongo lanceoladas, alternas, com 5 a 10 cm de comprimento e 1 a 1,5 cm de largura, de cor verde escura na face superior e verde amarelada na face inferior. As flores (Figura 1.2 A) são dispostas em corimbos axilares de aproximadamente 12 mm de diâmetro, pediceladas, com cálice tomentoso exteriormente. O fruto (Figura 1.2 B e C) é formado por 5 folículos dispostos na forma de estrela, conatos na base e tomentosos (CORRÊA, 1984; REITZ, 1996).



Figura 1.1: Exemplar nativo de *Q. brasiliensis*, Canguçu, RS.

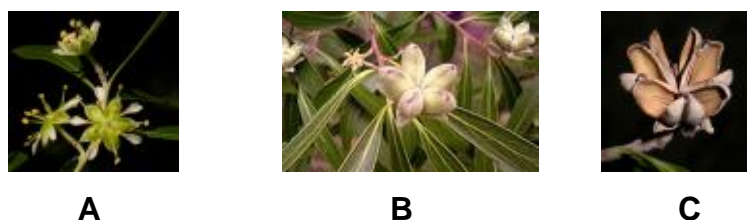


Figura 1.2: Flores (A) e frutos (B e C) de *Q. brasiliensis*. Em B observa-se um fruto verde e em C um fruto maduro, cujas sementes foram dispersas (Fonte: http://132.236.163.181/cgi-bin/dol/dol_terminal.pl?family=Quillajaceae).

2.1.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE *Q. BRASILIENSIS*

KAUFFMANN (2002) e KAUFFMANN e colaboradores (2004) verificaram a presença dos flavonóides quercetina e rutina, e do diterpeno glicosilado, éster 19-O- β -D-glicopiranosídeo do ácido 16-hidróxi-lambértico, na fração *n*-butanólica das folhas da espécie brasileira, sendo esse o primeiro diterpeno abietano isolado de um membro da família Rosaceae. Esses estudos demonstraram que o diterpeno isolado, além de ser o composto majoritário das folhas de *Q. brasiliensis*, não pode ser detectado por cromatografia em camada delgada (CCD) nas folhas da espécie congênere chilena.

Por meio da hidrólise ácida do extrato aquoso de folhas de *Q. brasiliensis*, foi possível isolar uma pró-sapogenina, o ácido 3-O- β -D-glicuronopiranosil-quiláico, identificado por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . A presença dessa substância indica que as folhas da espécie brasileira apresentam compostos com estrutura química semelhante às saponinas encontradas nas cascas da espécie chilena, uma vez que o ácido quiláico é uma das agliconas presente em *Q. saponaria*. Outro indicativo da semelhança estrutural destes compostos foi a similaridade encontrada entre os espectros de RMN de ^1H das frações QB-80 e QB-90 (purificadas a partir do extrato aquoso de folhas de *Q. brasiliensis*) e os espectros de Quil-A[®] (extrato de saponinas de *Q. saponaria*, disponível comercialmente) e de suas frações purificadas (QA-4 e QA-5) (KAUFFMANN, 2002; KAUFFMANN et al, 2004).

No mesmo estudo, foi realizada a comparação do perfil cromatográfico dos hidrolisados de cascas, folhas e ramos de *Q. brasiliensis*, por CCD. Verificou-se no hidrolisado de ramos a presença de uma substância com comportamento cromatográfico semelhante à pró-sapogenina isolada das folhas, permitindo, desse modo, inferir que esta parte da planta apresenta saponinas com estrutura similar às encontradas em *Q. saponaria* (KAUFFMANN, 2002).

2.1.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS COM *Q. BRASILIENSIS*

KAUFFMANN (2002) avaliou a atividade imunoadjuvante dos extratos de cascas, folhas e ramos de *Q. brasiliensis*, bem como da fração purificada QB-90, em vacinas contra *herpesvirus bovino* tipo 1 (BoHV-1) em camundongos. Os resultados demonstraram que os extratos e a fração purificada de *Q. brasiliensis*, nas doses empregadas, foram capazes de potencializar a resposta imune ao antígeno BoHV-1, de forma comparável à Quil-A[®], durante o período do experimento.

Assim, há promissores indícios de que a espécie brasileira possa ser utilizada em substituição à congênera chilena, com a vantagem da utilização das folhas, ao invés de cascas, visto que esta é uma fonte renovável, não sendo necessária a derrubada das árvores.

2.2 *QUILLAJA SAPONARIA*

Espécie nativa da América do Sul, *Q. saponaria* Molina é encontrada no Chile, Bolívia e Peru. Conforme citado anteriormente, suas cascas são uma das principais fontes de saponinas industriais, sendo utilizadas nos setores têxtil, alimentício, fotográfico e farmacêutico, apresentando, este último, o principal interesse desta revisão. A característica peculiar às saponinas desta espécie é a pronunciada atividade imunoadjuvante, sendo portanto empregadas na produção de vacinas (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995; VAN SETTEN e VAN DE WERKEN, 1996; SAN MARTÍN e BRIONES, 1999).

2.2.1 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE *Q. SAPONARIA*

As cascas desta espécie contêm 9-10% de saponinas, detectando-se por espectrometria de massas a presença de, no mínimo, 60 estruturas diferentes. No entanto, não há relato da ocorrência de saponinas nas folhas, tendo sido verificada a presença de compostos fenólicos como delfinidina, cianidina, quercetina, canferol, ácido caféico e ácido ascórbico (BATE-SMITH, 1965; VAN SETTEN e VAN DE WERKEN, 1996; VAN SETTEN et al., 1998).

As saponinas de *Q. saponaria* possuem estrutura complexa, sendo que o primeiro relato da obtenção de um extrato bruto foi em 1887, enquanto a elucidação estrutural de uma saponina ocorreu somente em 1988 (HIGUCHI et al., 1988; VAN SETTEN e VAN DE WERKEN, 1996).

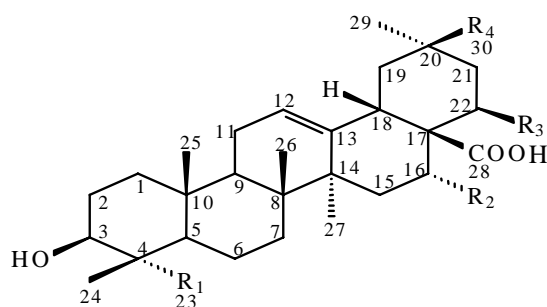
A aglicona comumente relatada para as saponinas desta espécie é o ácido quiláico (ácido 3 β ,16 α -di-hidróxi-23-oxo-olean-12-en-28-óico), o qual caracteriza-se pela presença de um grupo aldeído em C-23. Além desta, outras agliconas foram encontradas, sendo elas o ácido 22 β -hidróxi-quiláico, o ácido equinocístico e o ácido fitolacagênico (Tabela 1) (HIGUCHI et al., 1987; HIGUCHI et al., 1988; JACOBSEN et al., 1996; GUO et al., 1998; NORD e KENNE, 1999; GUO et al., 2000; GUO e KENNE, 2000a; GUO e KENNE, 2000b; NORD e KENNE, 2000; NYBERG et al., 2000).

O ácido quiláico substituído na posição C-3 com um di ou trissacarídeo e na posição C-28 com um oligossacarídeo compõe a estrutura básica para a maioria das saponinas de *Q. saponaria* (NORD et al., 2001). A ligação do oligossacarídeo em C-28 da aglicona ocorre por um resíduo fucosila. O ácido graxo, que faz parte desse oligossacarídeo, pode estar ligado à hidroxila em C-3 ou em C-4 da fucose, podendo ocorrer a migração entre estas duas posições e, assim, a formação de estruturas regioisômeras (JACOBSEN et al., 1996; NORD e KENNE, 2000; NYBERG et al., 2000). Algumas variações estruturais encontradas nas saponinas de *Q. saponaria* podem ser observadas na Tabela 1.

Foram isoladas e elucidadas mais de 50 saponinas a partir das cascas de *Q. saponaria*. Dentre as técnicas empregadas no isolamento, pode-se citar a cromatografia em coluna com gel de sílica de fase normal e de fase reversa, e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo esta última a mais utilizada. Com o propósito de isolamento por CLAE têm-se utilizado colunas de fase reversa e sistemas eluentes com variações de pH, visto que sistemas cromatográficos em pH 6,4 permitem a separação de saponinas que diferem no oligossacarídeo em C-28, enquanto sistemas com pH baixo permitem a separação das estruturas conforme a cadeia sacarídica em C-3. A fim de monitorar o processo de isolamento, utiliza-se cromatografia em camada delgada (CCD), CLAE analítica, espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear

(RMN) de ^1H (HIGUCHI et al., 1987; HIGUCHI et al., 1988; JACOBSEN et al., 1996; GUO et al., 1998; NORD e KENNE, 1999; GUO et al., 2000; GUO e KENNE, 2000a; GUO e KENNE, 2000b; NORD e KENNE, 2000; NYBERG et al., 2000).

Tabela 1: Variações estruturais observadas nas saponinas de *Q. saponaria*: agliconas, cadeias de açúcares ligadas a C-3 e ao carbono 28 (HIGUCHI et al., 1987; HIGUCHI et al., 1988; JACOBSEN et al., 1996; GUO et al., 1998; NORD e KENNE, 1999; GUO et al., 2000; GUO e KENNE, 2000a; GUO e KENNE, 2000b; NORD e KENNE, 2000; NYBERG et al., 2000).



AGLICONAS

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

□ CADEIAS SACARÍDICAS LIGADAS AO C-3 DA AGLICONA:

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

□ CADEIAS SACARÍDICAS LIGADAS AO C-28 DA AGLICONA:

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

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

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

A elucidação estrutural dessas saponinas é realizada empregando-se, usualmente, técnicas de clivagem, uma vez que a estrutura desses compostos é muito complexa. Assim, para a obtenção da aglicona e dos açúcares, emprega-se hidrólise ácida. A hidrólise alcalina branda é utilizada na obtenção da saponina sem o resíduo de ácido graxo (desacil-saponina) e a hidrólise alcalina forte é utilizada na obtenção da saponina monodesmosídica com o grupamento ácido livre (C-28). São ainda empregadas, para a sua elucidação estrutural, a degradação com diazometano, que possibilita a obtenção da saponina sem a cadeia de açúcares ligada em C-3, a espectroscopia de RMN de ^1H , de ^{13}C e experimentos de correlação, e a espectrometria de massas (HIGUCHI et al., 1987; HIGUCHI et al., 1988; JACOBSEN et al., 1996; GUO et al., 1998; NORD e KENNE, 1999; GUO et al., 2000; GUO e KENNE, 2000a; GUO e KENNE, 2000b; NORD e KENNE, 2000; NYBERG et al., 2000). Ainda objetivando a elucidação estrutural destes compostos, NYBERG e colaboradores (2003) empregaram uma técnica que combina extração em fase sólida com RMN na análise de frações cromatográficas de saponinas de *Q. saponaria*. Segundo os autores, este método apresenta como vantagens principais a simplicidade no manuseio da amostra, quando comparado aos convencionais, e a possibilidade de coletar e analisar componentes em uma ampla faixa de concentração.

SAN MARTÍN e BRIONES (1999) estudaram a viabilidade do emprego da madeira e de pequenos galhos em substituição às cascas de *Q. saponaria* na produção de extratos e na obtenção de saponinas, uma vez que as florestas chilenas têm sido intensamente exploradas. Em seus estudos utilizando CLAE em fase reversa, verificaram que a madeira contém cerca de 1,6% de saponinas. Seus estudos demonstraram ainda que utilizando a madeira e galhos, a demanda mundial poderia ser suprida com 10000 árvores/ano em vez de 50000 árvores/ano, como ocorria em 1999.

2.2.2 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE *Q. SAPONARIA*

As saponinas de *Q. saponaria* têm sido investigadas quanto às atividades hipocolesterêmica, estimulante da absorção de antibióticos e peptídeos por via nasal e ocular, larvicida contra *Aedes aegypti* e *Culex pipiens*, e imunoadjuvante, sendo

essa última a mais pesquisada. Devido à sua capacidade de estimular resposta imune humoral e mediada por células, quando administradas com diversos antígenos e em várias espécies de animais (camundongos, ratos, macacos, coelhos), têm sido empregadas como adjuvantes em vacinas. É observada atividade quando administradas tanto por via oral como por via parenteral (CAMPBEEL e PEERBAYE, 1992; JENKINS e ATWAL, 1994; PILLION et al., 1995; RECCHIA et al., 1995; PELAHL et al., 2002; PICKERING et al., 2006).

2.2.2.1 QUIL-A[®]

O primeiro relato da potencial atividade adjuvante das saponinas de *Q. saponaria* ocorreu na década de 70, quando Dalsgaard preparou, a partir das cascas, um extrato purificado de saponinas, conhecido comercialmente como Quil-A[®]. Esse extrato padronizado é comercializado pela empresa Superfos[®] (Dinamarca). Embora não tenha sua composição química totalmente determinada, tem sido empregado na produção de vacinas para animais, um exemplo comercial é a vacina Leucogen[®], produzida pela indústria francesa VIRBAC[®] e utilizada para prevenir leucemia felina (VAN SETTEN e VAN DE WERKEN, 1996; VIRBAC, 2007).

Quil-A[®] tem apresentado resultados promissores quando utilizado como adjuvante em diversas vacinas experimentais. Os estudos incluem a avaliação de uma vacina contra *Leishmania donovani*, em cães, que protegeu os animais contra leishmaniose visceral, e vacinas contra protozoários, vírus e bactérias, como *Neisseria meningitidis* e *Mycobacterium tuberculosis*, em camundongos, que demonstraram a atividade imunoestimulante de Quil-A[®] (BORJA-CABRERA et al., 1997; PEETERS et al., 1999; FONSECA et al., 2001).

A atividade adjuvante de Quil-A[®] é também relatada em vacinas contra sarampo. O primeiro ensaio, realizado por STITTELAAR e colaboradores (2000) em camundongos, resultou na seleção de três formulações diferentes que foram posteriormente avaliadas em um ensaio pré-clínico em ratos (WYDE et al., 2000). Deste modo, verificou-se que os três candidatos à vacina protegiam os animais no desafio com o vírus do sarampo tipo selvagem. Assim, estes resultados conduziram à avaliação da duração dos níveis protetores de anticorpos neutralizantes, em macacos, induzidos por administração em regime único destas formulações. Os

resultados obtidos demonstraram que os candidatos testados induzem níveis longos e duradouros de anticorpos neutralizantes contra o vírus do sarampo em macacos (STITTELAAR et al., 2002).

Outros extratos purificados de *Q. saponaria* são empregados como adjuvantes em vacinas. Como exemplo desses, podem ser citados os extratos produzidos pela indústria sueca Iscotec AB[®], sendo eles Spikoside[®], suas frações purificadas QH-A, QH-B e QH-C, e Iscoprep[®] 703 (mistura QH-A:QH-C, na proporção 7:3) (RÖNNBERG et al., 1995; JOHANSSON e LOVGREN-BENGTSSON, 1999). Um outro exemplo é o extrato S-4521 produzido pela Sigma[®], o qual apresentou atividade adjuvante em vacina contra sarampo, administrada por via oral (PICKERING et al., 2006).

Além dos extratos purificados, foram estudadas as saponinas QS-7, QS-17, QS-18 e QS-21, isoladas com o emprego de CLAE por KENSIL e colaboradores (1991). Nesse estudo, verificou-se que, apesar de diferirem no índice hemolítico e na toxicidade, apresentaram atividade adjuvante semelhante, induzindo um aumento de até 1000 vezes o título de anticorpos antígeno-específico (IgG) obtidos por ELISA, quando comparados ao grupo controle.

2.2.2.2 QS-21

Por apresentar elevada atividade adjuvante e nível de toxicidade aceitável, a saponina QS-21 tem sido empregada em inúmeras vacinas experimentais. Em camundongos, vacinas contendo QS-21 como adjuvante estimularam resposta imune contra variados antígenos como polissacarídeos de *Escherichia coli*, vírus sincicial respiratório, rotavírus e vírus da doença de Aujeszky. A utilização de QS-21 tem sido bem tolerada por outras espécies como coelhos, cobaias, gatos, macacos e humanos (COUGHLIN et al., 1995; HANCOCK et al., 1995; KENSIL et al., 1996; JIANG et al., 1999; KATAYAMA et al., 1999; MADORE et al., 1999; McNEAL et al., 1999; KATAYAMA et al., 2001; PAL et al., 2006).

Diversos experimentos têm empregado QS-21 no desenvolvimento de vacinas contra malária. Em um ensaio pré-clínico realizado em macacos *Aotus* e camundongos, QS-21 foi utilizada conjuntamente com hidróxido de alumínio em uma formulação contendo como antígeno a proteína do circunsporozoítio, um peptídeo

antigênico múltiplo. Esta formulação promoveu elevados níveis de anticorpos, passando assim a ensaios clínicos de fase I (MORENO et al., 2000).

Dois ensaios clínicos de fase I, publicados em 2006, avaliaram outro candidato à vacina contra malária (THERA et al., 2006; WITHERS et al., 2006). Ambos empregaram como antígeno uma proteína recombinante de *Plasmodium falciparum*, codificada como FMP1, e como adjuvante AS02A, produzido pela GlaxoSmithKline Biologicals, o qual consiste em uma emulsão óleo em água contendo 3-desacetil-monofosforil-lipídio A e QS-21. WITHERS e colaboradores (2006) avaliaram a segurança, os efeitos adversos e a imunogenicidade da vacina FMP1/AS02A em 135 crianças africanas com 12 a 47 meses de idade. Foram empregadas diferentes doses de antígeno:adjuvante (10:100, 25:250, 50:500 µg/µl), além da vacina *Imovax*[®] (vacina contra raiva) utilizada para comparação. Os autores verificaram que as crianças que receberam a vacina FMP1/AS02A apresentaram significativamente mais dor e inchaço no local da injeção, havendo relação dose-efeito. O nível de reações adversas sistêmicas foi baixo em todas as doses. Após aproximadamente um ano de estudo, os autores concluíram que a vacina FMP1/AS02A mostrou-se segura e imunogênica para as crianças em estudo expostas à malária, e que a magnitude da resposta para as doses de 25 e 50 µg foi superior a de 10 µg.

O estudo de THERA e colaboradores (2006) foi realizado com a mesma vacina, na dose de 50:500 µg/µl (FMP1:AS02A), administrada a quarenta adultos africanos saudáveis, com idade entre 18 e 55 anos. Os autores concluíram que a vacina FMP1:AS02A foi bem tolerada e altamente imunogênica para os indivíduos em estudo, os quais estavam expostos a intensa transmissão sazonal de malária, e que foi capaz de estimular resposta imune para clones parasitários geneticamente diferentes.

MACETE e colaboradores (2007) avaliaram a segurança, os efeitos adversos e a imunogenicidade de uma vacina pediátrica contra malária em 60 crianças, com idade entre 1 e 4 anos. Este ensaio clínico de fase I foi realizado em Moçambique e empregou como antígeno RST,S (proteína recombinante de *P. falciparum*, que contém uma grande porção C-terminal da proteína do circumsporozoíto (CSP), fundida com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B) e como adjuvante,

AS02A. A dose utilizada foi de 25:250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (RST,S:AS02A). Os autores consideraram que a vacina em estudo foi segura e bem tolerada, nas condições testadas.

PATTNAIK e colaboradores (2007) avaliaram a imunogenicidade de uma vacina recombinante contra malária, em camundongos. Foram testadas três formulações contendo diferentes adjuvantes compatíveis com uso humano, Montanide ISA 720, AS02A e hidróxido de alumínio. Todas as formulações estimularam elevados níveis de anticorpos, que bloquearam a invasão eritrocítica *in vitro*. No entanto, os maiores títulos após a primeira e a segunda imunizações foram verificados, por ELISA, para a formulação contendo AS02A.

A vacina sintética contra malária SPf66 foi o alvo do estudo de BERMÚDEZ e colaboradores (2007). Dentre os diversos ensaios realizados, a utilização de QS-21 como adjuvante foi comparada ao hidróxido de alumínio, em humanos. Os autores observaram um aumento significativo nos títulos de anticorpos contra SPf66 (até 150x) na formulação com QS-21 em comparação com os resultados obtidos com hidróxido de alumínio.

A atividade imunoadjuvante de QS-21 tem sido avaliada ainda em ensaios clínicos de vacinas para o tratamento de melanoma, contra HIV-1 e contra hepatite B demonstrando ser ativa. É importante destacar que, no caso da vacina contra HIV-1, a utilização de QS-21 como adjuvante permitiu uma redução de 30 vezes na dose de antígeno requerida, o que é interessante também do ponto de vista econômico, uma vez que significará menor custo de produção (CHAPMAN et al., 2000; FOON et al., 2000; EVANS et al., 2001; BIENZLE et al., 2003).

2.2.2.3 ISCOM

As saponinas de *Q. saponaria* e seus extratos purificados podem ser utilizados na forma livre ou na forma de um complexo imunoestimulante, conhecido como ISCOM. Este é constituído de saponinas, colesterol e fosfolipídeos, que por interações hidrofóbicas, fatores estéricos e provavelmente pontes de hidrogênio, formam uma partícula rígida, esférica e oca, de 40 nm de diâmetro. A base da estrutura desse complexo é a interação entre saponina e colesterol. O fosfolipídeo

tem a função de facilitar a incorporação de moléculas anfifílicas de antígeno, como proteínas de membrana de vírus (BARR et al., 1998; MOREIN e BENGTSSON, 1998; KERSTEN e CROMMELIN, 2003). Suas vantagens, em relação ao emprego da forma livre da saponina, são a redução na dose de antígeno requerida e a minimização de efeitos adversos (RÖNNBERG et al., 1995). É relevante destacar que o emprego do ISCOM é capaz de induzir resposta imune local e sistêmica após administração por via oral ou intranasal (MOREIN e BENGTSSON, 1998; HU et al., 2001; MOHAMEDI et al., 2001).

2.2.2.4 MECANISMO DE AÇÃO

O mecanismo de ação da atividade imunoadjuvante de saponinas e extratos de *Q. saponaria* ainda não está completamente esclarecido. Todavia, sabe-se que estes compostos estimulam imunidade do tipo linfócito T auxiliar 1 (Th-1), uma vez que induzem a produção de interleucina 2 (IL-2) e interferon- γ , além de observar-se um aumento substancial de IgG2a. Mesmo verificando-se esta predominância Th-1, o perfil de resposta Th-2 também pode ser induzido pelas saponinas, mas em menor grau. Outro aspecto a ser destacado é a indução de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ por estes compostos, observando-se deste modo tanto uma resposta humoral, por indução de anticorpos, como resposta celular (BARR et al., 1998).

HU e colaboradores (2005) avaliaram o perfil de resposta induzido por ISCOMs contendo diferentes frações de saponinas, QH-A, QH-C e IscoprepTM 703 (mistura QH-A:QH-C, na proporção 7:3), em uma vacina contra o vírus sincicial respiratório humano. Os autores verificaram que as três formulações induziram resposta Th-1, com proeminente produção de interferon- γ e forte indução de IgG2a. O perfil de resposta Th-1 foi induzido de modo mais pronunciado com ISCOMs formulados com IscoprepTM 703, seguidos pelos formulados com QH-C e QH-A.

Alguns autores sugerem que as saponinas desta espécie possam interagir com a membrana das células apresentadoras de antígeno (CAA), facilitando a entrada do antígeno no citoplasma destas células devido, provavelmente, às suas características tensoativas, e estimulando a produção de IL-1. A saponina pode intercalar-se com o colesterol da membrana celular formando poros, através dos quais o complexo saponina-antígeno poderia passar para o citoplasma da CAA

(BARR et al., 1998). Essa hipótese é reforçada por estudos de relação estrutura-atividade dessas saponinas, que demonstraram que modificações que alteram os valores de concentração micelar crítica (CMC) resultam na perda da atividade imunoadjuvante (SOLTYSIK et al., 1995; VOGEL, 1995; KENSIL et al., 1996).

2.2.2.5 ESTUDOS DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

Estudos de relação estrutura-atividade têm demonstrado que o grupo aldeído, presente em C-4 da aglicona, é responsável pela estimulação de imunidade Th-1, talvez devido a um sinal co-estimulatório pela formação de uma base de Schiff deste com o grupo amino livre da CAA, estabilizando a interação celular. Por outro lado, a presença do ácido graxo ligado à fucose em C-28, parece ser responsável pela produção de linfócitos T citotóxicos contra antígenos exógenos, além de estar envolvido com a toxicidade dessas saponinas (SOLTYSIK et al., 1995; KENSIL et al., 1996; MARCIANI et al., 2001).

KENSIL e colaboradores (1996) verificaram que a saponina desacilada DS-1 (saponina QS-21 sem o ácido graxo) não estimulou níveis elevados de anticorpos contra o antígeno experimental albumina de ovo (OVA), nem resposta T citotóxica específica. MARCIANI e colaboradores (2001) também verificaram alteração da atividade adjuvante com desacil-saponinas, que resultou na redução dos títulos de IgG2a e IgG2b, bem como em reduzida capacidade de estimular resposta proliferativa e produção de linfócitos T citotóxicos, observando-se apenas o estímulo de uma resposta tipo Th-2. Foi verificado, ainda, que as saponinas desaciladas apresentaram menor toxicidade que as demais.

Apesar das alterações em sua capacidade imunoadjuvante, DS-1 mostrou-se capaz de estimular a absorção de alguns fármacos via mucosas. Em estudos realizados com ratos, DS-1 possibilitou a absorção de insulina e antibióticos aminoglicosídeos, gentamicina e tobramicina com o uso de gotas nasais e oculares (PILLION et al., 1995; RECCHIA et al., 1995; KENSIL et al., 1996).

MARCIANI e colaboradores (2000) desenvolveram uma mistura de análogos semi-sintéticos das saponinas nativas, codificada como GPI-0100. Esta foi preparada pela desacilação de uma mistura de saponinas de *Q. saponaria*, com posterior

acoplamento de uma cadeia lipofílica (dodecilamina) à carboxila do resíduo de ácido glicurônico ligado ao C-3 da aglicona, por uma ligação amida. GPI-0100 estimulou um perfil isotípico de anticorpos característico de resposta Th-1, bem como a produção de linfócitos T citotóxicos para antígenos exógenos, de modo similar ao que ocorre com as saponinas de *Q. saponaria*. Este ensaio foi realizado em camundongos, tendo como antígeno a OVA. No entanto, a dose necessária para a estimulação desta resposta foi muito maior que a requerida para as saponinas nativas. Além da atividade imunoadjuvante, este derivado mostrou-se estável em solução aquosa e com toxicidade negligenciável.

No intuito de obter maiores esclarecimentos quanto à importância da acilação para a atividade adjuvante, LIU e colaboradores (2002) compararam a atividade adjuvante de QS-21 com as atividades de um extrato bruto de saponinas desaciladas, de DS-1, de GPI-0100 e de RDS-1 (análogo à QS-21, purificado a partir de GPI-0100). O ensaio foi realizado em camundongos, tendo como antígeno a OVA. Segundo os autores, não houve diferenças significativas entre GPI-0100 e o extrato bruto de desacil-saponinas, nem entre RDS-1 e DS-1 na estimulação de resposta humoral e celular. Verificou-se que a reacilação com ácido graxo sintético, em local diferente ao natural, não aumenta substancialmente a atividade adjuvante. Foi sugerido ainda que a estimulação residual de IgG2a e linfócitos T citotóxicos obtida com GPI-0100 e com o extrato bruto de desacil-saponinas pode ser devido à presença de QS-7 e de outras saponinas nativas minoritárias, que não teriam sido desaciladas com a metodologia empregada.

Com o objetivo de esclarecer essa hipótese, foi realizado o fracionamento de GPI-0100 em dois derivados: RP18-1 e RP18-2. As propriedades imunológicas destas frações foram comparadas às do alumínio e às das saponinas de *Q. saponaria*, empregando a OVA como antígeno, em camundongos (MARCIANI et al., 2003). Verificou-se que GPI-0100 não fracionado e RP18-2 estimularam um perfil de anticorpos característico de resposta Th-1 dose dependente, enquanto RP18-1 estimulou um perfil isotípico característico de resposta Th-2, similar ao obtido com alumínio. A atividade imunoadjuvante obtida neste estudo para GPI-0100 não fracionado e para RP18-2 foi cinco vezes menor que a atividade das saponinas nativas, mas a baixa toxicidade destes análogos permitiu seu emprego em altas doses. A elucidação estrutural de diversos compostos de RP18-2 demonstrou que

eles são derivados de QS-7, QS-17, QS-18 e QS-21 desaciladas, bem como de outras desacil-saponinas, e que QS-7 não está presente na fração, não podendo ser esta a responsável pela atividade observada.

2.2.2.6 VACINAS COMERCIAIS CONTENDO ISCOMs

Estão disponíveis no mercado europeu e nos Estados Unidos algumas vacinas veterinárias formuladas com ISCOMs. Como exemplos, podem ser citadas ISCOVAC FLU vetTM empregada contra vírus influenza eqüino e produzida em 1989 pela indústria sueca ISCOTEC AB[®] (foi a primeira vacina comercial contendo ISCOM), Equip[®] F, vacina contra influenza eqüina, disponível no mercado desde 1997, e Bovine Viral Diarrhea Virus Vaccine[®], contra diarreia viral bovina, disponível no mercado desde 2003, ambas pertencentes à indústria sueca ISCONOVA[®] (BARR et al., 1998; ISCONOVA, 2007).

2.3. REFERÊNCIAS

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

BATE-SMITH, E.C. Investigation of the chemistry and taxonomy of sub-tribe Quillajeeae of the Rosaceae using comparisons of fresh and herbarium material. *Phytochemistry*, v. 4, p. 535-539, 1965.

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

BIENZLE, U.; GÜNTHER, M.; NEUHAUS, R.; VANDEPAPELIERE, P.; VOLLMAR, J.; LUN, A.; NEUHAUS, P. Immunization with an adjuvant hepatitis B vaccine after liver transplantation for hepatitis B-related disease. *Hepatology*, v. 38, n. 4, p. 811-819, 2003.

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

BREMER, K.; CHASE, M.W.; STEVENS, P.F. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 85, p. 531-553, 1998.

CAMPBELL, J.B.; PEERBAYE, Y.A. Saponin. *Research Immunology*, v. 143, n. 5, p. 526-530, 1992.

CHAPMAN, P.B.; MORRISSEY, D.M.; PANAGEAS, K.S.; HAMILTON, W.B.; ZHAN, C.; DESTRO, A.N.; WILLIAMS, L.; ISRAEL, R.J.; LIVINGSTON, P.O. Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin+QS-21 vaccine: a dose-response study. *Clinical Cancer Research*, v. 6, n. 3, p. 874-879, 2000.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Editora Gráfica Brasileira, 1984. P. 247, v. 6.

COUGHLIN, R.T.; FATTOM, A.; CHU, C.; WHITE, A.C.; WINSTON, S. Adjuvant activity of QS-21 for experimental *E. coli* 018 polysaccharide vaccines. *Vaccine*, v. 13, n. 1, p. 17-21, 1995.

EVANS, T.G.; McELRATH, M.J.; MATTHEWS, T.; MAONTEFIORI, D.; WEINHOLD, K.; WOLFF, M.; KEEFER, M.C.; KALLAS, E.G.; COREY, L.; GORSE, G.F.; BELSHE, R.; GRAHAM, B.S.; SPEARMAN, P.W.; SCHWARTZ, D.; MULLIGAN, M.J.; GOEPFERT, P.; FAST, P.; BERMAN, P.; POWELL, M.; FRANCIS, D.; NIAID AIDS VACCINE EVALUATION GROUP. QS-21 promotes an adjuvant effect allowing for

reduced antigen dose during HIV-1 envelope subunit immunization in humans. *Vaccine*, v. 19, p. 2080-2091, 2001.

FONSECA, D.P.A.J.; FRERICHS, J.; SINGH, M.; SNIPPE, H.; VERHEUL, A.F.M. Induction of antibody and T-cell responses by immunization with ISCOMS containing the 38-kilodalton protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*, v. 19, p. 122-131, 2001.

FOON, K.A.; LUTZKY, J.; BARAL, R.N.; YANNELLI, J.R.; HUTCHINS, L.; TEITELBAUM, A.; KASHALA, O.L.; DAS, R.; GARRISON, J.; REISFELD, R.A.; BHATTACHARYA-CHATTERJEE, M. Clinical and immune responses in advanced melanoma patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking disialoganglioside GD2. *Journal of Clinical Oncology*, v. 18, n. 2, p. 376-384, 2000.

GUO, S.; FALK, E.; KENNE, L.; RÖNNBERG, B.; SUNDQUIST, B. G. Triterpenoid saponins containing an acetylated branched D-fucosyl residue from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochemistry*, v. 53, p. 861-868, 2000.

GUO, S.; KENNE, L.; LUNDGREN, L.N.; RÖNNBERG, B.; SUNDQUIST, B.G. Triterpenoid saponins from *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry*, v. 48, n. 1, p. 175-180, 1998.

GUO, S.; KENNE, L. Characterization of some O-acetylated saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochemistry*, v. 54, p. 615-623, 2000a.

GUO, S.; KENNE, L. Structural studies of triterpenoid saponins with new acyl components from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochemistry*, v. 55, p. 419-428, 2000b.

HANCOCK, G.E.; SPEELMAN, D.J.; FRENCHICK, P.J.; MINEO-KUHN, M.M.; BAGGS, R.B.; HAHN, D.J. Formulation of the purified fusion protein of respiratory syncytial virus with the saponin QS-21 induces protective immune responses in Balb/c mice that are similar to those generated by experimental infection. *Vaccine*, v. 13, n. 4, p. 391-400, 1995.

HIGUCHI, R.; TOKIMITSU, Y.; FUJIOKA, T.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T.; OAKENFUL, D.G. Structure of desacylsaponins obtained from the bark of *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 1, p. 229-235, 1987.

HIGUCHI, R.; TOKIMITSU, Y.; KOMORI, T. An acylated triterpenoid saponin from *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry*, v. 27, n. 4, p. 1165-1168, 1988.

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

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

HU, K-F.; REGNER, M.; SIEGRIST, C-A.; LAMBERT, P.; CHEN, M.; BENGTSSON, K.L.; MOREIN, B. The immunomodulating properties of human respiratory syncytial virus and immunostimulating complexes containing *Quillaja* saponin components

QH-A, QH-C and ISCOPREP™ 703. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 43, p. 269-276, 2005.

ISCONOVA. Disponível em: <<http://www.isconova.com/pipeline/>>. Acesso em: 23.06.2007.

JACOBSEN, N.E.; FAIRBROTHER, W.J.; KENSIL, C.R.; LIM, A.; WHEELER, D.A.; POWELL, M.F. Structure of the saponin adjuvant QS-21 and its base-catalyzed isomerization product by ¹H and natural abundance ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, v. 280, p. 1-14, 1996.

JENKINS, K.J.; ATWAL, A.S. Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, and availability of vitamins A and E in the chick. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 5, p. 134-137, 1994.

JIANG, B.; ESTES, M.K.; BARONE, C.; BARNIAK, V.; O'NEAL, C.M.; OTTAIANO, A.; MADORE, H.P.; CONNER, M.E. Heterotypic protection from rotavirus infection in mice vaccinated with virus-like particles. *Vaccine*, v. 17, p. 1005-1013, 1999.

JOHANSSON, M.; LOVGREN-BENGTSSON, K. Iscoms with different quillaja saponin components differ in their immunomodulating activities. *Vaccine*, v. 17, p. 2894-2900, 1999.

KATAYAMA, S.; ODA, K.; OHGITANI, T.; HIRAHARA, T.; SHIMIZU, Y. Influence of antigenic forms and adjuvants on the IgG subclass antibody response to Aujeszky's disease virus in mice. *Vaccine*, v. 17, p. 2733-2739, 1999.

KATAYAMA, S.; ODA, K.; OHGITANI, T. Influence of antigenic forms and adjuvants on protection against a lethal infection of Aujeszky's disease virus. *Vaccine*, v. 19, p. 54-58, 2001.

KAUFFMANN, C. *Constituição química e avaliação da atividade imunoadjuvante de Quillaja brasiliensis*. 2002. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2002.

KAUFFMANN, C.; MACHADO, A.M.; FLECK, J.D.; PROVENSÍ, G.; PIRES, V.S.; GUILLAUME, D.; SONNET, P.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Natural Product Research*, v. 18, n. 2, p.153-157, 2004.

KENSIL, C.R.; PATEL, U.; LENNICK, M.; MARCIANI, D. Separation of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *The Journal of Immunology*, v. 146, n. 2, p. 431-437, 1991.

KENSIL, C. R.; SOLTYSIK, S.; WHEELER, D. A.; WU, J. Y. Structure/function studies on QS-21, a unique immunological adjuvant from *Quillaja saponaria*. In: WALLER, G.R.; YAMASAKI, K. (Ed.). *Saponins used in traditional and modern medicine*. 1ª ed. New York: Plenum Press, 1996. P. 165-172.

KERSTEN, G.F.A.; CROMMELIN, D.J.A. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine*, v. 21, p. 915-920, 2003.

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.

MACETE, E.; APONTE, J.J.; GUINOVART, C.; SACARLAL, J. OFORI-ANYINAM, O.; MANDOMANDO, I.; ESPASA, M.; BEVILACQUA, C.; LEACH, A.; DUBOIS, M. C.; HEPPNER, D.G.; TELLO, L.; MILMAN, J.; COHEN, J.; DUBOVSKY, F.; TORNIEPORTH, N.; THOMPSON, R.; ALONSO, P.L. Safety and immunogenicity of the RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in children aged 1-4 in Mozambique. *Tropical Medicine and International Health*, v.12, p. 37-46, 2007.

MADORE, H.P.; ESTES, M.K.; ZARLEY, C.D.; HU, B.; PARSONS, S.; DIGRAVIO, D.; GREINER, S.; SMITH, R.; JIANG, B.; CORSARO, B.; BARNIAK, V.; CRAWFORD, S.; CONNER, M.E. Biochemical and immunologic comparison of virus-like particles for a rotavirus subunit vaccine. *Vaccine*, v. 17, p. 2461-2471, 1999.

MARCIANI, D. J.; PATHAK, A. K.; REYNOLDS, R. C.; SEITZ, L.; MAY, R. D. Altered immunomodulating and toxicological properties of degraded *Quillaja saponaria* Molina. *International Immunopharmacology*, p.813-818, 2001.

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.

MARCIANI, D.J.; REYNOLDS, R.C.; PATHAK, A.K.; FINLEY-WOODMAN, K.; MAY, R.D. Fraction, structural studies, and immunological characterization of the semi-synthetic Quillaja saponins derivative GPI-0100. *Vaccine*, v. 21, p. 3961-3971, 2003.

MATTEI, V.L. Efeito do período de colheita na longevidade de sementes de timbuva (*Quillaja brasiliensis* Martius). *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 1, n. 3, p. 133-136, Set.-Dez.1995.

McNEAL, M.M.; ERA, M.N.; WARD, R.L. Effects of different adjuvants on rotavirus antibody responses and protection in mice following intramuscular immunization with inactivated rotavirus. *Vaccine*, v. 17, 1573-1580, 1999.

MOHAMEDI, S.A.; HEATH, A.W.; JENNINGS, R. A comparison of oral and parenteral routes for therapeutic vaccination with HSV-2 ISCOMs in mice; cytokine profiles, antibody responses and protection. *Antiviral Research*, v. 49, p. 83-99, 2001.

MOREIN, B.; BENGTSSON, K.L. Functional aspects of iscoms. *Immunology & Cell Biology*, v. 76, n. 4, p. 295-299, 1998.

MORENO, C.A.; RODRIGUEZ, R.; OLIVEIRA, G.A.; FERREIRA, V.; NUSSENZWEIG, R.S.; CASTRO, Z.R.M.; CALVO-CALLE, J.M.; NARDIN, E. Preclinical evaluation of a synthetic *Plasmodium falciparum* MAP malaria vaccine in *Aotus* monkeys and mice. *Vaccine*, v. 18, p. 89-99, 2000.

MORGAN, D.R.; SOLTIS, D.E.; ROBERTSON, K.R. Systematic and evolutionary implications of *rbcl* sequence variation in Rosaceae. *American Journal of Botany*, v.81, n. 7, p. 890-903; 1994

NORD, L. I.; KENNE, L.; JACOBSSON, S. P. Multivariate analysis of ¹H NMR spectra for saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Analytica Chimica Acta*, v. 446, p. 199-209, 2001.

NORD, L.I.; KENNE, L. Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research*, v. 320, p. 70-81, 1999.

NORD, L.I.; KENNE, L. Novel acetylated triterpenoid saponins in a chromatographic fraction from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research*, v. 329, p. 817-829, 2000.

NYBERG, N.T.; KENNE, L.; RÖNNBERG, B.; SUNDQUIST, B.G. Separation and structural analysis of some saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research*, v. 323, p. 87-97, 2000.

NYBERG, N.T.; BAUMANN, H.; KENNE, L. Solid-phase extraction NMR studies of chromatographic fractions of saponins from *Quillaja saponaria*. *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 2, 2003.

PAL, R.; WANG, S.; KALYANARAMAN, V.S.; NAIR, B.C.; WHITNEY, S.; KEEN, T.; HOCKER, L.; HUDACIK, L.; ROSE, N.; MBOUDJEKA, I.; SHEN, S.; WU-CHOU, T-H.; MONTEFIORI, D.; MASCOLA, J.; MARKHAM, P.; LU, S. Immunization of rhesus macaques with a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 vaccine elicits protective antibody response against simian human immunodeficiency virus of R5 phenotype. *Virology*, v. 348, p. 341-353, 2006.

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.

PELAH, D.; ABRAMOVICH, Z.; MARKUS, A.; WIESMAN, Z. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 407-409, 2002.

PEETERS, C.C.A.M.; CLAASSEN, I.J.T.M.; SCHULLER, M.; KERSTEN, G.F.A.; VOORT, E.M.R.V.D.; POOLMAN, J.T. Immunogenicity of various presentation forms of PorA outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* in mice. *Vaccine*, v. 17, p. 2702-27012, 1999.

PICKERING, R.J.; SMITH, S.D.; STRUGNELL, R.A.; WESSELINGH, S.L.; WEBSTER, D.E. Crude saponins improve the immune response to an oral plant-made measles vaccine. *Vaccine*, v. 24, p. 144-150, 2006.

PILLION, D.J.; RECCHIA, J.; WANG, P.; MARCIANI, D.J.; KENSIL, C. DS-1, a modified *Quillaja* saponin, enhances ocular and nasal absorption of insulin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 84, n. 11, p. 1276-1279, 1995.

RECCHIA, J.; LURANTOS, M.H.A.; AMSDEN, J.A.; STOREY, J.; KENSIL, C.R. A semisynthetic *Quillaja* saponin as a drug delivery agent for aminoglycoside antibiotics. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 12, p. 1917-1923, 1995.

REITZ, R. (Ed.). *Flora ilustrada catarinense – Rosaceas*. Itajaí, Santa Catarina, 1996, p. 113-116.

RÖNNBERG, B.; FEKADU, M.; MOREIN, B. Adjuvant activity of non-toxic *Quillaja saponaria* Molina components for use in ISCOM matrix. *Vaccine*, v. 13, n. 14, p. 1375-1382, 1995.

SAN MARTÍN, R.; BRIONES, R. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (ROSACEAE) saponins. *Economic Botany*, v. 53, n. 3, p. 302-311, 1999.

SCHULTZ, A.R. *Introdução ao estudo da botânica sistemática*. 5 ed. rev. Porto Alegre: Ed. da Universidade/UFRGS, 1985. P. 140, v.2.

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, n. 15, p. 1403-1410, 1995.

STITTELAAR, K.J.; BOES, J.; KERSTEN, G.F.A.; SPIEKSTRA, A.; MULDER, P.G.H.; VRIES, P.; ROHOLL, P.J.M.; DALSGAARD, K.; DOBBELSTEEN, G.V.D.; ALPHEN, L.V.; OSTERHAUS, A.D.M.E. In vivo antibody response and in vitro CTL activation induced by selected measles vaccine candidates, prepared with purified Quil A components. *Vaccine*, v. 18, p. 2482-2493, 2000.

STITTELAAR, K.J.; VOS, H.W.; VAN AMERONGEN, G.; KERSTEN, G.F.A.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; DE SWART, R.L. Longevity of neutralizing antibody levels in macaques vaccinated with Quil A-adjuvanted measles vaccine candidates. *Vaccine*, v. 21, p. 155-157, 2002.

THERA, M.A.; DOUMBO, O.K.; COULIBALY, D.; DIALLO, D.A.; SAGARA, I.; DICKO, A.; DIEMERT, D.J.; HEPNER JR, D.G.; STEWART, V.A.; ANGOV, E.; SOISSON, L.; LEACH, A.; TUCKER, K.; LYKE, K.E.; PLOWE, C.V. Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in Malian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS Clinical Trials*, v.1, n. 7, e34, 2006.

VAN SETTEN, D.C.; HOVE, G.J.T.; WIERTZ, E.J.H.J.; KAMERLING, J.P.; VAN DE WERKEN, G. Multiple-stage tandem mass spectrometry for structural characterization of saponins. *Analytical Chemistry*, v. 70, p. 4401-4409, 1998.

VAN SETTEN, D.C.; VAN DE WERKEN, G. Molecular structures of saponins from *Quillaja saponaria* Molina. In: WALLER, G.R.; YAMASAKI, K. (Ed.). *Saponins used in traditional and modern medicine*. 1^a ed. New York: Plenum Press, 1996. P. 185-193.

VINCKEN, JP.; HENG, L.; DE GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, v. 68, p. 275-297, 2007.

VIRBAC. Disponível em: <<http://www.virbac.com>>. Acesso em: 23.06.2007

VOGEL, F.R. The role of adjuvants in retroviral vaccines. *International Journal of Immunopharmacology*, v. 17, n. 2, p. 85-90, 1995.

WINK, M. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. M. Wink (ed.), Annual Plant Reviews, v. 2, Sheffield Academic Press, p. 1-16, 1999.

WITHERS, M.R.; MCKINNEY, D.; OGUTU, B.R.; WAITUMBI, J.N.; MILMAN, J.B.; APOLLO, O.J.; ALLEN, O.G.; TUCKER, K.; SOISSON, L.A.; DIGGS, C.; LEACH, A.; WITTES, J.; DUBOVSKY, F.; STEWART, V.A.; REMICH, S.A.; COHEN, J.; BALLOU, W.R.; HOLLAND, C.A.; LYON, J.A.; ANGOV, E.; STOUTE, J.A.; MARTIN, S.K.; HEPNER JR, D.G. Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clinical Trials*, v.1, n. 7, e32, 2006.

WYDE P.R.; STITTELAAR, K.J.; OSTERHAUS, A.; GUZMAN, E.; GOLBERT, B.E. Use of cotton rats for preclinical evaluation of measles vaccines. *Vaccine*, v. 19, p. 42-53, 2000.

http://132.236.163.181/cgi-bin/dol/dol_terminal.pl?family=Quillajaceae, acesso em 23.06.2007.

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos gerais caracterizar quimicamente uma fração de saponinas purificada de folhas de *Q. brasiliensis*, avaliar sua atividade imunoadjuvante, bem como sua toxicidade subcutânea e iniciar estudos de propagação com esta espécie.

E como objetivos específicos:

- Caracterizar o perfil químico da fração QB-90.
- Desenvolver um método quantitativo para a caracterização de QB-90 por CLAE.
- Avaliar a toxicidade *in vivo* da fração purificada QB-90 pela administração por via subcutânea em camundongos.
- Delinear a curva dose-resposta para atividade imunoadjuvante de QB-90, empregando como antígeno uma amostra vacinal de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), em camundongos.
- Determinar protocolos de propagação de *Q. brasiliensis* a partir de sementes assépticas.
- Avaliar a distribuição órgão-específica e sazonal (ao longo de 2 anos) de saponinas em plantas de *Q. brasiliensis*.
- Analisar o efeito de fatores de estresses bióticos (como ataque por patógenos e herbivoria, simulados pelo uso de moléculas sinalizadoras e dano mecânico controlado) e abióticos (por exemplo, pela exposição à luz branca e ultravioleta) na produção de saponinas.
- Recomendar, com base nos resultados, procedimentos para propagação e cultivo de *Q. brasiliensis*, visando a obtenção de saponinas.

4. CONTEÚDOS ABORDADOS

O trabalho visa dar continuidade aos estudos realizados pelo grupo. Assim, no **Capítulo II** está apresentada a caracterização química da fração QB-90, purificada a partir do extrato aquoso de folhas de *Q. brasiliensis* por CCD, bem como o desenvolvimento de um método quantitativo, empregando CLAE, para a quantificação dessa fração no extrato aquoso de *Q. brasiliensis*.

No **Capítulo III** está apresentado o manuscrito publicado no periódico *Vaccine* (2006), sob o título: “Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice”, no qual é analisado o perfil imunoadjuvante da fração QB-90 em camundongos, sendo avaliada sua toxicidade subcutânea e a relação dose-resposta para a atividade adjuvante, em vacina contra BHV-1.

No **Capítulo IV** estão apresentados estudos de propagação com a espécie brasileira, bem como a análise sazonal de suas saponinas e o efeito de fatores de estresse sobre a produção das mesmas.

CAPÍTULO II. ESTUDO QUÍMICO DE *QUILLAJA BRASILIENSIS*

1. INTRODUÇÃO

O emprego de CLAE na análise e no doseamento de saponinas está amplamente descrito na literatura. Sua sensibilidade e adaptabilidade na análise de substâncias polares são características que tornam este o principal método de análise de saponinas e sapogeninas (HOSTETMANN e MARSTON, 1995).

Tendo em vista a complexidade estrutural das saponinas de *Q. saponaria*, inúmeros trabalhos têm sido publicados empregando CLAE para purificação e isolamento dessas saponinas, assim como na caracterização de frações purificadas.

Neste contexto, KENSIL e MARCIANI depositaram patente nos Estados Unidos em 1991, na qual caracterizaram uma fração purificada em saponinas e compararam-na com o extrato comercial Quil-A[®] (Superfos[®]), empregando CCD e CLAE. A caracterização por CCD foi realizada utilizando placas de gel de sílica de fase reversa (E.M. Science[®], C₈) e sistema eluente metanol:água (70:30, v/v), e por fase normal utilizando placa de gel de sílica 60 e sistema eluente composto de n-butanol, etanol, água e amônia (30:60:29:21, v/v/v/v). No método empregando CLAE, foi utilizada uma coluna de fase reversa Vydac[®] C₄, ácido acético 40 mM em metanol/água (58/42, v/v) como fase móvel e detecção por índice de refração. Os picos majoritários da fração purificada foram separados por CLAE semipreparativa utilizando uma coluna Vydac[®] C₄ e eluída em um gradiente de metanol, com fluxo de 3 ml/min e monitoramento por absorvância no ultravioleta a 214 nm. Um artigo também foi publicado no mesmo ano por KENSIL e colaboradores, onde as frações purificadas foram analisadas por CLAE utilizando uma coluna Vydac[®] C₄ e um gradiente de 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) em acetonitrila, com fluxo de 1 ml/min.

Em 2000, SAN MARTÍN E BRIONES propuseram um método para controle de qualidade de extratos comerciais de saponinas de *Q. saponaria* pela utilização de uma coluna de fase reversa Vydac[®] C₄ e um gradiente cuja fase A compunha-se de 1,5 g/kg de TFA em água ultrapura e a fase B de 1,5 g/kg de TFA em acetonitrila. O fluxo de eluição empregado foi de 1 ml/min e o comprimento de onda de 220 nm.

No mesmo ano, NYBERG e colaboradores publicaram três métodos para a purificação das saponinas dessa espécie com o emprego de CLAE, utilizando coluna de fase reversa C₁₈ e fase móvel contendo acetonitrila. Entretanto, os sistemas eluentes diferiam nos tampões empregados, objetivando variações de pH para melhorar a separação das saponinas. Neste mesmo artigo, para a análise das saponinas purificadas, foi utilizada uma coluna de fase reversa C₈, fluxo de 0,8 ml/min, sendo empregados sistemas eluentes isocráticos com acetonitrila e diferentes tampões, e um sistema gradiente de 34-45% de acetonitrila. Em todos os métodos apresentados a detecção ocorreu a 205 nm.

NORD e KENNE, ainda em 2000, relataram a separação em fase sólida do extrato bruto de saponinas de *Q. saponaria*, com posterior purificação das mesmas por CLAE. Nesta purificação, foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈, eluída com uma mistura de acetonitrila e tampão acetato de amônio aquoso (0,03 M, pH 6,4), fluxo de 10 ml/min e detecção a 214 nm. Foi empregado ainda um segundo passo de separação, utilizando as mesmas condições anteriores, mas com a fase móvel contendo tampão fosfato (0,03 M, pH 2,8). As frações assim obtidas foram analisadas por CLAE, empregando coluna C₁₈ e fase móvel contendo acetonitrila e tampão acetato de amônio (pH 6,4) ou acetonitrila e tampão fosfato (pH 2,8).

NYBERG e colaboradores (2003) fracionaram o extrato bruto utilizando uma coluna C₁₈ semipreparativa, fluxo de 10 ml/min e detecção a 210 nm. Foram realizados três fracionamentos empregando como eluentes acetonitrila/tampão acetato de amônia 20 mM (pH 6,4) e acetonitrila/tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 2,8), em sistema gradiente. As misturas de saponinas assim obtidas foram analisadas por extração em fase sólida acoplada a RMN e espectrometria de massas. As duas principais frações apresentaram, no mínimo, 28 saponinas, diferenciando-se as mesmas na cadeia de açúcares.

CLAE foi ainda utilizada em estudos de estabilidade realizados com QS-21 (CLELAND et al., 1996; LIU et al., 2002) e na caracterização de derivados semi-sintéticos das saponinas de *Q. saponaria* (MARCIONI et al., 2000; MARCIONI et al., 2003; ZANG et al., 2003).

Tendo em vista a semelhança no perfil de saponinas interespecie, relatada por KAUFFMANN (2002), o intenso uso de CLAE nos estudos com *Q. saponaria* e suas vantagens como método de análise, caracterização e purificação de frações e substâncias, no presente capítulo temos como objetivos:

- A caracterização do perfil químico da fração QB-90 de *Q. brasiliensis*, por CCD.
- O desenvolvimento de método quantitativo para a caracterização da fração QB-90 no extrato aquoso de *Q. brasiliensis*, empregando CLAE.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

Os equipamentos empregados rotineiramente no laboratório foram: cuba cromatográfica Desaga[®], estufa de ar circulante Heraeus[®] modelo RVT 360, triturador de facas Retsch[®], evaporador rotatório Büchi[®] R114, ultra-som Thornton T1440 Unique[®], balança analítica Gibertini[®] modelo Crystal 200, liofilizador modular Edwards modelo Modulyo 4K.

Na preparação das colunas cromatográficas empregou-se como adsorvente gel de sílica 60 (70-230 mesh) e gel de sílica de fase reversa LiChroprep[®] C-18 (40 - 63 µm), ambos de procedência Merck[®]. Para a realização da cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de gel de sílica GF₂₅₄, procedência Aldrich[®]. Os solventes utilizados foram de procedência Nuclear[®], Synth[®], Grupo Química[®], Vetec[®], Merck[®] e EM[®], grau p.a.

Para o desenvolvimento do método quantitativo foram empregados Cromatógrafo Líquido Waters[®] 600, equipado com controlador de fluxo 6CE, bomba 60F, detector Waters[®] 2487, injetor automático Waters[®] 717 (código 71P) e software Waters[®] Millennium³². Os solventes empregados foram de procedência Merck[®], grau CLAE e a água obtida por sistema MILLI-Q PLUS (Millipore[®]).

2.2 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas foram coletadas em área nativa, em Canguçu, RS, identificadas pelo Prof. Dr. Gilson Moreira (Depto Zoologia/UFRGS) e o material testemunho encontra-se depositado no herbário do Departamento de Botânica da UFRGS (ICN 142953).

O material vegetal empregado na caracterização química e para a obtenção da fração QB-90 foi seco em estufa de ar circulante, sob temperatura inferior a 40 °C. Após a secagem, as partes aéreas foram trituradas separadamente em triturador de facas.

Para o desenvolvimento e a validação do método por CLAE, parte do material fresco foi congelada, liofilizada, triturada em triturador de facas e posteriormente submetida ao processo de extração.

2.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO PURIFICADA

As folhas de *Q. brasiliensis* foram submetidas à extração por maceração durante 8 horas, à temperatura ambiente. Como líquido extrator utilizou-se água destilada. O extrato foi filtrado e o resíduo vegetal submetido à nova extração. Após ser liofilizado, o extrato foi purificado.

Visando a obtenção da fração purificada QB-90, várias cromatografias em coluna foram realizadas, empregando o método desenvolvido por KAUFFMANN (2002). Nestes procedimentos utilizou-se gel de sílica como adsorvente e um gradiente água:metanol, como eluente.

A fração QB-90 foi utilizada no desenvolvimento e validação de método CLAE.

2.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO BRUTO E DA FRAÇÃO QB-90

Os metabólitos majoritários no extrato bruto e na fração em estudo foram caracterizados por CCD em diferentes sistemas cromatográficos, como n-butanol : ácido acético : água (5:1:4, v/v) e clorofórmio : metanol : água : ácido acético (30:20:3:0,2, v/v). Utilizando-se como padrões cromatográficos as frações de saponinas purificadas de *Q. saponaria* disponíveis comercialmente, saponinas Sigma[®] e QUIL-A[®] (Superfos[®]). Os cromatogramas foram observados sob luz UV₂₅₄ e UV_{365 nm} e, posteriormente, revelados com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento.

2.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO PARA ANÁLISES POR CLAE

O líquido extrator empregado foi água destilada em diferentes proporções planta:solvente (1:20 e 1:40). O material vegetal previamente liofilizado e triturado foi pesado e submetido à maceração mecânica em gral, por três minutos. Após foi transferido quantitativamente para copo de béquer e levado ao ultra-som durante 20, 30 ou 40 minutos. Os extratos assim obtidos foram filtrados, liofilizados e analisados por CLAE.

2.6 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE QUANTITATIVA DA FRAÇÃO QB-90 POR CLAE

2.6.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

No desenvolvimento do método de análise quantitativa da fração QB-90 por CLAE, foram utilizadas colunas de fase reversa C₈ (Waters Spherisorb[®] 5 µm, 4,6 x 150 mm) e C₁₈ (LiChrospher[®], 5 µm). Sendo empregadas colunas de guarda Waters Spherisorb[®] C₈ e Nova-Pak[®] C₁₈, respectivamente. Diferentes sistemas eluentes foram testados, como acetonitrila:água, metanol:água e acetonitrila:TFA 0,01%, em diferentes proporções, visando obter um sistema simples e eficaz para a quantificação da fração QB-90 no extrato aquoso de *Q. brasiliensis*.

2.6.2 VALIDAÇÃO

O método desenvolvido para a quantificação da fração QB-90 no extrato de *Q. brasiliensis* foi validado segundo normas da RE 899 (BRASIL, 2003) e do ICH (2005). Os parâmetros avaliados na validação do método foram linearidade e intervalo de variação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

2.6.2.1 Avaliação da Linearidade e Intervalo de Variação

A avaliação da linearidade do método foi realizada pela construção de curvas de calibração obtidas tanto para a fração QB-90 quanto para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis*. Foram analisados os parâmetros exigidos pela RE 899 (BRASIL, 2003).

2.6.2.1.1 Curvas de Calibração

As curvas de calibração foram construídas empregando seis concentrações diferentes, sendo cada ponto injetado em triplicata. Foram construídas três curvas, em dias diferentes, tanto para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis* quanto para a fração QB-90. As soluções foram filtradas em membrana hidrofílica Millipore®, com diâmetro nominal de poro 0,45 µm e 13 mm de diâmetro, antes da injeção.

As curvas de calibração para a fração QB-90 foram preparadas a partir de soluções em concentrações de 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0 e 10 µg/ml, e para o extrato a partir de soluções em concentrações de 50, 100, 200, 400, 800 e 1000 µg/ml.

2.6.2.2 Avaliação da Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. Os resultados correspondem à média de seis determinações e foram expressos como desvio padrão relativo (DPR).

Foram pesados exatamente cerca de 10 mg de extrato aquoso de *Q. brasiliensis*, que foram solubilizados em 10 ml de fase móvel, originando a solução mãe. Desta solução foram retiradas seis alíquotas de 1 ml, as quais foram diluídas a 5 ml, em balão volumétrico. Deste modo foram obtidas seis soluções com concentração de 200 µg/ml (injetadas em triplicata), utilizadas na avaliação da repetibilidade.

O procedimento descrito acima foi realizado por três vezes, em dias diferentes, fornecendo assim os dados de precisão intermediária.

2.6.2.3 Avaliação da Exatidão

A exatidão foi avaliada empregando-se o ensaio de adição de padrão, sendo realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade método.

Em vista disso, foram preparadas, para cada ensaio, uma solução padrão de QB-90 (50 µg/ml) e quatro soluções de extrato, sendo uma solução controle e três soluções denominadas soluções de recuperação. A solução padrão foi adicionada às soluções de recuperação de modo a obter três níveis de concentração (2,3; 4,6 e 10 µg/ml) de QB-90 adicionada.

A recuperação foi determinada subtraindo-se os valores apresentados pela solução controle dos valores apresentados pelas soluções de recuperação. E a exatidão determinada pela relação entre a concentração média recuperada e a concentração teórica correspondente.

2.6.2.4 Determinação dos Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir das curvas de calibração da fração QB-90 e calculados segundo as equações presentes na RE 899 (BRASIL, 2003).

$$LD = (DPa \times 3) / IC$$

$$LQ = (DPa \times 10) / IC$$

Onde DPa é o desvio padrão médio do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração e IC é a inclinação média das curvas de calibração.

2.6.2.5 Avaliação da Robustez

A robustez do método foi avaliada pela observação do seu desempenho após sofrer pequenas alterações na composição e no fluxo da fase móvel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Q. BRASILIENSIS* E DA FRAÇÃO QB-90

O extrato aquoso de folhas de *Q. brasiliensis* foi obtido com base no descrito por KAUFFMANN (2002), realizando-se algumas modificações para aperfeiçoar a metodologia empregada. Assim, foi verificado que o método utilizado foi eficiente e reprodutível, uma vez que várias extrações foram realizadas e os extratos obtidos apresentaram perfil cromatográfico similar por CCD.

Para a obtenção de quantidade suficiente da fração QB-90 para os estudos químicos e biológicos, foi necessária a realização de cerca de 70 colunas cromatográficas. Como processos repetidos foram empregados, cada lote de amostra obtida foi acondicionada separadamente para serem analisadas por CCD e CLAE, pelas quais se verificou que a metodologia de purificação desenvolvida foi adequada, uma vez que permitiu a obtenção de frações idênticas, que puderam ser reunidas e empregadas nos demais ensaios.

A análise cromatográfica da fração QB-90 e das frações comerciais de saponinas purificadas de *Q. saponaria* (Quil-A[®] e extrato comercial de saponinas Sigma[®]) permitiu verificar que as saponinas de *Q. brasiliensis* apresentam um comportamento cromatográfico semelhante ao comportamento cromatográfico das saponinas de *Q. saponaria* (Figura 2.1).

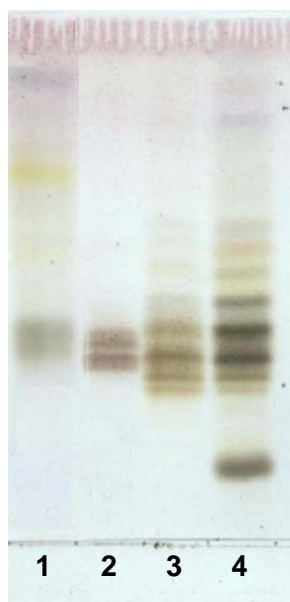


Figura 2.1: Análise cromatográfica do extrato aquoso de *Q. brasiliensis*, QB-90 e frações comerciais de *Q. saponaria*, por CCD

Sistema eluente: n-butanol:ácido acético:água (5:1:4)

Adsorvente: cromatofolhas de gel de sílica Aldrich[®]

Agente cromogênico: anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento

Amostras: 1- Extrato Aquoso de *Q. brasiliensis*

2- QB-90

3- Quil-A[®]

4- Extrato comercial de saponinas Sigma[®]

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO PARA ANÁLISES POR CLAE

Para a obtenção do extrato aquoso a ser utilizado para o desenvolvimento e validação do método de doseamento empregando CLAE, foram testados diferentes processos de extração. O líquido extrator empregado foi água destilada em diferentes proporções planta:solvente (1:20 e 1:40). O material vegetal previamente liofilizado e triturado foi pesado e submetido à maceração mecânica em gral, por três minutos. Após, foi transferido quantitativamente para copo de béquer e levado ao ultra-som durante 20, 30 ou 40 minutos. Os extratos assim obtidos foram filtrados, liofilizados e analisados por CLAE. O método escolhido para a obtenção dos extratos foi o que empregou a proporção 1:40 (planta:solvente) e 40 minutos de extração no ultra-som, uma vez que a análise por CLAE demonstrou ser este mais eficiente na extração da fração QB-90.

3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE QUANTITATIVA DA FRAÇÃO QB-90 POR CLAE

Dentre as diferentes condições cromatográficas testadas, selecionou-se aquela que empregou coluna de fase reversa C₈ (Waters Spherisorb[®]) com respectiva coluna de guarda, sistema isocrático acetonitrila:água (65:35), previamente filtrado em membranas Schleicher & Schuell ou Millipore (0,22 µm) e degaseificado. O fluxo de eluição empregado foi de 0,8 ml/min e o volume de injeção de 20 µl. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 214 nm. Essas condições foram selecionadas porque o cromatograma obtido apresentou adequada separação entre o pico correspondente à fração QB-90 e o(s) pico(s) referente(s) aos demais componentes do extrato.

Os cromatogramas assim obtidos para a fração QB-90 e para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis* estão apresentados na Figura 2.2 A e B, respectivamente. Nesses cromatogramas são observadas injeções em triplicata, com o pico referente à fração QB-90 em tempo de retenção de aproximadamente 9,8 minutos.

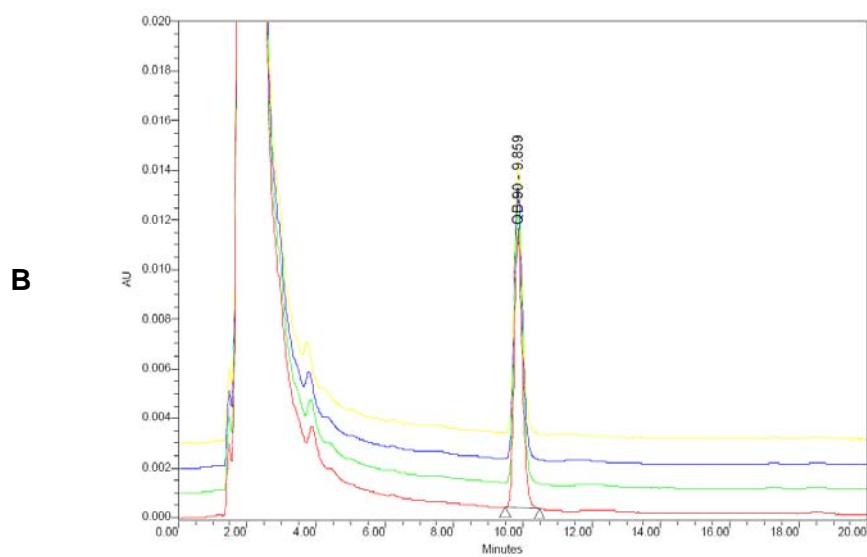
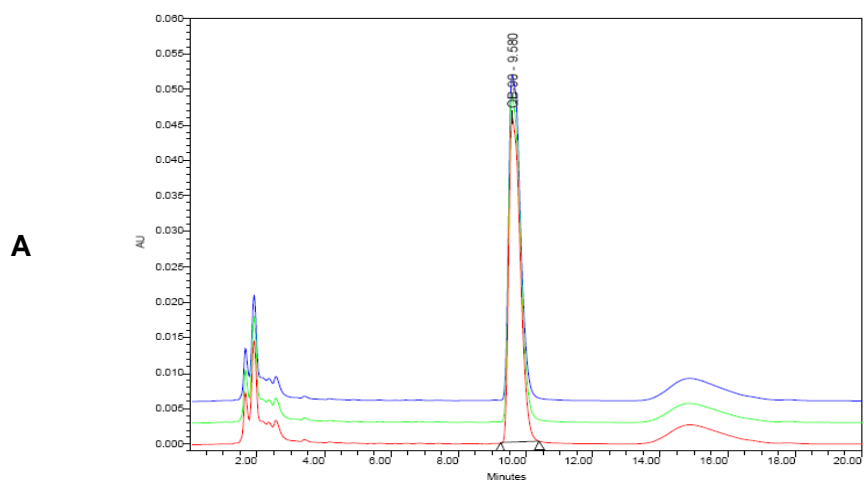


Figura 2.2: Perfis cromatográficos para injeções em triplicata da fração QB-90 (**A**) e do extrato aquoso de *Q. brasiliensis* (**B**) obtidos por CLAE, utilizando coluna C₈ Waters Spherisorb[®], sistema isocrático acetonitrila:água (65:35), fluxo de 0,8 ml/min e detecção a 214 nm. Em aproximadamente 9,8 minutos observa-se o pico referente à fração QB-90.

3.3.1 Linearidade e Intervalo de Variação

Segundo a RE 899 (BRASIL, 2003), a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos com seu emprego são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É recomendado que seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (RE 899, BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A linearidade do método foi avaliada tanto para a fração QB-90 quanto para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis*, conforme descrito no item 2.6.2.1. Na Figura 2.3 podemos observar a representação gráfica da curva de calibração obtida para a fração QB-90.

A equação de reta obtida para esta curva foi $y = 10247x + 93,771$, onde y representa a área do pico e x a concentração de QB-90 ($\mu\text{g/ml}$). O coeficiente de determinação (r^2) obtido foi 0,9993, o que significa que a variação da concentração de QB-90 explica 99,93% da área do pico observada para QB-90.

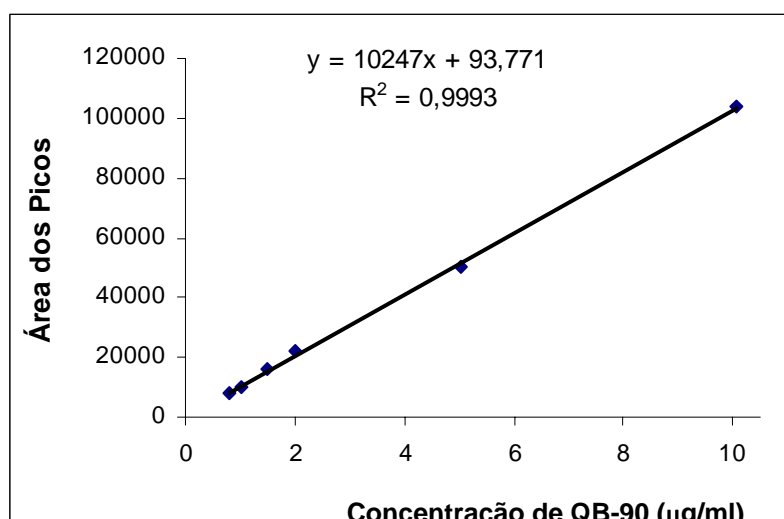


Figura 2.3: Representação gráfica da curva de calibração da fração QB-90 obtida por CLAE, utilizando coluna C_8 Waters Spherisorb[®], sistema isocrático acetonitrila:água (65:35), fluxo de 0,8 ml/min e detecção a 214 nm.

A RE 899 (BRASIL, 2003) exige ainda que, se o exame visual do gráfico demonstrar relação linear aparente, os resultados dos testes devem ser tratados estatisticamente a fim de determinar o coeficiente de correlação, a intersecção com o eixo Y, o coeficiente angular, a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e o DPR.

O coeficiente de correlação (r) permite avaliar a correlação existente entre duas características quantitativas. Deste modo, o valor máximo de r (1) é obtido quando todos os pontos do gráfico estão em uma linha reta inclinada, sendo esta correlação chamada de plena ou perfeita. O coeficiente de correlação mínimo aceitável para o critério de linearidade no processo de validação de um método analítico é 0,99, conforme a RE 899 (BRASIL, 2003). Para a curva de calibração da fração QB-90 foi obtido o valor de $r = 0,99965$, apresentando-se assim em conformidade com o exigido pelas normas vigentes.

Os resultados referentes à intersecção com o eixo Y e ao coeficiente angular (inclinação) obtidos para a curva de calibração de QB-90 são apresentados na Tabela 2.1. Observando-se os valores encontrados para a intersecção, verifica-se que o intervalo entre os limites de confiança (LC) inferior e superior contém o zero, indicando a ausência de um fator de variação independente da variável x (chamado erro sistemático constante). Outro fator a ser destacado é o valor de P , associado ao teste t , o qual avalia se a hipótese nula é ou não verdadeira. Em relação à intersecção esta hipótese representa a inclusão do valor zero ao intersepto da reta. Assim, o valor- P (0,7823) apresentado na Tabela 2.1 não rejeita a hipótese nula para um nível de significância de 0,05, ou seja, a intersecção não difere de zero.

Tabela 2.1: Análise de regressão linear da curva de calibração da fração QB-90.

Parâmetros	Coeficientes	valor- P	LC Inferior	LC Superior
Intersecção	93,77155094	0,782339738	-613,748264	801,2913659
Inclinação	10246,56789	2,04639E-26	10097,42328	10395,71249

A hipótese nula também deve ser avaliada para a inclinação da reta, a qual sugere que a inclinação seria constante ou igual a zero, não havendo regressão entre as variáveis. Neste caso, o valor- P encontrado ($2,0464 \times 10^{-26}$) rejeita claramente esta hipótese, demonstrando assim que a inclinação da reta é diferente

de zero. A análise de variância (ANOVA) da regressão linear para a fração QB-90 (Tabela 2.2) também demonstra a rejeição desta hipótese ($F = 21211,65$; $P < 0,0001$), indicando a existência de regressão linear entre os dados.

Tabela 2.2: Análise de variância (ANOVA) da regressão linear para as áreas dos picos determinadas para a curva de calibração da fração QB-90.

	<i>gl</i>	SQ	MQ	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	20548993714	20548993714	21211,6508	2,04639E-26
Resíduo	16	15500156,14	968759,7588		
Total	17	20564493870			

Na Tabela 2.3 estão apresentadas as áreas encontradas para os picos referentes à fração QB-90, nas concentrações analisadas, com os respectivos DPR.

Tabela 2.3: Áreas dos picos da fração QB-90 analisadas por CLAE, utilizando coluna C_8 Waters Spherisorb®, sistema isocrático acetonitrila:água (65:35), fluxo de 0,8 ml/min e detecção a 214 nm.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Área dos Picos (Média \pm s; n=3)	DPR
0,8	8074,33 \pm 230,46	2,85%
1,0	10333,33 \pm 140,80	1,36%
1,5	15897,67 \pm 250,77	1,58%
2,0	21902,00 \pm 154,98	0,71%
5,0	50045,33 \pm 690,37	1,38%
10,0	103979,33 \pm 138,36	0,13%

A avaliação da linearidade do método para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis* contemplou o intervalo de concentração de 50 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ de extrato. Na Figura 2.4 podemos observar a representação gráfica da curva de calibração obtida para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis*.

A equação de reta obtida para esta curva foi $y = 227,61x - 1199,4$, onde y representa a área do pico e x a concentração de QB-90 ($\mu\text{g/ml}$). O coeficiente de determinação (r^2) obtido foi 0,9994, e o coeficiente de correlação (r), 0,999699, apresentando-se em conformidade com a RE 899 (BRASIL, 2003).

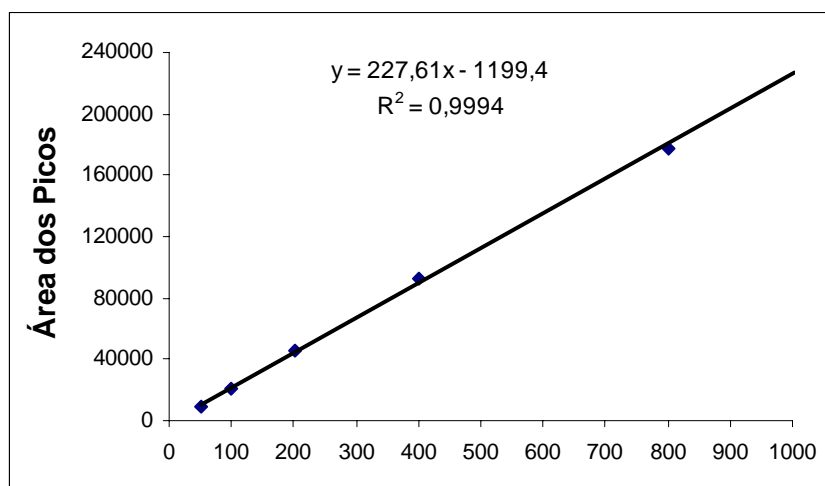


Figura 2.4: Representação gráfica da curva de calibração do extrato aquoso de *Q. brasiliensis* obtida por CLAE, utilizando coluna C₈ Waters Spherisorb®, sistema isocrático acetonitrila:água (65:35), fluxo de 0,8 ml/min e detecção a 214 nm.

A análise dos LC inferior e superior (Tabela 2.4) demonstram que a intersecção inclui o valor zero, o que é reafirmado pelo valor-*P* (0,1366), para um nível de significância de 0,05 (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Análise de regressão linear da curva de calibração para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis*.

Parâmetros	Coefficientes	valor- <i>P</i>	LC Inferior	LC Superior
Intersecção	-1199,42168	0,136599033	-2821,70528	422,8619198
Inclinação	227,6113927	2,59254E-27	224,6999452	230,5228402

A análise da regressão linear para a inclinação (Tabela 2.4) demonstra que esta exclui o valor zero ($P = 2,59 \times 10^{-27}$), o que é confirmado pela ANOVA da regressão linear (Tabela 2.5), na qual foi encontrado $F = 27466,46$ ($P < 0,0001$), indicando a existência de regressão linear entre os dados.

Tabela 2.5: Análise de variância (ANOVA) da regressão linear para as áreas dos picos determinadas para a curva de calibração do extrato aquoso de *Q. brasiliensis*.

	<i>gl</i>	SQ	MQ	<i>F</i>	<i>F</i> de significação
Regressão	1	1,2015E+11	1,2015E+11	27466,46563	2,59254E-27
Resíduo	16	69990682,87	4374417,679		
Total	17	1,2022E+11			

Na Tabela 2.6 estão apresentadas as áreas encontradas para os picos referentes à fração QB-90, no extrato aquoso de *Q. brasiliensis*, com os respectivos DPR.

Tabela 2.6: Áreas dos picos correspondentes a QB-90 no extrato aquoso de *Q. brasiliensis*, obtidas por CLAE, utilizando coluna C₈ Waters Spherisorb[®], sistema isocrático acetonitrila:água (65:35), fluxo de 0,8 ml/min e detecção a 214 nm.

Concentração (µg/ml)	Área dos Picos (Média ± s; n=3)	DPR
50	9187,33 ± 141,15	1,54%
100	21417,00 ± 107,92	0,50%
200	45050,00 ± 467,12	1,04%
400	92417,33 ± 539,63	0,58%
800	177859,00 ± 333,10	0,19%
1000	228907,00 ± 355,42	0,16%

3.3.2 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de uma mesma amostra (RE 899, BRASIL, 2003). É considerada em três níveis, repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo que esta última não é um critério exigido quando a precisão intermediária é estabelecida (FDA, 1994).

A repetibilidade é a precisão intracorrida ou intradia, ou seja, é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. Deve ser verificada por, no mínimo, seis determinações na mesma concentração, ou no mínimo nove concentrações contemplando o intervalo linear do método (concentrações baixa, média e alta). A precisão intermediária é a concordância dos resultados obtidos em dias diferentes, ou seja, precisão intercorridas ou interdias.

A avaliação da repetibilidade foi realizada por meio da análise de seis soluções de extrato aquoso de *Q. brasiliensis* (200 µg/ml), preparadas a partir de uma solução mãe. Este procedimento foi repetido por três dias, fornecendo o resultado da precisão intermediária. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 2.7 e 2.8, respectivamente.

O desvio padrão relativo (DPR) obtido no teste de repetibilidade foi 0,6%, e 2,76% para a precisão intermediária. Tais valores apresentam-se dentro dos limites aceitáveis especificados pela RE 899 (BRASIL, 2003), a qual preconiza que o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, mas não admite valores superiores a 5%.

Tabela 2.7: Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis* por CLAE.

Amostras	Concentração de QB-90 (μg / 200 μg de extrato)
1	4,81
2	4,79
3	4,78
4	4,83
5	4,81
6	4,86
Concentração Média \pm s	4,81 \pm 0,03
DPR	0,60%

Tabela 2.8: Valores experimentais obtidos na determinação da precisão intermediária para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis* por CLAE.

Dias	Concentração de QB-90 (média ± s, n = 6) (µg / 200µg de extrato)	DPR
1	4,81 ± 0,03	0,60%
2	4,76 ± 0,05	1,09%
3	4,57 ± 0,03	0,64%
Concentração Média ± s		4,71 ± 0,13
DPR (interdia)		2,76%

3.3.3 Exatidão

A exatidão expressa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo com o valor verdadeiro. Assim, foi utilizado o ensaio de recuperação a fim de avaliar a exatidão da metodologia analítica em questão.

Foram adicionadas concentrações conhecidas de QB-90 a soluções de extrato aquoso. As amostras com e sem adição de QB-90 foram analisadas pelo método em estudo, sendo verificada a quantidade recuperada pela diferença entre os dois valores. A taxa de recuperação foi determinada pela comparação destes valores com a quantidade de QB-90 adicionada. Na Tabela 2.9 estão apresentados os resultados encontrados no teste de exatidão.

Tabela 2.9: Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o extrato aquoso de *Q. brasiliensis* por CLAE.

Concentração média adicionada (µg/ml)	Concentração média recuperada (µg/ml)	Taxa de recuperação (%)	DPR
2,31	2,29	99,28%	3,56
4,62	4,72	102,10%	2,22
10,02	9,75	97,32%	1,51

Tendo em vista os resultados obtidos, considera-se que o método proposto apresenta exatidão adequada, uma vez que as taxas de recuperação situaram-se dentro dos limites de 95 – 105% preconizados pelo ICH (2005).

3.3.4 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado pelo método em questão. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais.

Uma estimativa destes limites foi obtida empregando-se as equações presentes nas normas vigentes e apresentadas no item 3.1.6.3. Deste modo, o LD encontrado para o método proposto foi 0,074 µg/ml e o LQ foi 0,248 µg/ml.

3.3.5 Robustez

A robustez de um método analítico demonstra a capacidade deste em resistir a pequenas variações em seus parâmetros. Neste sentido, empregaram-se pequenas alterações no fluxo e na composição da fase móvel para avaliar a robustez do método em estudo.

Observando-se os resultados apresentados na Tabela 2.10, verifica-se que há uma pequena alteração nos tempos de retenção quando comparados às condições originais, no entanto, o teor de QB-90 na amostra analisada não sofreu variações significativas. O teor médio de QB-90 obtido nas soluções foi de 5,52 µg/ml, com um DPR de 1,63%, demonstrando a pequena variação observada. Além disso, o perfil do pico cromatográfico permaneceu o mesmo frente às alterações impostas. Tendo em vista os resultados observados considera que o método desenvolvido atende ao critério de robustez.

Tabela 2.10: Resultados obtidos para o teste de robustez, aplicado ao método desenvolvido por CLAE, para análise quantitativa de QB-90 no extrato aquoso de *Q. brasiliensis*.

	Teor de QB-90 (µg/ml)	Tr (min)
Condições originais	5,43	9,86
Fluxo 0,7 ml/min	5,61	11,27
Acetonitrila 67%	5,53	10,72

Visto que os parâmetros de eficiência analítica, como linearidade e intervalo de variação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, foram avaliados e os resultados obtidos apresentaram-se em conformidade com o exigido pela legislação vigente (RE 899, BRASIL, 2003), considera-se o método desenvolvido validado e adequado para detecção e doseamento da fração QB-90 em extratos aquosos de *Q. brasiliensis*.

4. REFERÊNCIAS

ABOURASHED, E.A.; VANDERPLANK, J.R.; KHAN, I.A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants – I. Application to *Passiflora* flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, v. 40, n. 2, p. 81-91, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 02 jun. 2003.

CLELAND, J.L.; KENSIL, C.R.; LIM, A.; JACOBSEN, N.E.; BASA, L.; SPELLMAN, M.; WHEELER, D.A.; WU, J.Y.; POWELL, M.F. Isomerization and formulation stability of the vaccine adjuvant QS-21. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, n. 1, p. 22-28, 1996.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Validation of Chromatographic Methods*. Reviewer Guidance, 1994.

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

ICH: Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1). In *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 2005

KAUFFMANN, C. Constituição química e avaliação da atividade imunoadjuvante de *Quillaja brasiliensis*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. Porto Alegre, RS. 2002.

KENSIL, C.A.; MARCIANI, D.J. Saponin adjuvant. USA Patent N° 5057540, 1991.

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.

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.

MARCIANI, D.J.; REYNOLDS, R.C.; PATHAK, A.K.; FINLEY-WOODMAN, K.; MAY, R.D. Fraction, structural studies, and immunological characterization of the semi-synthetic *Quillaja* saponins derivative GPI-0100. *Vaccine*, v. 21, p. 3961-3971, 2003.

NORD, L.I.; KENNE, L. Novel acetylated triterpenoid saponins in a chromatographic fraction from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research*, v. 329, p. 817-829, 2000.

NYBERG, N.T.; KENNE, L.; RÖNNBERG, B.; SUNDQUIST, B.G. Separation and structural analysis of some saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research*, v. 323, p. 87-97, 2000

NYBERG, N.T.; BAUMANN, H.; KENNE, L. Solid-phase extraction NMR studies of chromatographic fractions of saponins from *Quillaja saponaria*. *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 2, 2003.

SAN MARTÍN, R.; BRIONES, R. Quality control of comercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 2063-2068, 2000.

ZANG, P.; YANG, Q-B.; MARCIANI, D.J.; MARTÍN, M.; CLEMENTS, J.D.; MICHALEK, S.M.; KATZ, J. Effectiveness of the quillaja saponin semi-synthetic analog GPI-0100 in potentiating mucosal and systemic responses to recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Vaccine*, v. 21, p. 4459-4471, 2003.

**CAPÍTULO III. ADJUVANT ACTIVITY OF *QUILLAJA BRASILIENSIS* SAPONINS
ON THE IMMUNE RESPONSES TO BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 IN MICE**

Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice

Juliane D. Fleck^a, Carla Kauffmann^a, Fernando Spilki^c, Claiton L. Lencina^a,
Paulo M. Roche^{b,c}, Grace Gosmann^{a,*}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FARF/RS), Av. Itália s/n, Porto Alegre 91501-900, RS, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Escola de Medicina, UNIRIO (União Rio de Janeiro), Instituto de Pesquisas Médicas e Dentárias, Financiar (IPM/D), Maracanã de Jd., RJ, Brazil

Received 27 June 2008; accepted 20 June 2008

Available online 12 July 2008

Abstract

The chemical characterization of aqueous extracts (AE) of bark, leaves and branches and the saponin fraction desaponinated QSI-60 obtained from *Quillaja brasiliensis*, a native species from Southern Brazil, show remarkable similarities to *Quillaja saponaria* saponins which are known as adjuvants in vaccine formulations. *In vitro* toxicity assays of AE and QSI-60 showed acute lethality for mice in doses ranging from 30 to 1480 μ g and 50–480 μ g, respectively. Experimental vaccines prepared with bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) antigen and either AE (bark 300 μ g, leaves 400 μ g, branches 400 μ g) or QSI-60 (180 μ g) were able to enhance the immune response of mice in a

compatible manner to saponins from *Q. saponaria* (QsIA, 100 μ g). BHV-1 specific IgG, IgG1 and IgG2a antibody levels in serum were also significantly enhanced by AE, QSI-60 and QsIA compared to control group ($p < 0.05$). These results showed that AE and QSI-60 from *Q. brasiliensis* are potential candidates as adjuvants in vaccines.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Quillaja brasiliensis*; Saponin; QSI-60; BHV-1; Adjuvant

1. Introduction

Quillaja brasiliensis (A. St.-Hil. ex Tul.) Mart. is native to Southern Brazil, commonly known as soap tree due to the capacity of its leaves and bark to produce sudsant foam in water [1]. We had previously presented the first chemical analysis carried out on this species [2]. From *Q. brasiliensis* leaves, a new diterpene, named 18-O- β -D-glucopyranoside of 18-hydroxy-lambertic acid was isolated and identified together with quercetin and rutin. After acid hydrolysis of the aqueous leaves extract, one prosapogenin was isolated and identified as 3-O- β -D-glucosapogeninoyl-quillic acid (Fig. 1). Since from first studies, we proceed to the physicochemical studies and determination of the immunoadjuvant properties of this Brazilian *Quillaja* species.

A number of studies have focused on the use of saponins as immunological adjuvants. Particular attention has been drawn to the economically important Chilean tree *Quillaja saponaria* Molina whose bark extract furnishes saponins, such as, QsIA [3]. QsIA has been incorporated into immunostimulating complexes (ISCOMs) and used in many immunogens such as vesicular influenza virus, feline leukemia virus and bovine mastitis vaccines [4,5]. *Quillaja* saponins were further purified to allow adjuvant formulations for human vaccine use, such as, melanomas, HIV-1 and malaria vaccines [6–12]. Chemical structural comparisons suggest that the known adjuvant saponins have the same triterpene backbone including the aldehyde at carbon-4 (quillic acid) and glucuronic acid, two oligosaccharide chains, one of which is acylated by two fatty acid residues in tandem [13–38].

Considering that the overexploitation of the *Q. saponaria* bark has caused important ecological damage and a consid-

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316 3316; fax: +55 51 3324 3323.

E-mail address: gogosmann@ufrgs.br (G. Gosmann).

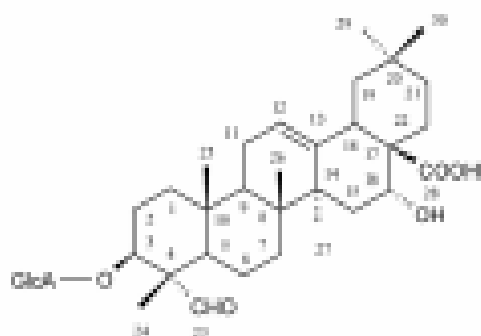


Fig. 1. Compound 3-O-β-D-glucosylquercetin gallic acid ester.

terrible shortages of the available supplies, the possible use of *Q. brasiliensis* saponins could provide another possible source of such compounds, decreasing the pressure on *Q. saponaria* exploitation and adding to the possibilities of sustainable exploitation [17].

Herein, we describe the preparation of aqueous extracts from the leaves, barks and branches of *Q. brasiliensis*, the isolation from its leaves of one saponin fraction named QB-60 and their structural characterization by hydrolysis and NMR. The immunological properties of these extracts and QB-60 were compared to those of *Q. saponaria* saponins on the induction of specific immune responses to bovine leishmaniasis type 1 (BLV-1) antigen following immunization of mice.

2. Materials and methods

2.1. Material

QuilA[®] was from Superfos[®]. 3-O-β-D-glucosylquercetin-gallic acid was isolated previously from *Q. brasiliensis* leaves [2]. ¹H NMR spectra were measured in methanol-*d*₄/D₂O (2:1) with an INOVA NARIAN 300 MHz spectrometer.

2.2. Plant material

Q. brasiliensis (A. St.-Hil. et Tul.) Mart. were collected in Capapava do Sul, State of Rio Grande do Sul, Brazil. A herbarium specimen is deposited at the Herbarium of the Botany Department of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil (JCN124818).

2.3. Extraction and purification of saponins

Air-dried powdered leaves, barks and branches from *Q. brasiliensis* were extracted, separately, in water (1:10, w/v) under constant stirring at room temperature for 5h. These extracts were filtered and lyophilized to obtain the leaves extract, the bark extract and the branches extract.

The leaves extract was submitted to further purification. It was applied to silica Lichroprep[®] (Merck, 40–63 μm particle size) using as eluent a stepwise gradient of aqueous 0–100% MeOH. Elution of saponins was monitored by thin-layer chromatography (TLC). TLC was performed on silica gel aluminum plates (Mallinck) using CHCl₃:MeOH:EtOAc:CO₂H (30:20:3:0.2, v/v) or n-BuOH:AcOH:H₂O (2:1:4, v/v) as solvent and anisaldehyde-sulphuric acid followed by heating as spray reagent. Fractions containing similar saponins were pooled together and evaporated to dryness. Fraction QB-60 was obtained and its immunological properties were determined.

2.4. Acid hydrolysis and NMR of AE, and QB-60

Aqueous extracts of leaves, barks and branches, QB-60 and QuilA were submitted, separately, to acid hydrolysis (reflux for 2h in 1M H₂SO₄ in EtOH 70%) as previous work [2]. Their residues were chromatographed using 5l gel and CHCl₃:MeOH (10:1, v/v) as eluent and anisaldehyde/sulphuric acid for detection. These same samples were submitted to ¹H NMR spectroscopy in order to visualize the fingerprint of the metabolites in these extracts.

2.5. Animals

Female Swiss mice (7–8 weeks old) of the CF-1 breed were purchased from the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, RS, Brazil, and acclimatized for 72h prior to use. Rodent laboratory chow and tap water were provided ad libitum. Mice were maintained under controlled temperature (22 ± 2 °C) and humidity under a 12/12h light/dark cycle. All the procedures were carried out in strict accordance with the International Legislation on the Use and Care of Laboratory Animals and were approved by the University Committee for Animal Experimentation/UFRGS (project number 2003112).

2.6. Toxicity assays of AE and QB-60

Toxicity of *Q. brasiliensis* extracts prepared from leaves, barks and branches were tested by subcutaneous administration on the back of mice (*n* = 4) using 300 μl of appropriate dilutions (50, 100, 200, 400, 800 and 1600 μg) of each extract dissolved in phosphate buffered sterile saline (PBS). The toxicity of the fraction QB-60 was tested in mice (*n* = 5) by subcutaneous administration of appropriate dilutions (50, 100, 200, 400, and 800 μg) of QB-60 dissolved in 300 μl of PBS. Each dilution was administered in two weekly doses. The mice were monitored daily for 14 days. Sterile saline-treated animals were included as control group. Toxicity was assessed by lethality, local swelling, loss of hair and development of skin lesions.

2.7. Virus and cells

A bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant vaccine strain was propagated on Media Darcy bovine kidney cells (MDBK, ATCC CCL-34) following standard procedures [18]. Cells were routinely maintained in Eagle's minimal essential medium (E-MEM, Gibco) supplemented with 8% fetal calf serum (FCS, Natocell) and nystatin (Bayrid, Bayer). When cytopathic effect was evident in 90–100% of the monolayers, supernatant medium and cells were harvested and frozen at -70°C . This was then clarified by low speed centrifugation ($2500 \times g$) and the supernatant use as antigen. Virus titrations were performed on microtitre plates following usual methods [19,20]. Titres were expressed as \log_{10} TCID₅₀ per 50 μl . The infectious virus titre of antigen before inactivation was 10^6 TCID₅₀/50 μl .

2.8. Immunization protocols

First, the evaluation of the adjuvant activity of AE from different parts of *Q. brantleyana* was performed in groups of six mice as follows: Group 1: 400 μg of leaves extract; Group 2: 100 μg of bark extract; Group 3: 400 μg of branches extract; Group 4: 100 μg of QB-60.

The second experiment was the determination of the dose-response curve of QB-60 through its serial dilutions (50–200 μg) in PBS and it was performed in groups of eight animals.

In both experiments PBS was used as the vehicle. All samples were filtered through 0.22 μm Microapore[®] filters and kept at 4°C until use. Animals were inoculated subcutaneously twice, on days 0 and 21 with 150 μl of BHV-1 antigen adjuvanted with 50 μl of different concentrations of saponin in a total vaccine volume of 200 μl . A control preparation was formulated with Qr1A (100 μg) as adjuvant. Another control without adjuvant (antigen only) was also included. Sera from inoculated mice were collected on days 0, 28, 42, 56, 84 and 112 post-inoculation (p.v.) of the first dose of vaccine, and frozen for subsequent determination of specific antibody titres in immunosays.

2.9. Immunosays

The titres for IgG, IgG1 and IgG2 a specific anti-BHV-1 were determined in pooled sera by an indirect ELISA as previously described [18]. ELISA plates were coated with the same BHV-1 antigen preparation used for preparation of the samples. Coating was performed in a previously determined dilution (1:8400, v/v) in bicarbonate buffer (pH 9.5) overnight at 4°C . Wells were then washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). One hundred microlitres of the sera collected from mice (diluted 1:50, v/v in PBS-T) were added to duplicate wells and incubated for 1 h at 37°C . Subsequently plates were washed three times in PBS-T. Next, an appropriate dilution (1:1500 in PBS-T) of anti-mouse IgG peroxidase conjugate (DAKO, Denmark) or

anti-mouse IgG1 or IgG2 a peroxidase conjugate (VMRD) was added to wells in 100 μl volumes. Plates were then incubated for another hour at 37°C . After washing, 100 μl of substrate (ortho-phenylenediamine Sigma[®] 10 mg; 0.003% H₂O₂) were added to each well. Plates were then incubated for 5 min at 37°C , when the reaction was terminated by adding 50 μl /well of 2N H₂SO₄. The optical density (OD) was measured in an ELISA plate reader (Mikrotiter, Titertek) at 492 nm. Data were expressed as the mean OD value of the samples minus the mean OD value of control wells.

2.10. Statistical analysis

The data were expressed as mean \pm standard errors and examined for their statistical significances by ANOVA and Tukey test performed on SPSS for Windows. Differences in *p*-value of ≤ 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Characterisation of AE and QB-60

From the dry weight of *Q. brantleyana* extracts, approximately 6% (leaves), 10% (bark) and 4% (branches) were extractable in water. One gram of the aqueous extract from leaves gives 15 mg of QB-60. Aqueous extracts of leaves, bark and branches, QB-60 and Qr1A were submitted, separately, to TLC after acid hydrolysis. The presence of 3-*O*- β -*D*-glucuronopyranosyl-quilic acid (RI = 0.4) was detected by co-TLC in all acid hydrolysis samples. This compound was previously isolated by us [2] and it is a saponin of the saponins found in *Q. saponaria* demonstrating that the different parts of *Q. brantleyana* should have saponins similar to the first one [3].

¹H NMR was carried out on aqueous extracts of leaves, bark and branches, QB-60 and Qr1A, separately in deuterated methanol-H₂O in order to visualize the chemical profile of these extracts. The aliphatic proton resonance (δ = 2.3, 5 = 0.45) characteristic of the quinic acid was presented in all samples together with the signals of methyls (δ = 0.7–1.5). The characteristic signals of Qr1A/saponin were also presented as those of aliphatic acid portion (δ = 2.4–2.7), the signals of sugar hydrogens (δ = 3.0–3.5) together with the anomeric ones (δ = 4.3–5.5). It was also possible to verify in the ¹H NMR spectrum of Qr1A the presence of one slight (δ = 1.68) attributed to the acetyl in the carbon 3 of the fatty acid attached to C-28 [15,16].

It was possible to demonstrate by detailed comparison that ¹H NMR spectra of QB-60 and the aqueous extracts (AE) from *Q. brantleyana* are very similar to the ¹H NMR spectra of Qr1A (saponin mixture from *Q. saponaria* bark).

3.2. Toxicity assays of AE and QB-60

When applied by the i.c. route to mice, no lethality was detected within the concentration range of the *Q. brantleyana*

Table 1.

Toxicity in mice of saponin extracts from the barks, leaves and branches of *Quillaja brasiliensis*^a

	Amounts (μg)					
	50	100	200	400	800	1600
Bark	0%	0%	0%	0%	0%	4%
Leaves	0%	0%	0%	0%	0%	1%
Branches	0%	0%	0%	0%	0%	2%

^a Deaths developed in numbers of animals within 72 h post-vaccination. Mortality rates are indicated as a percentage of saponin.

extracts evaluated. Local swelling or loss of hair was not detected in mice inoculated with two doses of 50–200 μg of all extracts. However, *Q. brasiliensis* bark extract, after the second administration, caused a local swelling in three out of four mice inoculated with 400 μg of such extract, as well as in all four animals inoculated with 800 and 1600 μg of bark extract (Table 1).

In mice inoculated with QB-80, after the first immunization, local swelling at the injection site was detected in one out of six mice inoculated with 400 μg and in three out of six animals that received 800 μg. Three out of six mice died after the second immunization with 800 μg of QB-80.

Taking into account the results, the doses of extracts and QB-80 which did not induce toxic reactions were selected to be tested as adjuvants.

3.3. Immunological studies of AE and QB-80

To estimate the adjuvant effect of the vaccine preparations with different amounts of saponin, the specific anti-BHY-1 IgG, IgG1 and IgG2a responses of inoculated mice were evaluated.

In relation to experiment 1, where saponin extracts (AE) from the leaves, barks and branches of *Q. brasiliensis* were used as adjuvants, 28 days after the first immunization (Fig. 2(a)) a significant rise ($p < 0.03$ to < 0.01) was detected in total specific anti-BHY-1 IgG levels in all saponin formulations in comparison to the control. The vaccine prepared with Qr1A induced significantly higher rises in IgG levels than AE and QB-80.

Total specific anti-BHY-1 IgG, IgG1 and IgG2a profiles on days 42 (data not shown) and 56 (data in 28 days after the second immunization) (Fig. 2(b)) are similar to all samples. On day 56 there are not significant differences in IgG and IgG1 levels among any of the saponin-adjuvanted formulations with the exception of the bark extract that presented a significant rise ($p < 0.05$). Relating to IgG2a, there are not significant differences in any of the saponin formulations tested. To all saponin samples, total specific IgG levels are significantly higher than IgG1 and this latter one is higher than IgG2a times. Antibody levels in the sera of all samples are higher than the control ($p < 0.05$). It was observed similar specific anti-BHY-1 IgG, IgG1 and IgG2a profiles on days 56 and 84 (data not shown) to all samples.

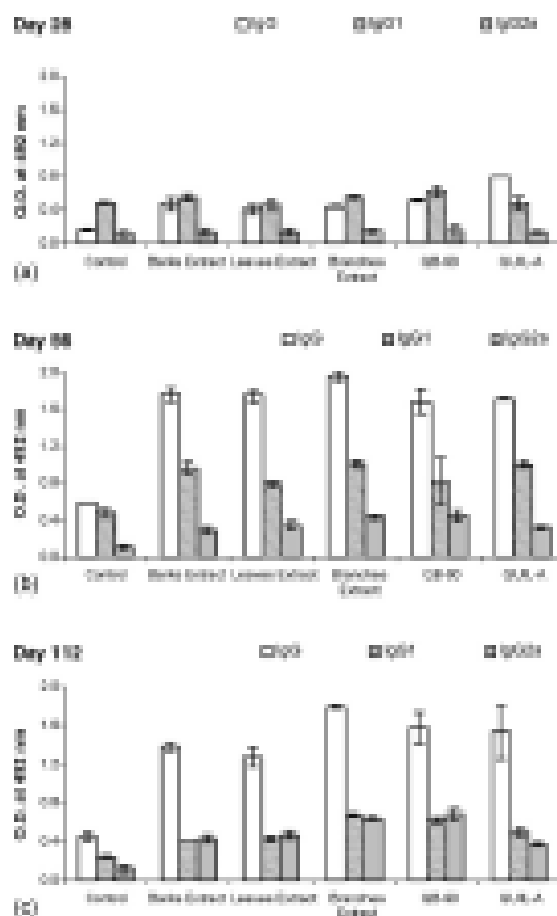


Fig. 2. BHV-1 specific serum IgG, IgG1 and IgG2a antibodies in mice immunized on day 0. On day 28, 56 and 112, sera samples prepared with: (a) adjuvanted BHV-1 (single Barks or Leaves or Branches), single Barks extract that (Quillaja brasiliensis) extracts from: (b) barks (100 μg), (c) leaves (100 μg), (d) branches (200 μg), (e) QB-80 (100 μg) and (f) Qr1A[®] (100 μg). Sera were collected on days 28, 42, 56, 84 and 112 after the second dose of vaccine ($n = 5$) and antibodies measured by ELISA as described in the text. (b) Sera collected on day 28 ($n = 5$), (c) and collected on day 56 ($n = 5$) and collected on day 112 ($n = 5$). Data were expressed in mean \pm S.E. ($n = 5$).

On day 112 (Fig. 2(c)), all saponin-adjuvanted vaccines significantly continue to enhance the total specific IgG and IgG1 levels in mice, as compared with control ($p < 0.05$), although these antibody levels were significantly lower on day 112 when compared to sera collected in previous days. Relating the total specific IgG levels in mice, there were not significant differences among QB-80, Qr1A and bark extract ($p > 0.05$).

In relation to the determination of the dose-responsiveness of QB-80, no significant differences were detected on the profiles of antibody responses examined in three groups of mice that received vaccine formulations with different amounts of QB-80 (50–200 μg) (Fig. 3). QB-80 was also found to stimulate IgG, IgG1 and IgG2a antibody responses to BHV-1

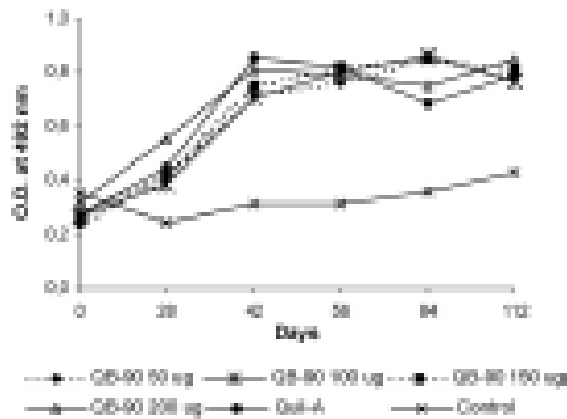


Fig. 3. BMY-1 specific serum of total IgG antibody levels measured in serum after 0, 28, 56, 84 and 112 days obtained from mice that received BMY-1 antigen without adjuvant (control) or either in combination with QB-60 (50, 100, 150 and 200 µg/ml) or QelA[®] (100 µg). Each mouse received on days 28, 56, 84 and 112 total injections measured by ELISA. It is presented in the table. The values are presented in units in OD (OD₄₅₀).

to levels equivalent to those obtained with QelA (100 µg, $p > 0.05$). The significant higher antibody levels detected in formulations containing QB-60 and QelA in comparison to the control was observed until day 112.

4. Discussion

Adjuvants play an important role in increasing the efficacy of a number of different vaccines. Such compounds may also play a role in determining the type of immune response generated. *Q. repens* saponins have for decades been studied for its important immune adjuvant activity. Presently, several pre-clinical and clinical experiments are in course in order to evaluate vaccines with *Quilaja* saponins as adjuvant, including vaccines to HIV, malaria and even tumors such as melanomas [6–12].

In this paper it was possible to demonstrate the potential adjuvant activity of aqueous extracts (AE) of leaves, barks and branches from *Q. brasiliensis*, a native plant from Southern Brazil, together with a purified saponin fraction named QB-60 obtained from leaves of *Q. brasiliensis*.

The chemical characterization of AE and QB-60 described in this paper indicates that they have the pentacyclic 3-O-β-D-glucuronopyranosyl-quilic acid as the main component of their saponins. Through the use of acid hydrolysis and ¹H NMR spectroscopy these extracts and QB-60 show remarkable structural similarities to *Q. repens* saponins which are known as outstanding adjuvants in vaccines.

BMY-1 specific IgG, IgG1 and IgG2a antibody levels in serum were also significantly increased by the different aqueous extracts (AE) and QB-60 and, this latter one presented adjuvant activity at doses from 50 to 200 µg.

Considering that the overexploitation of *Q. repens* bark has caused important ecological damage and a shortage of its resources, the possible use of the leaves of *Q. brasiliensis* to obtain adjuvant saponins should contribute to a stable supply of saponins through this new raw material and their sustainable exploitation [17].

In this study, bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) was used as an indicator antigen in order to demonstrate the immune activity of saponins of *Q. brasiliensis*. Our results demonstrated the low *in vivo* toxicity and the immune potentiating responses of formulations using aqueous extracts (AE) from the leaves, barks and branches of *Q. brasiliensis* altogether with different concentrations of the saponin fraction QB-60 isolated from the leaves of *Q. brasiliensis*.

In conclusion, *Q. brasiliensis* saponins could significantly aid the induction of antibodies to BHV-1 in immunized mice. These results showed that AE and QB-60 from *Q. brasiliensis* are potent immunological adjuvants that must be further studied to determine their potential as adjuvants in vaccines.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Gilson R.F. Moreira (Departamento de Zoologia, UFRRG, Brazil) and Marcos Sobral (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacológicas/UFRRG) for locating, collecting and identifying the plant material; Prof. Cláudia R.F. de Souza (Centro de Ciências da Saúde/UFRR, Brazil) who kindly supplied us QelA[®]; Prof. Teresa Della-Corra Laboratory for the kind supply of Bependorf Centrífuga (S41 TR). This work was supported by CAPES and CNPq (Brazil).

References

- [1] Stein R, Fleck JD, Almeida C, Moreira R, Sobral M, Fleck JD, et al. *Quilaja* saponins. *Phytochemistry* 1999;52:103–14.
- [2] Kharfaneh C, Ribeiro AM, Fleck JD, Moreira G, Fleck VB, Fleck-Júnior G, et al. Constituents from leaves of *Quilaja brasiliensis*. *Phytochem Res* 2004;19:110–3.
- [3] Kharfaneh C, Fleck V, Lencina M, Ribeiro G. Depletion and identification of saponins with highest activity from *Quilaja repens* saponin. *Phytochem Res* 1993;8:631–3.
- [4] Ribeiro G, Kharfaneh A, Fleck VC. BCCMB: first saponin identified by chromatography. *Phytochem Res* 1993;8:567–71.
- [5] Moreira G, Ribeiro G, Fleck VB, Fleck JD, Moreira G. Purification of highly active fractions by immunization with BCCMB containing the B2 subunit protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 2004;22:1117–21.
- [6] Calipso PR, Moreira GM, Fleck JR, Moreira VB, Zito C, Deane AK, et al. Induction of antibodies against B2 glycoprotein by immunizing with saponin using BCCMB: highly specific immunogenic B2 subunit. *Life Sciences* 2002;71:1279–85.
- [7] Moreira G, Rodrigues R, Ribeiro G, Fleck V, Kharfaneh A, Zito C, et al. Purification and induction of B2 specific. *Pharmacol Ther* 2003;99:109–19.
- [8] Fleck JD, Fleck V, Kharfaneh A, Ribeiro G, Moreira GM, Moreira G, et al. *In vivo* antibody response to bovine CTL-E antigen without

- by reduced models: cluster stability, project. Web portal Q&A compuserve. *Physica* 2008;29:2422–31.
- [9] Ertas TD, Mülkeli M, Mihalic T, Kuvshinov D, Yelisekli E, Yelisekli M. Q&D program for calculating direct coupling functions of biological oscillating NPN1 neurons: robustness analysis. *Physica* 2004;29:2088–91.
 - [10] de Bruin CBB, Ertas TD, Ciliberto C, de Ferra EP, Sauer LW, de Vries EP, et al. Periodic stimulation: optimal neuron circuit initialization using Kalman reconstruction. *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2020;521:2670–8.
 - [11] Ma K-F, Bagdasarian D-A, Lohmeijer P, Cline BL, Buzsaki G, et al. The in vivo remodeling properties of brain neocortical synapses: new but non-randomizing complex remodeling. *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2019;471:103073. doi:10.1016/j.jtbi.2019.103073.
 - [12] Mihalic T, Kuvshinov D, Kuvshinov G, A. strong Q&D T cell response observed using the synthetic glycoprotein from the C-terminal of the virus capsid protein of *Plasmodium falciparum* against the *Plasmodium falciparum* antibodies that glycosylate completion. *Physica* 2008;29:2189–92.
 - [13] Hagiwara S, Takahashi Y, Kuvshinov D. An optimal integrated algorithm from *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2008;29:2189–92.
 - [14] Hagiwara S, Wu P-C, Kuvshinov D, Kuvshinov M, Ciliberto C, et al. In vivo stimulation studies of Q&D biological functions of integrated biological and glycosylated cells in *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2008;29:2189–92.
 - [15] Fathi A, Kuvshinov D. Application of optimal algorithm of algorithm in *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2008;29:2189–92.
 - [16] Fathi A, Kuvshinov D. Model for optimal integrated algorithm in *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2008;29:2189–92.
 - [17] Ma M, Kuvshinov D. In vivo study of optimal supply of *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2008;29:2189–92.
 - [18] Mihalic T, Ertas TD, Ciliberto C, de Ferra EP, Sauer LW, de Vries EP, et al. Periodic stimulation: optimal neuron circuit initialization using Kalman reconstruction. *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2020;521:2670–8.
 - [19] Fathi A, Ciliberto C, de Ferra EP, Sauer LW, de Vries EP, et al. Periodic stimulation: optimal neuron circuit initialization using Kalman reconstruction. *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2020;521:2670–8.
 - [20] Fathi A, Ciliberto C, de Ferra EP, Sauer LW, de Vries EP, et al. Periodic stimulation: optimal neuron circuit initialization using Kalman reconstruction. *Journal of theoretical biology*. *Physica* 2020;521:2670–8.

CAPÍTULO IV. ESTUDOS DE PROPAGAÇÃO DE *QUILLAJA BRASILIENSIS*

1. INTRODUÇÃO

As células vegetais produzem uma grande variedade de compostos químicos, sendo denominados metabólitos primários os compostos que apresentam importância vital às funções celulares. Metabólitos secundários são moléculas cuja função individual não é considerada essencial à sobrevivência das células, mas que contribuem para a adaptação das plantas ao ambiente (AERTS *et al.*, 1991).

A biossíntese dos metabólitos secundários é distinta e não está restrita a rotas metabólicas clássicas (WINK, 1999). Muitas dessas moléculas possuem considerável valor econômico, sendo utilizadas por diversos setores industriais. Dentre estes compostos, as saponinas merecem destaque, pois são utilizadas por setores como o farmacêutico, na preparação de medicamentos, vacinas, cosméticos e reagentes para análises clínico-laboratoriais; alimentício, como emulsificante e espumante; têxtil, na lavagem de tecidos finos; entre outros. Uma das principais fontes industriais de saponinas são as cascas de *Quillaja saponaria* Molina, espécie arbórea nativa da América do Sul, encontrada no Chile, Bolívia e Peru (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995; BALANDRIN, 1996).

Apesar de sua ampla utilização, pouco é caracterizado quanto aos genes e enzimas envolvidos na biossíntese destes compostos. MEESAPYODSUK e colaboradores (2007), isolaram e identificaram dois genes envolvidos na biossíntese de saponinas de *Saponaria vaccaria*, cujas saponinas são similares às encontradas em *Q. saponaria*. Os genes estudados pelos autores foram SvBS (codificando β -amirina sintase) e UGT74M1 (codificando uma glicosiltransferase). Os autores relataram ainda que o gene SvBS é predominantemente expresso em folhas e que UGT74M1 é expresso em raízes e folhas, sendo, esse último, envolvido na biossíntese de saponinas monodesmosídicas em *S. vaccaria*.

As saponinas de *Q. saponaria* têm despertado grande interesse devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas. Diversas publicações recentes utilizam estes compostos como adjuvante em vacinas para o tratamento de melanoma, vírus influenza, *Escherichia coli*, vírus sincial respiratório, HIV-1, malária, leishmaniose, entre outros, conforme detalhado no Capítulo I.

Segundo SAN MARTIN e BRIONES (1999) cerca de 180-200 toneladas de extrato de *Q. saponaria*, provenientes de 1000 toneladas de cascas, eram exportados anualmente pelo Chile para os Estados Unidos, Europa e Japão. Para suprir esta demanda eram derrubadas mais de 50000 árvores anualmente, com idade entre 30 e 50 anos e diâmetro entre 20 e 50 cm. Em 2003, a exportação de extrato de *Q. saponaria* do Chile foi de US\$ 1.569.454 e os principais países importadores foram Estados Unidos, Japão, Irlanda, Brasil, Austrália, Holanda, Espanha, Argentina, México, França, Dinamarca e Coréia do Sul. Este mercado tende a aumentar, tendo em vista o grande número de estudos utilizando saponinas de *Q. saponaria* como adjuvantes em vacinas, conforme apresentado no Capítulo I. De fato, entre janeiro e maio de 2004, o mercado de exportação de *Quillaja* no Chile passou de US\$ 533.158 para US\$ 950.208, ou seja, um aumento de 78% (PROCHILE 2005 - Disponível em: www.prochile.cl Acesso 27.02.2007)

Conforme relatado anteriormente, no Brasil é encontrada *Quillaja brasiliensis* (A. St.-Hil. Et Tul.) Mart. (Rosaceae), espécie congênere à chilena (REITZ, 1996). Segundo estudos realizados por KAUFFMANN e colaboradores (2004) há indícios de que a espécie brasileira possui saponinas estruturalmente semelhantes às encontradas em *Q. saponaria*. A presença de saponinas nas folhas de *Q. brasiliensis* estrutural e funcionalmente semelhantes às saponinas encontradas nas cascas da espécie chilena é reforçada pelos estudos de FLECK e colaboradores (2006), conforme apresentado no Capítulo III.

Assim, denota-se a potencial utilização da espécie brasileira na obtenção de saponinas de interesse industrial. No entanto, há necessidade de desenvolver estratégias para uma exploração racional e sustentada dos recursos naturais, de modo a preservar o ambiente natural e produzir matéria-prima com máximo rendimento em saponinas para utilização industrial. Neste contexto, tornam-se essenciais estudos que conduzam ao conhecimento detalhado dos fatores que afetam o rendimento de saponinas de valor terapêutico, bem como a análise fisiológica de acúmulo destes compostos.

Em relação a estudos de propagação e cultivo, foi encontrado para *Q. brasiliensis* somente um trabalho, no qual o autor analisa a viabilidade das sementes em relação à época de coleta das mesmas. Segundo o autor, as melhores sementes

foram aquelas colhidas na fase de adiantado estágio de disseminação (MATTEI, 1995).

No entanto, para *Q. saponaria* há vários estudos de cultivo, seja no solo ou como cultura de células. WRANN E INFANTE (1988) apresentaram a influência da preparação da área (como adubação, modo de plantação das sementes, seleção de sementes), em solo árido para *Q. saponaria*. MUNOZ E FUENTES (1989) demonstraram que, em testes de laboratório, o aquecimento das sementes durante 5 minutos à 100°C aumenta a germinação das mesmas.

PREHN e colaboradores (2003) realizaram estudos de micropropagação de *Q. saponaria* a partir de sementes. O meio de germinação foi composto por vitaminas, macro e micronutrientes, conforme estabelecido por Murashige & Skoog (MS) (1962). Os autores testaram diferentes protocolos de assepsia e estratificação das sementes, bem como a utilização de diferentes concentrações de hidrolisado de caseína, glutamina e sulfato de magnésio, como suplementos nutricionais. Foram realizados, ainda, ensaios de multiplicação das plântulas com a utilização dos hormônios benzilaminopurina (BAP) ou zeatina, ambos na concentração de 1 mg/l. Os explantes obtidos com o ensaio de multiplicação foram empregados em um experimento de enraizamento, no qual foram utilizadas diferentes concentrações de AIB. Os explantes foram mantidos em meio com auxina durante um mês, sendo posteriormente transferidos para meio sem a presença do hormônio. Após o enraizamento, os explantes que possuíam tamanho aproximado a 7 cm foram empregados em um ensaio de aclimatação, utilizando vermiculita como substrato. As plântulas enraizadas transferidas para vermiculita foram mantidas em câmara de cultivo com alta umidade por dois meses, antes de sua transferência para casa de vegetação.

DALSGARD e MAX depositaram uma patente no Canadá em 1994 (2147480) e outra nos Estados Unidos em 1998 (5716848) relativas à cultura celular de *Q. saponaria*, *Q. smegmadermos* e *Q. brasiliensis*.

Linhagens celulares de *Q. saponaria* também foram obtidas por HENRY e FONS (Disponível em: <http://www.ensaia.inpl-nancy.fr/News/IAPTC/conferences.htm>). Acesso: 23.06.2007), a partir de plântulas

provenientes de sementes esterilizadas. Diversos parâmetros de cultura foram testados como meio líquido, ausência e presença de luz e citocininas. A metodologia detalhada desse experimento não foi publicada, os autores relatam apenas que empregaram meio MS e diferentes combinações de auxinas e de citocininas.

SANTELICES e BOBADILLA (1997) estudaram o enraizamento de estacas de *Q. saponaria*. O experimento foi realizado em casa de vegetação equipada com canteiro de enraizamento com controle de temperatura de substrato (permitindo manter o substrato em temperaturas entre 21 °C e 25 °C) e sistema automatizado de rega por aspersão, chamado Microjet[®] (que se caracteriza por pulverizar a gota de água sem produzir névoa). O ambiente foi mantido com umidade elevada durante todo o período de experimento. Os autores avaliaram o efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) sobre o enraizamento das estacas, bem como a influência da posição das estacas na copa da “árvore-mãe”. Os resultados demonstraram que, nas condições empregadas, o enraizamento foi relativamente fácil após quatro meses. A posição das estacas na copa da “árvore-mãe” influenciou significativamente o enraizamento e a taxa de sobrevivência, sendo obtidos melhores resultados com estacas provenientes das porções média e baixa. Entretanto, não foi observado efeito significativo da aplicação de AIB, nas concentrações testadas (0; 0,5; 1 e 2%), sobre a sobrevivência e capacidade de enraizamento.

Tendo em vista as considerações acima relatadas, a proposta geral para este capítulo inclui o estabelecimento de protocolos de propagação de *Q. brasiliensis*, bem como o estabelecimento de sistemas *in vitro* para propagação clonal eficiente da espécie e a análise dos fatores que interferem na produção de saponinas. Assim, temos como objetivos:

- ✓ Determinar protocolos de propagação de *Q. brasiliensis* a partir de sementes assépticas.
- ✓ Avaliar a distribuição órgão-específica e sazonal (ao longo de 2 anos) de saponinas em plantas de *Q. brasiliensis*.
- ✓ Analisar o efeito de fatores de estresses bióticos (como ataque por patógenos e herbivoria, simulados pelo uso de moléculas sinalizadoras e dano mecânico

controlado) e abióticos (por exemplo, pela exposição à luz branca e ultravioleta) na produção de saponinas.

- ✓ Recomendar, com base nos resultados, procedimentos para propagação e cultivo de *Q. brasiliensis*, visando a obtenção de saponinas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas e as sementes de *Q. brasiliensis* foram coletadas em área nativa, local conhecido como Paredão, no município de Riozinho, RS e na propriedade do Prof. Dr. Gilson Moreira, no município de Canguçu, RS (Latitude: 31°5'19.5"; Longitude: 52°49'53.6" – No anexo 2 são apresentadas as coordenadas geográficas de cada árvore, localizadas via satélite por GPS). Exsicatas destes materiais foram depositadas no herbário do Departamento de Botânica da UFRGS (ICN 137550 e 142953, respectivamente).

2.2 PROTOCOLOS DE PROPAGAÇÃO

Tendo em vista a obtenção de protocolos de propagação de *Q. brasiliensis*, foram empregados, como material de partida, sementes e explantes oriundos de culturas meristemáticas.

Os ensaios de germinação com sementes de frutos maduros foram realizados empregando três sistemas diferentes: germinação em caixas Gerbox com papel filtro, germinação em solo/vermiculita, previamente esterilizados, e germinação em meio asséptico. Para a germinação em meio asséptico foram utilizados os sais empregados por Murashige & Skoog (1962) (0,1 x), suplementados ou não com sacarose. Antes da inoculação as sementes foram superficialmente esterilizadas com Dithane[®] (5 g/l, 20 minutos), etanol (70%, 1 minuto) e hipoclorito de sódio 2% com algumas gotas de detergente neutro (10 minutos); todos os tratamentos foram realizados com agitação constante e, ao final da exposição ao hipoclorito, foram realizadas 4 lavagens com água destilada esterilizada.

As plantas obtidas pelos ensaios de germinação foram utilizadas no estabelecimento de culturas de partes aéreas, para avaliação da distribuição órgão-específica das saponinas e variação de acúmulo destes metabólitos ao longo da ontogenia inicial.

Um outro modo de se propagar uma espécie é através do enraizamento de explantes cultivados *in vitro*, o qual foi realizado e será descrito no item 2.4.

2.3 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS DE PARTES AÉREAS

As plantas germinadas em meio asséptico serviram como material de partida para o estabelecimento de cultivos de partes aéreas, sendo utilizado meio MS (1X), sacarose 30 g/l, ágar Merck[®] grau microbiológico extra puro (6 g/l) e o hormônio benzilaminopurina (BAP) na concentração de 0,05 mg/l, a fim de induzir o crescimento das culturas. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$, e este foi posteriormente esterilizado por autoclavagem a 121 °C e 0,15 MPa por 25 minutos.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz com radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de aproximadamente $45 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$, mantida por lâmpadas fluorescentes brancas. Os explantes assim obtidos foram utilizados nos experimentos de enraizamento.

2.4 EXPERIMENTOS DE ENRAIZAMENTO

Nos ensaios de enraizamento empregou-se meio MS (0,3 x), sacarose 30 g/l, tiamina (0,4 mg/l), inositol (100 mg/l), ágar Merck[®] grau microbiológico extra puro (6 g/l), e tratamentos utilizando diferentes concentrações de auxinas, em sistema de exposição por pulso ou contínuo. Nos experimentos que empregaram o sistema de pulso os explantes foram mantidos em meio de indução (com auxina) por quatro dias, seguido de transferência para meio de formação (ou seja, meio sem auxina, suplementado com carvão ativado 1 g/l).

Os meios tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, sendo posteriormente esterilizados por autoclavagem a 121 °C e 0,15 MPa por 25 minutos. Os experimentos foram realizados utilizando-se frascos de 20 ml cobertos com dupla camada de papel alumínio, contendo dois explantes por frasco e 6 ml de meio. Todos os experimentos foram realizados em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, em 16 horas de fotoperíodo, com PAR de aproximadamente $45 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$, mantida por lâmpadas fluorescentes brancas. Os experimentos foram repetidos por, no mínimo,

duas vezes. Com base em resultados preliminares obtidos a partir de estudos piloto foram delineados os experimentos subseqüentes.

A fim de avaliar a influência da estabilidade da auxina sobre o enraizamento dos explantes de *Q. brasiliensis*, foram empregadas as auxinas: ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA), na concentração de 10 mg/l, além de um tratamento controle sem auxina, todos em sistema de exposição contínuo. Foram utilizados 40 explantes por tratamento.

Outro experimento foi delineado empregando-se os seguintes tratamentos, AIB 1 e 10 mg/l e AIA 10 mg/l, em sistema contínuo, e AIB 50 mg/l em sistema de pulso, com seus respectivos controles. Foram empregados 60 explantes por tratamento.

Os explantes enraizados foram transferidos para meio *ex vitro* 50 dias após o início de cada experimento, sendo utilizado como substrato uma mistura de vermiculita:areia (2:1). Algumas plantas foram congeladas para análise da produção de QB-90.

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO E ACÚMULO DA FRAÇÃO QB-90 EM *Q. BRASILIENSIS*

Os explantes enraizados, previamente adaptados a ambiente *ex vitro*, foram utilizados para a avaliação dos efeitos da aplicação de ácido salicílico e ácido jasmônico, bem como de dano mecânico controlado e da exposição à luz ultravioleta B (UVB) e C (UVC), sobre a produção de QB-90. Em todos os tratamentos as plantas foram mantidas em sala de crescimento a temperatura 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas.

Amostragens foram realizadas ao longo do tempo, sendo coletadas quatro ou cinco plantas, de acordo com o experimento, em cada ponto. Essas foram extraídas e analisadas individualmente por CLAE.

2.5.1 Ácido Salicílico

Para a execução deste ensaio foi preparada uma solução de ácido salicílico 5 mM, a qual foi aspergida sobre as plantas (até ponto de escorrimento iminente) três vezes ao dia, nos dias zero, 2, 4 e 6. Nesses mesmos dias foram utilizados 50 ml dessa solução para regar as plantas. Outro grupo de plantas foi regado e aspergido com água bidestilada nos mesmos dias e horários que as tratadas com ácido salicílico.

Cinco plantas de cada grupo foram coletadas nos dias zero, 2, 4 e 6 congeladas individualmente em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até a liofilização.

2.5.2 Ácido Jasmônico

Foram preparadas duas soluções de ácido jasmônico, nas concentrações de 40 e 400 μ M. As 40 plantas utilizadas neste ensaio foram divididas em grupos, compreendendo 4 plantas para o dia zero e 12 plantas para cada tratamento (controle, ácido jasmônico 40 μ M e ácido jasmônico 400 μ M), sendo coletadas 4 plantas de cada tratamento nos dias 2, 4 e 6, as quais foram congeladas individualmente em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até a liofilização.

O esquema de administração das soluções de ácido jasmônico e para a solução controle foi de três aspersões diárias nos dias zero, 2, 4 e 6, sendo ainda realizada a rega com 50 ml das respectivas soluções nos mesmos dias. Tendo em vista a volatilidade do ácido jasmônico, as plantas foram cobertas com plástico transparente e mantidas assim durante uma hora após a aspersão das respectivas soluções (Figura 4.1).

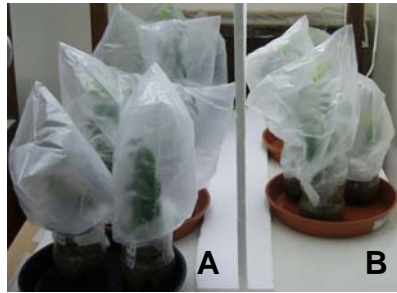


Figura 4.1: Plantas tratadas com soluções de ácido jasmônico (A) e com solução controle (B), mantidas sob plástico transparente durante uma hora após a aspersão das respectivas soluções.

2.5.3 Dano Mecânico

O dano mecânico foi aplicado realizando-se cortes com tesoura, no dia zero, em três quartos da superfície foliar total das plantas. As plantas danificadas foram comparadas com plantas intactas.

O esquema de coleta, armazenagem, liofilização, extração e análise das plantas foi o mesmo empregado nos experimentos acima descritos.

2.5.4 Exposição à luz UVC

No dia zero, as plantas foram colocadas em uma câmara fechada dividida em dois compartimentos, em um dos compartimentos as plantas foram expostas à luz UVC (lâmpada germicida, λ máx. 254 nm, 16hs por dia, 10.5 kJ. cm^{-2}) e no outro, expostas somente à luz branca.

Em virtude da forte agressão sofrida pelas plantas expostas à luz UVC, foi necessário coletá-las nos dias 2, 3 e 4, uma vez que já no dia 2 essas apresentavam algumas folhas secas e no dia 3 algumas já perdiam folhas. Do mesmo modo que nos experimentos anteriores as plantas assim obtidas foram congeladas individualmente em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até serem submetidas à liofilização.

2.5.5 Exposição à luz UVB

Da mesma forma que no experimento anterior, as plantas foram subdivididas em dois grupos, codificadas como grupo controle as plantas expostas somente à luz branca e como grupo tratamento, as plantas expostas à luz UVB (lâmpada UVB 313EL, λ máx. 313 nm, Q-Lab, Cleveland, Ohio, USA, fotoperíodo de 16hs, lâmpada distante cerca de 45 cm das plantas). A amostragem foi realizada nos dias 7 e 14, seguindo-se o congelamento, a liofilização, a extração e a análise individual de cada planta.

2.6 ANÁLISE SAZONAL DE QB-90 EM *Q. BRASILIENSIS*

O conteúdo de saponinas em folhas de plantas nativas foi analisado ao longo das estações, durante dois anos. As plantas, pertencentes à propriedade do Prof. Dr. Gilson Moreira – Departamento de Zoologia-UFRGS localizada no município de Canguçu, RS, foram previamente identificadas e marcadas, sendo as partes aéreas coletadas individualmente. Um total de trinta indivíduos foi analisado.

As partes aéreas foram coletadas de forma padronizada quanto à orientação solar, ou seja, foram coletadas amostras nas diferentes orientações. Folhas e ramos foram separados, congelados e liofilizados. Para a extração, as folhas foram reunidas em grupos de três indivíduos, totalizando dez repetições.

2.7 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ÓRGÃO-ESPECÍFICA E ONTOGENÉTICA DE QB-90 EM *Q. BRASILIENSIS*

Com o objetivo de analisar a distribuição órgão-específica das saponinas de interesse foram realizados dois experimentos. Primeiramente, cinco plantas propagadas no laboratório tiveram suas raízes, caules e folhas separados, congelados, liofilizados e extraídos individualmente. Desse modo, foram obtidos cinco extratos de cada uma das partes vegetais, que foram liofilizados e analisados por CLAE.

Com a finalidade de verificar as concentrações de QB-90 em diferentes órgãos de indivíduos adultos, foram coletadas, em agosto de 2004, cascas, folhas e ramos de nove indivíduos, no município de Canguçu. As partes vegetais foram

agrupadas em “pools” de três indivíduos, de maneira a obter-se grupos idênticos para cada uma das três partes vegetais. Estes “pools” foram liofilizados, extraídos e analisados por CLAE quanto ao conteúdo de QB-90.

Visando determinar o conteúdo de saponinas bioativas ao longo da ontogênese foram analisadas por CLAE sementes germinadas (com radícula visível), sementes germinadas com emergência de cotilédones, plântulas com duas e com quatro folhas. Frutos maduros foram coletados, suas sementes foram separadas e superficialmente esterilizadas conforme descrito no item 2.2 deste capítulo. Tendo em vista a necessidade da utilização do antifúngico Dithane na assepsia de sementes de *Q. brasiliensis*, não habitual na rotina do laboratório, foram analisadas sementes superficialmente esterilizadas com e sem utilização do antifúngico, com a finalidade de verificar se este poderia ou não interferir no conteúdo de QB-90. Após a coleta, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até a liofilização.

2.8 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DAS SAPONINAS

O material vegetal foi extraído conforme apresentado no Capítulo II (item 3.2) e analisado por CLAE, empregando-se método analítico desenvolvido e validado, descrito anteriormente.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguida por teste de Duncan (quando pertinente). Nas situações em que não houve homogeneidade de variâncias, empregou-se análise de variância por ANOVA de Welch seguida por teste de Dunnett-C. Os programas estatísticos utilizados foram SPSS e SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PROTOCOLOS DE PROPAGAÇÃO

Com o intuito de desenvolver protocolos de propagação de *Q. brasiliensis*, diferentes experimentos foram realizados por meio de germinação de sementes e enraizamento de explantes provenientes de culturas de meristema apical, sendo este último descrito no item 3.3.

Os experimentos de propagação por meio de germinação de sementes demonstraram que há um diferencial considerável na taxa de germinação conforme o substrato. Foi verificada uma taxa de germinação de 95% para as sementes germinadas em caixas Gerbox, 97% para as sementes germinadas em meio asséptico sem sacarose, 93% para meios com sacarose e menor que 10% para as sementes germinadas diretamente na mistura solo/vermiculita. Desse modo, verificou-se que germinações *in vitro* e em caixas Gerbox (Figura 4.2) são mais adequadas para a espécie em estudo. Pode ser observado ainda que a presença de sacarose no meio aumenta os índices de contaminação e que a presença de luz parece diminuir este percentual nos meios sem sacarose, mas não interferir nos meios com sacarose (Figura 4.3).



Figura 4.2: Sementes germinadas sob condições assépticas.

A – Plântulas oriundas de sementes germinadas em caixas Gerbox, transferidas para solo/vermiculita, em fase de adaptação ao ambiente *ex vitro*.

B – Plântulas obtidas por germinação em meio asséptico (em frascos com aproximadamente 15 cm de altura), **(a)** no escuro em meio com sacarose, **(b)** no escuro em meio sem sacarose, **(c)** na luz em meio com sacarose e **(d)** na luz em meio sem sacarose.

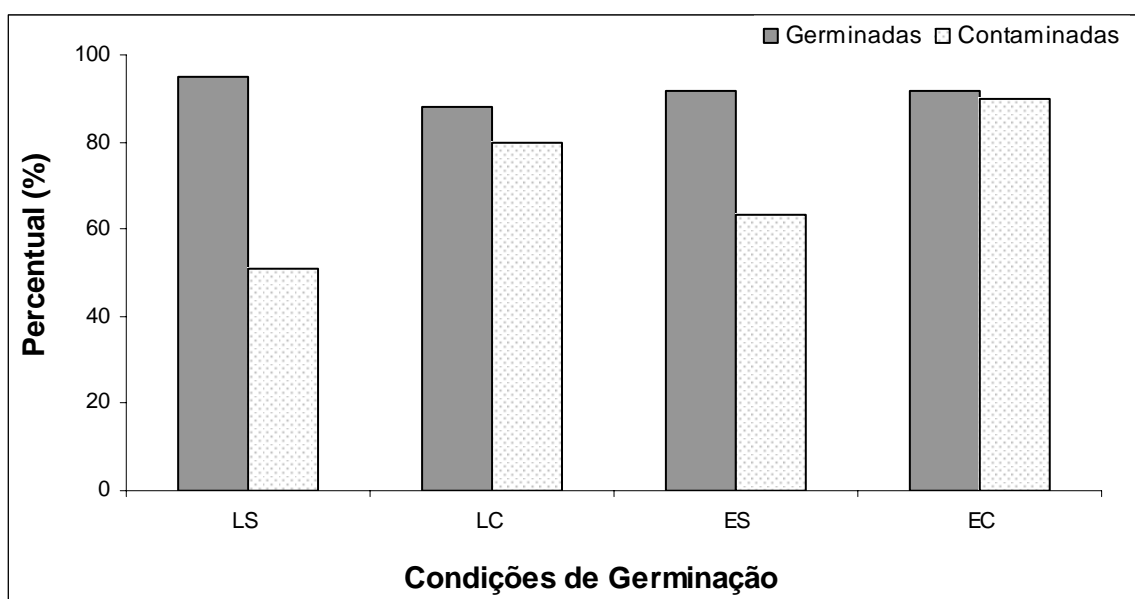


Figura 4.3: Percentuais de germinação e contaminação de sementes de *Q. brasiliensis* germinadas *in vitro* na luz em meio sem sacarose (LS), na luz em meio com sacarose (LC), no escuro em meio sem sacarose (ES) e no escuro em meio com sacarose (EC), quatro dias após a inoculação nos respectivos meios de germinação.

3.2 ESTABELECIMENTO DE CULTIVOS DE PARTES AÉREAS

Foram estabelecidas culturas de partes aéreas, pela utilização de BAP na concentração de 0,05 mg/l (Figura 4.4). As culturas apresentaram um crescimento adequado, combinando alongamento e brotações, sendo repicadas a cada dois meses.



Figura 4.4: Culturas meristemáticas de *Q. brasiliensis* com 45 dias.

O emprego de BAP em maiores concentrações resultou em grande número de brotações sem alongamento dos explantes, não sendo adequado para a obtenção de material de partida a ser utilizado em ensaios de enraizamento. PREHN e colaboradores (2003) relataram a utilização de BAP e Zeatina, ambos na concentração de 1 mg/l, em ensaios de multiplicação de explantes de *Q. saponaria*. Os autores consideraram o emprego de BAP mais adequado para esta etapa.

3.3 EXPERIMENTOS DE ENRAIZAMENTO

Estudos de enraizamento de *Q. brasiliensis* foram conduzidos a partir dos cultivos meristemáticos. A espécie em estudo mostrou-se de fácil enraizamento, tendo em vista o elevado percentual de plantas enraizadas (em média 70%) nos tratamentos controle (sem auxina).

A influência da estabilidade da auxina sobre o enraizamento dos explantes de *Q. brasiliensis* foi avaliada considerando-se os resultados obtidos em experimento piloto. Assim, foram empregados os hormônios AIA, AIB e ANA, na concentração de 10 mg/l, e um tratamento controle (sem auxina). O sistema utilizado foi de exposição contínua, empregando-se 40 explantes por tratamento. Foi verificado que na presença de AIB e ANA houve a formação de calos na extremidade do explante, e que as raízes partem destes calos, sendo mais curtas que as formadas nos tratamentos com AIA e controle (Figura 4.5). Isto era esperado, uma vez que a presença de auxina no meio inibe o alongamento da raiz, entretanto esse efeito inibitório não é observado no tratamento com AIA, provavelmente por esta ser uma auxina mais instável, sendo metabolizada pelo vegetal (DE KLERK et al., 1999).



Figura 4.5: Explantes de *Q. brasiliensis* enraizados nos tratamentos (a) controle, (b) AIA 10 mg/l, (c) AIB 10 mg/l e ANA 10mg/l (d), 50 dias após a inoculação em meio de enraizamento.

Foi possível verificar ainda que o número médio de raízes por explante enraizado não variou significativamente entre os tratamentos com AIA, AIB e ANA, mas foi superior para AIB e AIA quando comparados com o controle (Figura 4.6 A). No entanto, quanto ao comprimento das raízes, os tratamentos com AIA e controle apresentaram comprimento médio de raízes significativamente maior que os obtidos com o emprego de AIB e ANA (Figura 4.6 B). Desse modo, verifica-se que, para a espécie em estudo, a estabilidade da auxina, nas concentrações testadas, parece

não ter um efeito pronunciado no número de raízes por explante, mas interfere significativamente no alongamento destas raízes.

O efeito das diferentes auxinas sobre o conteúdo de QB-90 foi avaliado. Explantes enraizados foram congelados em nitrogênio líquido (50 dias após o início do experimento), extraídos e analisados por CLAE. O emprego de AIA, AIB ou ANA não demonstrou afetar significativamente o conteúdo de QB-90, embora uma tendência a menores teores tenha sido observada em plantas oriundas de meios com AIB e ANA (dados não mostrados). Tal tendência pode ser devida à formação de calos na base dos explantes.

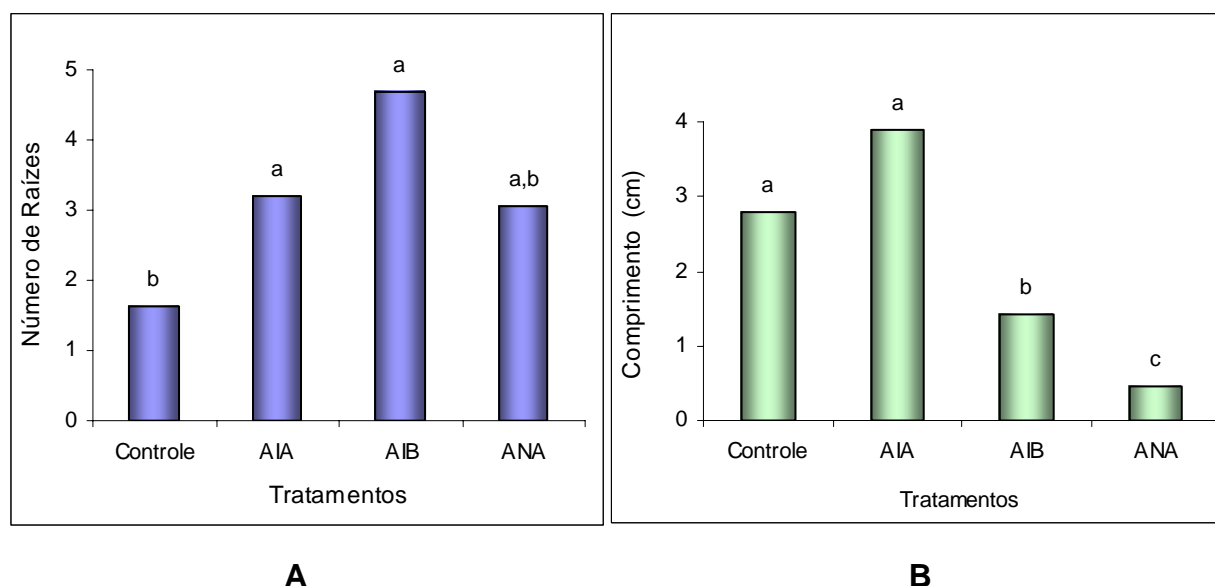


Figura 4.6: Número (A) e comprimento (B) médio de raízes por explante de *Q. brasiliensis*, expostos continuamente a AIA, AIB, ANA ou controle sem auxina, por 50 dias. Letras diferentes demonstram diferenças significativas entre os tratamentos, conforme teste de Dunnett-C, realizado após análise de variância por ANOVA de Welch ($p < 0,05$).

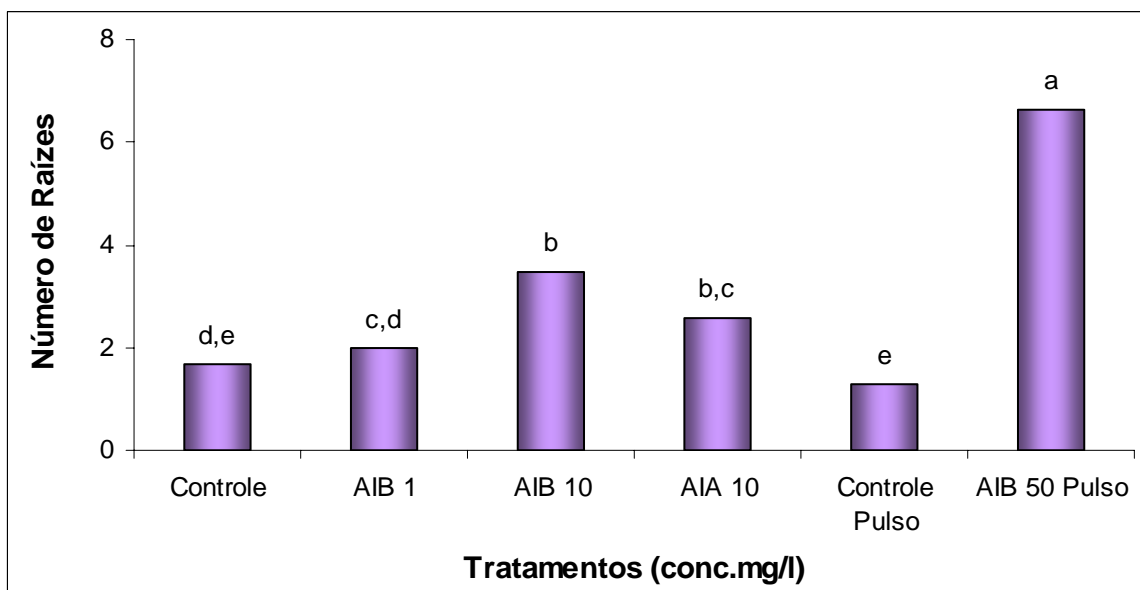
A fim de avaliar o efeito de diferentes concentrações de AIB (auxina com estabilidade intermediária) sobre o enraizamento de explantes de *Q. brasiliensis*, os tratamentos, AIB 1 e 10 mg/l, em sistema contínuo, e AIB 50 mg/l em sistema de pulso, com seus respectivos controles, foram empregados. Tais concentrações e sistemas de exposição foram definidos a partir dos resultados preliminares obtidos em experimento piloto. Tendo em vista o resultado satisfatório obtido com a utilização de AIA (10 mg/l), este tratamento foi mantido. Os resultados demonstraram que AIB 50 mg/l, em pulso, induziu um número médio de raízes por explante

enraizado significativamente maior que os demais tratamentos (Figura 4.7 A); no entanto, foi observada a presença de calos entre a extremidade inferior do explante e as raízes formadas, em todos os explantes, o que é indesejado, pois torna o sistema radicular formado menos robusto (DE KLERK et al., 1999). Novamente não foi verificada diferença significativa no número médio de raízes por explante entre os tratamentos com AIA e AIB na mesma concentração (10 mg/l). Quanto ao comprimento médio de raízes obteve-se um comprimento médio significativamente maior para o tratamento com AIA (10 mg/l) e para o controle de pulso, que para os demais tratamentos (Figura 4.7 B).

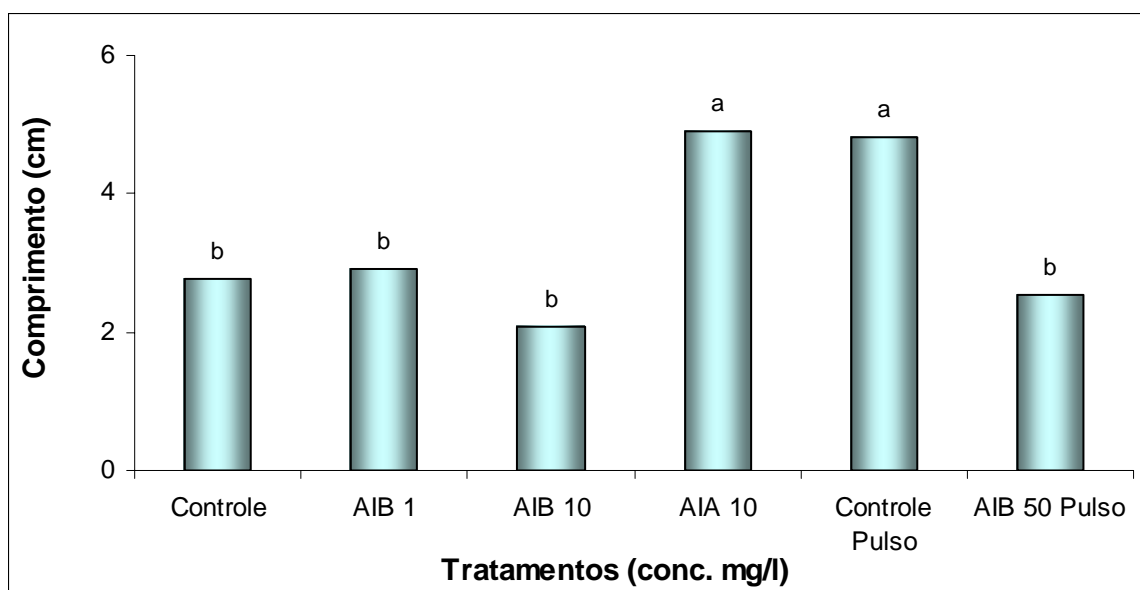
Os percentuais de plantas enraizadas em sistema de exposição contínua foram de aproximadamente 95% no tratamento com AIA, 50% com AIB 1 mg/l e 70% com AIB 10 mg/l. Para o tratamento com AIB 50 mg/l, em pulso, este percentual foi de aproximadamente 80%. É relatada uma taxa de enraizamento de aproximadamente 59% com a utilização de AIB (0,1 mg/l) em experimentos de micropropagação de *Q. saponaria* (PREHN et al., 2003).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DE FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO E O ACÚMULO DA FRAÇÃO QB-90 EM *Q. BRASILIENSIS*

A fim de identificar possíveis fatores que influenciem a produção e o acúmulo de saponinas bioativas em *Q. brasiliensis*, plantas cultivadas no laboratório sob condições controladas foram tratadas com ácido salicílico, ácido jasmônico, expostas a dano mecânico controlado e à luz ultravioleta B e C. Foram realizadas amostragens ao longo do tempo, sendo as plantas posteriormente congeladas, liofilizadas e extraídas individualmente conforme descrito no item 3.2 do Capítulo II. Os extratos obtidos foram liofilizados e analisados por CLAE, empregando o método desenvolvido e validado, descrito no referido capítulo. A concentração de QB-90 foi expressa em g/100g de planta seca (ou seja, % de peso seco).



A



B

Figura 4.7: Número (A) e comprimento (B) médio de raízes por explante de *Q. brasiliensis*, expostos aos tratamentos, AIB 1 mg/l, AIB 10 mg/l e AIA 10 mg/l, em sistema contínuo, e AIB 50 mg/l em sistema de pulso, com seus respectivos controles. Letras diferentes demonstram diferenças significativas entre os tratamentos, conforme teste de Duncan ($p < 0,05$).

3.4.1 Ácido Salicílico

As plantas foram tratadas com solução de ácido salicílico (5 mM) ou solução controle, nos dias zero, 2, 4 e 6, sendo amostradas nesses mesmos dias. A concentração da solução de ácido salicílico foi selecionada com base em dados da literatura, e o esquema administração das soluções e de amostragem das plantas, em experiências prévias do grupo de pesquisa. O tratamento foi bem tolerado pelos indivíduos testados. Não foi possível verificar qualquer influência deste elicitor sobre a produção de QB-90 durante o período de experimento. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.8.

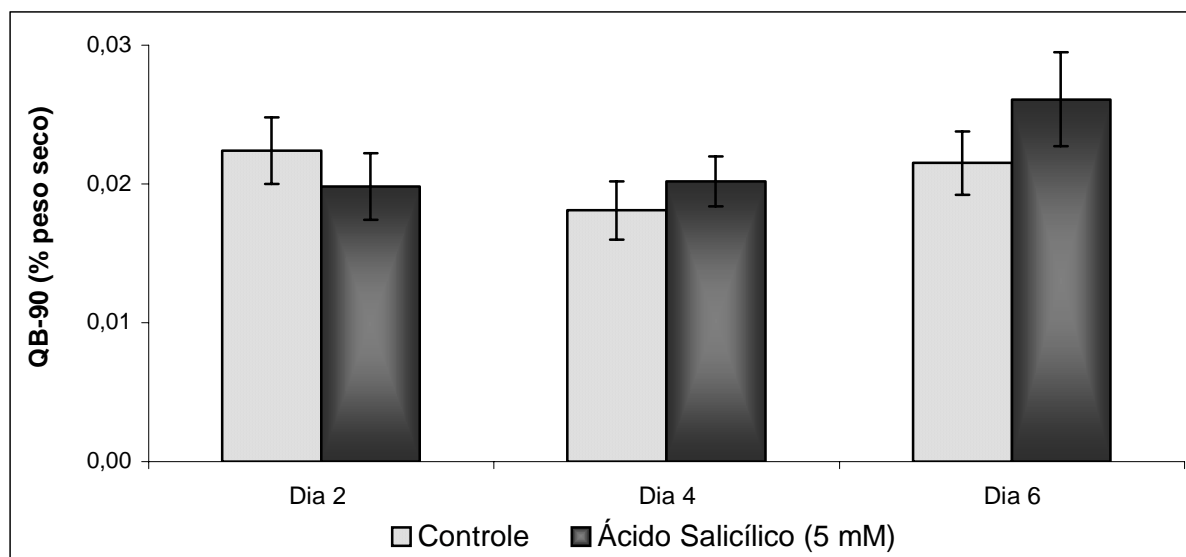


Figura 4.8: Efeito da aplicação exógena de ácido salicílico sobre o conteúdo de QB-90 (% peso seco), analisado por CLAE. O teor de QB-90 em plantas tratadas com solução controle é representado pelas barras claras e em plantas tratadas com solução de ácido salicílico por barras escuras, nos diferentes dias de coleta (dias 2, 4 e 6). Não foi verificada diferença significativa por ANOVA ($p < 0,05$) entre tratamento e controle em cada dia de amostragem.

O ácido salicílico é uma molécula sinalizadora envolvida em mecanismos de defesa a ataque por patógenos e associada ao estabelecimento de resistência sistêmica adquirida (MÉTRAUX, 2002). Sua influência na produção de metabólitos secundários tem sido avaliada. Segundo GREGIANINI e colaboradores (2004), a aplicação exógena de ácido salicílico não afetou o teor de braquicerina (alcalóide indol-monoterpênico) em *Psychotria brachyceras*, nas condições testadas. No estudo realizado por ALI e colaboradores (2006) foi verificado que este elicitor influenciou o acúmulo de ginsenosídeos em culturas em suspensão de raízes de *Panax ginseng*, no entanto foi observado um decréscimo significativo na biomassa

de raízes tratadas com ácido salicílico quando comparadas ao controle. Apesar de pertencerem à classe das saponinas triterpênicas, os ginsenosídeos são estruturalmente diferentes das saponinas de *Q. brasiliensis*, visto que essas são saponinas triterpênicas pentacíclicas, enquanto que os ginsenosídeos são tetracíclicos, derivando de diferentes precursores biossintéticos, o que pode estar relacionado aos efeitos contraditórios observados com a aplicação exógena de ácido salicílico.

3.4.2 Ácido Jasmônico

Para a realização deste experimento, as plantas foram subdivididas em três grupos: o primeiro foi tratado com solução controle, o segundo, com solução de ácido jasmônico 40 μM e o terceiro, com solução de ácido jasmônico 400 μM . As respectivas soluções foram administradas aos grupos nos dias zero, 2, 4 e 6, dias em que foram realizadas as amostragens. Tanto as concentrações de ácido jasmônico como os esquemas de administração das soluções e de amostragem foram selecionados com base em resultados preliminares e em experimentos realizados com outras plantas arbóreas. Conforme pode ser observado na Figura 4.9, os tratamentos foram bem tolerados pelas plantas em estudo durante todo o período de experimento.

Foi verificado, no dia 2, aumento significativo no conteúdo de QB-90 nas plantas tratadas com ácido jasmônico 400 μM (Figura 4.10). Neste mesmo ponto de amostragem, foram obtidas quantidades equivalentes de QB-90 para as plantas tratadas com solução de ácido jasmônico 40 μM e com solução controle.

Na Figura 4.10 observa-se para o dia 4 uma tendência de aumento da concentração de QB-90 nas plantas tratadas com as soluções de ácido jasmônico em relação ao controle. É possível, ainda, perceber que a concentração de 400 μM tende a induzir maior acúmulo que a concentração de 40 μM . No entanto, não foi verificada diferença estatisticamente significativa.

No último dia de experimento foi observado um aumento no teor de QB-90 obtido com o tratamento de ácido jasmônico 40 μM , estatisticamente superior aos demais tratamentos (Figura 4.10). Assim, foi verificado que a aplicação de ácido

jasmônico exógeno induziu a produção de QB-90 em ambas concentrações, sendo observada uma resposta mais rápida para a solução de concentração mais elevada.

Tem sido relatado o aumento de saponinas triterpênicas por ácido jasmônico ou seu metil éster (metil jasmonato) em culturas de *Centella asiática*, *Galphimia glauca*, *Panax ginseng* e *Medicago truncatula*, o que pode estar associado aos relatos de envolvimento de saponinas em mecanismos de defesa vegetal, uma vez que estas moléculas sinalizadoras desempenham um papel importante no processo de transdução do sinal que regula genes de defesa vegetal (OUSBOURN, 1996; PAPADOPOULOU et al.; 1999; YU et al., 2002; BROECKLING et al., 2005; ALI et al., 2006; MANGAS et al., 2006).

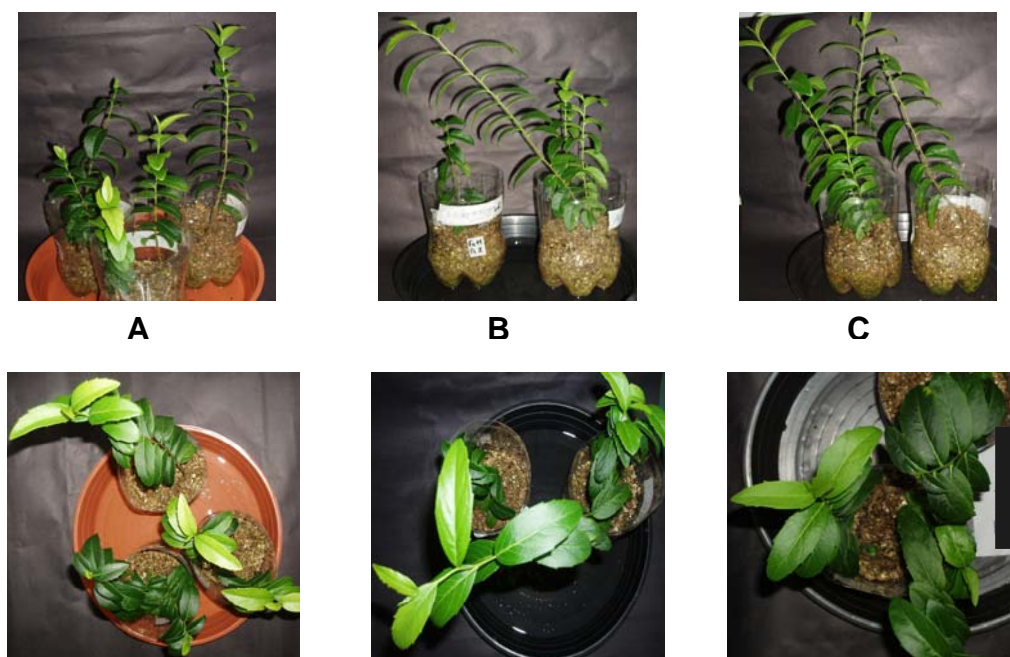


Figura 4.9: Plantas tratadas com solução controle (A), solução de ácido jasmônico 40 μ M (B) e 400 μ M (C) no último dia de experimento (dia 6).

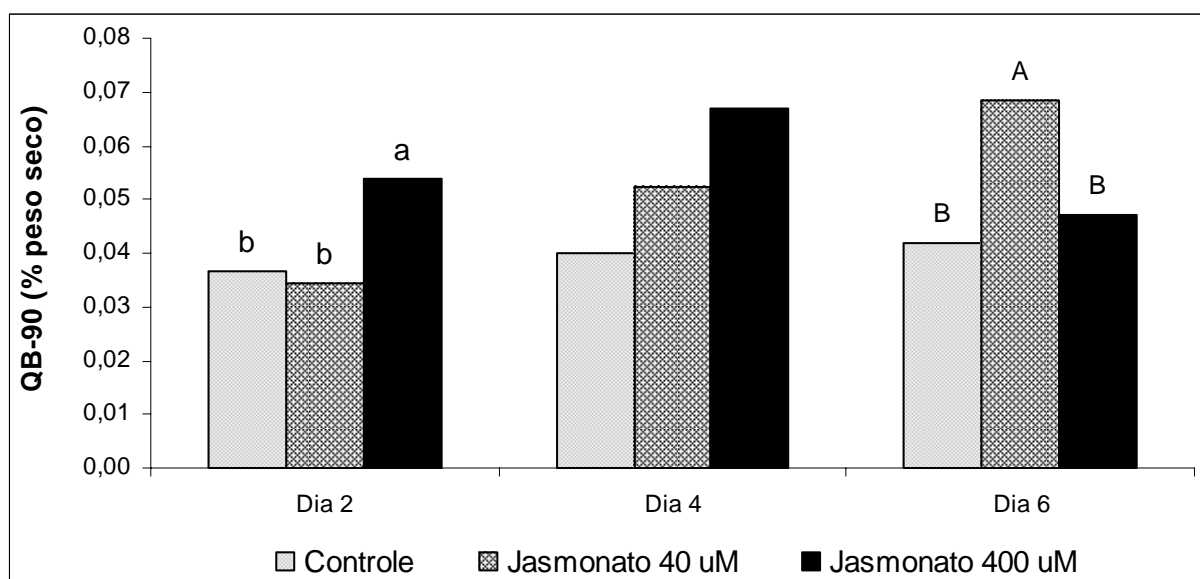


Figura 4.10: Efeito da aplicação de ácido jasmônico exógeno sobre a produção e acúmulo de QB-90 em plantas de *Q. brasiliensis*. As amostras foram coletadas nos dias 2, 4 e 6 após o início do experimento, sendo congeladas individualmente e submetidas à extração. Os extratos obtidos foram analisados por CLAE. As barras claras representam o conteúdo de QB-90 em plantas tratadas com solução controle, as barras quadriculadas o conteúdo em plantas tratadas com solução de ácido jasmônico 40 μM e as barras pretas com solução de ácido jasmônico 400 μM. Valores com letras diferentes nos dias 2 e 6 são significativamente diferentes de acordo com ANOVA e teste de Duncan ($p \leq 0,05$). A ausência de letras para os resultados do dia 4 indica a inexistência de diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Duncan ($p < 0,05$).

3.4.3 Dano Mecânico

O dano mecânico foi aplicado no dia zero em três quartos da superfície foliar, sendo, então, estas plantas mantidas nas mesmas condições que as plantas intactas. A amostragem foi realizada nos dias zero, 2, 4 e 6.

Os resultados apresentados na Figura 4.11 mostram que neste experimento há uma tendência no aumento da concentração de QB-90 nas plantas expostas a dano mecânico nos dias 4 e 6; no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Em outro experimento, foi verificado, no segundo ponto de amostragem, acúmulo de QB-90 em plantas sob dano mecânico significativamente superior ao obtido para as plantas intactas (dados não mostrados).

Estes resultados corroboram os obtidos no experimento que empregou ácido jasmônico como fator de estresse, uma vez que esta molécula sinalizadora está envolvida na transdução do sinal de mecanismos de defesa contra herbivoria (KESSLER e BALDWIN, 2002), aqui simulada por dano foliar.

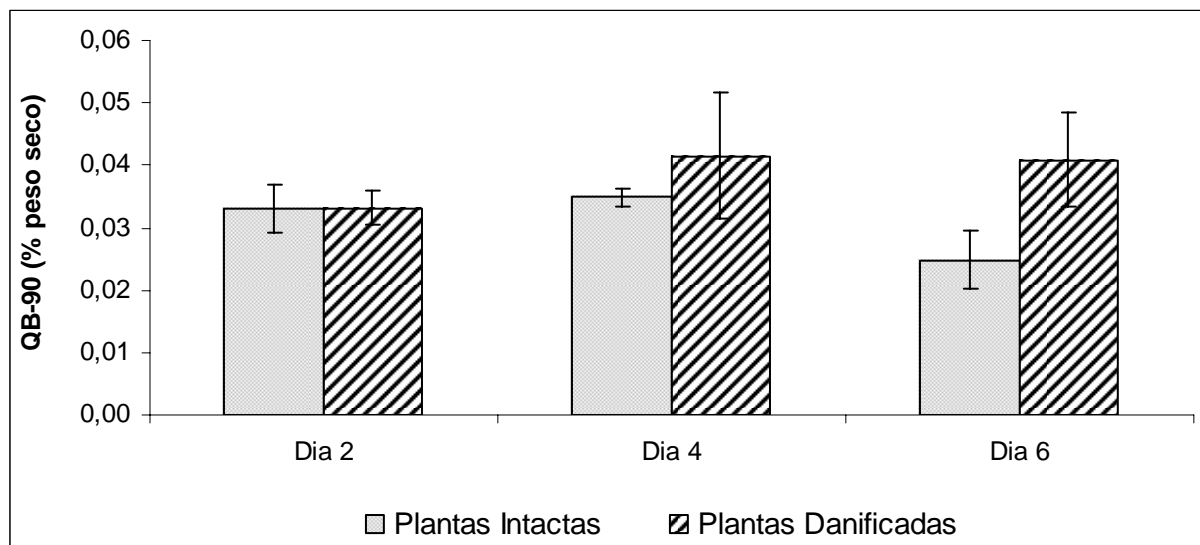


Figura 4.11: Efeito da aplicação de dano mecânico sobre a concentração de QB-90 (% peso seco) em *Q. brasiliensis*, analisada por CLAE. As barras claras representam o conteúdo de QB-90 em plantas intactas e as barras tracejadas o conteúdo em plantas danificadas. No topo das barras, estão mostrados os erros padrão das médias. As plantas foram amostradas nos dias 2, 4 e 6 após a aplicação do tratamento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos de acordo com ANOVA ($p < 0,05$).

3.4.4 Exposição à luz UVC

As plantas testadas foram expostas à luz UVC no dia zero, sendo mantidas assim durante todo o período de experimento. Em virtude do forte efeito negativo desta radiação, os pontos de amostragem para este experimento foram alterados, sendo realizados nos dias zero, 2, 3 e 4. No segundo dia de amostragem, as plantas apresentaram algumas folhas secas, no dia 3 houve perda de algumas folhas e no dia 4 elas estavam ressecadas em boa parte das folhas.

A concentração de QB-90 foi comparada, entre os grupos controle e tratamento, em cada ponto de amostragem, sendo observado maior acúmulo desta nas plantas expostas à luz UVC em todos os pontos (Figura 4.12). Verificou-se ainda um aumento na produção de QB-90 com o decorrer do experimento, sendo obtida uma concentração significativamente superior no dia 4 em relação aos dias 2 e 3.

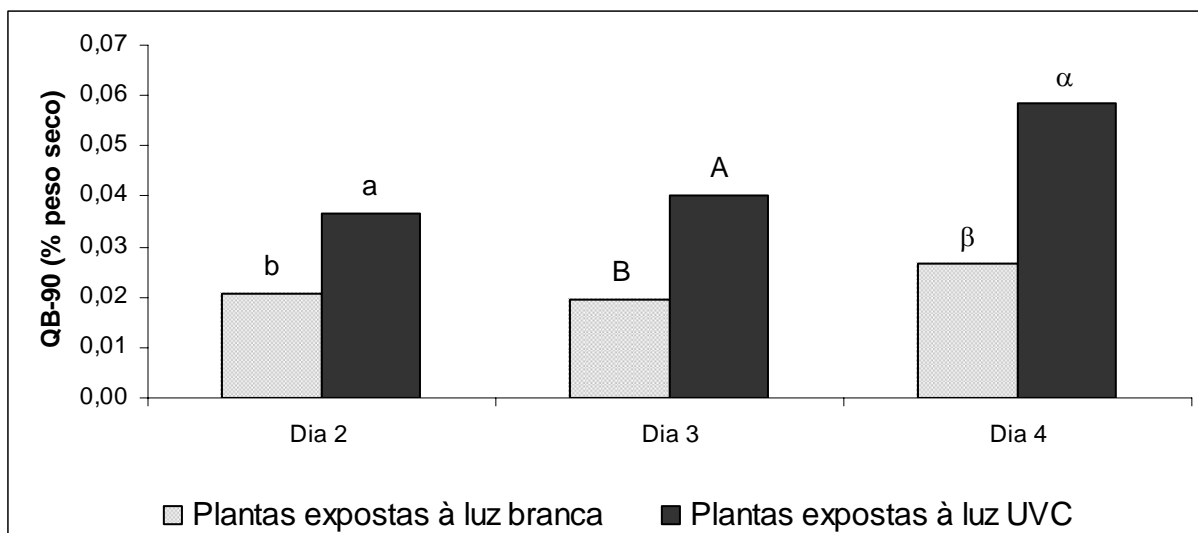


Figura 4.12: Efeito da exposição à luz UVC sobre o conteúdo de QB-90 (% peso seco), analisado por CLAE. As barras claras representam a concentração de QB-90 em plantas expostas à luz branca e as barras escuras a concentração em plantas expostas à luz UVC. As plantas foram amostradas nos dias 2, 3 e 4 após o início do experimento. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA ($p < 0,05$) dentro de cada dia, sendo valores diferentes representados por letras diferentes em cada dia.

3.4.5 Exposição à luz UVB

As plantas foram expostas à luz UVB no dia zero, sendo mantidas nessas condições durante 14 dias. Conforme pode ser observado na Figura 4.13, de modo geral, o tratamento foi bem tolerado pelas plantas durante todo o período de experimento.

Há uma tendência de aumento na produção e acúmulo de QB-90 nas plantas expostas à luz UVB (Figura 4.14). Entretanto, esta não se mostrou estatisticamente significativa, não sendo observada diferença na concentração da fração de interesse nem entre os controles, nem entre os tratamentos, no decorrer do experimento.



Figura 4.13: Plantas expostas à luz branca (A) e à luz UVB (B), no último dia de experimento (dia 14).

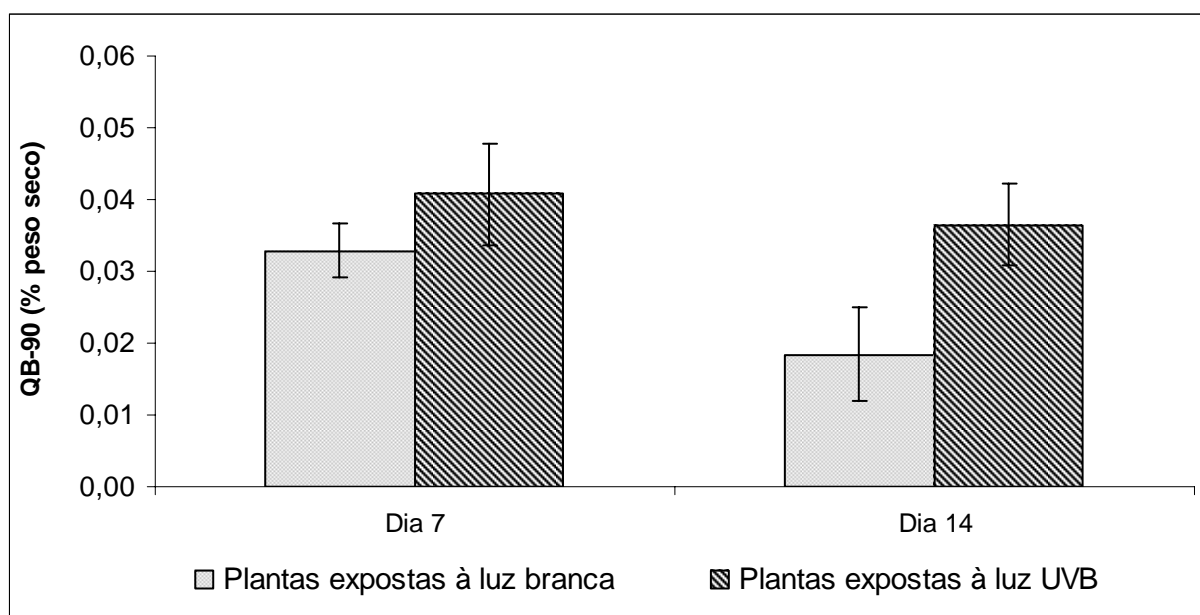


Figura 4.14: Efeito da exposição à luz UVB sobre o conteúdo de QB-90 (% peso seco), analisado por CLAE. As barras claras representam a concentração de QB-90 em plantas expostas à luz branca e as barras escuras a concentração em plantas expostas à luz UVB. No topo das barras, estão mostrados os erros padrão das médias. As plantas foram amostradas nos dias 7 e 14 após o início do experimento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos nos dias analisados de acordo com ANOVA ($p < 0,05$).

A maior indução de resposta de produção de saponinas por UVC pode estar relacionada à maior energia deste tipo de radiação comparada à UVB. Porém, a tendência de resposta à UVB é importante, uma vez que este tipo de radiação UV é a ecologicamente relevante, por atingir a superfície terrestre. Os resultados de indução de saponinas por luz UVC e tendência de indução por UVB sugerem um papel protetor de saponinas contra este tipo de radiação. Embora os metabólitos mais frequentemente induzidos na resposta de defesa à UV sejam flavonóides, antocianinas e ceras cuticulares, o envolvimento de outras classes de compostos, como alcalóides, já foi relatado (JANSEN et al., 1998). Este papel protetor de metabólitos contra irradiância nociva pode ser exercido tanto pela absorção de luz na faixa do espectro UV, como também pela capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio geradas por UV nas células (JANSEN et al., 1998). Respostas protetoras desta dupla natureza já foram relatadas para alcalóides (GREGIANINI et al., 2003). A ocorrência de indução de metabólitos responsivos a dano mecânico também por UV não é surpreendente, uma vez que ambos fatores são capazes de gerar estresse oxidativo nas células, inclusive compartilhando partes das vias de sinalização que resultam no acúmulo de metabólitos (CONCONI et al., 1996).

3.5 ANÁLISE SAZONAL DE QB-90 EM *Q. BRASILIENSIS*.

Para a análise sazonal de saponinas na espécie alvo, trinta plantas foram previamente identificadas e marcadas. Suas partes aéreas foram coletadas a cada estação, ao longo de dois anos. Posteriormente a cada coleta procedeu-se a seleção de folhas saudáveis, o congelamento, a liofilização e a extração das folhas, sendo o extrato obtido liofilizado e analisado por CLAE.

O primeiro ano de coleta iniciou no inverno de 2004 e terminou com a coleta do outono de 2005, sendo verificada maior concentração de QB-90 nesta última estação (Figura 4.15 A). Por conseguinte, o segundo ano de coleta teve seu início no inverno de 2005 e seu término no outono de 2006, sendo verificada maior concentração de QB-90 no inverno de 2005 (Figura 4.15 B). Os resultados sugerem que o fator determinante da maior produção de QB-90 foi a redução de insolação, geralmente associada a períodos de baixa pluviosidade (Tabela 4.1). Tomando-se por base os dois meses anteriores à data de cada coleta, verifica-se que os períodos de maior rendimento de QB-90, inverno e outono de 2005, apresentaram estas características. Além disso, as outras estações de rendimento aparente maior em relação às suas correspondentes em anos seguintes (primavera de 2004 e verão de 2005) também apresentaram menores índices de insolação e pluviosidade (Tabela 4.1).

Estes resultados sugerem a necessidade de estudos adicionais com intensidade e qualidade de luz, bem como estresse hídrico em relação à produção de saponinas. De fato, há relatos de aumento nos teores de saponinas triterpênicas em *Panax quinquefolius* com irradiância contendo vermelho-extremo, típica de ambientes sombreados (FOURNIER et al., 2003). Por outro lado, os estresses osmótico e hídrico são caracteristicamente associados a estresse oxidativo. Em culturas de células de *Panax notoginseng*, estresse osmótico resultou em maior produção de saponinas (ZHANG et al., 1995).

Tabela 4.1: Relação entre as condições climáticas (insolação, pluviosidade e temperatura média) no período de coleta e a produção de QB-90 em folhas de *Q. brasiliensis*, coletadas sazonalmente durante dois anos.

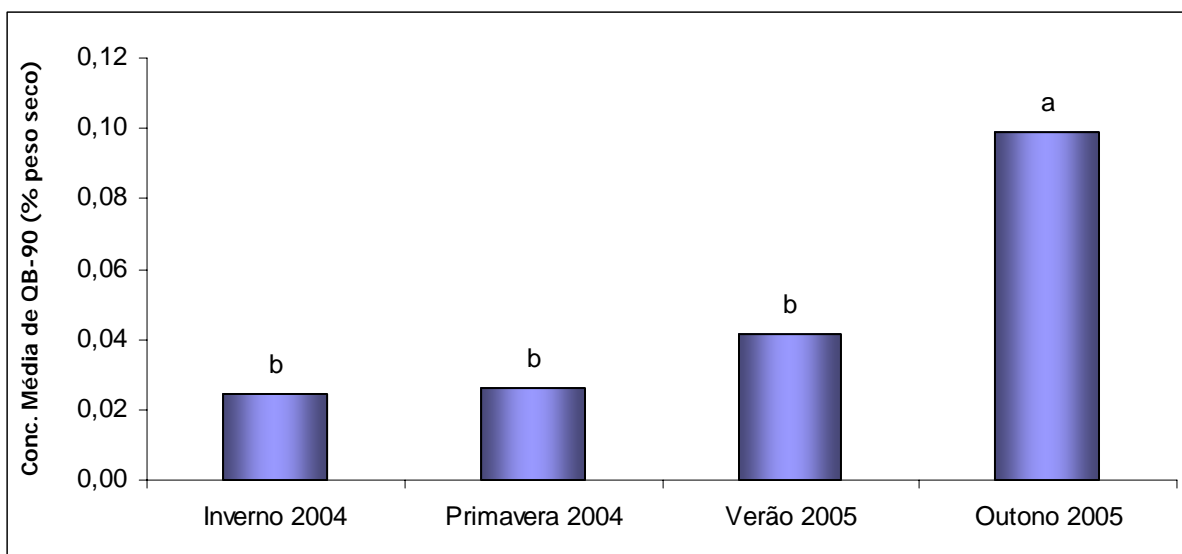
Período	Meses	Insolação (média mensal)	Pluviosidade (mm) (média mensal)	Temperatura Média (°C)	Teores Relativos de QB-90 (* = maior teor)
Inverno 2004	junho e julho	125,0	152,5	12,9	*
Inverno 2005	junho e julho	100,0	73,9	14,3	*****
Primavera 2004	setembro e outubro	149,3	162,4	16,3	**
Primavera 2005	setembro e outubro	164,6	217,0	12,8 - outubro indisponível	*
Verão 2005	novembro e dezembro	144,9	43,6	19,8	***
Verão 2006	dezembro e janeiro	253,4	80,4	22,0	*
Outono 2005	março e abril	146,6	138,4	19,6	****
Outono 2006	março e abril	205,1	65,7	20,0	*

3.6 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ÓRGÃO-ESPECÍFICA E ONTOGENÉTICA DE QB-90 EM *Q. BRASILIENSIS*

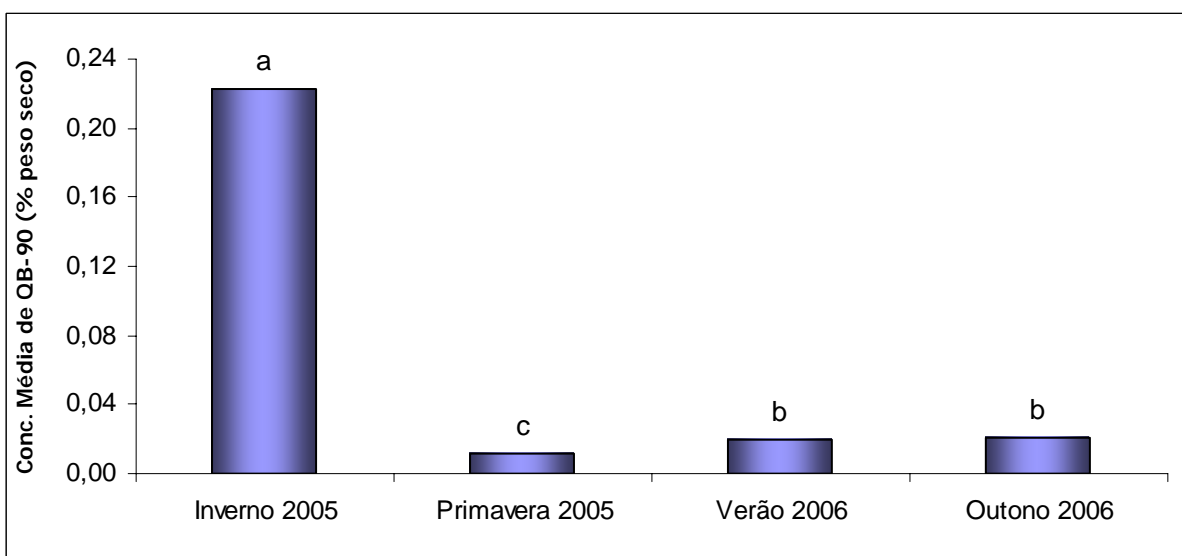
Raízes, caules e folhas de plantas propagadas no laboratório (n = 5) foram extraídas e analisadas individualmente por CLAE quanto ao conteúdo dos metabólitos de interesse. Neste experimento, as folhas apresentaram uma concentração significativamente maior de QB-90 que raízes e caules (Figura 4.16).

O rendimento do extrato de folhas é superior aos demais o que contribui para maior concentração de QB-90 neste órgão, quando considerado o percentual em relação ao peso seco.

A concentração das saponinas de interesse também foi comparada em cascas, folhas e ramos, coletados de nove indivíduos adultos, em agosto de 2004 no município de Canguçu. Cada parte vegetal foi agrupada em pools de três indivíduos. Conforme observado na Figura 4.17, não foi verificada diferença significativa no conteúdo de QB-90 nas condições testadas.



A



B

Figura 4.15: Análise sazonal da concentração média de QB-90 em folhas de *Q. brasiliensis*, coletadas no município de Canguçu, RS, (**A**) entre o inverno de 2004 e o outono de 2005 (primeiro ano de coleta) e (**B**) entre o inverno de 2005 e o outono de 2006 (segundo ano de coleta). Valores com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste de Duncan ($p < 0,05$).

A fim de verificar o conteúdo de saponinas de interesse ao longo do desenvolvimento ontogenético de *Q. brasiliensis*, foi realizado o doseamento do conteúdo de QB-90 em sementes germinadas com radícula visível, plântulas com cotilédones e em plântulas com duas e com quatro folhas. Tendo em vista a necessidade do emprego de um fungicida no processo de assepsia das sementes devido ao elevado índice de contaminação fúngica das mesmas, foi avaliada a influência do emprego de Dithane (antifúngico utilizado em nossos experimentos) no conteúdo de QB-90 das sementes germinadas. Neste estudo, observou-se uma maior concentração dos metabólitos de interesse no estágio de quatro folhas, o qual diferenciou-se estatisticamente dos demais, que por sua vez não se diferenciaram entre si (Figura 4.18).

Os resultados sugerem que folhas de *Q. brasiliensis* constituem uma boa fonte de saponinas da fração QB-90, podendo ser usadas tanto folhas de plantas jovens como adultas. Em geral, folhas de plantas jovens tendem a ser mais ricas em QB-90 que folhas de indivíduos adultos (Fig. 4.16 e Fig. 4.17), porém, dependendo da estação e condições de campo, o conjunto de folhas de diferentes idades de plantas adultas pode conter teores superiores destas saponinas (Fig. 4.15).

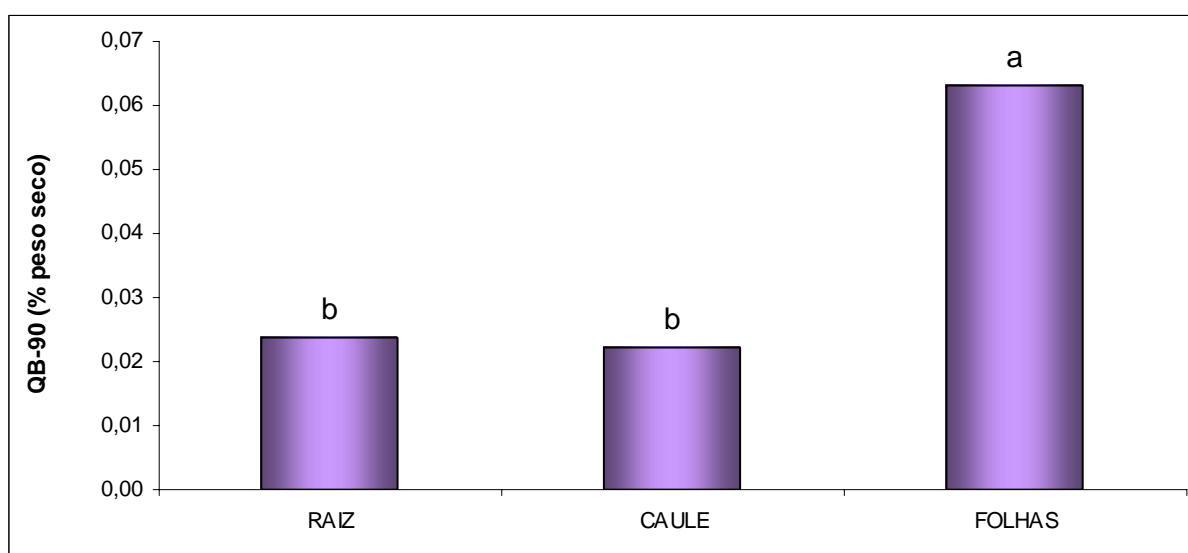


Figura 4.16: Distribuição de QB-90 nas diferentes partes vegetais (raiz, caule e folhas) de plantas propagadas em laboratório (n = 5). Valores com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com ANOVA e teste de Duncan ($p < 0,05$).

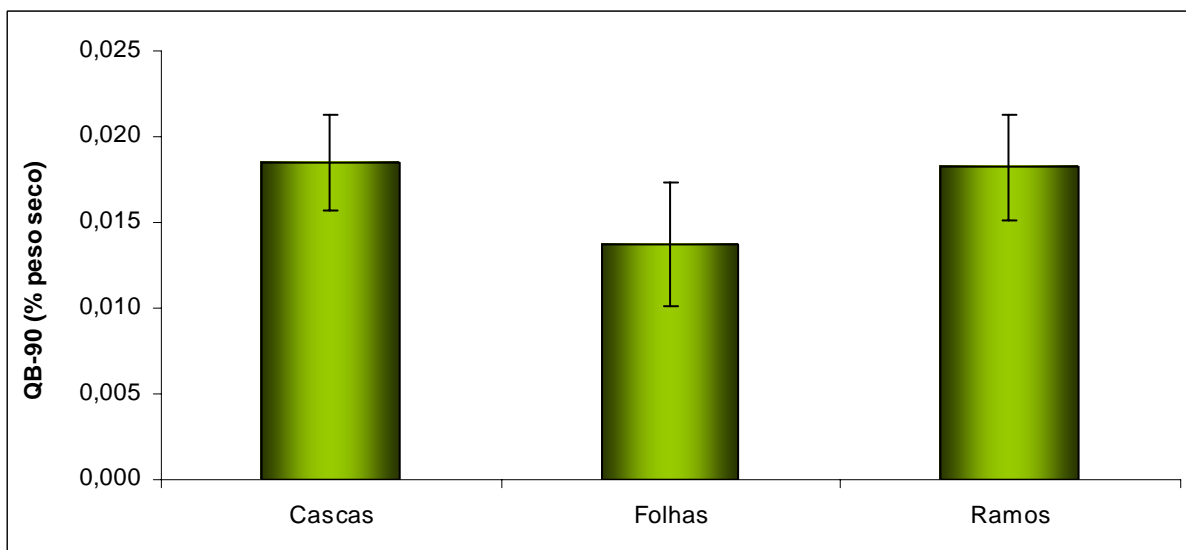


Figura 4.17: Distribuição de QB-90 nas diferentes partes vegetais (cascas, folhas e ramos) de indivíduos adultos, coletados no inverno de 2004 no município de Canguçu – RS. Não houve diferença significativa entre os órgãos analisados de acordo com ANOVA e teste de Duncan ($p < 0,05$).

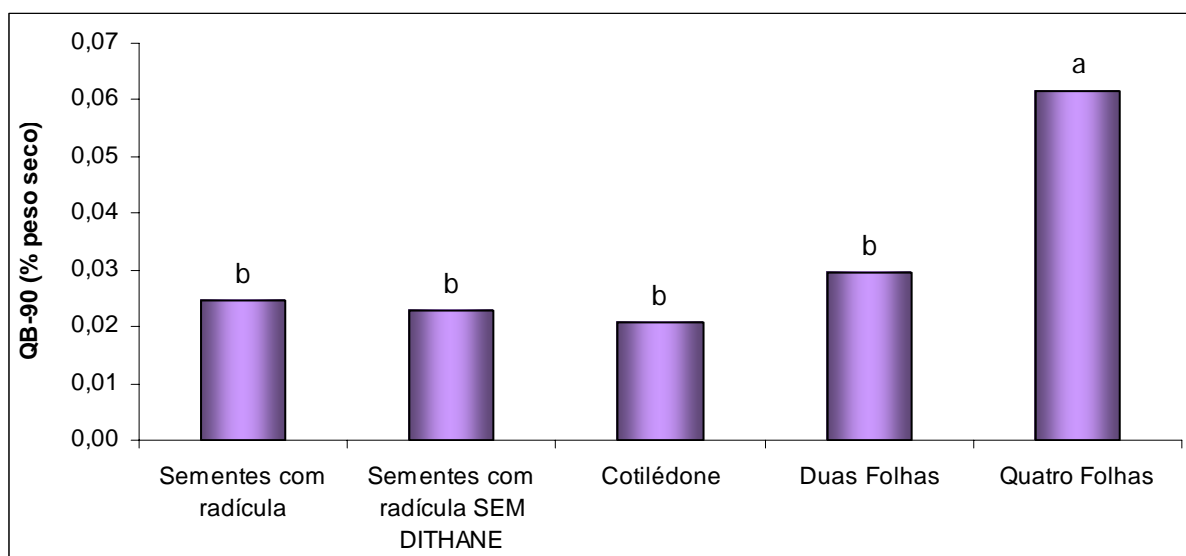


Figura 4.18: Distribuição de QB-90 ao longo do desenvolvimento ontogenético em *Q. brasiliensis*. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com ANOVA e teste de Duncan ($p < 0,05$).

4. REFERÊNCIAS

AERTS R.J.; SNOEIJER, W.; AERTS-TEERLINK, O., van der MEIJDEN, E.; VERPOORTE, R. Control and biological implications of alkaloid synthesis in *Cinchona* seedlings. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3571-3577, 1991.

ALI, M.B.; YU, K-W.; HAHN, E-J.; PAEK, K-Y. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Reports*, v. 25, p. 613-620, 2006.

BALANDRIN, M.F. Commercial utilization of plant-derived saponins: an overview of medicinal, pharmaceutical, and industrial applications. In: WALLER, G.R.; YAMASAKI, K. (Ed.). Saponins used in traditional and modern medicine. 1^a ed. New York: Plenum Press, p. 1-14, 1996.

BROECKLING, C.D.; HUHMANN, D.V.; FARAG, M.A.; SMITH, J.T.; MAY, G.D.; MENDES, P.; DIXON, R.A.; SUMNER, L.W. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 410, p. 323-336, 2005.

CONCONI, A.; SMERDON, M. J.; HOWE, G. A. and RYAN, C. A. The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature*, v. 383, p.826-829, 1996.

DALSGARD, K.; MAX, H. Cultured cells of *Quillaja* sp. CIPO-Nº. 2147480, 1994.

DALSGARD, K.; MAX, H. Cultured cells of *Quillaja* sp. USPTO-Nº. 5716848, 1998.

DE KLERK, G.J.; KRIEKEN, W.; JONG, J.C. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, v. 35, p. 189-199, 1999.

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, issue 49-50, p. 7129-7134, 2006.

FOURNIER, A.R.; PROCTOR, J.T.A.; GAUTHIER, L.; KHANIZADEH, S.; BÉLANGER, A.; GOSSELIN, A.; DORAIS, M. Understorey light and root ginsenosides in forest-grown *Panax quinquefolius*. *Phytochemistry*, v. 63, issue 7, p. 777-782, 2003.

GREGIANINI, T.S.; SILVEIRA, V C.; PORTO, D. D.; KERBER, V.A.; HENRIQUES, A.T; FETT-NETO, A.G. The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. *Photochemistry and Photobiology*, v. 78, n. 5, p. 470-474, 2003.

GREGIANINI, T.S.; PORTO, D.D.; NASCIMENTO, N.C.; FETT, J.P.; HENRIQUES, A.T; FETT-NETO, A.G. Environmental and ontogenetic control of accumulation of

brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 30, n. 10, p. 2023-2036, 2004.

HENRY, M.; FONS, F. Sélection de lignées cellulaires de *Quillaja saponaria* Molina productrices de saponines immunostimulantes. Disponível em: <http://www.ensaia.inpl-nancy.fr/News/IAPTC/conferences.htm>. Acesso em: 23.06.2007.

HERNANDEZ, R.B. The importance of soil dressings. *Chilean-Forestry-News*, v. 212, p. 19-21, 2000.

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

JANSEN, M.A.K.; GABA, V.; GREENEBERG, B.M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*, v. 3, p. 131-135, 1998.

KAUFFMANN, C.; MACHADO, A.M.; FLECK, J.D.; PROVENSÍ, G.; PIRES, V.S.; GUILLAUME, D.; SONNET, P.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Natural Product Research*, v. 18, n. 2, p.153-157, 2004.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, v. 53, p. 299-328, 2002.

MANGAS, S.; BONFILL, M.; OSUNA, L.; MOYANO, E.; TORTORIELLO, J.; CUSIDO, R. M.; PIÑOL, M.T.; PALAZÓN, J. The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2041-2049, 2006.

MATTEI, V.L. Efeito do período de colheita na longevidade de sementes de timbuva (*Quillaja brasiliensis* Martius). *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 1, n. 3, p. 133-136, Set.-Dez.1995.

MEESAPYODSUK, D.; BALSEVICH, J.; REED, D.W.; COVELLO, P.S. Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs encoding β -amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase. *Plant Physiology*, v. 143, p. 959-969, 2007.

MÉTRAUX, JP. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, Research Update, p. 1-3, 2002.

MUNOZ, M.R.; FUENTES, E.R. Does fire induce shrub germination in the Chilean matorral. *Oikos*, v. 56, n. 2, p. 177-181, 1989.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

OSBOURN, A. Saponins and plant defence – a soap story. *Trends in Plant Science*, v. 1, n. 1, p. 4-9, 1996.

PAPADOPOULOU, K.; MELTON, R.E.; LEGGETT, M.; DANIELS, M.J.; OSBOURN, A.E. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, v. 96, n. 22, p. 12923-12928, 1999.

PREHN, D.; SERRANO, C.; BERRIOS, C.G.; ARCE-JOHNSON, P. Micropropagación de *Quillaja saponaria* Mol. a partir de semillas. *Bosque (Valdivia)*, v. 24, n. 2, p. 3-12, 2003.

PROCHILE 2005 - Disponível em: www.prochile.cl . Acesso 27.02.2007.

REITZ, R. (Ed.). *Flora ilustrada catarinense – Rosaceas*. Itajaí, Santa Catarina, 1996, p. 113-116.

SAN MARTÍN, R.; BRIONES, R. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (ROSACEAE) saponins. *Economic Botany*, v. 53, n. 3, p. 302-311, 1999.

SANTELICES, R.; BOBADILLA, C. Arraigamiento de estacas de *Quillaja saponaria* Mol. y *Peumus boldus* Mol. *Bosque*, v. 18, n. 2, p. 77-85, 1997.

WINK, M. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. M. Wink (ed.), Annual Plant Reviews, v. 2, Sheffield Academic Press, p. 1-16, 1999.

WRANN, H.J.; INFANTE, L.P. Establishment methods for *Eucalyptus camaldulensis* and *Quillaja saponaria* plantations in the arid zone of Chile. *Ciencia-e-Investigacion-Florestal*, v. 3, p. 13-25, 1988.

YU, KW.; GAO, W.; HAHN, EJ.; PAEK, KY. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Biochemical Engineering Journal*, v. 11, p. 211-215, 2002.

ZHANG, H.; ZHONG, J.J. and YU, J.T. Effect of osmotic pressure on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*. *Biotechnology Letters*, v. 17, p. 101-106, 1995.

CAPÍTULO V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Q. brasiliensis é uma espécie nativa encontrada nos estados de São Paulo ao Rio Grande do Sul. Estudos anteriores realizados pelo grupo relataram a presença, nas folhas, de saponinas funcional e estruturalmente semelhantes às encontradas nas cascas de sua espécie congênere chilena, *Q. saponaria* (KAUFFMANN, 2002; KAUFFMANN et al., 2004). A fração QB-90, purificada por KAUFFMANN (2002), é uma fração enriquecida em saponinas, obtida a partir do extrato aquoso da espécie brasileira, que demonstrou potencial atividade como adjuvante em vacina contra BHV-1, sendo escolhida como alvo deste estudo.

O perfil cromatográfico de QB-90 foi caracterizado por CCD, com o emprego de sistema eluente composto por n-butanol: ácido acético: água, na proporção 5:1:4 (v/v) e cromatofolhas de gel de sílica como adsorvente. A análise de QB-90 por esta metodologia permitiu verificar um que as saponinas de *Q. brasiliensis* apresentam um comportamento cromatográfico semelhante aos extratos purificados de *Q. saponaria*, disponíveis comercialmente, QUIL-A[®] e saponinas Sigma[®].

No intuito de caracterizar quantitativamente esta fração, foi desenvolvido um método por CLAE empregando coluna de fase reversa C₈ (Waters Spherisorb[®]), sistema isocrático acetonitrila:água (65:35), fluxo de 0,8 ml/min e detecção a 214 nm. O método desenvolvido foi validado avaliando-se os parâmetros de linearidade e intervalo de variação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, preconizados pela RE 899 (BRASIL, 2003). Os resultados obtidos apresentaram-se em conformidade com o exigido pela legislação, sendo o método considerado adequado para a detecção e doseamento da fração QB-90 em extratos aquosos de *Q. brasiliensis*.

Tendo em vista a detecção de atividade adjuvante de QB-90 comparável à QUIL-A[®], em estudos anteriores realizados pelo grupo (KAUFFMANN, 2002), foi avaliada a toxicidade desta fração, em camundongos. Doses de 50 a 800 µg de QB-90 foram administradas, por via subcutânea, a grupos de seis animais, sendo utilizado um regime de duas administrações com intervalo de uma semana. Foi observado enrijecimento subcutâneo local em um dos animais pertencente ao grupo de que recebeu 400 µg de QB-90 e em três animais que receberam a dose de 800 µg. Além disso, ocorreram três mortes após a segunda administração da dose de 800 µg.

A curva dose-resposta para a atividade adjuvante da fração QB-90 foi delineada empregando-se como antígeno BoHV-1 e como controles Quil-A[®] ou somente o vírus sem adição de adjuvante. O intervalo de doses entre 50 a 200 µg de QB-90 foi selecionado, considerando-se os resultados obtidos no experimento de toxicidade. As vacinas foram administradas a grupos de oito camundongos e o método de ELISA indireto foi empregado para a quantificação do nível de imunoglobulinas anti-BoHV-1 (IgG). Não foi detectada diferença significativa no perfil de resposta obtido para as formulações que empregaram diferentes quantidades de QB-90, bem como entre estas e QUIL-A[®]. Estes resultados indicam a ausência de um perfil dose-dependente para a atividade adjuvante de QB-90, nas doses testadas.

Assim, denota-se a potencial utilização da espécie brasileira na obtenção de saponinas de interesse industrial. No entanto, é necessário desenvolver estratégias para uma exploração racional e sustentada dos recursos naturais, de modo a preservar o ambiente natural e produzir matéria-prima com máximo rendimento em saponinas, para utilização industrial. Neste contexto, foram realizados estudos de propagação clonal e germinação da espécie, além de ensaios visando conhecer os fatores que afetam o rendimento dessas saponinas, bem como a fisiologia de acúmulo destes compostos.

Estudos de propagação a partir de sementes de *Q. brasiliensis* foram realizados, sendo possível determinar um protocolo adequado para a assepsia e germinação das sementes e verificar uma alta taxa de germinação para sementes germinadas em condições assépticas. Um protocolo de micropropagação foi estabelecido por meio do enraizamento de explantes provenientes de culturas meristemáticas, as quais foram estabelecidas com o emprego de BAP (0,05 mg/l). O alto percentual de explantes enraizados em meios sem adição de auxina denota que a espécie é de fácil enraizamento. Todavia, o emprego de AIA mostrou-se mais adequado para a propagação desta espécie, uma vez que aumentou o número médio de raízes por explante enraizado, quando comparado a meios sem adição de auxina, sem afetar negativamente o alongamento das raízes, como ocorreu com o emprego de AIB e ANA. O sistema radicular formado nos explantes enraizados com AIA mostrou-se robusto, visto a ausência de calos na extremidade inferior do

explante e a elevada taxa de sobrevivência destas plantas quando transferidas para meio *ex vitro*.

Com o intuito de identificar possíveis fatores de influência sobre a produção e acúmulo de QB-90 em *Q. brasiliensis*, foi avaliado o efeito da aplicação foliar dos elicitores ácido salicílico e ácido jasmônico, bem como de dano mecânico controlado e da exposição à luz UVB e UVC, em plantas cultivadas no laboratório a partir do protocolo estabelecido. Conforme os resultados observados, ácido salicílico exógeno, na concentração de 5m M, não parece influenciar o acúmulo de QB-90. No entanto, a aplicação exógena de ácido jasmônico demonstrou induzir significativamente a produção de QB-90, sendo verificada no segundo dia de tratamento maior concentração das saponinas de interesse em plantas tratadas com 400 μ M deste elicitor. Já a aplicação da solução de 40 μ M apresenta efeito mais tardio, o qual foi significativo somente no dia 6. A simulação de herbivoria, por meio da aplicação de dano mecânico controlado, demonstrou tendência ao maior acúmulo de QB-90. O efeito observado com ácido jasmônico, aliado à tendência apresentada pelo experimento com dano mecânico, fornece indícios do envolvimento destas saponinas com mecanismos de defesa em *Q. brasiliensis*.

A exposição à radiação UVC estimulou a produção de QB-90 significativamente, enquanto plantas expostas à radiação UVB demonstraram tendência no acúmulo de QB-90, sem significância estatística. A maior indução de resposta de produção de saponinas por UVC pode estar relacionada à maior energia deste tipo de radiação comparada à UVB. No entanto, a tendência de resposta à UVB é um fator a ser considerado, visto que este tipo de radiação UV é a ecologicamente relevante, por atingir a superfície terrestre. Os resultados de indução de saponinas por luz UVC e tendência de indução por UVB sugerem um papel protetor de saponinas contra este tipo de radiação, e pode estar relacionado à tendência observada com a aplicação de dano mecânico. A ocorrência de indução de metabólitos responsivos a dano mecânico também por UV não é surpreendente, uma vez que ambos fatores são capazes de gerar estresse oxidativo nas células, inclusive compartilhando partes das vias de sinalização que resultam no acúmulo de metabólitos (CONCONI et al., 1996)

A distribuição órgão-específica de QB-90 foi avaliada em dois experimentos. Foram analisados raízes, caules e folhas de plantas propagadas em laboratório, detectando-se maior acúmulo de QB-90 nas folhas. No entanto, quando cascas, folhas e ramos de indivíduos adultos foram analisados não foi observada diferença significativa no conteúdo desses órgãos. A importância das folhas no acúmulo de QB-90 é reforçada pela análise do conteúdo desta ao longo do desenvolvimento de sementes germinadas, visto que a quantidade encontrada em plântulas com dois pares de folhas é significativamente maior que nos demais estádios.

A análise sazonal das saponinas de interesse foi realizada ao longo de dois anos, sendo o primeiro ano compreendido entre o inverno de 2004 e o outono de 2005, verificando-se nesta última estação maior concentração de QB-90. O segundo ano de coleta iniciou no inverno de 2005 e terminou com a coleta do outono de 2006. Neste período a estação na qual foi encontrado maior acúmulo de QB-90 foi o inverno de 2005. Os dados climáticos da região durante o período foram obtidos junto ao 8º Distrito de Meteorologia do Rio Grande do Sul. Os resultados sugeriram que o fator determinante para a maior produção de QB-90 foi a redução da insolação, geralmente associada a períodos de baixa pluviosidade. No entanto, estudos adicionais com intensidade e qualidade de luz, bem como com estresse hídrico devem ser conduzidos visando esclarecer estes fatores.

Apesar dos teores de QB-90 em folhas de *Q. brasiliensis* serem cerca de duas ordens de magnitude menores do que aqueles encontrados para saponinas totais em cascas de *Q. saponaria*, a possibilidade de exploração de folhas de *Q. brasiliensis* como fonte de saponinas bioativas é interessante. Ao contrário do que ocorre na exploração de cascas de *Q. saponaria*, árvores matrizes de *Q. brasiliensis* com poucos anos de idade podem ser extraídas por vários anos sem necessidade de abate e extração somente após várias décadas. A disponibilidade de protocolo viável de micropropagação da espécie possibilita a multiplicação de indivíduos “elite” para produção de saponinas foliares, os quais poderão ser selecionados considerando-se aspectos tais como: acúmulo de metabólitos, arquitetura de copa, capacidade de brotamento após poda, entre outros parâmetros.

Para estudos futuros, colocam-se como prioridades: a) a investigação mais detalhada do papel de insolação, irradiância e qualidade de luz, bem como de

estresse hídrico, na produção de QB-90; b) investigação das rotas bioquímicas envolvidas na biossíntese de QB-90; c) estudos experimentais e pré-clínicos do adjuvante QB-90 em vacinas de uso veterinário e humano, bem como a determinação do perfil de resposta induzido por este adjuvante; d) estabelecimento de protocolos de propagação comercial por mini-estaquia; e) busca de marcadores moleculares associados à alta produção de QB-90 para seleção de plantas matrizes.

VI. ANEXOS

1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

2. Coordenadas geográficas das plantas coletadas na propriedade do Prof. Dr. Gilson Moreira, município de Canguçu – RS.

Indivíduo	Latitude (S)	Longitude (W)
1	31°5'13.1"	52°50'8.5"
2	31°5'12.1"	52°50'5.6"
3	31°5'11.6"	52°50'5.5"
4	31°5'13.6"	52°50'4.4"
5	31°5'14.3"	52°50'3.5"
6	31°5'14.5"	52°50'2.7"
7	31°5'15.4"	52°50'1.1"
8	31°5'17.1"	52°49'57.6"
9	31°5'21.5"	52°49'55.1"
10	31°5'22.2"	52°49'55.8"
11	31°5'20.4"	52°49'54.4"
12	31°5'20.1"	52°49'53.5"
13	31°5'19.0"	52°49'53.8"
14	31°5'19.7"	52°49'52.2"
15	31°5'19.2"	52°49'49.2"
16	31°5'18.8"	52°49'47.9"
17	31°5'19.5"	52°49'47.7"
18	31°5'18.8"	52°49'47.9"
19	31°5'18.8"	52°49'47.9"
20	31°5'19.2"	52°49'48.4"
21	31°5'20.4"	52°49'47.4"
22	31°5'21.5"	52°49'47.5"
23	31°5'23.4"	52°49'48.6"
24	31°5'22.5"	52°49'47.9"
25	31°5'24.5"	52°49'49.2"
26	31°5'24.3"	52°49'49.6"
27	31°5'25.0"	52°49'49.1"
28	31°5'25.2"	52°49'48.9"
29	31°5'26.7"	52°49'48.7"
30	31°5'21.7"	52°49'47.0"

VII. BIOGRAFIA

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Juliane Deise Fleck

Filiação: Moacir Julio Fleck e Liane de Lurdes Fleck

Nascimento: 06.08.1977, Novo Hamburgo, RS - Brasil

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

1995 – 2000: Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

2000 – 2005: Ênfase em Farmácia Industrial. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

2002 – 2007: Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS.

3. PRÊMIOS E TÍTULOS

Prêmio Alfredo Leal do Mérito Acadêmico, concedido pela Direção da Faculdade de Farmácia - UFRGS, ao primeiro lugar da turma de formandos do Curso de Farmácia de 2000/1.

4. CO-ORIENTAÇÃO DE MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA - UFRGS

Aluna: Fernanda de Costa - Título do Trabalho: Constituição Química e Atividade Imunoadjuvante de *Quillaja saponaria*, apresentado em julho de 2006.

5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

5.1 Artigos completos publicados em periódicos

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, issue 49-50, p. 7129-7134, 2006.

KAUFFMANN, C.; MACHADO, A.M.; FLECK, J.D.; PROVENSÍ, G.; PIRES, V.S.; GUILLAUME, D.; SONNET, P.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Natural Product Research*, v. 18, n. 2, p.153-157, 2004.

PETRY, R.; SOUZA, T.P.; SILVA, F.A.; HEBERTE, G.; SILVA, W.B.; FLECK, J.D.; BASSANI, V.L.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; GUTERRES, S.S. Influência de adjuvantes e técnica de enchimento sobre as características farmacêuticas de

cápsulas de gelatina dura contendo teofilina. *Caderno de Farmácia*, v. 14, p. 13-19, 1998.

5.2 Resumos Publicados em Anais de Congressos

1998-2006: 10 resumos publicados em Anais de Congressos.

6. ATIVIDADES PROFISSIONAIS

2000 – 2002: Farmacêutica - responsável técnica. Proderma Farmácia. Novo Hamburgo, RS.

VIII. PARECERES

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)