

Informe final publicable de proyecto

Fracción B y QS-21: Desarrollo y caracterización de dos productos biotecnológicos de alto valor agregado, obtenidos en forma sustentable a partir de Quillaja brasiliensis, un árbol de la flora nativa de Uruguay.

Código de proyecto ANII: FMV_3_2018_1_149104

10/09/2021

OLIVARO SILVEIRA, Maria Cristina (Responsable Técnico - Científico)

DE SOUZA, Guillermo (Investigador)

FERREIRA CHIESA, Fernando Amaury (Investigador)

FONTANA MALÁN, Estella Carolina (Investigador)

MORALES OLMOS, Virginia (Investigador)

VERZA, Simone (Investigador)

WALLACE, Federico (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO DE TACUAREMBÓ (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDADE FEEVALE \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO DE TACUAREMBÓ \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

Las saponinas son productos naturales tensoactivos. La principal fuente de saponinas de uso industrial y biotecnológico es la especie arbórea chilena Quillaja saponaria (Qs). Existe una oportunidad para nuestro país, que involucra el desarrollo y producción de nuevos biomateriales de elevado valor agregado a partir del hecho que las hojas de la especie Quillaja brasiliensis (Qb), nativa de nuestro país, es una fuente renovable de saponinas de comprobada efectividad como adyuvantes de vacunación.

Una fracción purificada (a escala de laboratorio mediante SPE) de saponinas de hojas de Qb, a la que hemos designado Fracción B (FB), posee una potente actividad inmunoadyuvante comparable con Quil-A®, la referencia mundial dentro de los adyuvantes comerciales basados en saponinas. Nuestro grupo ha identificado de forma preliminar QS-21 (mezcla de saponinas) en FB por LC-MS, la cual se usa para formulaciones de vacunas humanas. El objetivo del proyecto fue el desarrollo y la caracterización de dos productos biotecnológicos de alto valor agregado: FB (producto escalable) como alternativa al adyuvante comercial Quil-A® y QS-21.

Se obtuvo y caracterizó un proceso escalable para la producción de FB por diafiltración, obteniendo además un subproducto con potencial uso comercial, un extracto enriquecido en compuestos fenólicos.

Para la obtención de QS-21 se desarrollaron dos procesos eficientes de producción. Se aislaron y purificaron una de las moléculas de QS-21 (mezcla de dos saponinas isómeras) y tres moléculas isómeras más. Sólo uno de los isómeros está en proceso de elucidación estructural, las tres moléculas restantes han sido caracterizadas detalladamente mediante análisis de RMN. Estos isómeros no se han reportado en Qs. Asimismo se ha aislado y caracterizado otra saponina inmunoadyuvante (S13). Se desarrollaron diferentes metodologías analíticas (HPLC-DAD, UHPLC-Full MS, UHPLC-SIM (m/z 1987.9) que permitieron monitorear los diferentes procesos ensayados. A su vez se pueden usar para analizar diferentes extractos de Qb.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Orgánica / Productos Naturales

Palabras clave: Fitofarmacéuticos / Saponinas / Adyuvante de vacunación /

Introducción

Las saponinas son compuestos tensoactivos cuyas soluciones acuosas pueden formar espuma estable, poseen capacidad emulsionante y forman soluciones micelares con un comportamiento similar al de los detergentes. Desde el punto de vista estructural son glicósidos naturales formados por la unión de una (mondesmósidos), dos (bidesmósidos) o tres (tridesmósidos) cadenas de oligosacáridos a una aglicona esteroideal o triterpénica a través de enlaces acetálicos y/o éster-acetal, pudiendo presentar características fisicoquímicas y actividades biológicas diversas según su estructura. Numerosos reportes han demostrado que este grupo de compuestos presenta diversas actividades biológicas, entre ellas, actividad antimicrobiana, citotóxica, insecticida, molusquicida y alelopática (Sparg et al., 2004).

La principal fuente tradicional de saponinas de uso industrial y biotecnológico ha sido y es la especie arbórea chilena Quillaja saponaria. La sobreexplotación de sus bosques nativos, junto a prácticas no sustentables de producción llevó a la escasez del recurso. Si bien actualmente los métodos de producción tradicionales han sido sustituidos por métodos más sustentables, el problema persiste en cierto grado, y la disponibilidad de fuentes alternativas de estos productos adquiere una renovada importancia. Una oportunidad para nuestro país en la producción de nuevos biomateriales de elevado valor agregado surge del hecho que las hojas de la especie arbórea nativa, Quillaja brasiliensis, son una fuente renovable de saponinas con comprobada efectividad como adyuvantes de vacunación (de Costa et al., 2013).

Quillaja brasiliensis (A.St.-Hill y Tul.) Mart. (Quillajaceae), es una especie arbórea endémica del sur de Brasil, norte de Uruguay, noreste de Argentina y este de Paraguay (Luebert, 2013). Comúnmente es conocido como árbol de jabón, ya que sus hojas y cortezas producen espuma al ser agitadas en agua debido a la presencia de saponinas. Las saponinas de esta especie han mostrado muchas similitudes con las de la corteza de Q. saponaria, especie relacionada, que constituye la principal fuente de saponinas con actividad inmunoadyuvante empleadas en vacunas (Kauffmann et al., 2004; Wallace et al., 2017).

Se ha demostrado en vacunas experimentales en modelos animales que el extracto acuoso y fracciones purificadas de saponinas obtenidas a partir de hojas de Q. brasiliensis poseen actividad inmunoadyuvante comparable con Quil-A®, el

principal producto adyuvante comercial basado en saponinas de *Q. saponaria*, y la referencia en la práctica para la industria biotecnológica de vacunas. Su efectividad se ha confirmado en vacunas experimentales contra herpesvirus bovino tipo 1 y 5 (BoHV), poliovirus humano, virus de la diarrea viral bovina en ratones (BVDV) y vacunas contra la rabia (Fleck et al., 2006; Silveira et al., 2011; de Costa et al., 2014; Cibulski et al., 2016; Yendo et al., 2016). Estas saponinas, son además, capaces de formar estructuras micelares nanométricas tipo ISCOM que presentan aún mayor efectividad como adyuvante de vacunas, con capacidad para generar tanto respuesta humoral como celular y a nivel de mucosas (Quirici et al., 2013, Cibulski et al., 2016). Hemos demostrado la efectividad de una fracción definida de saponinas extraídas de hojas de *Q. brasiliensis* denominada Fracción B (Wallace et al., 2017) como adyuvante en vacunas antirrábicas mostrando un 100% de protección en ensayos de desafío en modelo murino (Yendo et al., 2016).

El monte nativo representa el 44% de la superficie forestada en Uruguay, superando levemente las plantaciones actuales con *Eucalyptus* (40%). Sin embargo, el aprovechamiento de la flora arbórea nativa se ha limitado, hasta ahora, a la simple extracción de leña o productos madereros convencionales como piques o postes. La obtención de biomateriales, asociados a metabolitos secundarios (taninos, polifenoles, resinas, gomas, glicósidos, fitosteroles, etc) de la flora nativa, abre campos de investigación e innovación viables desde diferentes perspectivas. Algunos metabolitos secundarios constituyen productos de alto valor agregado en diferentes procesos industriales y el uso de biomateriales cobra prioridad en escenarios de manejo sustentable de los recursos naturales y de búsqueda de vías de implementación de actividades bioeconómicas. En el marco del proyecto INIA L4: "De la bioprospección a la biorrefinería: desarrollo de estrategias para la valorización de la flora arbórea de Uruguay", cuyo equipo de investigación integramos, se logró establecer las principales zonas de distribución de la especie *Q. brasiliensis* en nuestro país, la identificación georreferenciada de individuos y la obtención de nuevos individuos mediante distintos métodos incluyendo propagación vegetativa (micropropagación) y germinación de semillas, generándose la información básica necesaria para el desarrollo de la presente propuesta. Hemos realizado el primer estudio químico estructural, en el cual hemos identificado la presencia de 27 saponinas en la Fracción B (Wallace et al., 2017), la cual posee comprobada acción inmunoestimulante al ser empleada como adyuvante en vacunas (Yendo et al., 2016). Además, se estudiaron por primera vez las saponinas de la Fracción B producidas a partir de hojas de individuos juveniles (1-2 años de edad) producidos en vivero de *Q. brasiliensis*. Estos individuos juveniles se obtuvieron por germinación de semillas colectadas de un árbol adulto seleccionado en Valle Edén (Qb147). Las saponinas de las hojas juveniles son triterpénicas también y presentan un perfil de composición similar, encontrándose las mismas 4 geninas que en las hojas adultas (datos no publicados).

El presente proyecto aspira a desarrollar y caracterizar dos productos biotecnológicos de alto valor agregado basados en saponinas de *Q. brasiliensis*: Fracción B y QS-21.

Fracción B

El proceso de obtención de Fracción B a escala de laboratorio está desarrollado y optimizado. Se obtiene a partir del extracto acuoso seco de las hojas de *Q. brasiliensis* y posterior purificación mediante extracción en fase sólida (SPE) en fase reversa (Wallace et al., 2017). Esta Fracción B ha sido caracterizada químicamente en forma preliminar mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-IT-MSn). En el primer estudio hemos identificado la presencia de 27 saponinas en dicha fracción (Wallace et al., 2017) y actualmente tenemos identificadas de forma análoga unas 20 saponinas más (datos no publicados aún). El rendimiento en la obtención de Fracción B es de 0.3 % (0.3 g Fracción B/100 g de hojas secas de *Q. brasiliensis*). Dicho rendimiento es el mismo partiendo tanto de hojas de individuos juveniles como adultos.

Se busca el desarrollo y optimización de un proceso de producción de Fracción B estandarizado y escalable como producto alternativo a Quil-A®. En primer lugar, se estudiarán en forma sistemática diferentes alternativas de obtención de Fracción B. Se buscará el desarrollo de un proceso basado en operaciones unitarias escalables. Algunas de las alternativas pueden incluir precipitación parcial con solventes, precipitación de compuestos fenólicos por PVPP, intercambio aniónico y diafiltración por membranas, etc. Pueden definirse los procesos como combinación de más de un método mencionado anteriormente. A cada uno de los procesos alternativos se les evaluará el rendimiento (g Fracción B/100 g de hojas secas), caracterización química mediante cromatografía en capa fina revelando con anisaldehído y FeCl₃ y mediante ESI-IT-MSn, determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu como forma de determinar de manera indirecta la pureza en saponinas.

Una vez elegida/s la/s alternativa/s con mejor/es rendimiento/s y pureza se identificarán los costos de producción asociados. Luego se procederá a la elaboración de la especificación técnica del producto Fracción B. La misma incluirá: 1- descripción, 2- caracterización química preliminar mediante LC-ESI-IT-MSn, 3- métodos analíticos para control de calidad y 4- actividad inmunoadyuvante, actividad hemolítica y ensayos de toxicidad. El método LC-ESI-IT-MSn ya ha sido

desarrollado y es un método rápido y sensible para la identificación de saponinas en Fracción B (Wallace et al., 2017). LC-ESI-MSn se ha convertido en el método más popular para la identificación on-line de moléculas bioactivas en productos naturales dadas sus ventajas de muy buena sensibilidad, velocidad de análisis y por la riqueza de información estructural que brinda (Hostettmann et al., 2001; Madl et al., 2006; Wolfender et al., 2010; Dias et al., 2012). Dentro del ítem 3 se optimizará un método de análisis por HPLC-DAD, tratando de subsanar las limitaciones de los métodos actuales más empleados (San Martín et al., 2000), incluyendo la derivatización de los productos en forma previa a su análisis cromatográfico para introducción de grupos cromóforos. La evaluación de las actividades biológicas y la toxicidad será llevada a cabo por el grupo de la Prof. Simone Verza.

QS-21

Se desarrollará y optimizará un método de producción de QS-21 a partir de Fracción B usando diferentes sistemas cromatográficos (CC, VLC, MPLC y HPLC preparativo). La identificación inequívoca de QS-21 se realizará por LC-ESI-IT-MSn, por RMN y métodos químicos.

Se identificarán los costos asociados al método de producción de QS-21 seleccionado. Luego se trabajará en la elaboración de la especificación técnica del producto. La misma incluirá: 1- descripción, 2- caracterización química mediante LC-ESI-IT-MSn, RMN y métodos químicos, 3- métodos analíticos para control de calidad y 4- actividad inmunoadyuvante, actividad hemolítica y ensayos de toxicidad. Se propone como métodos analíticos de control de calidad los siguientes métodos: HPLC-DAD y LC-ESI-IT-MSn. El método a desarrollar por HPLC-DAD para Fracción B será adaptado si fuera necesario para el análisis de QS-21 y el método LC-ESI-IT-MSn ya desarrollado para Fracción B también será adaptado para el análisis de QS-21.

Metodología/diseño del estudio

Se ha creado un marco de colaboración con colegas con formación y especialización complementarios, contando en el conjunto del equipo de investigación con los recursos humanos y materiales necesarios para el logro de los objetivos. El diseño y la ejecución del presente proyecto se apoya en los antecedentes generados por el grupo tanto en los aspectos de bioprospección, fitoquímica, análisis estructural y caracterización de la actividad biológica de los productos de estudio, así como de experiencia de cooperación con el sector biotecnológico de fabricación de vacunas para la identificación de productos con gran potencial.

Metodología

Colecta de muestras en individuos adultos

Las muestras tomadas de ejemplares silvestres de la región noreste del país (Tacuarembó-Rivera) serán secadas y reservadas para su posterior uso. Cada muestra será apropiadamente identificada botánicamente y se depositarán muestras de herbario en el Herbario de Facultad de Química (MVFQ).

Colecta de muestras en individuos juveniles

Los individuos juveniles son producidos en INIA por diferentes métodos incluyendo propagación vegetativa (micropropagación) y por germinación de semillas. Ellos nos proveerán del material necesario.

Preparación del extracto acuoso

El material vegetal seco (hojas) será extraído por maceración con agua destilada a temperatura ambiente, el extracto será filtrado y liofilizado según lo requiera el proceso de producción de Fracción B.

Obtención de Fracción B a escala de laboratorio

Se obtendrá mediante extracción en fase sólida (SPE) en fase reversa C-18 y elución con gradiente de metanol-agua. Esta purificación ya ha sido optimizada (Wallace et al., 2017). Este producto se usará como referencia para controlar los productos análogos obtenidos por metodologías alternativas.

Cromatografía en capa fina (TLC)

Los distintos procesos de obtención de Fracción B serán monitoreados por TLC (extracto acuoso y cada etapa de purificación). Se usarán placas de Sílica gel (Alugram, Macherey-Nagel) y como fase móvil se usará la mezcla de solventes BuOH: AcOH: H₂O (6:2:2). Las placas se revelarán con el revelador de triterpenos y esteroides p-anisaldehído: H₂SO₄: EtOH: AcOH (1:10:170:20) y con el revelador de compuestos fenólicos y taninos FeCl₃ al 5% en H₂O.

Determinación de fenoles totales

Se realizará a cada Fracción B obtenida por cada proceso alternativo de producción que se haya ensayado y además para monitorear las distintas etapas de los procesos. La determinación se realizará por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu usando ácido p-cumárico como material de referencia.

Espectrometría de masas en tándem por infusión directa (ESI-IT-MSn)

Se realizará a cada Fracción B obtenida por cada proceso alternativo de producción que se haya ensayado.

Se empleará el espectrómetro de masas que contamos en el Laboratorio del Espacio de Ciencia y Tecnología Química del CUT (LTQ XL TM Thermo-FisherScientific), y se realizará en el modo negativo. Se utilizarán los parámetros que fueron optimizados para el estudio de la Fracción B obtenida a escala de laboratorio (Wallace et al., 2017). Dichos parámetros se detallan a continuación: composición del solvente de muestra, concentración de trabajo de Fracción B para favorecer la máxima intensidad de las señales, parámetros de la fuente de ionización y del espectrómetro de masas (voltaje de electrospary, corriente electrospary, temperatura capilar, voltaje del capilar, flujos del gas nebulizador (sheath y auxiliar gas), voltaje de los lentes y energías de colisión) y el flujo de entrada de la muestra al espectrómetro ($\mu\text{L}/\text{min}$).

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-IT-MSn)

Se realizará a la Fracción B obtenida por el mejor proceso alternativo de producción. Se utilizará la metodología ya desarrollada para el análisis de la Fracción B producida a escala de laboratorio (Wallace et al., 2017). Además de esta metodología se probarán diferentes columnas UHPLC de fase estacionaria tales como fase reversa C18 (columna de 100 mm) y HILIC (Hydrophilic interactions chromatography) y columnas fused core. También se probarán distintas fases móviles y se optimizarán el resto de las condiciones cromatográficas (temperatura de columna, flujo, tipo de elución (isocrática y con gradiente) buscando optimizar la separación cromatográfica y la generación de datos espectrales que permitan resolver mejor la complejísima mezcla de saponinas presentes en *Q. brasiliensis*. Se evaluará la posibilidad de implementar un diseño experimental como herramienta en la optimización del método analítico (Ferreira et al., 2007; Bezerra et al., 2008).

Determinación de las saponinas de Fracción B por HPLC-DAD

Este método se utilizará como método analítico de control de calidad para la Fracción B obtenida por el proceso seleccionado de su producción.

Se ensayará la preparación de derivados de saponinas adecuados que permitan su análisis por HPLC-DAD mediante la introducción de grupos cromógenos. A estos efectos en principio se procederá a la preparación de una amida aromática a partir del residuo de ácido glucurónico presente en todas las saponinas con p-amino-benzoato de etilo, usando como agente de acoplamiento una carbodiimida soluble en agua (Ferreira et al., 1997).

Obtención de QS-21 a partir de Fracción B

El aislamiento y purificación de QS-21 será realizado por métodos cromatográficos (CC, VLC, MPLC, HPLC preparativo) con diferentes fases estacionarias (fase normal, C18, resinas de intercambio iónico, etc.). El fraccionamiento será monitoreado por TLC y ESI-IT-MSn. El HPLC-preparativo en un equipo recientemente adquirido por el ECTQ/CUT, lo que permitirá en principio obtener productos puros a la escala del miligramo.

Una vez aislada se confirmará su identidad por métodos convencionales e incluirán análisis RMN 1D y 2D, LC-ESI-IT-MSn, análisis de monosacáridos (Sawardeker et al., 1965) y análisis de metilación (Morelle & Michalski, 2007) por GC-MS. Además, se determinará la proporción de los isómeros que la componen (QS-21 Api y QS-21 Xyl), y su pureza.

Se pondrá a punto un método cromatográfico de rutina para su identificación y análisis que pueda ser incorporado a su hoja de Especificación Técnica o de Control de Calidad. Podría ser un método HPLC-DAD con derivatización previa para introducir un grupo cromóforo o por LC-MS. Estos métodos son más sencillos que los métodos analíticos de la Fracción B, siendo esta última una mezcla muy compleja de saponinas. QS-21 son sólo dos saponinas. Por esta razón lo que se propone es adaptar el método a desarrollar por HPLC-DAD para Fracción B. Se estima que con pequeñas modificaciones quede adecuado para el análisis de QS-21. Lo mismo pasaría con el método LC-ES-IT-MSn desarrollado para Fracción B. Al mismo se le pueden hacer pequeñas modificaciones y quedaría apto para el análisis de QS-21.

Evaluación de la toxicidad y actividad adyuvante

La evaluación de la toxicidad y la evaluación de la actividad adyuvante serán llevadas a cabo por el grupo de la Prof. Simone Gasparín Verza, de la Universidade Feevale de Porto Alegre, Brasil, de acuerdo a los siguientes procedimientos.

Estas actividades serán realizadas dentro del Convenio Marco firmado entre UdelaR y Feevale, y en el ámbito particular de un acuerdo de cooperación académica entre nuestro grupo y la Prof. Verza, la cual formará parte del programa de posgraduación en Farmacia de Feevale.

1- Evaluación de la toxicidad de Fracción B y de QS-21

Con el fin de evaluar la actividad sobre el sistema inmune, es necesario determinar la toxicidad de las fracciones de saponinas y de las saponinas aisladas de *Q. brasiliensis*.

1.1 - Actividad Hemolítica:

Actividad hemolítica será evaluada de acuerdo con el método descrito por Silveira et al (2011). Serán usadas microplacas y concentraciones crecientes de fracción de saponinas y saponinas aisladas, en conjunto de una suspensión que contiene 0,5% de eritrocitos de conejo en solución salina. Salina se incluye como un control negativo, y diluciones de Quil-A®, serán utilizadas como un control positivo. El análisis se realizará usando lector de ELISA y de la actividad hemolítica se expresa como la concentración capaz de inducir el 50% de hemólisis (HD50).

1.2 - Citotoxicidad:

El ensayo de citotoxicidad se realizará por ensayo de viabilidad celular MTT (3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio), descrita por primera vez por Mossman (1983). Así, las células VERO (riñón de mono verde africano, ATCC CCL 81, serán expuestas a diluciones en serie de saponinas de *Q. brasiliensis* y la viabilidad mitocondrial se cuantifica mediante la reducción de MTT a cristales de formazan dentro de las células. Los cristales serán disueltos en DMSO (dimetil sulfóxido) y se llevará a cabo la cuantificación por espectrofotometría a 550 nm.

1.3 - Toxicidad aguda:

La evaluación de la toxicidad aguda se realizará de acuerdo con el método descrito por Cibulski et al (2016). Para esto, se utilizarán ratones machos CD-1 (8 semanas de edad, n = 5) para la administración subcutánea de 100 μ L de saponinas de *Q. brasiliensis* en solución salina. Las concentraciones serán evaluadas en base a los resultados obtenidos por Fleck et al (2006) que observaron que las concentraciones superiores a 400 μ g de una fracción enriquecida en saponinas de *Q. brasiliensis*, QS-90, causaron la muerte de ratones mediante la administración subcutánea. Por ello se propone evaluar las concentraciones de 30, 60, 120 y 240 μ g/dosis). Estas concentraciones pueden ser cambiadas dependiendo de los resultados de las pruebas de toxicidad preliminares propuestas en este trabajo. Para la evaluación de la toxicidad aguda, los ratones serán supervisados durante 3 días, en busca de signos de toxicidad (letalidad, dolor local, y la pérdida de la piloerección). El control negativo se realizará con un grupo de ratones inoculado con 100 μ L de solución salina.

2- Evaluación de la actividad adyuvante

Para evaluar la actividad adyuvante se utilizarán ratones macho CF-1 con ocho semanas. Los animales se inmunizarán por vía subcutánea en los días 0 y 14. Las inmunizaciones se realizarán con los siguientes grupos (n = 6): antígeno viral solo, antígeno viral añadido saponinas de *Q. brasiliensis* (la dosis establecida a partir de los ensayos de toxicidad aguda), antígeno viral añadido Quil-A®, (10 mg/dosis), ISCOM obtenido con saponinas de *Q. brasiliensis*, ISCOM obtenidos con Quil-A®, (10 μ g/dosis) y salina, este último como control negativo. Las muestras de sangre se toman inmediatamente antes de las inoculaciones (días 0 y 14) y dos semanas después de la segunda inmunización (día 28). Las muestras de suero se almacenaron a -20 ° C (Verza et al, 2012; Cibulski et al, 2016b.). Para evaluar la actividad de las dosis de anticuerpos específicos de antígeno inmunes se llevará a cabo, IgG1, IgG2b, IgG3, y el total de IgG en placas de ELISA. Para evaluar la actividad adyuvante también se realizará la medida de la proliferación de esplenocitos. Por lo tanto, 28 días después de la primera inmunización.

Determinación de los costos de producción de Fracción B y QS-21

Para la determinación de los costos de producción asociados a las alternativas de obtención de Fracción B que obtengan mejores rendimientos, se identificarán los costos fijos y variables asociados a las actividades. Se registrarán los costos de las diferentes actividades desde la extracción de la materia prima en el monte hasta las realizadas en el laboratorio y se estimarán para una escala comercial. Los costos de extracción en el monte incluyen la recolección de hojas del árbol, por lo tanto, serían mayoritariamente de mano de obra y traslado desde y hacia el lugar de la plantación. También se estimarán los costos asociados a la obtención de la materia prima a partir de individuos juveniles plantados. Se compararán los costos asociados a la obtención de Fracción B y se seleccionará la de menor costo.

Se identificarán los costos asociados a la producción de QS-21 a partir de Fracción B en laboratorio. Los costos de

extracción a partir de la materia prima en el laboratorio dependerán del método de producción de QS-21 seleccionado como más eficiente dentro de los utilizados. En todos los casos, se incluirá además la depreciación de los equipos utilizados para el procesamiento. Se estimará así el costo unitario de QS-21 por kg procesado.

Complementariamente se identificarán los principales mercados de venta de saponina a nivel mundial para conocer los volúmenes comercializados, así como los precios. Se caracterizará el mercado local de vacunas de equinos y pequeños animales domésticos (perros y gatos), como primer paso para conocer la potencial demanda local por saponina.

Resultados, análisis y discusión

Desarrollo y optimización de un proceso escalable para la producción de Fracción B (FB)

Se probaron 7 procesos anteriormente. Ver informe de avance.

Proceso de diafiltración con cassettes: Las saponinas fueron purificadas a partir del extracto acuoso de hojas de *Q. brasiliensis* mediante diafiltración usando el equipo LabScale® TFF System (Millipore) con Pellicon® XL Cassette Ultracel® (CRC, 50 cm², 10 kDa). Se realizaron dos procesos en forma separada, ambos a la misma concentración del extracto acuoso (25g/l), uno disuelto en agua y el otro en agua con ácido fórmico al 0.1%. El volumen de cada solución (100 ml) fue filtrado y llevado a volumen tres veces, de forma de obtener tres permeados de 100 ml cada uno y el retenido. Las moléculas por debajo de 10 kDa pueden pasar la membrana. Como consecuencia, el retenido concentra saponinas, las cuales forman micelas de 50 o más moléculas (Kensil et al., 1991), y los permeados concentran compuestos de bajo peso molecular como polifenoles, azúcares, sales, etc.

Estos procesos de diafiltración ensayados fueron monitoreados mediante la determinación de saponinas totales por HPLC-DAD y UHPLC-ESI-IT-MS (Full MS) y mediante el contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu. También fueron monitoreados QS-21 y sus isómeros mediante UHPLC-ESI-IT-MS (SIM, m/z 1987.9).

Todos los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 1 (se adjunta). Obtuvimos dos productos de alto valor agregado, un extracto enriquecido en saponinas y otro extracto enriquecido en compuestos fenólicos. Este proceso es robusto, escalable, fácil de operar y con bajos requerimientos energéticos.

Extracto enriquecido en saponinas (Retenidos): El proceso 2 demostró ser más efectivo que el proceso 1 debido a su mayor rendimiento y mayor porcentaje de saponinas totales. El porcentaje de compuestos fenólicos totales no varió entre los dos procesos. QS-21 y sus isómeros mostraron la misma tendencia que las saponinas totales con mayor porcentaje en el retenido del proceso 2. A pesar de que este proceso produce saponinas de pureza intermedia, este producto podría tener implicaciones para su uso per se, o como material de partida para una preparación más eficaz de compuestos puros.

Extracto enriquecido en compuestos fenólicos (Permeados I): Estos extractos mostraron un alto rendimiento, bajo porcentaje de saponinas y estar enriquecidos en compuestos fenólicos.

Los avances de este trabajo se presentarán en el ENAQUI 2021.

Desarrollo de un proceso de producción de QS-21 a partir de Fracción B.

El proceso de producción de QS-21 se realizó en dos etapas:

- 1) Purificación preliminar de QS-21 por cromatografía líquida (MPLC) en Silica Gel.
- 2) Purificación de QS-21 por HPLC preparativo.

Etapa 1: La MPLC se realiza en una columna de vidrio Buchi de 15 x 460 mm y con silica flash (40 g) como fase estacionaria. El solvente de elución es isocrático y presenta la siguiente composición: CH₂Cl₂/CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (270:139:25:1 v/v/v/v). Se siembran 100 mg de FB disueltos en el solvente de elución y se trabaja con un flujo de 4-5 ml/min. El monitoreo de la separación se realiza analizando las fracciones obtenidas por TLC usando como fase móvil CH₂Cl₂/CH₃OH/H₂O (60:40:10 v/v/v) y revelando con 0.1% orcinol en 5% de H₂SO₄ conc. (EtOH). Se juntaron las siguientes fracciones: fracciones 1-4, fracciones 5-9 (denominada B1), fracciones 16-21 (denominada B2), fracciones 22-25, fracciones 26-37 (denominada B3).

Etapa 2: Las fracciones B2 y B3 son las que se usan para separar QS-21. La fracción B1 se utiliza para separar la saponina S13, otra saponina con actividad inmunoadyuvante que se encuentra también en la especie *Q. saponaria* (Nord & Kenne, 1999).

Condiciones usadas:

Columna: C18, 20 x 250 mm, 5 µm, 100 Å°.

Fase móvil: Eluyente A: Agua con 0.1% ácido fórmico. Eluyente B: Acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico. Gradiente: 5-45% de eluyente B en 3 min, 45-53% eluyente B en 20 min, 100% eluyente B durante 6 min, vuelta a las condiciones iniciales en 5 min.

Muestras: 10 mg de B2 y B3 respectivamente disueltas en 300µl de CH₃CN/H₂O (45:55 v/v)

Flujo: 10 ml/ min.

Detección: 210 nm, 220 nm.

En las dos muestras sembradas (B2 y B3) se separó el pico que salía con un tiempo de retención de 13 minutos. A la muestra obtenida de la fracción B2 se le llamó H y a la muestra obtenida de la fracción B3 se le llamó B. Estas dos fracciones se monitorearon por LC-ESI-IT-MS2 en modo negativo y presentaron el mismo ion molecular a m/z=1987.9 y el mismo espectro MS2, pero diferentes tiempos de retención. La muestra B consistió en un solo pico (tr= 24.85 min.), mientras que H consistió en dos picos (tr1= 27.13 min. y tr2= 27.94 min.). Estas muestras se estudiaron por RMN y se determinó que B es un isómero de QS-21, una molécula de H es QS-21 y la otra es un isómero de QS-21. Se verificó también usando un estándar comercial de QS-21. Con la información obtenida de esta elucidación estructural detallada por RMN se está elaborando un manuscrito.

También se separó y elucidó S13 mediante RMN. Este avance se presentará en el ENAQUI 2021.

Además del proceso para obtener QS-21 (MPLC + HPLC preparativo) descrito anteriormente se estudió otro alternativo.

El proceso alternativo de producción de QS-21 se realizó en dos etapas usando HPLC preparativo:

1) Primera separación de QS-21 en fase reversa (C18, 20 x 250 mm, 5 µm, 100 A°) y con fase móvil en sistema isocrático consistiendo en buffer NH₄OAc a pH 6,8: CH₃CN (65,8:34,2). Detección a 214 nm, flujo 10 ml/min. Muestra: Se inyectan repetidamente 10 mg FB disueltos en 0.5 ml de agua con 0.1% de ácido fórmico.

2) Segunda separación de QS-21 en fase reversa (C18, 20 x 250 mm, 5 µm, 100 A°). Esta segunda separación es idéntica a la etapa 2 del proceso descrito anteriormente. Acá se inyectan las fracciones obtenidas provenientes de la primera separación por HPLC preparativo.

Ambas etapas del proceso fueron monitoreadas por LC-MS. Acá logramos separar otro isómero de QS-21 (tercer isómero), denominado S4, el cual se encuentra en etapa de elucidación estructural por RMN. También se logró separar en forma pura una de las moléculas constituyentes de H (el isómero de QS-21). Los isómeros elucidados presentan variantes en el oligosacárido en C28, manteniendo los motivos estructurales responsables de la actividad inmunoadyuvante (Marciani et al., 2018).

Determinación de saponinas totales por HPLC-DAD en extractos y productos purificados de Quillaja brasiliensis (Qb).

Las saponinas triterpénicas de Qb son separadas en fase reversa y cuantificadas en forma relativa a las saponinas de FB obtenida de las hojas de Qb mediante SPE (Wallace et al, 2017; 2019). Se integran todas las áreas de los picos de los cromatogramas comprendidos entre los tiempos 12.1 y 40 minutos. Estos picos corresponden a saponinas y los que eluyen antes son taninos y polifenoles. Se verificaron los espectros UV de los picos en ese rango de tiempo que fueran "compatibles" con saponinas triterpénicas, comparándolos con los del estándar comercial de QS-21. La suma de las áreas (12.1 - 40 min.) de la FB se considera 100%.

Preparación de la muestra: Disolver la muestra en agua con ácido fórmico 0.1% a una concentración de 10 mg/ml. Filtrar por filtro de 0.2 µm.

Preparación del estándar: Disolver la FB en agua con ácido fórmico 0.1% a una concentración de 10 mg/ml. Filtrar por filtro de 0.2 µm.

Condiciones cromatográficas:

Equipo: HPLC Ultimate 3000, Dionex, Germany.

Columna: C4, 4.6 x 250mm, 5 µm, Thermo Scientific TM Hypersil GoldTM

Temperatura columna: 35°C

Gradiente:

Solvente A: Agua purificada con 0.1% de ácido fórmico

Solvente B: Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico

Tiempo (min) % Solvente A % Solvente B

0 70 30

35 55 45

40 55 45

Flujo: 1 ml/min

Longitud de onda: 220 nm

Volumen de inyección: 70 µL

Cálculos:

% Saponinas Totales en muestra * = ($\frac{?áreas\ muestra}{?áreas\ FB}$)/100

*Relativo a las saponinas totales de FB

Determinación de saponinas totales por UHPLC-ESI-IT-MS1 (Full MS) en extractos y productos purificados de Qb.

Las saponinas triterpénicas de Qb son separadas en fase reversa y cuantificadas en forma relativa a las saponinas de FB obtenida de las hojas de Qb mediante SPE (Wallace et al, 2017; 2019). Se integran todas las áreas de los picos de los cromatogramas comprendidos entre los tiempos 10 y 40 minutos. Estos picos corresponden a iones en el rango de masas entre m/z 1300-2000. Las áreas de los picos considerados corresponden a saponinas, previamente verificados por sus espectros MS/MS. Los compuestos polifenólicos de bajo peso molecular (< m/z 1300) no estarían considerados. La suma de las áreas (10 - 40 min.) de la FB se considera 100%.

Preparación de la muestra: Disolver la muestra en agua con ácido fórmico 0.1% a una concentración de 10 mg/ml. Filtrar por filtro de 0.2 µm.

Preparación del estándar: Disolver la FB en agua con ácido fórmico a una concentración de 10 mg/ml. Filtrar por filtro de 0.2 µm.

Condiciones:

Equipo: UHPLC (Ultimate 3000 RSLQ, Dionex, Germany) acoplado a espectrómetro de masas con trampa de iones lineal (LTQXLTM Thermo-Fisher Scientific).

Columna: C18, 50 x 21 mm, 1.9 µm, Hypersil Gold™ RP, Thermo Scientific TM.

Temperatura columna: 35°C

Gradiente:

Solvente A: Agua purificada con 0.1% de ácido fórmico

Solvente B: Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico

Tiempo (min) % Solvente A % Solvente B

0 65 25

50 50 50

55 40 60

65 0 100

Flujo: 0.5 ml/min

Volumen de inyección: 25 µL

Modo de adquisición MS: Full MS en modo negativo, m/z 1300-2000.

Condiciones MS: Ídem al método LC-ESI-IT-MS/MS (Wallace et al, 2017; 2019).

Cálculos:

% Saponinas Totales en muestra * = ($\frac{?áreas\ muestra}{?áreas\ FB}$)/100

*Relativo a las saponinas totales de FB

Determinación de QS-21 y sus isómeros por UHPLC-ESI-IT-MS1 (SIM, m/z 1987.9) en extractos y productos purificados de Qb.

QS-21 y sus isómeros en Qb son separadas en fase reversa y cuantificadas en forma relativa a QS-21 y sus isómeros en FB obtenida de las hojas de Qb mediante SPE (Wallace et al, 2017; 2019). Se integran todas las áreas de los picos de los cromatogramas. Estos picos corresponden a iones con m/z 1987.9. Las áreas de los picos considerados corresponden a QS-21 y sus isómeros, previamente verificados por sus espectros MS/MS.

Preparación de la muestra: Disolver la muestra en agua con ácido fórmico 0.1% a una concentración de 10 mg/ml. Filtrar por filtro de 0.2 µm.

Preparación del estándar: Disolver la FB en agua con ácido fórmico a una concentración de 10 mg/ml. Filtrar por filtro de 0.2 µm.

Condiciones cromatográficas: Ídem método UHPLC-Full MS.

Condiciones MS: Ídem al método LC-ESI-IT-MS/MS (Wallace et al, 2017; 2019).

Modo de adquisición MS: SIM en modo negativo, m/z 1987.9.

Cálculos:

% Saponinas Totales en muestra * = ($\frac{?áreas\ muestra}{?áreas\ FB}$)/100

*Relativo a las saponinas totales de FB

Discusión de las metodologías analíticas

HPLC-DAD: Se concluye que no se pueden cuantificar las saponinas de Qb contra las saponinas de Q. saponaria (Quil-A® o VetSap). No presentan el mismo perfil. Hay saponinas abundantes en Qb que no aparecen en Quil-A®, (como molécula B aislada). Por ejemplo cuando se cuantificó FB contra Quil-A®, por el método escrito en este protocolo, asignándole 90% a las saponinas totales de Quil-A® (según su declaración de pureza), las saponinas totales de FB dan 164%.

HPLC-DAD vs UHPLC-Full MS: Las dos metodologías dan diferentes resultados absolutos de saponinas totales relativas a las saponinas totales de FB. Esto se podría deber a la baja sensibilidad de la detección por UV a 220 nm de estos compuestos. También podría haber alguna sobreestimación en el método por LC-MS, por estar considerando algún compuesto que no sea saponina en el rango de masas estudiado (m/z 1300-2000). Si bien los picos que se consideran para el área total en el estándar de FB fueron verificados con el espectro MS2 (fragmentación de saponina), no se hace esto en las muestras a cuantificar. La idea de estos métodos es poder usarlos para monitorear separaciones, como la diafiltración y así lograr optimizar estos métodos. También son adecuados para el estudio de diferentes extractos de Qb, por ejemplo distintos órganos de las plantas, y así determinar cuál es más concentrado en saponinas.

Conclusiones y recomendaciones

Se obtuvo un proceso escalable para la producción de FB. Si bien el producto obtenido es de menor pureza en saponinas que la FB obtenida usando SPE, este producto podría tener implicaciones para su uso per se, o como material de partida para una preparación más eficaz de compuestos puros. Existen formulaciones comerciales de adyuvantes en base a saponinas de Q. saponaria (Matrix-MTM, ISCOMATRIX®) que contienen fracciones definidas de saponinas, colesterol y fosfolípidos. Por ejemplo, Matrix-MTM (Novavax) consiste en la mezcla de dos tipos de partículas, cada una de ellas conteniendo una fracción de saponinas diferente y bien caracterizada con propiedades complementarias. Una fracción con saponinas con alta actividad adyuvante y la otra con actividad adyuvante más débil pero con saponinas que son bien toleradas (baja toxicidad). La mezcla de partículas muestra excelentes resultados en eficacia y seguridad (Magnusson et al., 2018). Por lo mencionado anteriormente nuestro producto de pureza intermedia de saponinas se podría mezclar con otro producto de mayor pureza y así lograr una formulación efectiva. La parte química de estos productos la conocemos bien, el conocimiento que se generó en su composición será clave en la formulación de futuras vacunas experimentales. Nos resta avanzar en la actividad inmunoadyuvante de los mismos.

Los filtros cassettes usados en la diafiltración, son un nuevo diseño de filtros que presentan varias ventajas (robustos, procesos escalables en forma lineal, requieren bajo caudal, capacidad de alta presión, etc.). La diafiltración es un proceso de membrana y es una alternativa válida a las tecnologías tradicionales debido a sus bajos costos de operación y mantenimiento, a las condiciones moderadas de temperatura y presión, al fácil control y escalado del proceso, al no uso de solventes y a la alta eficiencia en las separaciones (Conidini et al., 2018).

Además con este proceso se logra obtener otro producto de potencial valor agregado, el extracto enriquecido en compuestos fenólicos.

El desarrollo de las diferentes metodologías analíticas (HPLC-DAD, UHPLC-Full MS, UHPLC-SIM (m/z 1987.9) permitió monitorear los procesos de separación para obtención de FB y QS-21. Fueron adecuados para cumplir con su propósito. Aunque el contenido de saponinas totales difiera entre los dos métodos ensayados (HPLC-DAD y UHPLC-Full MS), presentan la misma tendencia de resultados relativos a FB. También QS-21 + isómeros presenta la misma tendencia que las saponinas totales en el retenido y los permeados. Sin ellos hubiera sido imposible el desarrollo y comparación de los distintos procesos ensayados. A su vez se pueden usar para monitorear saponinas totales en diferentes extractos de Q. brasiliensis.

Se lograron dos procesos eficientes para la obtención de QS-21 a partir de FB. Los datos obtenidos son muy relevantes, ya que además de separar e identificar QS-21 encontramos 3 moléculas isómeras más, dos de las cuales ya elucidamos (manuscrito en proceso) y otra está en proceso de elucidación. Estos isómeros no se han descrito aún en Q. saponaria (porque no están o no se han aislado aun). Asimismo con estos métodos de separación de QS-21, generamos el conocimiento para poder separar otras saponinas. Por ahora separamos y elucidamos S13 (Nord & Kenne, 1999), pero en el proceso vimos la viabilidad de separar otras más.

Con los estudios de RMN confirmamos la presencia de QS-21, la cual había sido identificada de forma tentativa por nosotros (Wallace et al., 2017) y antes de nuestro trabajo la única fuente comercial conocida de QS-21 lo constituía el árbol chileno Q. saponaria. Dadas las características estructurales de los isómeros de QS-21 podemos predecir su actividad inmunoadyuvante (Marciani et al., 2018) y su estudio podrá contribuir al conocimiento acerca de sus mecanismos de

acción.

En forma paralela se realizó la caracterización preliminar por LC-MS de los compuestos fenólicos de las hojas de *Q. brasiliensis*, compuestos considerados impurezas en FB (obtenido por diafiltración y por SPE) y compuestos de potencial valor agregado presentes en subproducto de la diafiltración. Se estudiaron en un extracto enriquecido en estos compuestos y luego purificados mediante columna Sephadex LH20. La metodología ensayada se puede adaptar al estudio de los compuestos fenólicos en los distintos productos obtenidos. Este trabajo se presentará en IMSC2021 (International Mass Spectrometry Conference).

También se avanzó en la caracterización preliminar por LC-MS de saponinas de raíces y tallos en individuos juveniles producidos en vivero por germinación de semillas. Las hojas ya se habían caracterizado y presentan un perfil similar a las hojas del individuo adulto. En raíces y tallos aparecen nuevas saponinas, no caracterizadas previamente en hojas y corteza de *Qb*. Se identificaron en cada órgano aprox. 50 saponinas en cada uno. Este trabajo se presentará en IMSC2021 (International Mass Spectrometry Conference).

En resumen, se ha avanzado muchísimo en el conocimiento estructural de las saponinas de *Q. brasiliensis*, en aspectos de aislamiento, purificación, caracterización preliminar por LC-MS y por RMN. Además en el desarrollo de técnicas analíticas adecuadas para determinar saponinas totales o alguna en particular, como el caso de QS-21 y sus isómeros. En forma análoga a esta última metodología se podrían determinar otras saponinas específicamente. De acuerdo a la bibliografía existente sabemos la potencial actividad inmunoadyuvante de los compuestos puros que obtuvimos. A corto plazo se evaluará su actividad biológica y la de FB obtenido por diafiltración, en la medida que se vayan retomando las actividades presenciales en el grupo de la Dra. Simone Verza.

Referencias bibliográficas

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76 (5), 965-977.

Brunner L., Barnier-Quer C., Collin N. (2017) QS-21 Adjuvant: Laboratory-Scale Purification Method and Formulation Into Liposomes. In: Fox C. (eds) *Vaccine Adjuvants. Methods in Molecular Biology*, vol 1494. Humana Press, New York, NY

Cibulski, S.P., Silveira, F., Mourglia-Ettlin, G., Teixeira, T.F., dos Santos, H.F., Yendo, A.C., de Costa, F., Fett-Neto, A.G., Gosmann, G., Roehe, P.M. (2016) Quillaja brasiliensis saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhoea virus vaccine in mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 45, 1-8.

Cibulski, S. P., Mourglia-Ettlin, G., Teixeira, T. F., Quirici, L., Roehe, P. M., Ferreira, F., & Silveira, F. (2016b). Novel ISCOMs from Quillaja brasiliensis saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine*, 34(9), 1162-1171.

de Costa, F., Yendo, A.C.A., Cibulski, S.P., Fleck, J.D., Roehe, P.M., Spilki, F.R., Gosmann, G., Fett-Neto, A.G. (2014) Alternative Inactivated Poliovirus Vaccines Adjuvanted with Quillajabrasiliensis or Quil-A Saponins Are Equally Effective in Inducing Specific Immune Responses. *PloS one*, 9 (8), 105374.

Dias, H.J., Crotti, A.E.M., de Melo, N.I. (2012) Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. INTECH Open Access Publisher.

Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., da Silva, E.G.P., dos Santos, W.N.L., Quintella, C.M., David, J.M., de Andrade, J.B., Breikreitz, M.C., Jardim, I.C.S.F., Neto, B.B. (2007) Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, 1158 (1), 2-14.

Ferreira, F.; Kenne, L.; Cotta, M.A.; Stack, R.J. (1997). Structural studies of the extracellular polysaccharide from *Butyrivibrio fibrisolvens* strain CF3. *Carbohydrate Research*, 301, 193 – 203.

Fleck, J.D., Kauffmann, C., Spilki, F., Lencina, C.L., Roehe, P.M., Gosmann, G. (2006) Adjuvant activity of Quillaja brasiliensis saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine*, 24 (49), 7129-7134.

Hostettmann, K., Wolfender, J.L., Terreaux, C. (2001) Modern screening techniques for plant extracts. *Pharmaceutical biology*, 39(1), 18-32.

Kauffmann, C., Machado, A.M., Fleck, J.D., Provensi, G., Pires, V.S., Guillaume, D., Sonnet, P., Reginatto, F.H., Schenkel, E.P., Gosmann, G. (2004) Constituents from leaves of Quillaja brasiliensis. *Natural Product Research*, 18 (2), 153-157.

Kensil, C.R., Patel, U., Lennick, M., Marciani, D. (1991) Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex. *J Immunol.*, 15, 146(2), 431-437.

Lignum (2017). "Quillay, un sofisticado y prometedor negocio". Disponible en: <http://www.lignum.cl/2017/06/30/quillayun-softificado-prometedor-negocio/#>. Acceso: 13 de setiembre de 2018.

Luebert, F. (2013) Taxonomy and distribution of the genus Quillaja Molina (Quillajaceae). *Feddes Repertorium*, 124 (4), 157-162.

Madl, T., Sterk, H., Mittelbach, M., Rechberger, G.N. (2006) Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*. *Journal of the American Society for Mass spectrometry*, 17(6), 795-806.

Magnusson, S.E., Altenburg, A.F., Lövgren Bengtsson, K, Bosman, F., de Vries, R.D., Rimmelzwaan, Stertman, L. (2018). Matrix-M™ adjuvant enhances immunogenicity of both protein- and modified vaccinia virus Ankara-based influenza vaccines in mice. *Immunol Res.*, 66(2), 224–233.

Marciani, D. J. (2018) Elucidating the Mechanisms of Action of Saponin-Derived Adjuvants. *Trends in Pharmacological*

Sciences, 39 (6), 573–585. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.005>

Morelle, W., Michalski, J. C. (2007) Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2(7), 1585-1602.

Nord LI, Kenne L. (1999) Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydr Res.*, 320(1), 70-81.

Quirici, L., Verza, S.G., Mastrogiovanni, M., Miraballes, I., Casanova, G., Gosmann, G., Ortega, G., Ferreira, F. (2013) Candidate particulate antigen delivery system based on *Quillaja brasiliensis* saponins. In: 7th Vaccine and ISB Congress, Sitges, Barcelona, España.

San Martín, R., & Briones, R. (2000) Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (14), 2063-2068.

Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H., Jeanes, A. (1965) Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 37(12), 1602-1604.

Silveira, F., Cibulski, S.P., Varela, A.P., Marqués, J.M., Chabalgoity, A., De Costa, F., Yendo, A.C.A., Gosmann, G., Roehe, P.M., Fernández, C., Ferreira, F. (2011) *Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. *Vaccine*, 29 (49), 9177-9182.

Sparg, S.G., Light, M.E., VanStaden, J. (2004) Biological activities and distribution of plants saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94 (2–3), 219-243.

Verza, S. G., Silveira, F., Cibulski, S., Kaiser, S., Ferreira, F., Gosmann, G., Roehe, P.M. & Ortega, G. G. (2012). Immunoadjuvant activity, toxicity assays, and determination by UPLC/Q-TOF-MS of triterpenic saponins from *Chenopodium quinoa* seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (12), 3113-3118.

Wallace, F., Bennadji, Z., Ferreira, F., Olivaro, C. (2017) Analysis of an immunoadjuvant saponin fraction from *Quillaja brasiliensis* leaves by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry. *Phytochem. Letters*, 20, 228-233.

Wallace F., Bennadji Z., Ferreira F., Olivaro C. (2019) Structural characterization of new immunoadjuvant saponins from leaves and the first study of saponins from the bark of *Quillaja brasiliensis* by liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 1-9.

Wolfender, J.L., Marti, G., Ferreira Queiroz, E. (2010) Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: Dereplication, quality control and metabolomics. *Current organic chemistry*, 14(16), 1808-1832.

Yendo, A.C.A., de Costa, F., Cibulski, S.P., Teixeira, T.F., Colling, L.C., Mastrogiovanni, M., Soulé, S., Roehe, P.M., Gosmann, G., Ferreira, F.A., Fett-Neto, A.G. (2016) A rabies vaccine adjuvanted with saponins from leaves of the soap tree (*Quillajabrasiliensis*) induces specific immune responses and protects against lethal challenge. *Vaccine*, 34, 2305-2311.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)