

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

Quantificação de açúcares solúveis de *Quillaja brasiliensis* visando à seleção indireta de plantas superprodutoras de saponinas triterpênicas bioativas

KELEN AROSSI

Porto Alegre, 2020.



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

Quantificação de açúcares solúveis de *Quillaja brasiliensis* visando à seleção indireta de plantas superprodutoras de saponinas triterpênicas bioativas

Dissertação apresentada por Kelen Arossi  
como um dos requisitos para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Dra. Grace Gosmann

Co-orientador: Dr. Arthur Germano Fett-Neto (Centro de Biotecnologia UFRGS)

Porto Alegre, 2020.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a ser apresentada em 29 de maio de 2020, frente à Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cibele Tesser da Costa

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

Prof. Dr. Felipe Dos Santos Maraschin

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

Prof. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

Arossi, Kelen

Quantificação de açúcares solúveis de *Quillaja brasiliensis* visando à seleção indireta de plantas superprodutoras de saponinas triterpênicas bioativas / Kelen Arossi. -- 2020.

62 f.

Orientador: Grace Gosmann.

Coorientador: Arthur Germano Fett-Neto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Saponinas. 2. Atividade Imunoadjuvante. 3. *Quillaja brasiliensis*. I. Gosmann, Grace, orient. II. Fett-Neto, Arthur Germano, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com bolsa obtida junto à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



Aos meus pais Ivone e Neivaldo  
dedico esta conquista, por todo o apoio,  
amor e dedicação durante todas as etapas  
deste caminho, e por toda a vida. Seu  
incentivo foi fundamental para esta  
conquista. Obrigada por tudo. Amo vocês!





## AGRADECIMENTOS

À Grace pela orientação, por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos, pela paciência, e principalmente pelo incentivo pessoal e profissional. Você foi e está sendo muito mais que uma orientadora: uma grande amiga.

Ao Arthur por abrir as portas do laboratório, tornando-me parte do Time *Quillaja*, pela orientação, dedicação, confiança e estímulo.

À Carla, por ter sido a primeira a acreditar em mim desde a graduação e me estimulado a lutar pelos meus objetivos, deixaste a marca de competência e respeito.

À querida Anna Carolina pelo convívio sempre prazeroso e enriquecedor, pela paciência, palavras de apoio e incentivo, pela amizade que ultrapassa o *Campus* do Vale.

Ao Rodrigo, meu orientador do TCC, que me ensinou o princípio de uma pesquisa, e a confiar em mim por mais que os momentos não fossem favoráveis. Você sempre será um grande amigo.

Ao time *Quillaja* por estarem sempre me apoiando e aos colegas do laboratório de Fisiologia, em especial à “profe” Yve por me mandar ler, e fazer o que tivesse que fazer, apesar de nossas diferenças ela sempre esteve lá.

À Anita pelas conversas, pela ajuda no lab, pelas aulas de inglês. Obrigada por estar sempre disposta a ajudar. À Betina por saber ouvir e sempre ter uma palavra amiga, um conselho daqueles que fazem você repensar os seus conceitos e crenças. À Cristina, por me mostrar que somos pessoas diferentes, com objetivos e pontos de vista diferentes.

À Cibele pela sua paciência, pelas conversas matinais acompanhadas de uma ótima carona, se tornou uma grande amiga que não quero perder. À Cássia, que me suportou como *roommate*, pela amizade diária, longas conversas, e bons momentos.

Ao Johnatan, um jovem com um coração enorme, além de adorar passar seus conhecimentos adiante, por muitas vezes, deixou de lado seus momentos de descanso para me ajudar.

Ao Jonas pelas conversas exploratórias sobre finanças, economia. Por me incentivar. À Kelly, por seus conselhos de mãe, por não me deixar desistir e sempre dizer que eu vou conseguir tudo o que eu quiser! Ao Nicolás por estar sempre preocupado com todos, pelos chocolates e balas que me destes nos meus dias difíceis.

À Yohanna por ser um poço de bondade, de preocupação, a menina prodígio que tenho tanto orgulho e por estar sempre lá para dizer “fica tranquila Kelen, vai dar tudo certo!”

Aos ICs maravilhosos, Leonardo, Alanis, Ju, Camila, Maria Eduarda e a inesquecível Ana Campos, com vocês o trabalho no laboratório foi mais leve.

A minha família amada, minha mãe Ivone que me ouviu, rezou. Ao meu pai Neivaldo por estar sempre zelando por mim e minha irmã Keila por torcer sempre por mim e por entender quando eu não podia estar por perto. Obrigada por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu namorado pela paciência, amor, apoio e incentivo, me dando força para prosseguir durante os momentos mais difíceis. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por me compreender.

E obrigada a Deus pela dádiva da vida, por ter me permitido concluir mais esta etapa, de tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância.

A todos que me acompanharam e que de algum modo, próximo ou distante, torceram por mim em algum momento, a minha eterna gratidão!

*“Mens sana in corpore sano”*

Decimus Iunius Iuvenalis

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt).*



## RESUMO

As folhas de *Quillaja brasiliensis*, espécie arbórea nativa do sul do Brasil, apresentam saponinas triterpênicas estrutural e funcionalmente semelhantes às encontradas nas cascas de *Q. saponaria*, espécie conhecida como fonte de saponinas imunoadjuvantes. Assim, as saponinas de *Q. brasiliensis* constituem uma fonte alternativa e mais sustentável para a grande demanda mundial de saponinas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico indireto rápido, robusto e barato para a quantificação de saponinas de *Q. brasiliensis* (triterpenos glicosilados), a fim de viabilizar a sua realização em larga escala e permitir a identificação de plantas super produtoras para posterior propagação clonal através de estaquia. Para isso, folhas de indivíduos jovens, germinados *in vitro* e subsequentemente mantidos em sistema de mini-jardim clonal, foram coletadas sazonalmente e extraídas para obtenção do extrato aquoso contendo saponinas, o qual foi submetido à hidrólise, seguido do doseamento de açúcares solúveis através de método colorimétrico. A biomassa da parte aérea e o conteúdo de açúcares solúveis de plantas jovens de *Q. brasiliensis* apresentou divergências entre as estações do ano. O maior acúmulo de biomassa ocorreu no verão, diferindo estatisticamente das demais estações. A concentração de açúcares solúveis encontrados nos extratos foliares também apresentou variação sazonal, alcançando médias entre 55 e 82 mg / g de massa seca. Em análise individual, há uma alta variabilidade do perfil de crescimento e acúmulo de açúcares entre plantas. É provável que fatores como temperatura e aumento de intensidade de luz estejam associados ao aumento significativo da biomassa e diminuição dos açúcares solúveis em estações como verão. Por outro lado, a diminuição da temperatura nas estações do outono e inverno apresenta possível relação com a diminuição da biomassa e aumento significativo no teor de açúcares. Dados obtidos até o momento sugerem que o nível de saponinas apresenta variação semelhante àquela dos açúcares obtidos dos extratos hidrolisados.

**Palavras-chave:** Saponinas, *Quillaja brasiliensis*, açúcares solúveis, biomassa.



## ABSTRACT

### *Quantification of soluble sugars in *Quillaja brasiliensis* aiming at indirectly selecting plants superproducing bioactive triterpene saponins*

The leaves of *Quillaja brasiliensis*, a tree species native to southern Brazil, have structurally and functionally similar triterpene saponins found in the bark of *Q. saponaria*, a species known as a source of immunoadjuvant saponins. Thus, saponins from *Q. brasiliensis* (glycosylated triterpenes) constitute an alternative and more sustainable source for the great global demand for these compounds. The objective of this work was to develop a fast, robust and inexpensive indirect analytical method for the quantification of saponins from *Q. brasiliensis*, in order to enable its large-scale application and consequent identification of super-producing plants for subsequent clonal propagation through mini-cuttings. To that end, leaves from young individuals, germinated in vitro and maintained in a clonal mini-garden system, were collected seasonally and extracted to obtain the aqueous saponin extract, which was hydrolysed and later assayed through a colorimetric method of quantification of soluble sugars. The biomass of the aerial part and the content of soluble sugars of young plants of *Q. brasiliensis* displayed changes between the seasons. The greatest accumulation of biomass occurred in the summer, differing statistically from the other seasons. The concentration of soluble sugars found in leaf extracts also showed seasonal variation, reaching averages between 55 and 82 mg / g of dry matter. High variability in growth profile and sugar accumulation was recorded among plants. It is likely that factors such as temperature and increased light intensity are associated with a significant increase in biomass and a decrease in soluble sugars during seasons such as summer. On the other hand, the decrease in temperature in the autumn and winter seasons is possibly related to the decrease in biomass and a significant increase in sugar content. Data obtained so far suggest that variations in saponin levels correlate with those of sugars present in hydrolysed extracts.

**Key words:** Saponins, *Quillaja brasiliensis*, soluble sugars, biomass.





## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
2. OBJETIVOS .....	21
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
5. RESULTADOS .....	37
6. DISCUSSÃO .....	51
7. CONCLUSÕES .....	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57



## 1. INTRODUÇÃO

As plantas produzem diversos compostos orgânicos conhecidos como metabólitos especializados, os quais são de suma importância para o desenvolvimento e principalmente para a proteção da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MURPHY; ZERBE, 2020).

As saponinas são uma importante classe de metabólitos especializados, estando presente no grupo dos terpenos. São estruturas complexas, ou seja, possuem alto peso molecular, contendo um núcleo apolar ligado a resíduos de açúcares (VINCKEN et al., 2007).

A *Quillja brasiliensis* é uma planta encontrada no sul do Brasil, é conhecida popularmente como pau-sabão devido a capacidade das folhas e cascas produzirem persistente espuma em água (LUEBERT, 2014). Estas saponinas apresentam similaridades estruturais como àquelas presentes nas cascas da *Quillaja saponaria*, uma espécie Chilena com grande relevância econômica, sendo uma das principais fontes industriais de saponinas as quais são utilizadas como adjuvantes em formulações de vacinas (KAUFFMANN, 2004; WALLACE et al., 2017, 2019).

As frações purificadas QB-80 e QB-90, derivadas das folhas da espécie Brasileira mostraram possuir atividade imunoadjuvante em modelo murino, frente a diversos vírus, como herpesvirus bovino tipo 1 e 5, poliovírus, vírus da raiva, e vírus da diarreia viral bovina, bem como menor toxicidade comparada às saponinas de *Q. saponaria*. Sendo assim, as saponinas de folhas de *Q. brasiliensis* constituem uma fonte alternativa e sustentável para a grande demanda mundial de saponinas imunoadjuvante.

Como estratégia alternativa para uma exploração racional e sustentável de *Q. brasiliensis* nosso grupo desenvolveu protocolos de germinação e micropropagação da espécie. Para isso, foram realizados estudos de germinação de sementes *in vitro*, micropropagação de plântulas e posterior enraizamento de explantes provenientes de culturas de meristema apical (FLECK et al., 2009).

A seleção de indivíduos elite superprodutores de saponinas, podem contribuir para a equivalência ou até a superação dos teores de saponinas na espécie brasileira em comparação aos da chilena. Estes são quesitos importantes para tornar o potencial da planta brasileira em realidade econômica para uso farmacêutico.

No entanto é necessário o desenvolvimento de um método analítico adequado para a quantificação de saponinas de *Q. brasiliensis* em larga escala, de modo a serem identificadas plantas elite ou superprodutoras de saponinas para propagação clonal posterior através de estaquia.

A hipótese desta pesquisa foi testar se a hidrólise padronizada de saponinas liberaria açúcares, cujo doseamento destes, permite aferir o teor de saponinas de diferentes clones de *Q. brasiliensis*.

Essa dissertação apresenta, assim, o desenvolvimento de um método indireto para a quantificação de compostos que possuem açúcares solúveis em sua estrutura, como as saponinas triterpênicas encontradas em *Q. brasiliensis*, rápido, robusto e de menor custo. Este método foi baseado em Dubois et al. (1956) e Chow e Landhäusser (2004), com algumas modificações realizadas ao longo dos experimentos.

## 2. OBJETIVOS

- Realizar o doseamento colorimétrico de açúcares solúveis totais pela quantificação de hexoses e pentoses presentes nas cadeias de açúcares;

- Propor um protocolo de avaliação do acúmulo de saponinas através do doseamento de açúcares solúveis nas folhas de *Q. brasiliensis* visando à seleção indireta de plantas superprodutoras de saponinas triterpênicas bioativas.



### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

O texto completo, que na dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 23 - 56, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um método analítico indireto rápido, robusto e barato para a quantificação de saponinas de *Q. brasiliensis* (triterpenos glicosilados), a fim de viabilizar a sua realização em larga escala e permitir a identificação de plantas super produtoras de saponinas para posterior propagação clonal através de estaquia. A partir da extração aquosa (relação droga : solvente m / V 1:40) das partes aéreas beneficiadas e secas em estufa de ar circulante e trituradas em triturador de facas, obtivemos o rendimento de cada indivíduo coletado nas diferentes estações do ano. Os resultados foram discutidos.























## 4. MATERIAL E MÉTODOS







## 5 .RESULTADOS































## 6. DISCUSSÃO







## 7. CONCLUSÕES





## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**, v. 2. 5<sup>o</sup> Ed. Brasília, 2010.

AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAY, p. 1–11, 2013.

BACCOU, J. .; LAMBERT, F.; SAUVAIRE, Y. Spectrophotometric method for the determination of sparfloxacin. **Analyst**, v. 102, p. 458–465, 1977.

BRUNETON, J.-N. Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants. In: 2. ed. Paris: Lavousier: Intercept Ltd 1999-01-01, 1999. p. 1136.

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

CHAPMAN, P. B. et al. Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin + QS21 vaccine: A dose-response study. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 874–879, 2000.

CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, v. 59, p. 16–40, 2014.

CHOW, P. S.; LANDHÄUSSER, S. M. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. **Tree Physiology**, v. 24, n. 10, p. 1129–1136, 2004.

CIBULSKI, S. et al. Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines. **Vaccine**, v. 36, n. 1, p. 55–65, 2018.

CIBULSKI, S. P. et al. *Quillaja brasiliensis* saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhea virus vaccine in mice. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 45, p. 1–8, 2016.

DALSGAARD, K. Saponin adjuvants. 3. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in food-and-mouth disease vaccines. **Arch Gesamte Virusforsch**, v. 44, n. 3, p. 243–254, 1974.

DE ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on Eucalyptus. In: **Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century**, Editors: Christian Walter and Mike Carson. [s.l: s.n.]. v. 661p. 303–333.

DE COSTA, F. et al. Immunoadjuvant and anti-inflammatory plant saponins: characteristics and biotechnological approaches towards sustainable production. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 857–880, 2011.

DE COSTA, F. et al. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 66, p. 56–62, 2013.

DIDIERLAURENT, A. M. et al. Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 1, p. 55–63,

2017.

DONOSO, S. et al. Respuesta fisiológica y de crecimiento en plantas de *Quillaja saponaria* y *Cryptocarya alba* sometidas a restricción hídrica. **Bosque**, v. 32, n. 2, p. 187–195, 2011.

DU, Y. et al. Effect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, n. October 2019, p. 1–12, 2020.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ELEKOFEHINTI, O. O. Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants - A review. **Pathophysiology**, v. 22, n. 2, p. 95–103, 2015.

**European Pharmacopeia - (Ph. Eur. - Germany, 2014.**

EVANS, T. G. et al. QS-21 promotes an adjuvant effect allowing for reduced antigen dose during HIV-1 envelope subunit immunization in humans. **Vaccine**, v. 19, n. 15–16, p. 2080–2091, 2001.

FAN, Z. et al. Antiplatelet aggregation triterpene saponins from the barks of *Ilex rotunda*. **Fitoterapia**, v. 101, p. 19–26, 2015.

FLECK, J. D. et al. Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. **Vaccine**, v. 24, n. 49–50, p. 7129–7134, 2006.

FLECK, J. D. Constituição química, avaliação da atividade imunoadjuvante e estudos de propagação de *Quillaja brasiliensis*. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. Porto Alegre, RS. 2007.

FLECK, J. D. et al. Immunoadjuvant saponin production in seedlings and micropropagated plants of *Quillaja brasiliensis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 6, p. 715–720, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GUO, N. et al. Saponins from seeds of Genus *Camellia*: Phytochemistry and bioactivity. **Phytochemistry**, v. 149, p. 42–55, 2018.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2831–2846, 2007.

HIAI, S.; OURA, T.; NAKAJIM, T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. **Planta Medica Medi**, v. 29, p. 116–122, 1976.

HOSTETTMANN, KURT; MARSTON, A. **Saponins**. [s.l.] Cambridge University Press, 1995.

HU, J. L. et al. Antimicrobial activity of saponin-rich fraction from *Camellia oleifera* cake and its effect on cell viability of mouse macrophage RAW 264.7. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 12, p. 2443–2449, 2012.

HU, Q. et al. Triterpenoid saponins from the pulp of *Sapindus mukorossi* and their antifungal activities. **Phytochemistry**, v. 147, p. 1–8, 2018.

INFOR, INDAP, F. **Monografía de *Quillaja saponaria***. [s.l: s.n.].

JACOBSEN, N. E. et al. Structure of the saponin adjuvant QS-21 and its base-catalyzed isomerization product by  $^1\text{H}$  and natural abundance  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 280, n. 1, p. 1–14, 1996.

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.

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. Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. **Natural Product Research**, v. 18, n. 2, p. 153-157, 2004.

KENNEY, R. T.; EDELMAN, R. Survey of human-use adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 167–188, 2003.

KENSIL, C. R. et al. Separation and characterization 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.; KAMMER, R. QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 7, n. 9, p. 1475-1482, 1998.

KIM, T. D. et al. Anticancer effects of saponin and saponin–phospholipid complex of *Panax notoginseng* grown in Vietnam. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 9, p. 795–800, 2016.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; MELZIG, M. F. Saponins: current progress and perspectives. **Planta Medica**, v. 82, n. 18, p. 1495–1495, 2016.

LAMOSA, P.; FRANCO, C. D. M. F.; COELHO, A. M. Tandem MS and NMR: An Efficient Couple for the Characterization of Saponins. In A. V. Coelho, & C. D. M. F. Franco (Eds.), Tandem Mass Spectrometry - **Molecular Characterization** (pp. 117-135). Croacia: InTech.

LEMOINE, R. et al. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. JUL, p. 1–21, 2013.

LIVINGSTON, P. O. et al. Phase 1 trial of immunological adjuvant QS-21 with a GM2 ganglioside-keyhole limpet haemocyanin conjugate vaccine in patients with malignant melanoma. **Vaccine**, v. 12, n. 14, p. 1275–1280, 1994.

LUEBERT, F. Taxonomy and distribution of the genus *Quillaja* Molina (Quillajaceae). **Feddes Repertorium**, v. 124, n. 4, p. 157–162, 2014.

MAGEDANS, Y. V. S. et al. Foamy matters: An update on *Quillaja* saponins and their use as immunoadjuvants. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 1485–1499, 2019.

MARCIANI, D. J. et al. Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity. **Vaccine**, v. 18, n. 27, p. 3141–3151, 2000.

MARCIANI, D. J. et al. Fractionation, structural studies, and immunological characterization of the semi-synthetic *Quillaja* saponins derivative GPI-0100.

**Vaccine**, v. 21, n. 25–26, p. 3961–3971, 2003.

MARCIANI, D. J. Elucidating the mechanisms of action of saponin-derived adjuvants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 6, p. 573–585, 2018.

MARTIÑÓN, S. et al. Chemical and immunological characteristics of aluminum-based, oil-water emulsion, and bacterial-origin adjuvants. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

MORENO, C. A. et al. Preclinical evaluation of a synthetic *Plasmodium falciparum* MAP malaria vaccine in Aotus monkeys and mice. **Vaccine**, v. 18, n. 1–2, p. 89–99, 1999.

CMURPHY, K. M.; ZERBE, P. Specialized diterpenoid metabolism in monocot crops: biosynthesis and chemical diversity. **Phytochemistry**, v. 172, n. January, p. 112–289, 2020.

NASCIMENTO, N. C. DO; FETT-NETO, A. G. Plant Secondary Metabolism and Challenges in Modifying Its Operation: An Overview. In: **Plant Secondary Metabolism Engineering, Methods in Molecular Biology**. A.G. Fett-Neto ed. [s.l.: s.n.]. v. 643p. 77–93.

NORD, L. I.; KENNE, L. Novel acetylated triterpenoid saponins in a chromatographic fraction from *Quillaja saponaria* Molina. **Carbohydrate Research**, v. 329, n. 4, p. 817–829, 2000.

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

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, v. 967, n. 1, p. 147–162, 2002.

PROCHILE. Boletín de Productos Forestales No Madereros. Disponible em: Acessado em: <https://wef.infor.cl/publicaciones/publicaciones.php>. Acessado em: 10 de abril de 2020.

REED, S. G. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23–32, 2009.

SAN MARTIN, R. Sustainable production of *Quillaja saponaria* Mol. saponins. **Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants**, p. 271–279, 2000.

SAN MARTÍN, R.; BRIONES, R. Quality control of commercial San Martí *Quillaja* (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, n. 5, p. 2063–, 2000.

SARKHEL, S. Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria* Mol. saponin extract in mice. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 1–3, 2016.

SCHIJNS, V. E. J. C.; LAVELLE, E. C. Trends in vaccine adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 539–550, 2011.

SCHLOTTERBECK, T. et al. The use of leaves from young trees of *Quillaja saponaria* (molina) plantations as a new source of saponins. **Economic Botany**, v. 69, n. 3, p. 262–272, 2015.

SILVEIRA, F. et al. *Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. **Vaccine**, v. 29, n. 49, p. 9177–9182, 2011.

SKENE, C. D.; SUTTON, P. Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use. **Methods**, v. 40, n. 1, p. 53–59, 2006.

SMITH, Y. A.; ADANLAWO, I. G.; ONI, O. S. Hypoglycaemic effect of saponin from the root of *Garcinia kola* (bitter kola) on alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 2, n. 6, 2012.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2–3, p. 219–243, 2004.

SUN, H. X.; XIE, Y.; YE, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 12, p. 1787–1796, 2009.

SZAKIEL, A.; PAĆZKOWSKI, C.; HENRY, M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 4, p. 471–491, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artemed, 2017, 285 - 308p.

VINCKEN, J. P. et al. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 275–297, 2007.

WAITE, D. C. et al. Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21. **Vaccine**, v. 19, n. 28–29, p. 3957–3967, 2001.

WALLACE, F. et al. Analysis of an immunoadjuvant saponin fraction from *Quillaja brasiliensis* leaves by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry. **Phytochemistry Letters**, v. 20, n. February, p. 228–233, 2017.

WALLACE, F. et al. Structural characterisation of new immunoadjuvant saponins from leaves and the first study of saponins from the bark of *Quillaja brasiliensis* by liquid chromatography electrospray ionisation ion trap mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 30, n. 6, p. 644–652, 2019.

WANG, X. DE et al. Anticancer activity and potential mechanisms of 1C, a ginseng saponin derivative, on prostate cancer cells. **Journal of Ginseng Research**, v. 42, n. 2, p. 133–143, 2018.

WARDLAW, I. F. Tansley Review No. 27 The control of carbon partitioning in plants. **New Phytologist**, v. 116, n. 3, p. 341–381, 1990.

WU, J. Y. et al. Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 133–138, 2005.

WU, P. et al. Triterpenoid saponins with anti-inflammatory activities from *Ilex pubescens* roots. **Phytochemistry**, v. 134, p. 122–132, 2017.

YANG, B. et al. Antiplatelet aggregation triterpene saponins from the leaves of *Ilex kudingcha*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 302–307, 2015.

YANG, J. et al. Response of sugar metabolism in apple leaves subjected to short-term drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 141, n. December 2018, p. 164–171, 2019.

YENDO, A. C. A. et al. Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields. **Molecular Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 94–104, 2010.

YENDO, A. C. A. et al. Irradiance-based treatments of *Quillaja brasiliensis* leaves (A. St.-Hil. & Tul.) Mart. as means to improve immunoadjuvant saponin yield. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 228–233, 2015.

YENDO, A. C. A. et al. A rabies vaccine adjuvanted with saponins from leaves of the soap tree (*Quillaja brasiliensis*) induces specific immune responses and protects against lethal challenge. **Vaccine**, v. 34, n. 20, p. 2305–2311, 2016.

ZHENG, T. et al. Antidiabetic effect of total saponins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 814–821, 2012.