

**Universidad ORT Uruguay**

**Facultad de Ingeniería**

**Cultivo *in vitro* de *Quillaja brasiliensis*:  
evaluación de su viabilidad para la  
producción de saponinas adyuvantes en  
vacunas**

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciado en Biotecnología

**Rafaela O'Brien – 267346**

**Tutor: Juan Pablo Gallino**

**2025**

## Declaración de autoría

Yo, Rafaela O'Brien, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano.

Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realice el Trabajo final de carrera;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Rafaela O'Brien

12 de Agosto de 2025

## Resumen

*Quillaja brasiliensis* es una planta leñosa nativa de América del Sur, valorada por su alto contenido de saponinas, compuestos con propiedades inmunoestimulantes y potencial aplicación como adyuvantes en vacunas. Estos metabolitos se encuentran presentes en las hojas de estos árboles, lo que conlleva desafíos evidentes en términos de velocidad de suministro y sostenibilidad. La creciente demanda de estos metabolitos junto con las preocupaciones de preservación de estos árboles han llevado a la necesidad de métodos alternativos de producción. Entre las alternativas emergentes, el cultivo *in vitro* representa una vía prometedora para lograr una producción continua, escalable y sostenible de saponinas a partir de *Quillaja brasiliensis*. Sin embargo, la investigación en esta especie es aún escasa, tanto en protocolos de establecimiento como en la extracción y purificación de sus metabolitos bioactivos.

En este estudio se exploró la posibilidad de cultivar *Quillaja brasiliensis in vitro* y de aprovechar sus tejidos como fuente de saponinas. Se ensayaron diferentes medios y condiciones de cultivo para la introducción, propagación e inducción de callos. Las saponinas se extrajeron de hojas y callos, se purificaron por cromatografía de alta resolución preparativa (*prep-HPLC*) y se caracterizaron por cromatografía en capa fina (*TLC*). Se trabajó con explantes de cinco genotipos, cultivados en medio Woody Plant Medium (WPM) enriquecido con BAP, lo que permitió alcanzar un 80 % de éxito en el establecimiento inicial. La formación de callo a partir de hojas y tallos resultó viable en la mayoría de los genotipos, siendo las hojas el material más receptivo y mostrando la mejor proliferación en presencia de 3 mg/L de BAP. Se logró extraer y caracterizar saponinas a partir de hojas jóvenes de *Q. brasiliensis*. En contraste, los intentos de generar suspensiones celulares en medios MS y FNL no prosperaron bajo las condiciones evaluadas y los callos cultivados en las condiciones de esta investigación no evidenciaron la presencia de saponinas.

En conjunto, los resultados demuestran que *Q. brasiliensis* puede ser propagada exitosamente *in vitro* y que sus hojas constituyen una fuente de saponinas inmunoestimulantes. Los cultivos de callo requieren optimización adicional (tiempo de inducción, combinaciones auxina/citocinina, elicitación) antes de ser considerados como una fuente productiva de estos metabolitos.

## **Palabras clave**

Saponinas, *Quillaja brasiliensis*, cultivo *in vitro*, callo.

# Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>6</b>
1.1. Adyuvantes.....	6
1.2. Estructura y características de las saponinas.....	7
1.3. Formulaciones de adyuvantes de vacunas con saponinas del género Quillaja.....	8
1.4. Quillaja brasiliensis y sus ventajas.....	11
1.5. Alternativas en producción de saponinas.....	13
1.6. Características del cultivo <i>in vitro</i> .....	14
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>16</b>
2.1. Objetivo general.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>17</b>
3.1 Estrategia experimental.....	17
3.2 Materiales.....	17
3.2.1 Material vegetal.....	17
3.2.2 Medios de cultivo.....	17
3.3 Procedimientos generales.....	20
3.3.1. Introducción y propagación de plantas en cultivo <i>in vitro</i> .....	20
3.3.2. Inducción de callo.....	21
3.3.3. Cultivo de células en suspensión.....	22
3.3.4. Tratamientos previos a la extracción de saponinas.....	23
3.3.5. Extracción de saponinas.....	23
3.3.6 Purificación de saponinas por cromatografía líquida de alta resolución preparativa (prep-HPLC).....	24
3.3.7. Caracterización de las fracciones por cromatografía de capa fina (TLC).....	24
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>26</b>
4.1. Introducción y propagación de plantas en cultivo <i>in vitro</i> .....	26
4.2. Inducción de callo.....	26
4.3. Cultivo de células en suspensión.....	28
4.4. Purificación de saponinas por cromatografía líquida de alta resolución preparativa (prep-HPLC).....	30
4.5 Caracterización de las fracciones por cromatografía de capa fina (TLC).....	36
4.6 Análisis del rendimiento de saponinas.....	38
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>41</b>
<b>6. Perspectivas a futuro.....</b>	<b>42</b>
<b>7. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>43</b>

# 1. Introducción

## 1.1. Adyuvantes

Con el fin de disminuir los efectos adversos asociados a ciertas vacunas, se han desarrollado nuevas formulaciones con una composición más definida, como las basadas en proteínas recombinantes purificadas, péptidos sintéticos o ADN plasmídico. Estos antígenos purificados presentan una menor inmunogenicidad en comparación con las vacunas tradicionales. Por esta razón, se ha vuelto fundamental la administración conjunta de antígenos con compuestos capaces de potenciar o modular su inmunogenicidad, para así poder generar una respuesta inmune más fuerte, duradera y específica (1). Los adyuvantes fueron descritos por primera vez en 1924 por Ramon, quien los definió como *“sustancias utilizadas en combinación con un antígeno específico que generan una respuesta inmune más intensa que el antígeno por sí solo”* (2). Desde entonces, se han desarrollado múltiples tipos de adyuvantes con diversas aplicaciones.

Estos componentes mejoran la respuesta inmune al activar y regular la inmunidad innata y adaptativa, aumentando la eficacia y duración de las vacunas. Además, favorecen la memoria inmunológica y son especialmente útiles en poblaciones vulnerables como neonatos, adultos mayores y personas con inmunidad comprometida.

Aunque los adyuvantes ofrecen numerosas ventajas reconocidas, solo unos pocos se emplean regularmente debido a su potencia y niveles aceptables de toxicidad (3). Las sales de aluminio se han utilizado como adyuvantes con gran éxito durante casi un siglo y han resultado particularmente efectivas para promover la inmunidad humoral protectora. No obstante, la eficacia del aluminio resulta limitada en enfermedades donde se requiere inmunidad mediada por células para brindar protección. Además existen otros como las emulsiones de aceite en agua con escualeno, los virosomas ensamblados artificialmente, así como los agonistas de los receptores tipo toll (TLR) y las saponinas formuladas en liposomas o complejos inmunoestimulantes (ISCOM).

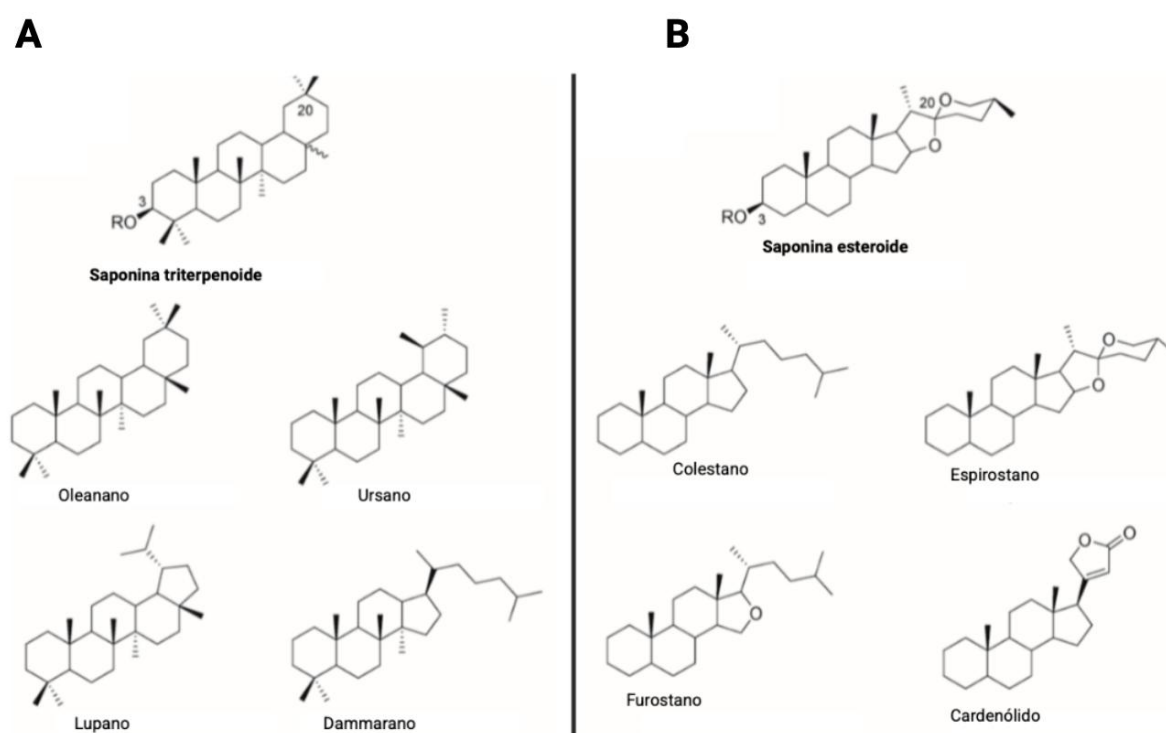
Sin embargo, la mayoría de estos adyuvantes no han sido aprobados para su uso en humanos, ya sea por su alto costo de producción, su limitada eficacia o su toxicidad local (4), lo que resalta la necesidad de desarrollar nuevos enfoques que mejoren la eficacia y la seguridad de los inmunomoduladores convencionales.

El uso de compuestos naturales de plantas, incluyendo saponinas, polisacáridos y brasinas, junto con sus derivados activos, tiene un gran potencial en la modulación de las respuestas inmunológicas. En la actualidad, la investigación de extractos vegetales ha ganado una atención considerable debido a sus diversas propiedades farmacológicas, que incluyen la regulación del sistema inmunológico y la actividad antioxidante (5).

## 1.2. Estructura y características de las saponinas

Las saponinas son compuestos glucósidos, extraídos de plantas con características anfipáticas que se deben a su estructura. Están compuestas por un aglicón (sapogenina) derivado de isoprenoides unido a una o más cadenas de azúcares mediante un enlace éter o éster. Según el tipo de esqueleto de su aglicón, estas pueden clasificarse en saponinas triterpenoides y saponinas esteroides.

Las saponinas triterpenoides (Figura 1A) están ampliamente distribuidas en plantas dicotiledóneas y presentan cuatro esqueletos principales: oleanano pentacíclico, ursano, lupano y dammarano tetracíclico. Por su parte, las saponinas esteroides (Figura 1B) derivan principalmente de monocotiledóneas, e incluyen cuatro esqueletos principales: colestano tetracíclico, espirostando hexacíclico, furostano pentacíclico y cardenólido con grupo lactona (5).



**Figura 1:** Estructura química de (A) Saponinas triterpenoides y (B) Saponinas esteroides. Adaptado de Liuhong Shen y colaboradores (5).

Estos metabolitos se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes especies de plantas en tejidos como corteza, hojas, tallos raíces y flores (6) y desempeñan un papel clave tanto en el estrés biótico como en el abiótico. Por otra parte, poseen un gran valor económico debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, siendo utilizadas en diversos procesos que incluyen: fabricación de emulsiones fotográficas, productos cosméticos, aplicaciones como emulsionantes en la industria alimentaria y como adyuvantes de vacunas en la industria médica (1).

Debido a su estructura anfifílica, tanto el aglicón como los radicales de azúcares ramificados desempeñan papeles importantes en la estimulación del sistema inmunológico.

Aunque el mecanismo inmunogénico aún no se comprende con claridad, se sabe que las saponinas pueden activar diferentes vías, incluyendo los receptores tipo Nod (NLR) y los receptores tipo Toll (TLR). Las saponinas pueden estimular a las células presentadoras de antígenos (APC) mediante la inducción de la formación del inflamasoma. El inflamasoma es un conjunto de receptores y sensores que inducen inflamación mediante la activación de la caspasa-1. Pueden estimular la secreción de IL-6 e IL-1 $\beta$  *in vitro*, aunque requieren la activación del TLR4, lo cual lleva a formas activas de caspasa-1. Además, pueden estimular la expresión del TLR2 y de interferón- $\alpha$ , promoviendo la activación de IL-18 e IL-1 $\beta$  (7). Estas se utilizan ampliamente tanto de forma individual como combinadas con sales de aluminio, liposomas o proteínas y lípidos anfipáticos para formar complejos detergente/lípido/saponina, conocidos como ISCOMs (5).

### **1.3. Formulaciones de adyuvantes de vacunas con saponinas del género *Quillaja*.**

El género *Quillaja*, perteneciente a la familia Quillajaceae dentro del orden Fabales (Magnoliopsida), está conformado por dos únicas especies leñosas: *Quillaja saponaria* Molina (*Q. saponaria*) y *Quillaja brasiliensis* (*Q. brasiliensis*). Su distribución se limita a regiones específicas de Sudamérica, donde *Q. brasiliensis* es endémica del sur de Brasil, noreste de Argentina, este de Paraguay y norte de Uruguay, entre los 21° S y 31° S y desde los 46° O hasta los 58° O, alcanzando hasta los 1350 m s. n. m. (metros sobre el nivel del mar) mientras que *Q. saponaria* es propia de las zonas mediterráneas de Chile se encuentra en bosques mixtos, en el denominado bosque esclerófilo, y creciendo abundantemente entre los 30° S y 38° S, alcanzando hasta los 2000 m s. n. m.

El interés en este género radica en la presencia de saponinas en la corteza, madera y hojas de estos árboles. Tanto *Q. saponaria* como *Q. brasiliensis*, son reconocidas por ser fuentes clave de saponinas crudas. En especial, *Q. saponaria* es reconocida por su elevado contenido de saponinas triterpénicas, que varía aproximadamente desde un 1,2 % en las ramas hasta un 16–20 % del peso seco en la corteza.

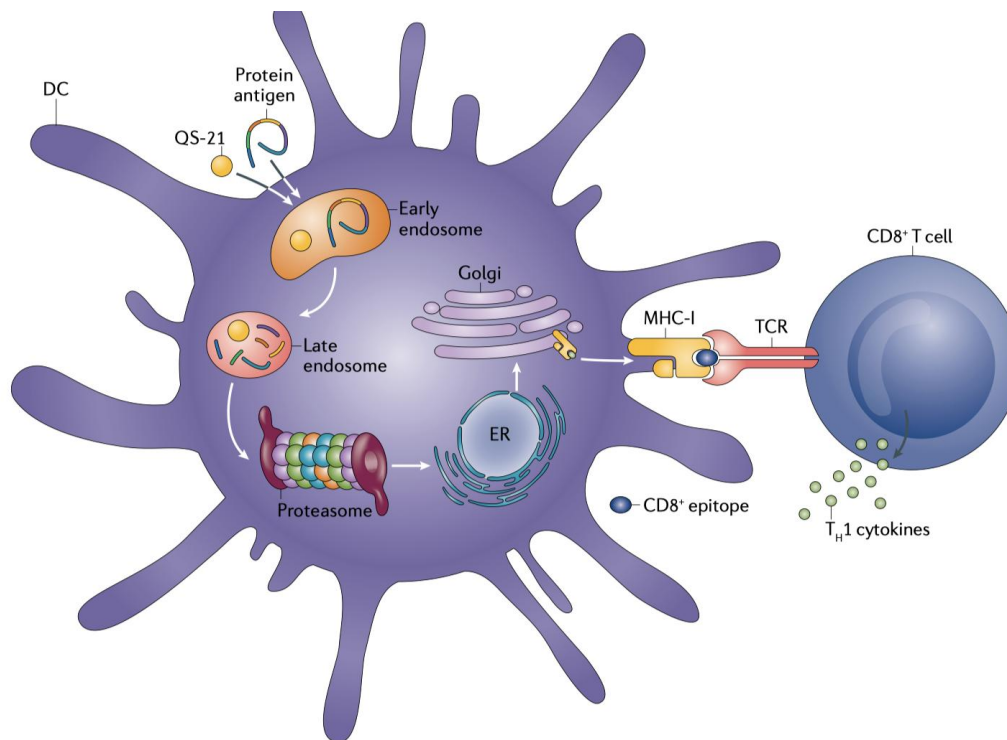
Desde los años 30 se sabe que *Q. saponaria* produce saponinas con efecto inmunoestimulante. Inicialmente, los extractos eran mezclas variables, pero en 1974 K. Dalsgaard logró estandarizar uno, Quil-A®, compuesto por más de 20 saponinas. Este compuesto demostró tener la capacidad de inducir tanto la respuesta inmune humoral como celular así como diferentes isotipos de anticuerpos. Desde entonces Quil-A® ha sido utilizado en diferentes vacunas veterinarias y estudios preclínicos (6). Fue purificado mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) de un extracto de corteza. A raíz de eso se descubrieron más de 20 saponinas solubles en agua provenientes de *Q. saponaria* que inducen

respuestas inmunes humorales y mediadas por células incluyendo QS-21, QS-18, QS-17 y QS-7 (8).

El principal componente de saponina, QS-18, resultó ser altamente tóxico en ratones, mientras que las saponinas QS-7 y QS-21 mostraron menor toxicidad. Dado que QS-7 era menos abundante, se seleccionó QS-21, compuesto por dos saponinas isoméricas y que se ha convertido en la saponina adyuvante más estudiada en los últimos 25 años (9). Actualmente el precio de mercado de Quil-A® excede los 500 USD por gramo (6) mientras que el de QS-21 altamente purificado es de aproximadamente 300.000 USD por gramo (10) lo que convierte a estos adyuvantes en algunos de los componentes más caros de las formulaciones de vacunas.

En cuanto a la respuesta inmune, se sabe que QS-21 estimula tanto las respuestas inmunes humorales como las respuestas inmunes mediadas por células, con producción de altos títulos de anticuerpos (IgG2a e IgG2b, además de IgG1) así como también linfocitos T citotóxicos. Sin embargo solo ha sido aprobado como parte de un adyuvante liposomal (AS01) en vacunas contra malaria y el herpes zóster. Esto se debe a que QS-21 presenta ciertas limitaciones como escasez, heterogeneidad, estabilidad hidrolítica y toxicidad que restringe la dosis lo cual ha limitado su desarrollo clínico como adyuvante independiente.

Los mecanismos de acción de QS-21 no se comprenden completamente, lo que dificulta el desarrollo racional de análogos mejorados y la selección de combinaciones óptimas entre adyuvantes y antígenos para futuras vacunas. Un modelo propuesto, basado en datos recientes con QS-21 formulado en liposomas, implica la endocitosis dependiente de colesterol de QS-21 por células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDCs), seguida de su acumulación y desestabilización en los lisosomas. Esta disrupción lisosomal puede inducir la activación de las moDCs mediada por catepsina B y la quinasa SYK, así como la producción de citoquinas proinflamatorias, y también podría influir en el procesamiento del antígeno y su translocación al citosol para una posterior presentación cruzada (Figura 2) (9).



**Figura 2:** Representación esquemática del mecanismo de acción propuesto para los adyuvantes de saponinas relacionados con QS-21. Tras la endocitosis, los antígenos y QS-21 ingresan a las células dendríticas, donde QS-21 favorece la ruptura de la membrana endosomal. Esto permite que los antígenos sean procesados en el citosol y sus péptidos resultantes se unan a moléculas MHC-I en el retículo endoplasmático. Finalmente, estos complejos se presentan en la superficie celular para activar células T CD8+ naïve mediante presentación cruzada. Tomado de Pifferi y colaboradores (9).

Se ha demostrado que los adyuvantes a base de saponinas, ya sea en forma purificada o formulados con colesterol y fosfolípidos en estructuras de tipo jaula de 40 nm (ISCOMATRIX), aumentan la presentación cruzada de antígenos en moDCs mediante el escape endosomal y la formación de cuerpos lipídicos intracelulares. Los ISCOMATRIX se basan principalmente en la capacidad adyuvante de las saponinas de *Quillaja* para inducir citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que reclutan y activan células presentadoras de antígenos, promover el tráfico del antígeno y su liberación al citosol y conectar las respuestas inmunes innata y adaptativa *in vivo*, de manera independiente de los receptores tipo Toll (TLR), pero dependiente de MyD88 (9).

Un ejemplo es Matrix-M™, que incluye QS-21 y ha sido usado exitosamente como adyuvante en vacunas contra malaria (4) y en Nuvaxovid™ (NVX-CoV2373), vacuna recombinante contra COVID-19 aprobada en humanos (6).

La Tabla 1 llevada a cabo por Morais y colaboradores (6) resume los adyuvantes derivados de *Q. saponaria* que fueron aprobados para su uso en humanos junto con sus formulaciones y aplicaciones en vacunas.

**Tabla 1:** Adyuvantes derivados de *Q. saponaria* aprobados para su uso en humanos junto con sus formulaciones y aplicaciones en vacunas. Adaptado de Morais y colaboradores (6).

	ASO1	ASO2	Matrix-M™
<b>Composición</b>	QS-21 + MPL en liposomas	QS-21 + MPL en emulsión aceite-en-agua	Fracción de saponinas de <i>Q. saponaria</i> en nanopartículas tipo ISCOM
<b>Respuesta inmune</b>	Respuesta dominante Th1 con activación de células T CD8 <sup>+</sup> y respuestas de anticuerpos	Respuesta equilibrada de células T (Th1/Th2) y respuestas de anticuerpos	Respuesta dominante Th1 con activación de células T CD8 <sup>+</sup> y respuestas de anticuerpos
<b>Aplicaciones clínicas</b>	Shingrix™ (Herpes Zóster); Mosquirix™ (Malaria); VIH, TB (vacunas candidatas)	Malaria, VIH, Hepatitis B (ensayos clínicos)	Nuvaxovid™ (NVX-CoV2373, COVID-19); Malaria
<b>Ventajas</b>	Activación eficiente de CD8 <sup>+</sup> ; reducción de la toxicidad de QS-21 mediante liposomas	Amplia estimulación inmune; adecuada para patógenos complejos	Activación eficiente de CD8 <sup>+</sup> ; autoensamblaje; reducción de la toxicidad de saponinas mediante matrices ISCOM
<b>Limitaciones</b>	Suministro limitado de QS-21; requiere formulación en liposomas	Suministro limitado de QS-21; estabilidad de la emulsión; posible reactividad antigénica	Suministro limitado de saponinas; complejidad en la formulación

## 1.4. *Quillaja brasiliensis* y sus ventajas

La gran ventaja que presenta la especie *Q. brasiliensis* es que las saponinas se encuentran presentes en las hojas, mientras que en *Q. saponaria* su principal fuente de extracción es la corteza del árbol. Esta diferencia es de gran importancia, ya que la obtención de saponinas a partir de la corteza implica la tala parcial o total del árbol, lo que puede afectar negativamente a la regeneración de la especie y generar un impacto ambiental significativo. En cambio, al encontrarse en las hojas, las saponinas de *Q. brasiliensis* pueden extraerse sin necesidad de dañar el árbol, permitiendo cosechas sucesivas de manera sostenible. Esto no solo garantiza una fuente renovable de estos compuestos, sino que también reduce los costos y la presión sobre los ecosistemas donde crecen estos árboles, favoreciendo la producción a largo plazo sin comprometer la biodiversidad ni la conservación de la especie.

A pesar de que *Q. brasiliensis* es reconocida como una fuente rica en saponinas triterpénicas, los estudios fitoquímicos sobre esta especie comenzaron relativamente tarde en comparación con su congénere *Q. saponaria*. En uno de los primeros trabajos pioneros, se identificó una prosapogenina derivada del ácido quillaico, glicosilada en la posición C-3 con un residuo de  $\beta$ -D-ácido glucurónico (GlcAp), a partir de productos de hidrólisis parcial. Este hallazgo sugirió que las saponinas de *Q. brasiliensis* podrían compartir similitudes estructurales con las de *Q. saponaria* (11).

Más recientemente, Wallace y colaboradores (9) realizaron los primeros estudios estructurales completos de las saponinas de *Q. brasiliensis* mediante espectrometría de masas por trampa de iones con ionización por electrospray y análisis en múltiples etapas (ESI-IT-MSn). Este análisis permitió la identificación de 27 saponinas triterpénicas bidesmósidicas, que presentaban como agliconas al ácido quillaico, la gypsogenina, el ácido fitolacínico y el ácido 23-O-acetil-fitolacínico. Las estructuras de estas saponinas mostraron patrones de glicosilación en las posiciones C-3 y C-28 de la aglicona, altamente conservados y análogos a los encontrados en las saponinas de *Q. saponaria*. También se identificaron saponinas equivalentes a QS-21. Recientemente, se evaluó una fracción purificada de saponinas conocida como QB-90 extraídas de *Quillaja brasiliensis* en la formación de ISCOMs (7).

Uno de los protocolos más conocidos de purificación de saponinas fue publicado por Yendo y colaboradores en 2017 (12), en donde se obtienen extractos acuosos a partir de las hojas seguido de la extracción de los compuestos más polares utilizando acetato de etilo y la precipitación de taninos con gelatina. Finalmente se realiza la purificación fraccionada mediante cromatografía en una columna C18 y elución con metanol. Aunque la fracción QB-90 (eluida con 90 % de metanol) es la más utilizada, las fracciones QB-80 y QB-100 (eluida con 80 % y 100 % de metanol, respectivamente) también muestran actividad coadyuvante de saponinas (13).

La principal limitación de las saponinas como adyuvantes es la posible toxicidad de las moléculas anfifílicas debido a su capacidad de interactuar con el colesterol en las membranas celulares de los mamíferos, alterando la integridad y la función de la membrana lo que se evalúa comúnmente a través de una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo* (6).

El compuesto QB-90 ha sido investigado por su potencial como inmunoadyuvante al ser co-administrado con antígenos virales en modelos murinos resultando ser menos tóxicos cuando se los administra por vía subcutánea en ratones en comparación con Quil-A®. Los estudios han demostrado que estas saponinas inducen una potente respuesta inmunitaria frente a antígenos virales, de manera similar a las de *Q. saponaria* (14).

En 2019, Wallace y colaboradores (9) aislaron y purificaron el compuesto QB1 el cual presenta una estructura similar a QS-21 (15). Para ello primero obtuvieron una fracción inmunoestimulante denominada fracción B a partir de un extracto acuoso de hojas de QB, mediante el fraccionamiento en columna C18. Posteriormente, la fracción B fue sometida a separaciones sucesivas utilizando cromatografía flash en sílica (MPLC) y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) con columna C18. Como resultado, se aislaron dos compuestos cuyas estructuras fueron determinadas mediante espectroscopia de RMN y espectrometría de masas. Uno de estos compuestos correspondió a una saponina triterpénica (Qb1), que es un isómero de QS-21 (13).

A continuación, en la Tabla 2 se presenta un análisis descriptivo llevado a cabo por Morais y colaboradores (13) donde se indican las respuestas inmunitarias inducidas por diferentes adyuvantes basados en saponinas derivados de *Quillaja brasiliensis*.

**Tabla 2:** Adyuvantes derivados de *Quillaja brasiliensis* con sus respuestas inmunitarias. AE: extracto acuoso; QB: fracción purificada de saponinas de *Q. brasiliensis*; IQB/IMXQB: formulaciones en matrices ISCOM; sc: vía subcutánea; in: vía intranasal; DTH: hipersensibilidad retardada; ↑: aumento en comparación con el grupo control. Adaptado de Morais y colaboradores (13).

Adyuvante	Antígeno	Tipo de respuesta inmune destacada	Aplicaciones / Observaciones
AE-sc	Herpesvirus (BoHV1, inactivado)	↑ IgG, IgG1, IgG2a/2c	Aumento de IFN- $\gamma$ e IL-2 en esplenocitos
QB-90-sc	Herpesvirus (BoHV5, inactivado)	↑ IgG2a/2c, IgG2b, IgG3, DTH	Aumento de citocinas IFN- $\gamma$ e IL-2
AE-sc	Poliovirus (Sabin 1, inactivado)	↑ IgG1, IgG2a/2c, IgA	Proliferación de esplenocitos y secreción de citocinas
QB-90-sc	Ovalbúmina (OVA)	↑ IgG, IgG1, IgG2a/2c	Estimulación de proliferación de esplenocitos
IQB-90-in	Influenza (vacuna fraccionada estacional)	↑ IgG, IgG1, IgG2a/2c, IgG3, IgA	Protección en ensayo de desafío y ahorro de dosis
IMXQB-sc	Influenza (vacuna fraccionada estacional)	↑ IgG e IgA	Respuesta mantenida 120 días en ratones viejos
IQB-80-sc	Zika (virus inactivado)	↑ IgG, IgG1, IgG2a/2c	Aumento de afinidad de anticuerpos
IQB-80-sc	Pestivirus (BVDV, inactivado)	↑ IgG1, IgG2a/2c	Producción de IFN- $\gamma$ en células T CD4+ y CD8+

## 1.5. Alternativas en producción de saponinas

El incremento en la demanda de saponinas plantea importantes desafíos en términos de velocidad de suministro y sostenibilidad. A su vez, las preocupaciones relacionadas con la preservación de los árboles de *Quillaja*, han puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos alternativos para la producción sostenible de estos compuestos. Entre las estrategias propuestas se encuentran la síntesis semisintética, procesos bioquímicos y técnicas de microcultivo agrícola de plantas o plántulas (16).

Un avance clave se logró recientemente con la identificación de las rutas enzimáticas fundamentales involucradas en la síntesis de saponinas inmunomoduladoras relacionadas con QS-21. Este descubrimiento abre oportunidades prometedoras para utilizar plataformas alternativas que combinan la bioingeniería con la química semisintética, con el objetivo de aumentar la producción de saponinas de manera más sostenible, además de permitir el diseño de nuevos coadyuvantes. A pesar de su potencial, ninguno de estos métodos ha sido aún aprobado ni ha demostrado ser suficientemente sostenible o rentable (4).

Una estrategia prometedora es el cultivo de células vegetales, donde la fermentación en suspensión celular de *Q. brasiliensis* podría permitir una producción escalable y consistente de saponinas, obtenida en forma de biomasa celular, extractos de biomasa y saponinas purificadas de manera individual (16). Sin embargo al día de hoy la investigación acerca del cultivo *in vitro*

de esta especie así como los métodos de extracción y purificación de sus metabolitos, sigue siendo muy escasa.

## **1.6. Características del cultivo *in vitro***

La propagación de la especie resulta un paso clave, dado que se trata de árboles con un crecimiento naturalmente lento. Implementar métodos de propagación eficientes permite obtener plantas en menor tiempo, lo que acelera los procesos de establecimiento, evaluación y producción. Esta rapidez en la obtención de ejemplares es fundamental para reducir los plazos de investigación, optimizar los programas de mejoramiento y asegurar la disponibilidad de material vegetal de calidad.

El cultivo *in vitro* puede iniciarse a partir de partes de la planta entera o de semillas germinadas de forma aséptica. Un requisito para introducir cualquier material en cultivo *in vitro* es la esterilización superficial con el fin de eliminar los microorganismos adheridos. Para eso suelen utilizarse soluciones acuosas de desinfectantes como hipoclorito de sodio.

Los explantes adecuados se transfieren a un medio semisólido con nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal, cultivándose en condiciones ambientales controladas. Según el material de partida y el medio utilizado, pueden establecerse diferentes tipos de cultivos, que se clasifican como cultivos celulares (suspensiones celulares, protoplastos o células gaméticas), cultivos de tejidos (callo o tejidos diferenciados) o cultivos de órganos (por ejemplo, brotes, raíces o embriones cigóticos). De igual forma se puede inducir la formación de callo (masas celulares desdiferenciadas) y al transferirse a un medio líquido, los callos pueden desintegrarse en pequeños agregados y células individuales, obteniéndose así cultivos en suspensión celular.

En el campo de la biotecnología, los cultivos de callo se utilizan exitosamente para la producción de metabolitos primarios y secundarios, y para la escalabilidad en la síntesis de compuestos bioactivos con aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria, cosmética y en procesos de fitorremediación. Esta capacidad se ve potenciada por la presencia de células totipotentes dentro del callo, que pueden regenerar plantas completas mediante organogénesis o embriogénesis somática (17). Además, aunque los cultivos de callo presentan una alta variabilidad genética, esta característica puede ser aprovechada para la generación de nuevas variedades vegetales o para el descubrimiento de metabolitos inéditos con potencial bioactivo. Como el callo suele ser bastante heterogéneo en cuanto a las propiedades bioquímicas de sus células, los cultivos en suspensión deben iniciarse a partir de pequeños agregados de callo, de modo que puedan desarrollarse líneas celulares homogéneas, idealmente de rápido crecimiento (17). Los cultivos en suspensión celular son una fuente potencial para la producción de metabolitos secundarios vegetales de alto valor, y durante las últimas décadas se han establecido cultivos de numerosas plantas medicinales (18).

Actualmente no existen protocolos estandarizados para el cultivo *in vitro* de *Q. brasiliensis* ni evaluaciones de su capacidad de producir saponinas, lo que justifica el presente trabajo

En una primera etapa, se evaluarán distintos medios de cultivo para la inducción de callos a partir de explantes de tallo y hoja, con el fin de establecer condiciones favorables para el inicio del cultivo celular. Posteriormente, se determinarán las condiciones óptimas para el cultivo celular de *Q. brasiliensis*, considerando variables como la concentración de reguladores del crecimiento, el tipo de medio y los parámetros físicos de incubación. Además, se evaluará la producción de saponinas mediante su extracción, purificación y caracterización, con el fin de establecer una correlación entre el comportamiento del cultivo y su capacidad biosintética.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Evaluar la capacidad de *Quillaja brasiliensis* para ser cultivada *in vitro* y su potencial como fuente de saponinas triterpénicas de interés farmacéutico.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Evaluar condiciones de crecimiento y propagación *in vitro* de *Q. brasiliensis*.
- Explorar condiciones para la inducción de callos a partir de tallo y hoja
- Analizar la presencia de saponinas en hojas y callos bajo las condiciones probadas

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental llevada a cabo para cumplir con los objetivos se esquematiza en la Figura 3. Brevemente se introdujeron 5 genotipos de la especie *Q. brasiliensis* al cultivo *in vitro* utilizando como explantes hojas y tallos. Se evaluaron distintos medios de cultivo y condiciones para la propagación e inducción de callos de la especie tanto en medio semisólido como en líquido. Luego se procedió a la extracción de las saponinas, para ello se realizaron extractos acuosos tanto de hojas como de callos se filtraron, se realizó una precipitación con gelatina seguida de una precipitación con acetato de etilo. Para la purificación se realizó una cromatografía líquida de alta resolución preparativa y finalmente se caracterizaron las saponinas mediante cromatografía de capa fina.



**Figura 3.** Esquema del procedimiento experimental para la obtención y purificación de saponinas a partir de *Quillaja brasiliensis*.

#### 3.2 Materiales

##### 3.2.1 Material vegetal

Se emplearon plántulas de origen seminal (no clonal), obtenidas a partir de semillas colectadas de un mismo árbol adulto de *Quillaja brasiliensis*.

##### 3.2.2 Medios de cultivo

**Tabla 3:** Woody Plant Medium (WPM)

Compuesto	mg/L
<b>Macronutrientes</b>	
Nitrato de Amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	400
Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	370
Sulfato de Potasio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )	990
Fosfato de Potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	170
<b>Micronutrientes</b>	
Acido Borico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	6.2

Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O)	0.25
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O)	22.3
Sulfato de Zinc (ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	8.6
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	0.25
<b>Otros componentes</b>	
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O)	96
Sodio EDTA (Na <sub>2</sub> -EDTA)	37.92
Sulfato Ferroso (FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	27.84

**Tabla 4: Medio Murashige-Skoog (MS)**

Compuesto	mg/L
<b>Macronutrientes</b>	
Nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1650
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O)	440
Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	370
Fosfato de Potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170
Nitrato de Potasio (KNO <sub>3</sub> )	1900
<b>Micronutrientes</b>	
Acido Borico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6.2
Cloruro de Cobalto (CoCl <sub>2</sub> *8H <sub>2</sub> O)	0.025
Sulfato de Cobre (CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O)	0.025
Sulfato de Manganeso (MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O)	22.3
Yoduro de Potasio (KI)	0.83
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	0.25
Sulfato de Zinc (ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	8.6
Sodio EDTA (Na <sub>2</sub> -EDTA)	37.2
Sulfato Ferroso (FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	27.8
<b>Vitaminas</b>	
Myo inositol	100
Tiamina	0.1
Piridoxina	0.5
Ácido nicotínico	0.5
Glicina	2

**Tabla 5:** Medio Finer and Nagasawa Lite (FNL)

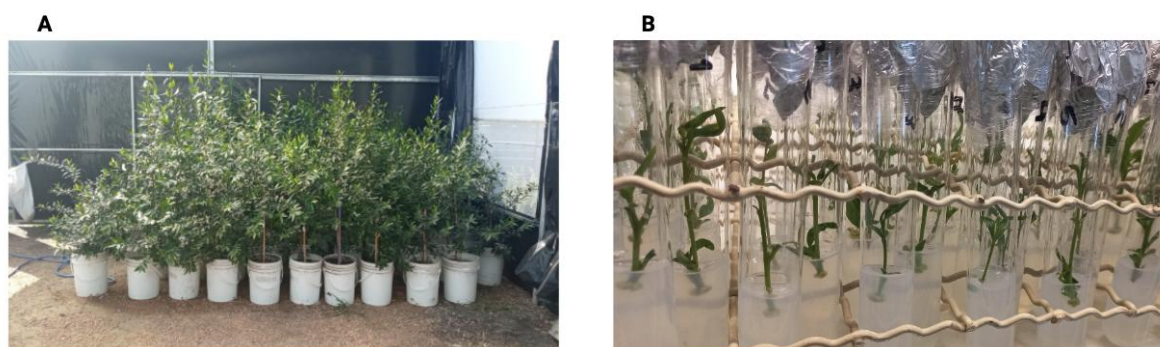
<b>Compuesto</b>	<b>mg/L</b>
<b>Macronutrientes</b>	
Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	463
Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	2830
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	370
Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	185
Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	300
<b>Micronutrientes</b>	
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	6.20
Sulfato de manganeso monohidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	22.3
Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	8.60
Molibdato de sodio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.250
Sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.025
Yoduro de potasio (KI)	0.830
Sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	27.8
Sodio EDTA ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ )	37.3
<b>Vitaminas</b>	
Myo inositol	100
Ácido nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina	10
Asparagina	1
Glutamina	20

### 3.3 Procedimientos generales

#### 3.3.1. Introducción y propagación de plantas en cultivo *in vitro*

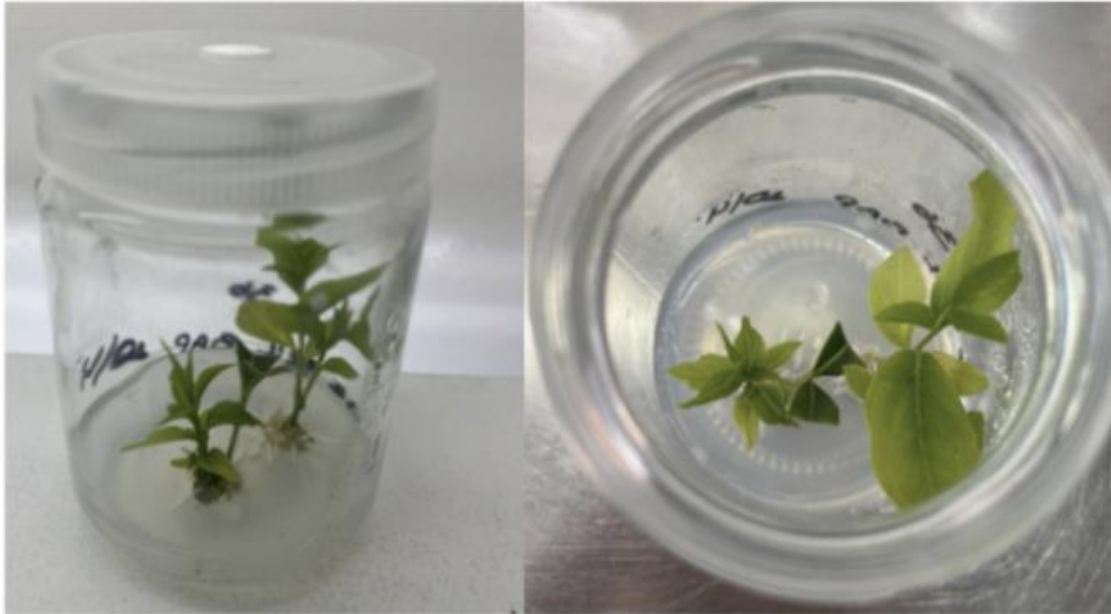
Los experimentos de cultivo *in vitro* de *Q. brasiliensis* se llevaron a cabo en el Laboratorio de cultivo *in vitro* de tejidos en INIA Las Brujas.

Se utilizaron explantes provenientes de la zona apical de plantas jóvenes de *Q. brasiliensis* (Figura 4A) los cuales fueron esterilizados mediante inmersión en solución de hipoclorito (20 g/L de Cloro activo y Tween 20 1 ml/L) por 5 minutos. Esto se realizó dos veces. Luego, se realizaron dos lavados con agua destilada. Posteriormente se cortaron en secciones de aproximadamente 10 cm y se colocaron en tubos de ensayo de 150 mm de altura y 20 mm de diámetro que contenían el medio de iniciación (Figura 4B) compuesto por medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) suplementado con 30g/L de sacarosa, 0,1 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP), 8g/L de Plant Agar (Duchefa) y pH 5,8. Este medio fue previamente autoclavado (20 min at 121 °C). Finalmente fueron ubicados en cámara de crecimiento bajo condiciones de luz y temperatura controlada. Fotoperíodo de 18 hs de luz 6 horas de oscuridad, con una intensidad lumínica de 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de  $24\pm 1^\circ\text{C}$ .



**Figura 4:** (A) Plantas jóvenes de *Q. brasiliensis* cultivadas en invernáculo y utilizadas para el cultivo *in vitro*. (B) Explantes introducidos en medio de iniciación WPM 30g/L de sacarosa, 0.1 mg/L BAP, 8 g/L de Plant Agar (Duchefa) y pH 5,8.

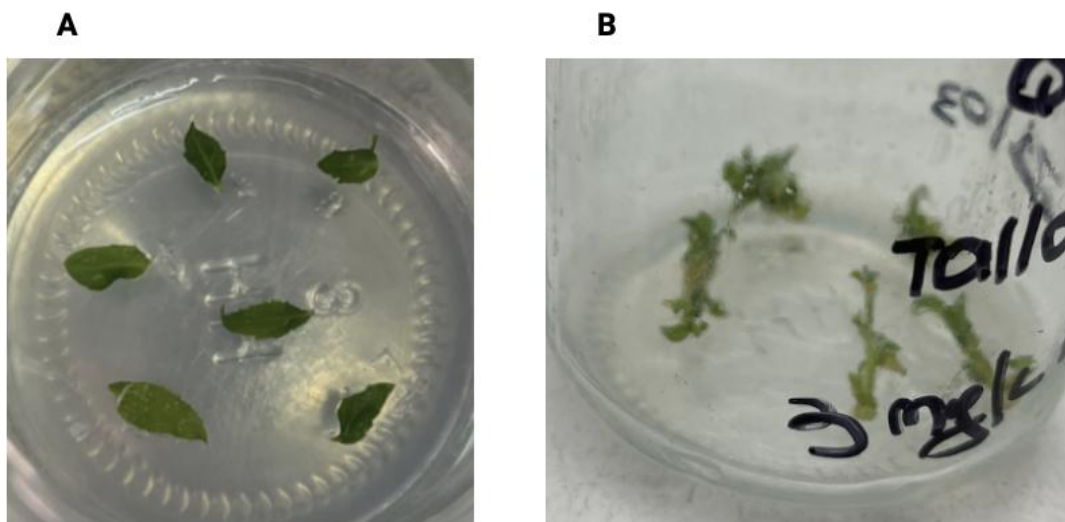
Se efectuaron observaciones cada 7 días descartando aquellos explantes contaminados. A las 4 semanas se pasaron a medio de multiplicación (Figura 5) compuesto por medio de cultivo WPM suplementado con 30 g/L de sacarosa, 0,5 mg/L BAP y 8g/L de Plant Agar (Duchefa) y pH 5,8. En este caso se utilizaron frascos de vidrio de 90 mm de altura y 60 mm de diámetro con filtro en la tapa, donde se colocaron 3 explantes por frasco. De igual forma se efectuaron observaciones cada 7 días, descartando los explantes contaminados.



**Figura 5:** Explantes en medio de multiplicación WPM suplementado con 30 g/L de sacarosa, 0,5 mg/L BAP, 8g/L de Plant Agar (Duchefa) y pH 5,8.

### 3.3.2. Inducción de callo

Para la inducción de callo se utilizaron hojas (Figura 6A) y tallos (Figura 6B) de plantas jóvenes de *Q. brasiliensis* que ya se encontraban en cultivo *in vitro*. Se utilizaron 43 tallos y 199 hojas de 5 genotipos distintos. Las hojas y tallos se colocaron en frascos de 90 mm de altura y 60 mm de diámetro, conteniendo medio WPM suplementado con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de Plant Agar (Duchefa) y pH de 5,8. El medio se preparó con dos concentraciones distintas de BAP, 1 mg/L o 3 mg/L. Los cultivos se incubaron con un fotoperíodo de 18 hs de luz 6 horas de oscuridad, con una intensidad lumínica de  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Después de 4 semanas se realizó una evaluación y clasificación del crecimiento del callo distinguiendo por genotipo, tipo de explante y tratamiento (1mg/L BAP o 3mg/L BAP) en donde se tabularon los valores obtenidos.



**Figura 6:** (A) Hojas en medio WPM 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de Plant Agar (Duchefa), 3 mg/L BAP y pH 5,8. Día 0 de inducción. (B) Tallos en medio WPM 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de Plant Agar (Duchefa), 3 mg/L BAP y pH 5,8. Día 0 de inducción.

Luego de 4 semanas de inducción de callo, el tejido fue separado de los explantes y colocado en nuevos frascos con medio fresco. En este caso el medio utilizado para la propagación de los callos fue WPM suplementado con 30g/L de sacarosa, 0,5 mg/L de BAP, 8g/L de Plant Agar (Duchefa) y pH 5,8. La propagación de los callos se llevó a cabo bajo las mismas condiciones experimentales. Luego de 2 meses el crecimiento relativo se calculó utilizando el peso fresco, se pesaron los callos al momento de la inoculación en el medio de subcultivo y al final del ciclo. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$CR = (\text{Peso fresco final} - \text{Peso fresco inicial}) / \text{Peso fresco inicial}.$$

### 3.3.3. Cultivo de células en suspensión

El cultivo de células en suspensión (Figura 7) se inició inoculando tejido de callo en 30 ml de medios líquidos Murashige-Skoog (MS) suplementado con 30 g/L de sacarosa 0,1 mg/L de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2 mg/L Adenina, 1 mg/L Kinetina y pH 5.7 y Finer and Nagasawa Lite (FNL) suplementado con 20 g/L de sacarosa, 1g/l de Asparagina, 20 mg/L de Glutamina y 5 mg/L de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), contenidos en matraces de 125 mL. Estos se incubaron a 25 °C en agitación, en shaker a 60 rpm durante 60 días (Figura 7). A continuación, las células en suspensión fueron recolectadas y centrifugadas; se descartó el sobrenadante y se pesaron las células obtenidas. Finalmente, se comparó esta masa con la cantidad de callo inicial para evaluar su crecimiento.



**Figura 7:** Matracas con células en suspensión en agitación a 60 rpm.

### **3.3.4. Tratamientos previos a la extracción de saponinas**

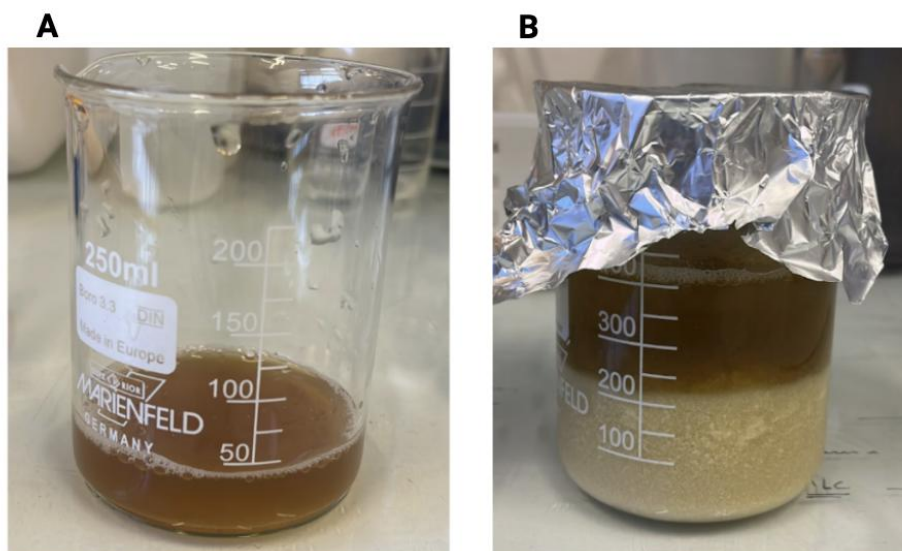
La extracción se realizó a partir del material de callo obtenido al momento y también de hojas jóvenes de plantas de *Q.brasiliensis* que se encontraban en invernáculo para comparar los perfiles de saponinas.

Para los tratamientos previos a la extracción de saponinas, en el caso de los callos, se recolectó una porción representativa del tejido obtenido, se pesó, se colocó en tubos falcon y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas durante 5 días. Por otro lado, el tratamiento de las hojas consistió en un secado en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 semana con el objetivo de eliminar la humedad antes de la extracción. Una vez obtenidos ambos tejidos deshidratados, fueron procesados utilizando una licuadora hasta obtener polvo.

### **3.3.5. Extracción de saponinas**

El proceso de extracción, purificación y caracterización de saponinas se realizó en la Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico - Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR. La obtención del extracto acuoso tanto de hojas como de callos se basó en el protocolo descrito por Yendo y colaboradores (12) con algunas modificaciones.

Para la extracción, el polvo vegetal se suspendió en agua destilada y se incubó en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$  ON. El extracto se filtró utilizando un colador con algodón y se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos. Para remover los taninos condensados, se adicionó una solución de gelatina al 2% y se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, promoviendo la formación de un precipitado (Figura 8). Luego se separó mediante centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos. El extracto clarificado se sometió a dos lavados con acetato de etilo descartando la fase orgánica tras cada repetición. Para la eliminación del solvente, el extracto acuoso se evaporó bajo agitación y calor. Finalmente, las muestras se congelaron en capa fina y se liofilizaron hasta obtener un extracto seco, el cual se conservó en condiciones de humedad y temperaturas controladas.



**Figura 8:** Precipitación de taninos en extractos acuosos. (A) Callos. (B) Hojas.

### **3.3.6 Purificación de saponinas por cromatografía líquida de alta resolución preparativa (*prep-HPLC*)**

Las fracciones liofilizadas obtenidas se resuspendieron en agua Milli-Q y se centrifugaron para luego ser sometidas a la *prep-HPLC*. Para la corrida cromatográfica, se empleó el equipo Pure C-850 FlashPrep (BUCHI) con una columna Flash Pure ID C18 de 12 g (BUCHI), utilizando como fase móvil una mezcla de agua y metanol. El método consistió en un gradiente de elución de 0 a 100% metanol, con un flujo de 30 mL/min o 20 mL/min y una duración total de 35 minutos. La recolección se configuró para capturar únicamente los picos detectados. La detección se realizó mediante espectrofotometría UV, con un umbral de 0,10 unidades de absorbancia (AU), y mediante un detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), con un umbral de 3 mV.

Las fracciones recolectadas se secaron utilizando un rotavapor, manteniendo una temperatura inferior a 45 °C para evitar la degradación de las saponinas. Una vez eliminados los residuos de solvente, las muestras se congelaron y posteriormente se sometieron a liofilización, con el fin de obtener los extractos secos correspondientes a cada fracción separada.

### **3.3.7. Caracterización de las fracciones por cromatografía de capa fina (TLC)**

Cada fracción obtenida del sistema *prep-HPLC* se analizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica gel. Para ello se resuspendieron las fracciones inicialmente en 50  $\mu$ L de agua Milli-Q y luego se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL utilizando metanol absoluto. Se aplicaron 100  $\mu$ L de cada muestra sobre la placa empleando una jeringa tipo Hamilton.

El desarrollo cromatográfico se llevó a cabo utilizando una fase móvil que consistió en la fase superior de una mezcla de 10 partes de ácido acético, 40 partes de agua Milli-Q y 50 partes de

1-butanol (en volumen). Cuando el disolvente alcanzó aproximadamente 1 cm del borde superior de la placa, ésta fue secada a temperatura ambiente y revelada con una solución de anisaldehído–H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Finalmente, se procedió al calentamiento de la placa a 105 °C para permitir la visualización de las manchas correspondientes a compuestos terpénicos.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Introducción y propagación de plantas en cultivo *in vitro*

La introducción y propagación de explantes se desarrollaron de forma exitosa. Se introdujeron 32 explantes conteniendo yemas jóvenes de dos genotipos distintos. Inicialmente se introdujeron en medio de iniciación WPM 0,1 mg/L BAP y luego se pasaron a medio de multiplicación WPM 0,5 mg/L BAP.

Los resultados obtenidos evidencian que *Q. brasiliensis* presenta una respuesta favorable al establecimiento *in vitro*, alcanzando un porcentaje de éxito del 80,6%. Este valor es elevado si se considera que en especies leñosas la fase de introducción suele ser una de las más críticas debido a la elevada incidencia de contaminaciones y a la posible recalcitrancia de los explantes. El hecho de que la especie responda positivamente tanto al medio de iniciación como al medio de multiplicación sugiere que *Q. brasiliensis* no presenta una fuerte dependencia de condiciones hormonales complejas para inducir la brotación y proliferación, lo cual representa una ventaja para el desarrollo de protocolos de micropropagación.

En conjunto, los resultados muestran que *Q. brasiliensis* no es una especie recalcitrante al cultivo *in vitro*, y que puede establecerse y multiplicarse bajo condiciones controladas. Este hallazgo constituye un punto de partida valioso para futuros trabajos orientados a la producción de metabolitos secundarios, como las saponinas, que tienen aplicaciones de alto valor agregado, especialmente como adyuvantes en vacunas.

### 4.2. Inducción de callo

Se evaluó la capacidad de diferentes explantes de *Q. brasiliensis* (hojas y tallos) para formar callo en medio WPM suplementado con 1 o 3 mg/L de BAP. A diferencia de lo reportado en otras especies leñosas, donde la callogénesis suele requerir la combinación de auxinas y citocininas, en este trabajo se probó únicamente el efecto de la citocinina BAP. Esta decisión metodológica permitió explorar la respuesta mínima de los tejidos a un regulador de crecimiento sin la influencia de auxinas.

En total se utilizaron 43 tallos y 199 hojas de 5 genotipos distintos en medios WPM suplementados con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de Plant Agar (Duchefa) y distintas concentraciones de BAP, 1 mg/L o 3 mg/L. Se logró establecer con éxito cultivo de callos a largo plazo. Luego de 40 días la inducción de callo se clasificó (Tabla 6) de acuerdo al genotipo, tipo de explante, tratamiento aplicado, y crecimiento del callo. Para esto último se realizó una escala en donde los números (0, 1, 3, 3) indican la escala convencional de crecimiento del callo. Siendo (1) callos de hasta 1mm de diámetro, (2) de 1 mm a 3 mm, (3) mayor a 3 mm, mientras que (0) indica que no hubo inducción de callo.

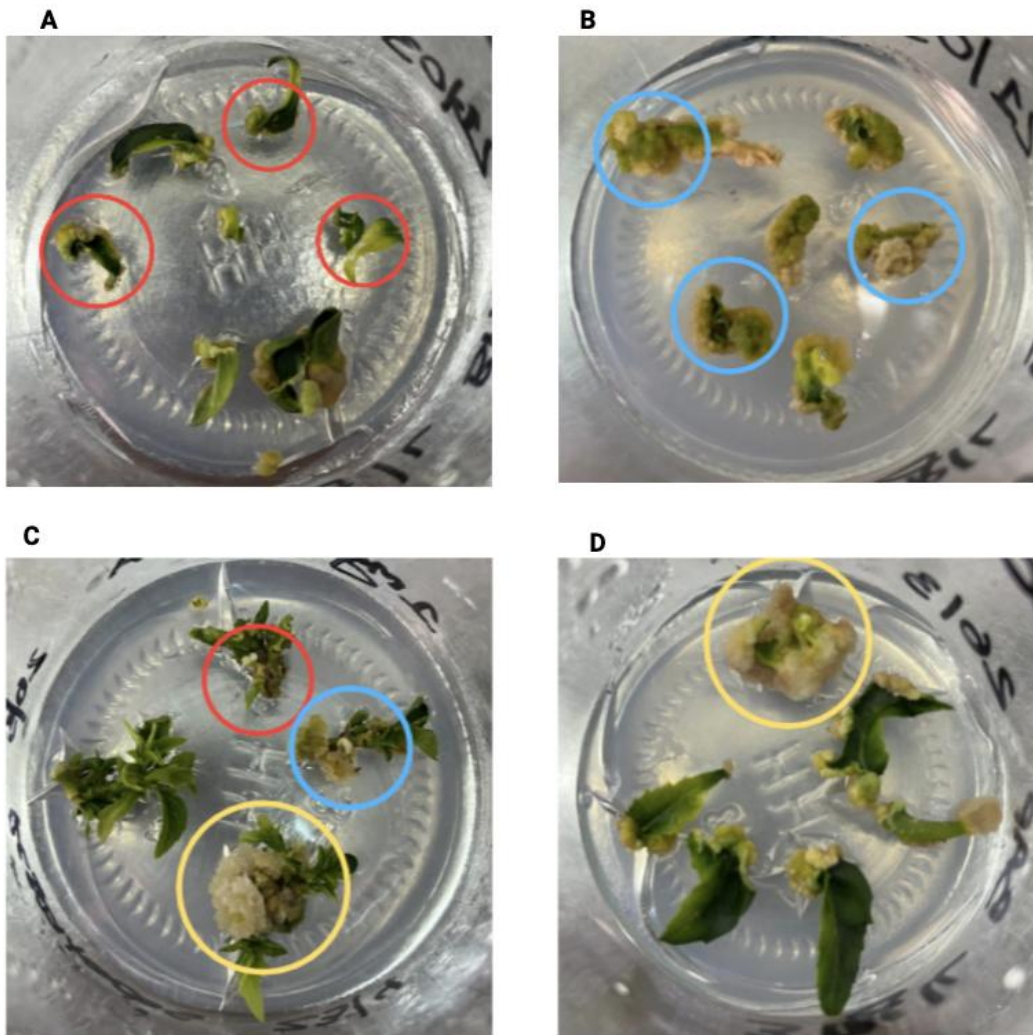
**Tabla 6:** Clasificación de la inducción de callo de acuerdo al genotipo, tipo de explante (tallo o hoja), tratamiento aplicado (1 mg/L de BAP o 3 mg/L de BAP) y crecimiento.

Genotipo	Tipo de explante	Tratamiento	Explantos totales	(0)	(1)	(2)	(3)
1	Hoja	1mg/L BAP	56	5.3%	32.2%	55%	3.5%
1	Hoja	3mg/L BAP	56	10.7%	10.7%	69.6%	8.9%
1	Tallo	1mg/L BAP	14	7.1%	7.1%	50%	-
1	Tallo	3mg/L BAP	7	14.2%	14.2%	71.4%	-
2	Hoja	1mg/L BAP	8	-	-	100%	-
2	Tallo	3mg/L BAP	5	-	100%	-	-
3	Hoja	1mg/L BAP	16	-	6.2%	93.7%	-
3	Hoja	3mg/L BAP	18	5.5%	50%	38.8%	5.5%
3	Tallo	1mg/L BAP	6	-	33.3%	66.6%	-
3	Tallo	3mg/L BAP	9	-	-	100%	-
4	Hoja	1mg/L BAP	12	-	83.3%	16.6%	-
4	Hoja	3mg/L BAP	25	-	8%	92%	-
4	Tallo	1mg/L BAP	7	-	28.5%	71.4%	-
4	Tallo	3mg/L BAP	3	-	-	66.6%	33.3%
5	Hoja	1mg/L BAP	22	-	13.6%	77.2%	9%
5	Hoja	3mg/L BAP	20	-	-	90%	10%
5	Tallo	1mg/L BAP	3	-	33.3%	66.6%	-
5	Tallo	3mg/L BAP	5	-	-	100%	-

En cuanto a los resultados obtenidos, se observó que en la mayoría de las combinaciones entre tratamiento y genotipo, el mayor porcentaje de crecimiento de callo se ubicó en la categoría de crecimiento (2), evidenciando que el protocolo utilizado presenta una alta eficiencia en la inducción de callo. Asimismo, la proporción de explantes sin respuesta (0) fue baja en la mayoría de los casos, lo que refuerza la efectividad del protocolo utilizado. En la Figura 9 se observan los explantes con formación de callo.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar si existían diferencias significativas entre las variables consideradas: tipo de explante, tratamiento y genotipo. Los resultados mostraron diferencias significativas ( $p = 0,021$ ) para la variable tipo de explante, siendo las hojas las que presentaron la mayor capacidad de inducción de callo. Este resultado resalta la importancia de la elección del explante como factor determinante en la eficiencia del proceso de inducción de callo.

Por otra parte, la ausencia de diferencias significativas entre genotipos indica que el protocolo presenta una aplicabilidad amplia, lo que constituye una ventaja para su implementación en programas de cultivo *in vitro* con distintos materiales.



**Figura 9:** Explantes a los 40 días de inducción. **(A)** Hojas con formación de callo en medio WPM 3 mg/L BAP. En rojo escala de crecimiento (1). **(B)** Hojas con formación de callo en medio WPM 3 mg/L BAP. En celeste escala de crecimiento (2). **(C)** Tallos con formación de callo en medio WPM 3 mg/L BAP. En amarillo escala de crecimiento (3). **(D)** Hojas con formación de callo en medio WPM 1mg/L BAP. En celeste escala de crecimiento (2) , en rojo (1) y en amarillo (3).

Se realizaron subcultivos periódicos de callos de forma de preservar la biomasa. Se constató que el medio WPM 0,5 mg/L BAP es eficiente para la propagación de callo. El crecimiento relativo luego de 2 meses de inducción mostró un crecimiento promedio del 10%.

### 4.3. Cultivo de células en suspensión

Después de 60 días de observación el callo cultivado en medio líquido no mostró un aumento en peso fresco del tejido ni cambio de color en ninguno de los dos medios utilizados, MS y

FNL. Si bien los cultivos líquidos en suspensión de células vegetales son utilizados en muchas especies para la obtención de metabolitos secundarios de importancia farmacéutica, resultó ser inefectivo para *Q. brasiliensis* con los medios y condiciones estudiadas en este trabajo.

El crecimiento y la producción de metabolitos en cultivos celulares pueden variar tanto entre especies vegetales como dentro de la misma especie. Diversos factores pueden influir en estos parámetros, tales como la edad de la línea celular, las condiciones de crecimiento, las características genéticas, la variación somaclonal, entre otros (10).

En relación con las condiciones del cultivo de células en suspensión, el medio más utilizado en este tipo de cultivos es el MS. En el presente trabajo, se decidió evaluar además el medio FNL el cual es ampliamente utilizado en embriones somáticos en soja. Las condiciones de cultivo implementadas consistieron en incubación a 25 °C con agitación en un agitador orbital a 60 rpm durante 60 días. Estos parámetros se encuentran respaldados por estudios previos, los cuales indican que la temperatura óptima para el crecimiento de células vegetales en suspensión se sitúa en un rango de 20 °C a 30 °C, y que una agitación de entre 40 y 60 rpm favorece la proliferación celular (19).

Otro factor relevante en la producción de metabolitos secundarios es la elicitación. Como se mencionó previamente, las saponinas cumplen roles importantes en la defensa de las plantas contra patógenos, plagas y herbívoros debido a sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitarias e insecticidas. Muchas plantas sintetizan y acumulan saponinas durante el crecimiento y desarrollo normal. La distribución de estos productos naturales varía enormemente entre especies vegetales, plantas individuales, órganos y tejidos, durante el desarrollo y la maduración, y muestra fluctuaciones estacionales. Algunos estudios han sugerido que las variaciones en la distribución, composición y cantidad de saponinas en las plantas pueden reflejar diferentes necesidades de protección vegetal. En varias especies, incluidas las del género *Quillaja*, la producción de saponinas se induce en respuesta al estrés biótico, incluyendo la herbivoría y el ataque de patógenos. Factores de estrés abiótico, como la humedad, la carencia de nutrientes, la luz y la temperatura, pueden influir tanto en la calidad como en la cantidad del contenido de saponinas. El aumento de los niveles de saponinas en respuesta al estrés suele estar mediado por la activación transcripcional de genes biosintéticos a través de una compleja cascada de señalización que involucra las hormonas jasmonato y salicilato. De esta forma, la biosíntesis de estos compuestos se puede inducir mediante elicitores para mejorar los rendimientos (19).

Específicamente en *Q. brasiliensis*, se ha demostrado que diversos estímulos abióticos y bióticos (ácido salicílico, ácido jasmónico, agentes osmóticos, ultrasonido y luz UV) inducen la acumulación de saponinas (10). Magedans y colaboradores (10) reportaron tratamientos de elicitación específicos como ácido salicílico a 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, ácido jasmónico a 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, sorbitol al 1 % o 2 % (m/v), y ultrasonido (baño ultrasónico durante 1 min, frecuencia fija de 40 kHz, 135 W).

Antes de inducir la producción de saponinas mediante elicitación, el estado fisiológico de las células es clave para lograr rendimientos óptimos. Se ha observado que la depleción de

nitrógeno previo a la elicitación prepara a las células, aumentando significativamente la producción de saponinas. Aunque el nitrógeno es esencial para el crecimiento celular, las células pueden mantenerse y proliferar, de manera limitada, en su ausencia o con concentraciones reducidas. Se ha reportado que esta fase de depleción de nitrógeno constituye un paso previo necesario para garantizar la eficacia de los tratamientos de elicitación. En cultivos de células en suspensión de *Q. saponaria*, se ha reportado que la depleción de nitrógeno mejoró la acumulación de saponinas. Además, se detalla que la obtención de rendimientos de QS-21 de aproximadamente 11.4 µg/g de peso fresco se logró mediante procedimientos optimizados que combinaban la elicitación con jasmonato de metilo (MeJA) y la privación de nitrógeno (10,19).

En el presente trabajo no se aplicaron tratamientos de elicitación ni estrategias de depleción de la fuente de nitrógeno, dado que al momento de la implementación de los cultivos celulares en suspensión no se disponía de antecedentes reportados en la literatura. Este hecho pudo haber constituido un factor determinante en la obtención de resultados por debajo de lo esperado.

#### **4.4. Purificación de saponinas por cromatografía líquida de alta resolución preparativa (*prep-HPLC*)**

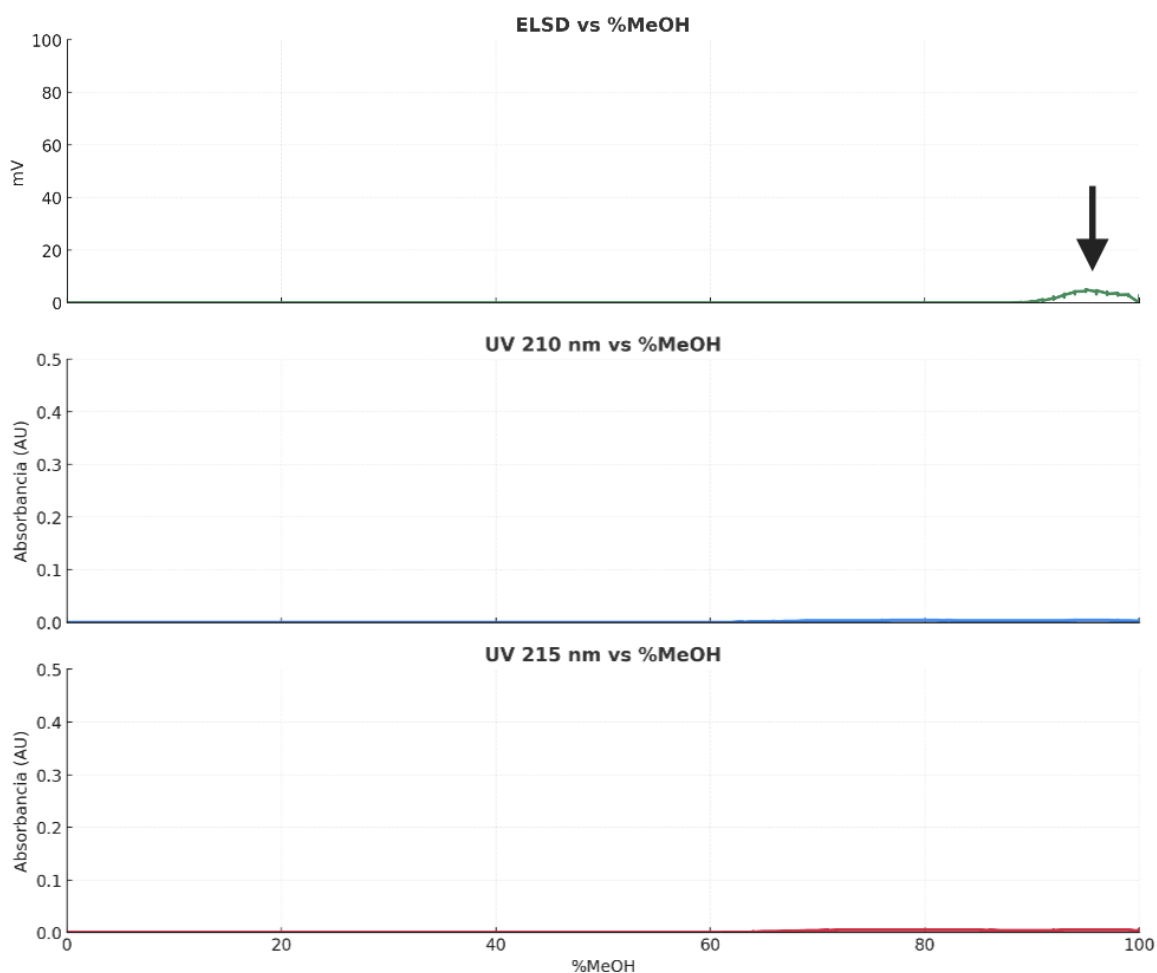
La purificación de saponinas por *prep-HPLC* se realizó a partir de extractos de callo cultivados de forma *in vitro* en medio semisólido, para los cuales no se distinguió por genotipo y de hojas jóvenes de dos genotipos de *Q. brasiliensis* cultivadas en invernáculo, con el objetivo de comparar los perfiles cromatográficos y analizarla composición de las saponinas presentes.

El análisis se llevó a cabo en un sistema Pure C-850 FlashPrep (BUCHI). La detección se realizó mediante absorbancia UV a 210 y 214 nm, longitudes de onda en las que pueden detectarse algunos cromóforos presentes en saponinas triterpénicas y con el detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) para aquellas que carecen de cromóforo (20).

Considerando que las saponinas del género *Quillaja* presentan un núcleo triterpenoide muy hidrofóbico, suelen estar glicosiladas con 2 o más cadenas de azúcares y, en algunos casos, aciladas con ácidos grasos que les confieren fuerte carácter anfipático (21), la separación se realizó en una columna C18 en fase estacionaria apolar, empleando un gradiente de metanol/agua, flujo de 20 mL/min o 30 mL/min y un tiempo de corrida de 35 min.

De acuerdo con Yendo y colaboradores (12) la fracción QB-90 eluye a 90% de metanol y QB-80 y QB-100 eluyen en 80%-100% de metanol por ello se recolectaron las fracciones a partir del 70% de metanol en adelante.

Los cromatogramas obtenidos se compararon con el estándar comercial Quil-A ®, una mezcla heterogénea de saponinas de la corteza de *Q. saponaria* muy utilizada en vacunas veterinarias (6). El cromatograma del estándar comercial (Figura 10) presentó un solo pico entre 90-100% de metanol detectado por el ELSD correspondiente a las saponinas sin cromóforo.

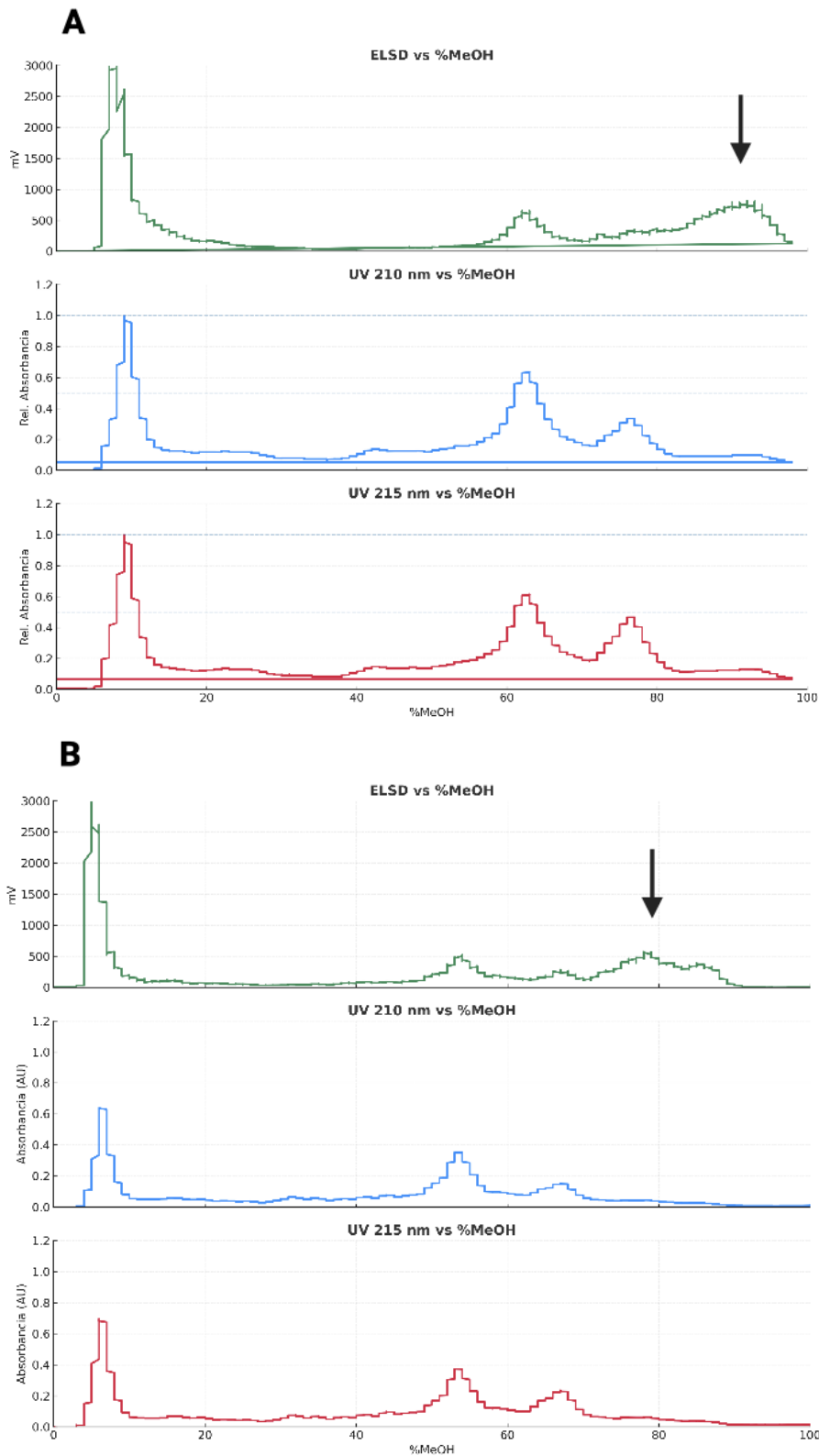


**Figura 10:** Cromatograma obtenido por *prep-HPLC* con detección ELSD y UV (210 y 214 nm) del extracto del estándar comercial Quil-A®. La separación se realizó en una columna C18 con un gradiente de metanol/agua, flujo de 20 mL/min y un tiempo de corrida de 35 min. La flecha indica el pico de interés.

Tanto en la corrida a partir de hojas jóvenes de *Q. brasiliensis* genotipo 1 (Figura 11A) como en las hojas genotipo 2 (Figura 11B) se obtuvieron diferentes picos que eluyen a diferentes tiempos y porcentajes de la fase móvil metanol/agua correspondientes a diferentes compuestos presentes en las muestras. En la fase inicial del gradiente (0-20% de Metanol) se detectan los compuestos más hidrofílicos mientras que en la región intermedia-tardía (60-100% de Metanol) aparecen picos correspondientes a los compuestos menos polares como las saponinas triterpénicas de *Quillaja* detectadas por el ELSD que se evidencian con los picos en verde y las detectadas por el UV a 210 y 215 nm en rojo y azul respectivamente.

La corrida cromatográfica de hojas del genotipo 1 se realizó a un flujo de 20 mL/min y sensibilidad de detección baja mientras que la muestra de hojas genotipo 2 se corrió a 30 mL/min y sensibilidad de detección alta. Esta diferencia metodológica podría haber contribuido a que los picos en la corrida del genotipo 2 se observan ligeramente mejor resueltos que en la del genotipo 1.

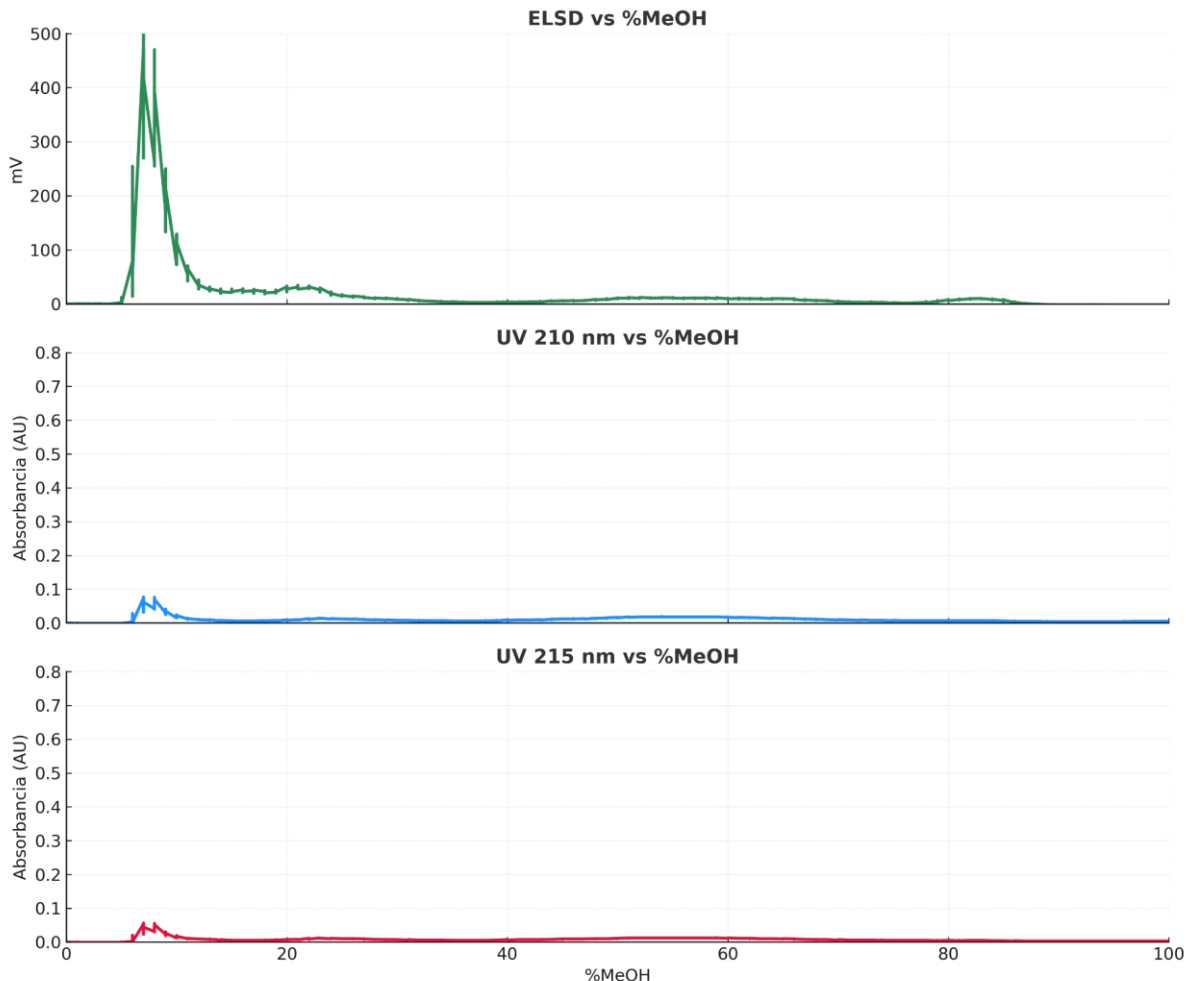
El pico de interés correspondiente a las saponinas triterpénicas aparece en ambos cromatogramas eluidas con porcentajes de metanol entre 70-100, lo cual concuerda con el pico obtenido en el cromatograma del estándar comercial Quil-A® y lo reportado en bibliografía.



**Figura 11:** Cromatogramas obtenidos por prep-HPLC de extractos de hojas jóvenes de *Q. brasiliensis* cultivadas en invernáculo. **(A)** Genotipo 1 y **(B)** Genotipo 2. Las señales se registraron mediante

detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD, verde) y absorbancia UV a 210 nm (azul) y 215 nm (rojo). La separación se realizó en columna C18 empleando un gradiente metanol/agua, con un flujo de 20 mL/min (A) y 30 mL/min (B), sensibilidad de detección baja (A) o alta (B), y un tiempo total de corrida de 35 min. La flecha representa el pico de interés.

En contraste, el cromatograma obtenido a partir de callos de *Q. brasiliensis* (3 meses de inducción) mostró únicamente algunos picos en la región hidrofílica temprana; sin señales compatibles con saponinas en la zona de 70%-100% de Metanol (Figura 12).



**Figura 12.** Cromatograma obtenido por prep-HPLC del extracto de callos de *Q. brasiliensis*. Las señales se registraron mediante detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD, verde) y absorbancia UV a 210 nm (azul) y 215 nm (rojo). La separación se realizó en columna C18 empleando un gradiente metanol/agua, con un flujo de 30 mL/min, sensibilidad de detección alta y un tiempo total de corrida de 35 min.

La ausencia de saponinas detectables en callos puede atribuirse a varios factores. Se sabe que el crecimiento y la producción de metabolitos en cultivos celulares pueden variar tanto entre especies vegetales como dentro de la misma especie. Varios factores pueden influir en estos parámetros, tales como la edad de la línea celular, las condiciones de crecimiento, las características genéticas, la variación somaclonal, entre otros.

Algunas especies productoras de saponinas han demostrado una correlación directa entre el crecimiento y la acumulación de metabolitos (10). Teniendo en cuenta que los callos fueron obtenidos de plantas jóvenes de no más de 2 años y que los callos tienen apenas 3 meses de inducción podría ser un factor importante a considerar en estos resultados obtenidos.

Con respecto al tiempo de inducción de los callos Dalsgaard K y colaboradores (22) reportaron que el tiempo mínimo necesario para considerar la línea celular de callo lo más estable posible son 6 meses, luego de ese tiempo se recomienda analizarlos para estimar el contenido de saponinas. No obstante, en el presente trabajo, debido a limitaciones de tiempo y a la escasez de reportes bibliográficos disponibles al momento de la inducción, se optó por establecer un período de inducción de 3 meses.

Otro factor que se encontró que puede influir en la síntesis de saponinas a partir de callo es el tipo de explante que se utiliza para la inducción. Ha sido reportado recientemente que utilizando directamente los entrenudos como explantes en lugar de otras partes como nudos y hojas se obtienen mejores resultados ya que la biosíntesis de saponinas ocurre en la parte del floema del tallo (22). Teniendo en cuenta que en este trabajo se utilizaron hojas y tallos para la inducción podría ser otro factor que contribuyó a la ausencia de resultados esperados.

Como ya se mencionó, las condiciones de crecimiento en general pueden afectar la biosíntesis de las saponinas. La composición del medio durante el ciclo de crecimiento parece ser otro factor determinante para el crecimiento y la acumulación de saponinas. Recientemente Magedans y colaboradores (10) en el primer reporte de producción de QS-21 en cultivos celulares de *Q. brasiliensis*, verificaron la presencia de QS-21 en los cultivos celulares al utilizar el medio MS suplementado con 3 % (m/v) de sacarosa, ácido naftalenacético a 5 mg/L y kinetina a 1 mg/L a los 9 meses de cultivo.

En el presente trabajo, el medio de inducción de callo consistió en WPM suplementado con 30 g/L de sacarosa y dos concentraciones de BAP, 1 mg/L o 3 mg/L. Al comparar los medios utilizados en ambos estudios, el medio MS se destaca como el más empleado en cultivos de tejidos vegetales, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Este medio se caracteriza por presentar altos niveles de nitrógeno, en forma de nitrato y amonio, con una proporción relativamente elevada de amonio respecto a nitrato, y es considerado particularmente eficaz para la regeneración de plantas. En contraste, el medio WPM fue formulado específicamente para especies leñosas, y contiene menores cantidades de sales macronutrientes en comparación con el MS. En particular, presenta menor concentración total de nitrógeno y de amonio, lo que lo hace más adecuado para el cultivo de especies leñosas. De esta forma, la elección del medio WPM resulta coherente, dado que *Q. brasiliensis* corresponde a una especie leñosa.

En cuanto a los reguladores de crecimiento, en esta investigación se empleó únicamente la citocinina BAP sin la adición de auxinas. Diversos autores (23) han demostrado que el uso exclusivo de citocininas, o una relación elevada de citocinina respecto a auxina favorece la formación y proliferación de brotes (organogénesis) en lugar de la proliferación de callo

indiferenciado. Así mismo se ha reportado que auxinas como ácido  $\alpha$ -Naftalenacético (NAA) y ácido Indol-3-butírico (IBA) son las más utilizadas en cultivo *in vitro* mientras que la Kinetina (KIN) es una citocina de uso común, todas ellas capaces de estimular la proliferación de callo o células.

En este sentido, la estrategia experimental empleada por Magedans y colaboradores (10), que utiliza ácido naftalenacético (5 mg/L) en combinación con kinetina (1 mg/L), se presenta como una alternativa más apropiada que la aplicada en el presente trabajo. Dicho enfoque ha demostrado ser eficaz no solo en la inducción de calogénesis, sino también en la obtención de QS-21 en cultivos celulares, además de encontrarse sólidamente respaldado por la literatura.

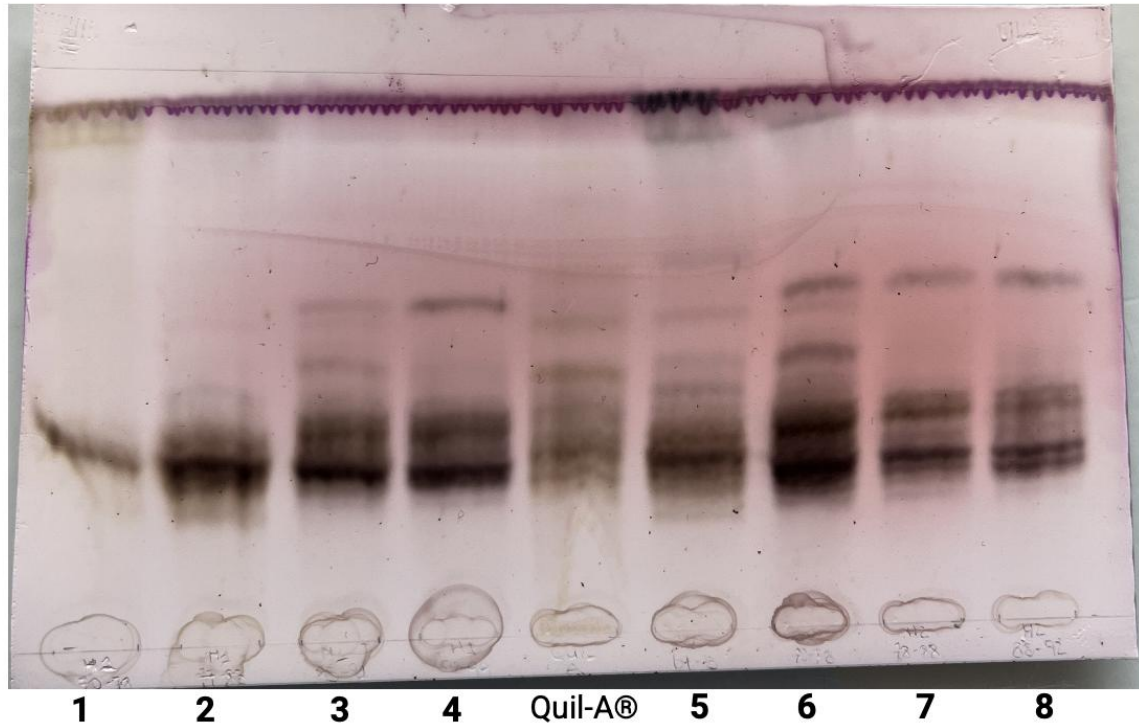
Finalmente, deben considerarse las diferencias en los protocolos todo de extracción de las saponinas. Mientras que en la presente investigación se utilizó un método adaptado de Yendo y colaboradores (2017) (12) desarrollado para hojas, Magedans y colaboradores (2025) (10) aplicaron un procedimiento optimizado para callos, que incluyó liofilización previa, homogenización, extracción acuosa 1:100 p/v, sonicación, centrifugación y posterior liofilización. Estas diferencias metodológicas pueden haber reducido la eficiencia de extracción en el presente estudio y contribuido a la falta de detección.

#### **4.5 Caracterización de las fracciones por cromatografía de capa fina (TLC)**

Las fracciones obtenidas a partir del sistema *prep-HPLC* de hojas jóvenes de *Q. brasiliensis* (genotipos 1 y 2) fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica gel, con el objetivo de caracterizar las saponinas extraídas. Se empleó como fase móvil la capa superior de una mezcla de 10 partes de ácido acético, 40 partes de agua y 50 partes de 1-butanol (10:40:50 v/v) y como revelador anisaldehído-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con calentamiento.

En el caso de los callos, no se realizó TLC dado que en el análisis cromatográfico previo (*prep-HPLC*) no se detectaron picos atribuibles a saponinas ni a compuestos relacionados.

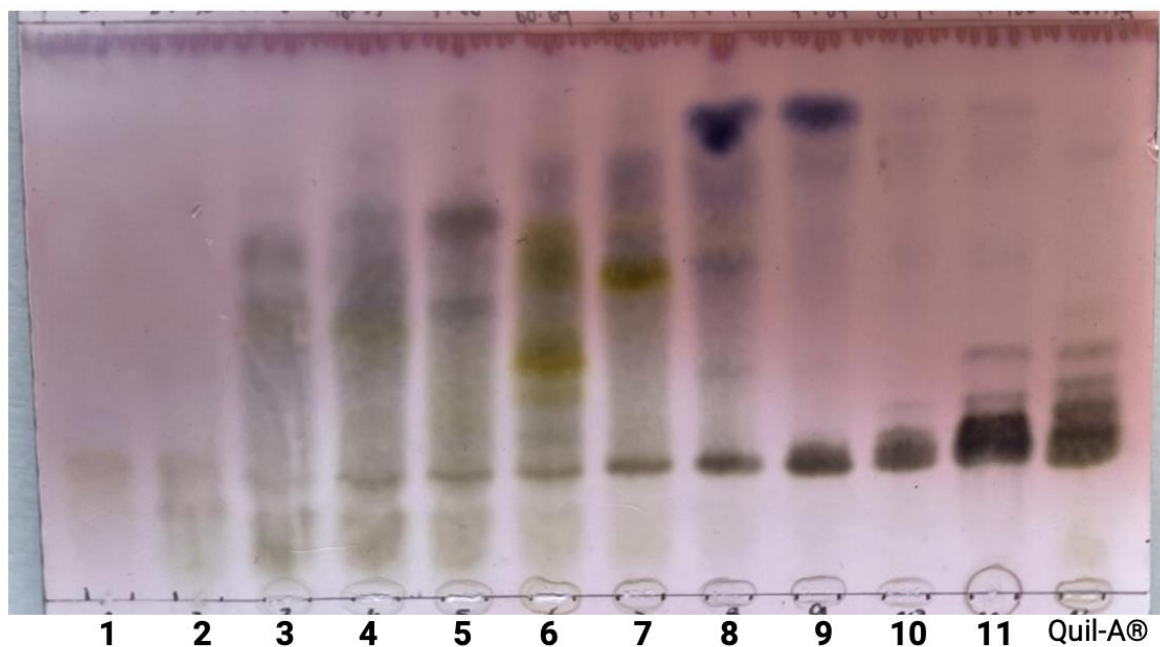
En la Figura 13 se presentan los perfiles de TLC correspondientes a las fracciones eluidas con  $\geq 70\%$  de metanol a partir de hojas jóvenes de ambos genotipos, junto con el estándar comercial Quil-A® y, a modo comparativo, un cromatograma de hojas adultas de *Q. brasiliensis* proporcionado por la Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico - Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR.



**Figura 13:** Cromatografía en capa fina de las fracciones de 70% de metanol en adelante de las hojas genotipo 1, genotipo 2 y del estándar comercial Quil-A. Del carril 1 al 4 se encuentran las fracciones correspondientes a las hojas genotipo 1. En el carril 1 se encuentra la fracción de 70-78% de Metanol, carril 2 la fracción de 77-85% de Metanol, carril 3 la fracción de 85-91% de Metanol, carril 4 fracciones de 92-99% de Metanol. En el centro de la placa se encuentra el estándar Quil-A. En el carril 5 se encuentra la fracción de 69-73% de Metanol, carril 6 la fracción de 72-78% de Metanol, carril 7 la fracción de 78-88% de Metanol, carril 8 fracciones de 88-92% de Metanol.

En las fracciones de hojas jóvenes se observan múltiples bandas características, cuya cantidad disminuyó progresivamente a medida que aumenta el porcentaje de metanol, lo que indica un incremento en la pureza de las fracciones. En particular, las fracciones de 92-99% (genotipo 1) y 78-88% y 85-99% (genotipo 2) mostraron un patrón más definido y con menor cantidad de bandas accesorias. La mayoría de las bandas coincidieron en posición y coloración con las del estándar Quil-A®, lo que respalda la presencia de saponinas en las muestras analizadas. Cabe destacar que, en estas condiciones, algunas fracciones presentan menos bandas adicionales que en el estándar, lo que sugiere una mayor pureza relativa bajo las condiciones ensayadas.

El cromatograma proporcionado por el Instituto de Higiene (Figura 14) mostró perfiles a lo largo de todo el gradiente metanol/agua, incluyendo compuestos adicionales como flavonoides (coloración amarilla). En las fracciones de hojas jóvenes no se detectaron señales atribuibles a este tipo de compuestos, lo cual resulta favorable dado que no constituían compuestos de interés en este estudio. De manera consistente con lo observado en hojas jóvenes, las fracciones eluidas con mayor proporción de metanol presentaron una reducción progresiva de bandas accesorias, y en el rango  $\geq 70$  % de metanol los patrones resultaron comparables a los obtenidos a partir de hojas jóvenes, mostrando nuevamente una pureza relativa superior a la del estándar comercial Quil-A®.



**Figura 14:** Cromatografía en capa fina de las fracciones correspondientes a todo el gradiente metanol/agua de una muestra de hojas adultas de *Q.brasiliensis*. La misma pertenece a la Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico - Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR. Carril 1 fracción correspondiente a 14-21% de metanol, carril 2, 21-30% de metanol, carril 3, 39-46% de metanol, carril 4, 46-53% de metanol, carril 5, 53-60% de metanol, carril 6, 60-69 % de metanol, carril 7, 69-77% de metanol, carril 8, 77-79% de metanol, carril 9, 79-87% de metanol, carril 10, 87-91% de metanol, carril 11, 91-100% de metanol y carril 12 estándar comercial de Quil-A.

## 4.6 Análisis del rendimiento de saponinas

Luego de la extracción y caracterización de saponinas de las diferentes muestras, tanto de callos como de hojas jóvenes de *Q. brasiliensis*, se analizaron los rendimientos obtenidos (Tabla 7). La tabla resume, para cada material, el peso seco inicial, los mg de extracto acuoso liofilizado obtenidos de cada muestra después de la extracción, el rendimiento del extracto acuoso, los mg de las fracciones ricas en saponinas obtenidas luego de la purificación por *prep-HPLC* y el rendimiento de las misma con respecto al peso seco. También se encuentran datos de rendimientos proporcionados por la Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico - Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR. de fracciones ricas en saponinas obtenidas de hojas de árboles adultos de *Q.brasiliensis* que se encuentran en el Parque José Batlle y Ordoñez, Montevideo, Uruguay.

En hojas jóvenes, los rendimientos de extracto acuoso fueron de 12,7% (genotipo 1) y 14,3% (genotipo 2) respecto al peso seco. En lo que respecta al rendimiento de las fracciones ricas en saponinas obtenidas luego de la purificación por *prep-HPLC* estas fueron relativamente bajas,

siendo el máximo rendimiento 0,014 % del peso seco. Estos valores deben considerarse preliminares, dado que solo se evaluaron dos genotipos y sin repeticiones biológicas.

En comparación, las hojas adultas presentaron un porcentaje mayor de fracciones ricas en saponinas que las hojas jóvenes.

Estas variaciones de resultados podrían atribuirse a las condiciones en las que se desarrollaron las plantas. Por un lado, las hojas jóvenes provienen de individuos cultivados en invernáculos, bajo condiciones controladas de radiación UV, temperatura y humedad, lo que implica una menor exposición a factores de estrés tanto bióticos como abióticos. En cambio, las plantas adultas se desarrollaron a la intemperie, expuestas a fluctuaciones extremas de temperatura, radiación UV, contaminación ambiental y presión biótica (herbivoría y patógenos). La relevancia de estos factores radica en que la biosíntesis de saponinas está fuertemente asociada a mecanismos de defensa inducidos por estrés biótico y abiótico, como se discutió anteriormente, de esta forma las plantas desarrolladas en un ambiente más hostil pueden haber producido una mayor cantidad de saponinas como mecanismo de defensa frente al estrés biótico y abiótico.

En consecuencia, para establecer comparaciones concluyentes sobre los rendimientos de saponinas entre hojas jóvenes y adultas, sería necesario evaluar a ambos grupos de plantas bajo condiciones experimentales equivalentes.

En lo que respecta a los callos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* en medio sólido de plantas jóvenes de *Q. brasiliensis*, el rendimiento del extracto acuoso fue de 4,75 % del peso seco y no fue posible detectar fracciones ricas en saponinas en los análisis realizados.

**Tabla 7:** Rendimientos de saponinas obtenidos a partir de hojas jóvenes y adultas de *Quillaja brasiliensis*, así como de callos cultivados *in vitro* derivados de hojas jóvenes.

	<b>Muestra (g)</b>	<b>Extracto acuoso (mg)</b>	<b>Rendimiento extracto acuoso liofilizado (%)</b>	<b>Fracciones ricas en saponinas (mg)</b>	<b>Rendimiento fracciones ricas en saponinas (%)</b>
<b>Hojas genotipo 1</b>	74	9.700	12,7	<b>QB 70-78:</b> 2,4 <b>QB 77-85:</b> 5,1 <b>QB 85-91:</b> 10,4 <b>QB 92-99:</b> 3,3	0,0032 0,0068 0,014 0,0044
<b>Hojas genotipo 2</b>	46	6.600	14,3	<b>QB 69-73:</b> 8,2 <b>QB 72-78:</b> 6,8 <b>QB 78-88:</b> 6,8 <b>QB 88-92:</b> 2,5	0,011 0,0091 0,0091 0,0033
<b>Hojas adultas</b>	100	10.400	10,4	<b>QB 70:</b> 51 <b>QB 80:</b> 21 <b>QB 90:</b> 71 <b>QB 100:</b> 0	0.051 0.021 0.071 0
<b>Callos</b>	10	475	4,75	-	-

## 5. Conclusiones

En este trabajo se logró propagar exitosamente la especie *Quillaja brasiliensis in vitro*, lo que constituye un avance significativo para el manejo y aprovechamiento sostenible de esta especie como fuente de saponinas. Los resultados mostraron que *Q. brasiliensis* no es recalcitrante para su cultivo *in vitro*, logrando resultados satisfactorios en las etapas de introducción, propagación e inducción de callos. En contraste, el crecimiento de células en suspensión en medio líquido no fue exitoso, lo que sugiere la necesidad de evaluar nuevos medios y condiciones como los reportados recientemente.

La extracción, purificación y caracterización de saponinas a partir de hojas se llevaron a cabo de forma exitosa, permitiendo obtener fracciones enriquecidas en estos metabolitos. Sin embargo, los extractos derivados de callos, tras los procesos de extracción y purificación no evidenciaron la presencia de saponinas.

En conjunto, los resultados obtenidos constituyen un primer paso hacia el desarrollo de una estrategia sostenible para la producción de saponinas a partir de *Q. brasiliensis*. No obstante, será necesario optimizar las condiciones de cultivo *in vitro* y profundizar en el estudio de las rutas metabólicas involucradas, con el fin de incrementar los rendimientos y asegurar la viabilidad de esta aproximación biotecnológica.

## 6. Perspectivas a futuro

Dado que los resultados obtenidos son preliminares y carecen de las repeticiones necesarias para considerarlos concluyentes, un primer paso será repetir los ensayos realizados aplicando las correcciones metodológicas sugeridas, con el fin de optimizar el cultivo celular de *Q. brasiliensis*

Una vez alcanzada esta optimización, será posible avanzar hacia la caracterización y cuantificación de las saponinas producidas. La cuantificación de saponinas totales podría realizarse mediante el método colorimétrico de vainillina-ácido perclórico utilizando QB-90 como estándar, seguido de un enriquecimiento de las fracciones mediante cromatografía de fase sólida (Sep-Pack C18) para obtener fracciones más puras. Estas fracciones podrían caracterizarse inicialmente por TLC utilizando diferentes solventes de extracción (acuoso, etanólico y partición con butanol) y confirmadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV y ELSD, empleando estándares de QS-21. Asimismo, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) permitiría establecer un perfil más detallado de las saponinas presentes.

Finalmente, como medida preliminar de seguridad se deberán realizar ensayos de actividad hemolítica de forma de compararlos con Quil-A y extractos de hojas. Para medir su eficacia se deberán realizar pruebas de actividad adyuvante en modelos animales de vacunación evaluando la capacidad de inducir diferentes subtipos de anticuerpos.

De este modo, el trabajo podría avanzar desde la caracterización química hacia la validación biológica, generando información relevante tanto para la optimización de la producción *in vitro* como para explorar aplicaciones biotecnológicas de las saponinas de *Quillaja brasiliensis*.

## 7. Referencias bibliográficas

1. Fleck JD, Schwambach J, Almeida ME, Yendo ACA, de Costa F, Gosmann G, et al. Immunoadjuvant saponin production in seedlings and micropropagated plants of *Quillaja brasiliensis*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 2009;45(6):715–20.
2. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*. 2013;4(MAY):1–10.
3. Schijns VEJC, Lavelle EC. Trends in vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(4):539–50.
4. Lv X, Martin J, Hoover H, Joshi B, Wilkens M, Ullisch DA, et al. Chemical and biological characterization of vaccine adjuvant QS-21 produced via plant cell culture. *iScience* [Internet]. 2024;27(3):109006. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109006>
5. Review A. molecules Potential Immunoregulatory Mechanism of Plant Saponins : 2024.
6. Morais V, Suarez N, Cibulski S, Silveira F. Leaf Saponins of *Quillaja brasiliensis* as Powerful Vaccine Adjuvants. 2025;1–28.
7. Fleck JD, Betti AH, Pereira da Silva F, Troian EA, Olivaro C, Ferreira F, et al. Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: Particular chemical characteristics and biological activities. *Molecules*. 2019;24(1).
8. Mastrogiovanni M. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRIMARIA DE SAPONINAS DE *Quillaja brasiliensis*. 2012;48. Available from: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/1442/1/uy24-16066.pdf>
9. Pifferi C, Fuentes R, Fernández- Tejada A. Carlo Pifferi , Roberto Fuentes and Alberto Fernández- Tejada. *Nat Rev Chem*. 2021;5(March):197–216.
10. Magedans, Y.V., Yendo, A.C., Zachert, E., Klauss, M.C., Cibulski, S., Silveira, F.L, do Nascimento, Y.M, da Silva, F.M, Silva, M.S, Roehe, P.M, Koetz, M., Zuanazzi, J.Â.S, Fett- Neto, A.G, Sourcing the vaccine adjuvant QS-21 and related saponins from cell cultures of *Quillaja lancifolia* (Brazilian soap tree), *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103724>.

11. Kauffmann C, Machado AM, Fleck JD, Provensi G, Pires VS, Guillaume D, et al. Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Nat Prod Res*. 2004;18(2):153–7.
12. Yendo ACA, de Costa F, Kauffmann C, Fleck JD, Gosmann G, Fett-Neto AG. Purification of an immunoadjuvant Saponin fraction from *Quillaja brasiliensis* leaves by reversed-phase silica gel chromatography. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1494:87–93.
13. Morais V, Suarez N, Silveira F. Methods of saponin purification from *Quillaja* sp. for vaccine adjuvant production. *Frontiers in Natural Products*. 2025;3(January):1–8.
14. Silveira F, Cibulski SP, Varela AP, Marqués JM, Chabalgoity A, de Costa 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* [Internet]. 2011;29(49):9177–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.137>
15. Wallace F, Bennadji Z, Ferreira F, Olivaro C. 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*. 2019;30(6):644–52.
16. Guerra F, Sepúlveda S. Saponin production from quillaja genus species. An insight into its applications and biology. *Sci Agric*. 2020;78(5):1–9.
17. Bojko M, Kędra M, Adamska A, Jakubowska Z, Tuleja M, Myśliwa-Kurdziel B. Induction and Characteristics of Callus Cultures of the Medicinal Plant *Tussilago farfara* L. *Plants*. 2024;13(21):1–22.
18. Wawrosch C, Zotchev SB. Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies—status and outlook. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2021;105(18):6649–68. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11539-w>
19. MATHY, Gregory. Saponin production. EP4419141A1; 024-08-28
20. Negi JS, Singh P, Pant GJN, Rawat MSM. High-performance liquid chromatography analysis of plant saponins: An update 2005-2010. *Pharmacogn Rev*. 2011;5(10):155–8.
21. Reichert CL, Salminen H, Weiss J. *Quillaja* Saponin Characteristics and Functional Properties. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2019;10:43–73.
22. Dalsgaard K, Henry M. United States Patent 5,716,848. 1998;(US005716848A).

23. Phillips GC, Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 2019;55(3):242–57.