

LA CORTEZA DE QUILLAY (*QUILLAJA SAPONARIA* MOL.), UN RECURSO DE LA FARMACOPEA INTERNACIONAL

por

Gloria Montenegro^{1,2}, Raúl C. Peña¹ & Bárbara N. Timmermann²

Resumen

Montenegro, G., Peña, R. C., & B. N. Timmermann. La corteza de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.), un recurso de la farmacopea internacional. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 25(96): 421-427, ISSN 0370-3908.

La corteza de quillay es un recurso de la farmacopea internacional. Se entregan los antecedentes farmacognósticos para una caracterización de la droga que se obtiene de *Quillaja saponaria* Mol.

Palabras claves: *Quillaja saponaria*, corteza de quillay, Chile, anatomía, farmacopea.

Abstract

The bark of quillay (*Quillaja saponaria* Mol.), a resource of the international pharmacopoeia. Historical pharmacological knowledge is evaluated to provide a characterization of the drug derived from *Quillaja saponaria* Mol.

Key words: *Quillaja saponaria*, bark, Chile Anatomy, pharmacopoeia.

Introducción

Quillaja saponaria Molina o quillay, es un árbol de las Rosaceae de Chile. El nombre *Quillaja* viene del vernáculo *quillai* que es una modificación de la palabra *quillean*, que significa lavar. El nombre coloquial hace referencia a la saponinas detergentes presentes en la cor-

teza. Es un árbol siempreverde delgado, erecto de 15 m. De alto con ramas péndulas. Las hojas verdes ovales de 2-4 cm long. y de 1-2,5 cm de ancho, márgenes ligeramente dentados y que se hacen casi enteros hacia la base. Flores blanquecino-ebúrneas estrelladas, de una 1-1,5 mm de diámetro; se producen libremente en los extremos de las ramas durante octubre a enero (Mayo a Junio en el hemisferio

¹ Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Av. Vicuña Mackenna 4860, Casilla 306, Santiago-22, Chile

² Department of Pharmacognosy and Toxicology, College of Pharmacy, The University of Arizona, Tucson 85719 U. S. A.

norte) (Fig 1). El fruto un polifolículo constituido por 5 lóbulos bivalvos coriáceos (1,3 cm de largo) que maduran en el otoño, mide unos 2-5 cm de diámetro. Las semillas numerosas, comprimidas, de 5-7 mm de largo, 1-2 mm de ancho, terminadas en alas membranáceas de 6-7 de largo y 4-5 mm de ancho.

El árbol, *Quillaja*, es resistente al frío, soporta inviernos crudos. Es tolerante a suelos adversos y soporta condiciones de sequía pero se ve mucho mejor cuando se le da irrigación regular de profundidad o cuando se planta en un prado. Las plantas jóvenes tienden a ser arbustivas y necesitan poda ocasional cuando joven pero eventualmente forman árboles angostos, casi columnares que son ideales para confines angostos. Otro uso es para un seto alto.

Junto con sus características ornamentales el quillay posee varias virtudes adicionales (Anónimo 1995). Una que se puede explotar mientras todavía posee características ornamentales es que este árbol es atrayente para insectos benéficos. Cornflower Farms of Elk Grove, California ha estado comercializando este árbol como una "Planta de insectos Beneficiosos", que atrae al jardín insectos tales como neurópteros, sírfidos (*Scaeva pyrastris*, *Eupeodes volucris*, *Metasyrphus* spp., *Melanostoma*), cochinelidos y avispas (Bugg 1992).

El otro atributo tiene que ver con las sustancias presentes en la corteza que ha causado tanto revuelo médico como también ha puesto a la planta en las listas de plantas tóxicas. *Quillaja saponaria* está catalogada en *Poisonous Plants of California* (Fuller & McClintock 1986) debido a los glicósidos de saponinas tóxicas. Estas toxinas afectan típicamente a los animales de sangre fría pero si el tracto gastrointestinal de sangre caliente ha su-



Figura 1. Detalle de la flor de *Quillaja saponaria* Mol. (Original de M.-T. Eyzaguirre)

frido una injuria ello puede absorberse. Las plantas que contienen saponinas son típicamente amargas al gusto y también a veces al ramonear. Es la corteza de *Quillaja* que contiene la saponina y no existe antecedente de cualquier tóxico conocido asociado con ella. En los estudios médicos recientes es esta misma saponina la que ha sido determinada con este potencial. La saponina QS-21, derivada de la corteza de *Q. saponaria*, ha mostrado gran potencial como un coadyuvante para un número de vacunas. Desgraciadamente ésta ha provocado la caída de las poblaciones nativas del árbol en Chile y ha despertado un interés como cultivo mayor agrícola (San Martín & Briones 1999).

Los principales mercados para la saponina y corteza actualmente son Estados Unidos, India, Argentina y Dinamarca para la primera y EE UU., Japón, Alemania y Holanda, en orden de importancia para la segunda. Una estimación de los valores de exportación de corteza asciende a 4.062 millones US\$ FOB para la corteza y 16.700 de US\$ FOB para la saponina. Una proyección de las tendencias de exportación podría moverse entre 1.000 y 1.200 ton., históricamente el promedio fue de 783 toneladas. Para el período, es decir hasta el 2002 en corteza y ninguna para la saponina (Vermeil de Conchard 1998).

Material y Método

Las muestras, de corteza de quillay, adquiridas en el comercio minorista local se sometieron a las técnicas ya descritas en (Montenegro et al. 1999). Las preparaciones se conservan en el Laboratorio de Botánica, Departamento de Ciencias Vegetales, Avda. Vicuña Mackenna 4860, Santiago-22, Chile.

Farmacognosia (Jackson & Snowdon 1968) (Fig. 2)

Un polvo rosado con un sabor desagradable y gusto acre, es fuertemente estornutatorio.

Los caracteres diagnósticos son:

a) Las abundantes fibras que aparecen aisladas o, más generalmente, en grupos asociados con los radios medulares en sección longitudinal tangencial. Las fibras individuales son de perfil irregulares con paredes lignificadas de grosor variable y presentando un lumen desigual; frecuentemente torcidas y las fibras adyacentes en un grupo que es entrelazada para formar una masa compacta.

b) Los cristales de oxalato de calcio característicos, que son muy abundantes (Fig. 3); se presentan frecuentemente como prismas alargados grandes algunos cristales menores aparecen como cúbicos o en forma de pastillas.

Los cristales generalmente se encuentran diseminados y los mayores generalmente fragmentados.

c) El tejido criboso y los radios medulares del floema. Los tubos cribosos son grandes y de paredes delgadas y ocasionalmente exhiben áreas cribosas en las paredes transversales. El parénquima floemático posee paredes delgadas y a veces ligeramente perforado en las paredes radiales; las células frecuentemente contienen gránulos de almidón u ocasionalmente grandes prismas de oxalato de calcio y muchos de ellos llenos con una sustancia amorfa parda pálida. Los radios medulares son generalmente multiseriados, como se ve en sección longitudinal tangencial, y se encuentran ocasionalmente asociadas con

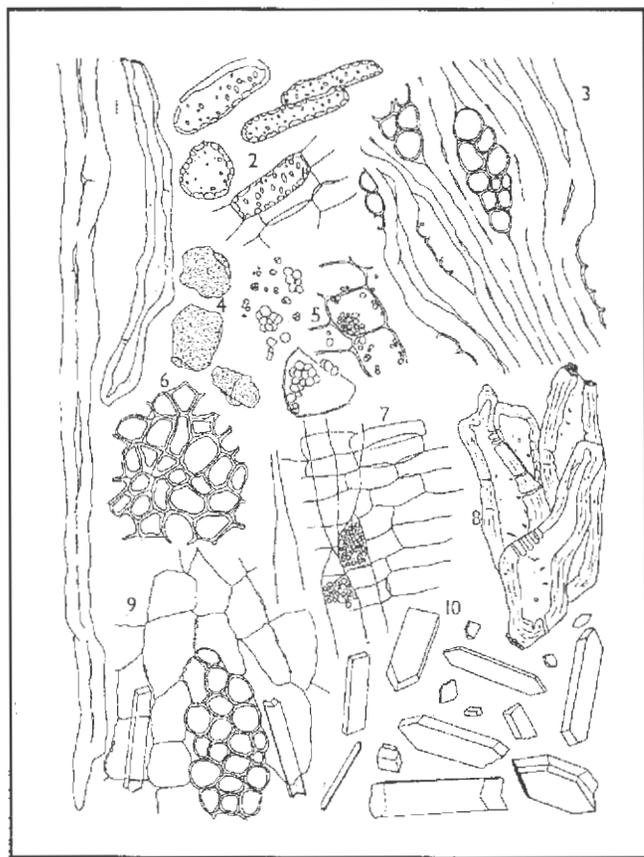


Figura 2. Esquema de las características morfológicas diagnósticas en el polvo de corteza de *Quillaja*. 1. Porciones de fibras aisladas. 2. Esclereidas pequeñas con paredes delgadas y perforaciones amplias. 3. Parte de un grupo de fibras y radios medulares en sección longitudinal tangencial. 4. Fragmentos de cuerpos pardos amorfos. 5. Gránulos de almidón, algunos incluidos en el parénquima. 6. Súber en vista superficial. 7. Tubos cribosos, áreas cribosas de un radio medular en sección longitudinal radial. 8. Esclereidas mayores con paredes gruesas y pocas punteaduras. 9. Parenquima floemático y parte de un radio medular en sección longitudinal tangencial y 10. Cristales de oxalato de calcio (x 300).

los tubos cribosos y el parénquima floemático, pero más comúnmente aparecen asociadas con los grupos de fibras; las células poseen paredes delgadas.

d) Las esclereidas de dos tipos se encuentran a veces. Aquellas de un tipo son bastante pequeñas, de perfil cuadrado o rectangular u oval y tienen paredes que son estriadas no definidas y atravesados por unos pocos poros bastantes pequeños. Ambos tipos de esclereidas aparecen aisladas o más frecuentemente en pequeños grupos.

e) Los gránulos de almidón bastante abundantes; estos son pequeños, simples o esféricos aunque unos pocos gránulos son compuestos y se encuentran hasta de cuatro o más; se encuentran diseminados o más frecuentemente como masas compuestas en el parénquima.

f) Los fragmentos escasos de súber pardo rojizos compuestos de células irregulares con paredes moderadamente gruesas y que poseen un contenido pardo amorfo

g) Los fragmentos angulares bastante largo de materia parda amorfa.

Fitoquímica

Quil A

Es una mezcla de varios componentes, que se resuelven en HPLC de fase reversa (Kensil et al. 1991). La Quil

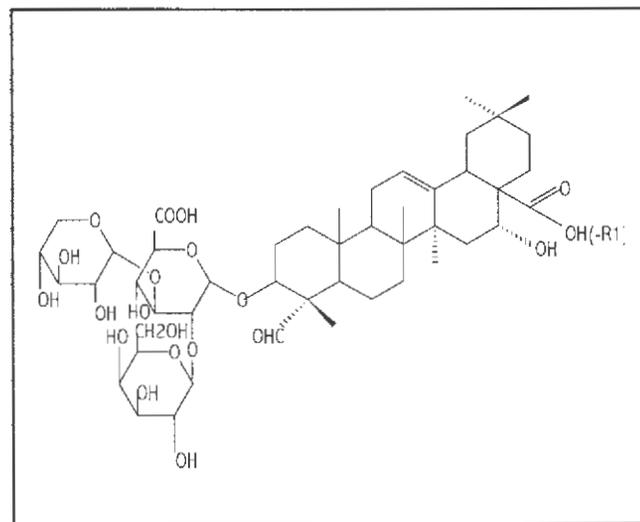


Figura 3. Estructura de la saponina de *Quillaja saponaria* QS-L1. En una fracción anteriormente informada QS21, en la posición R1 se encontraba glicosidada (Redibujada de Hong-Soeb So et al. 1997). Un Glicósido del ácido quillájico con ácido glucurónico, xilosa y galactosa

A es la base de la tecnología ISCOM (Morein et al. 1984), un coadyuvante poderoso con características peculiares v.g. la capacidad de estimular tanto la inmunidad celular como la humoral (Kamstrup et al. 2000)

QS-21

Un grupo danés en colaboración con el Departamento de Ingeniería de nuestra universidad ha estado investigando la posibilidad de obtener producto de mayor homogeneidad. Sin embargo, la variabilidad intraespecífica todavía es notable. Y la composición definida es un paso inicial para la introducción de estas sustancias en la producción de vacunas para uso humano.

La base de datos EAFUS (1995) (nombre derivado del acrónimo "Everything" Added to Food in the United States: literalmente, todo lo que se agrega a los alimentos en los EE.UU.) del Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) dependiente de la FDA consigna dos productos con estudios toxicológicos a saber el "extracto de Quillaja" (Chem. Abstract. Nr. 068990-67-0) y la corteza de "Quillaja saponaria" (CAS Nr. 977002-27-9).

Los estudios de la parte no triterpénica son escasos. Sin embargo, Steinbeck et al. (1995) aislaron el glicósido 4-metil-7-hidroxifitalido y otros compuestos, que pueden dar cuenta de la toxicidad de los productos sin purificar

Se fraccionó por separación consecutiva sobre tres diferentes sistemas de fase reversa HPLC QH-B. Ocho compuestos se aislaron y sus estructuras se elucidaron principalmente por análisis de glúcidos NMR espectroscopía. Las estructuras consistían de derivados de ácido quillájico con dos trisacáridos en C-3, β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-[α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcpA y β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Xilp-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcpA, y un tetra- o pentasacárido en C-28, β -D-Xilp-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fucp y β -D-Apif-(1 \rightarrow 3)- β -D-Xilp-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fucp. Estos compuestos estaban sustituidos con un grupo acilo en O-3 u O-4 del residuo de fucosa, que se ligan al azúcar del C-28 del ácido quillájico.

Se obtuvo una fracción de saponinas de *Q. saponaria* por separaciones consecutivas de tres sistemas de fase reversa en HPLC. Ocho compuestos aislados con sus correspondientes estructuras consistentes en derivados del ácido quillájico sustituido con dos trisacáridos diferentes C-3, β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-[α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcpA y β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Xilp-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcpA, y un tetra- o pentasacárido en C-28, β -D-Xilp-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fucp y β -D-Apif-(1 \rightarrow 3)- β -D-Xilp-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fucp. Es-

tos compuestos se sustituyen ulteriormente con O-3 u O-4 de un residuo de fucosa, el que está ligado a un azúcar en C-28 del ácido quillájico. Se aislaron tres saponinas nuevas de extracto comercial de corteza de *Q. saponaria*. Estos compuestos se obtuvieron por degradación de productos de saponinas mayores en este extracto cuando se trataban con álcali fuerte. Los compuestos se caracterizaban, usando principalmente espectroscopía de NMR, espectrometría de masa y métodos químicos, como ácido quillájico 3-O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosidurónico, 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosidurónico y 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosidurónico, respectivamente (Guo et al. 1998, Nyberg et al. 2000).

Un derivado 3, 28 O-bisglicosídico del ácido quillájico el QS-7 es afín a QS21; con algunas diferencias un grado superior de glicosilación y una unidad acilo graso mucho más corta. Estas diferencias se correlacionaban con una actividad lítica menor contra eritrocito de cordero (Kensil et al. 1998).

De las cuatro fracciones obtenidas por Kensil et al. - (1991) QS7, QS17, QS18 y QS21 - un grupo del Instituto de Biotecnología de Corea obtuvo una saponina purificada nueva que denominaron QSL1 (Fig. 3), y reanalizaron la restante ya conocidas, resultando la menos tóxica la fracción 21 (Hong-Soeb So et al. 1997). La subfracción QS-L1 aumenta la respuesta inmune humoral y celular al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. La toxicidad de esta fracción es menor que las de fracciones ya conocidas de la literatura. A diferencia de las anteriores precisa de la administración del antígeno precipitado con sales de aluminio. Las fracciones de Kensil et al (1991) poseían propiedades coadyuvantes aún en ausencia de tal activación.

Farmacología

El desarrollo de vacunas

La investigación de vacunas está progresando en dos direcciones: el desarrollo de cepas vivas atenuadas y el perfeccionamiento de las vacunas actuales mediante adición de coadyuvantes. El efecto deseable de aumentar

Esta mezcla se diseñó cuidadosamente y se demostró inducía una muy fuerte respuesta anticuerpos, respuesta celular inmune efectora fuerte (TH1 primariamente) y respuestas DTH, como también de ella clase I de MHC restrictivas a CTL (células T citolíticas). Este coadyuvante mientras es claramente más potente que alumbre es también más reactogénico. Sin embargo es todavía compatible con

el uso diseminado en humanos, sea para la prevención de enfermedades graves, o imprevisibles actualmente (paludismo, HIV...) o para el tratamiento de infecciones ya establecidas o enfermedades no infecciosas, tales como hepatitis B crónica, infecciones HPV crónicas, y cáncer.

El complejo inmunostimulante (ISCOM) es una formulación de vacuna que combina una presentación multimérica de antígeno con un coadyuvante incorporado. Posee una estructura de caja compuesta de saponinas de *Quillaja*, colesterol, fosfolípidos, y proteína. Típicamente, ISCOMs poseen simetría icosaédrica, de 30-40 nm de diámetro, y se compone de subunidades anulares 12-nm.

El procedimiento de preparación de ISCOMs comprende la disolución de las proteínas anfipáticas en detergentes preferentemente no iónicos, adición de saponinas de *Quillaja*, colesterol, y fosfatidilcolina. En presencia de proteínas anfipáticas, se forman las partículas ISCOM por remoción del detergente. Si no hay proteína (antígeno) en la mezcla, se forma la matriz ISCOM. Los componentes exclusivos de la matriz ISCOM son los glicósidos de *Quillaja* con una afinidad única al colesterol facilitando la estabilidad del complejo.

Los antígenos portados por ISCOM inducen una respuesta inmune aumentada, celular, reacción de hipersensibilidad retardada, y respuesta linfocito T citotóxica bajo la restricción MHC clase I. Las expresiones aumentadas de las moléculas MHC clase II también han sido ponderadas en inmunización primaria como también de repetición con ISCOMs.

Las formulaciones experimentales de vacuna ISCOM han inducido inmunidad protectora contra un número de microorganismos comprendiendo virus incluyendo retrovirus, parásitos y bacterias en varias especies, incluyendo primates.

Actividad coadyuvante y toxicidad de los glicósidos Iscom

Está bien establecido que los iscoms funcionan eficientemente como un sistema antígeno y protector inmune ha sido evocado contra una variedad de agentes infecciosos. La saponina coadyuvante de *Q. saponaria* es responsable de la actividad inmunoestimulante fuerte exhibida por iscom. Sin embargo, para poder usar los iscoms en vacunas para humanos es necesario determinar las propiedades inmunológicas y la toxicidad de los componentes químicamente definidos. Así, se ha determinado la actividad coadyuvante y toxicidad de los componentes aislados de *Quillaja*, como también formuladas en partículas, a saber la

matriz iscom. Los componentes purificados de *Quillaja* y las formulaciones de matrices iscom se examinan por su actividad coadyuvante en un sistema modelo ratón consistente en un antígeno contra el virus de la influenza y saponinas de *Quillaja*. Se demostraba que un componente de *Quillaja*, denominado QH-C, como componente libre o en una matriz iscom, posee una actividad coadyuvante potente, pero poca o ninguna toxicidad al nivel de dosis ensayado. Además, QH-C en la forma de matriz iscom no induce reacciones locales en el sitio de la inyección. Así, los iscoms que contienen el componente QH-C, sin toxicidad, más una actividad coadyuvante potente, puede resultar útil en formulaciones coadyuvantes para uso humano (Rönnerberg et al. 1995). Estudios desarrollados con la formulación QH703 para estudios en humanos había mostrado que los Iscoms administrados endonasalmente inducen respuestas secretorias IgA en pulmones y membranas mucosas v. g. en el tracto genital (Morein et al. 1998).

Aislamiento y cuantificación de los glicósidos y lípidos de Iscom

En los iscom, las copias múltiples del antígeno anexan por interacción hidrofóbica a una matriz que está constituida por saponinas triterpénicas de *Quillaja* y lípidos. Así, el iscom presenta el antígeno en una forma multimérica en una partícula pequeña con un coadyuvante incorporado resultando una formulación antigénica altamente activa. Behboudi et al. (1995, 1999) habían diseñado un procedimiento de extracción con la mezcla de cloroformo-metanol-agua para aislar las saponinas triterpénicas y los lípidos libres o incorporados en la matriz iscom. Los triterpenoides de la fase triterpénica se cuantifican usando orcinol ácido sulfúrico detectando sus cadenas hidrocarbonadas y por HPLC. El colesterol y la fosfatidilcolina en la fase lipídica se cuantifican mediante HPLC y métodos colorimétricos comerciales para colesterol. La separación y recuperación de los triterpenoides y lípidos en sus respectivas fases es prácticamente completa. Estos métodos deben ser útiles para adecuar constituyentes definidos en vacunas prospectivas iscoms. Las fracciones A y C de las saponinas de *Quillaja* poseen capacidades diversas de estimulación de citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL2-alfa. La eficacia de la IL-12 (interleukin 12) como un coadyuvante de la administración parenteral en asociación con diversos tipos de inmunógenos ha sido igualmente demostrado en modelos tumorales. La vacunación con el mutante péptido p53 asociado con QS21 y IL-12 ratón curado tumor Meth A establecido (heterocigoto para el p53 mutado) (Noguchi et al. 1994).

La inmunidad de los coadyuvantes para las vacunas de la influenza son los siguientes:

- optimizar la presentación de antígeno, promoviendo una mejor estimulación de la célula T helper para incrementar los títulos de anticuerpos neutralizantes sistémicos contra virus,
- mejorar los anticuerpos neutralizantes en secreciones mucosas (IgA), que son la primera barrera contra la infección de influenza,
- inducir respuestas CTL, que pueden ayudar al clearance de virus, y
- desarrollar una respuesta inmune más prolongada a los virus (es decir, protección permanente).

Los coadyuvantes QS-21 (de la fracción 21 de *Q. saponaria*) (Kensil et al. 1991) y el PCPP (poli-di (carboxilatofenoxi)fosfazeno) (Payne et al. 1995) ya han sido descritos en la literatura como coadyuvantes potentes para diversas vacunas en los modelos animales correspondientes probados. Para evaluar su tolerancia y eficacia en humanos, ambos coadyuvantes, cuando se agregan a la vacuna clásica de la influenza actualmente comercializada, ha sido probada en pruebas clínicas de fase I.

QS-21, extraída de la corteza de quillay, pertenece al grupo de las saponinas, que es conocido por sus propiedades coadyuvantes, pero también por sus efectos laterales cuando se emplea como preparación cruda. Aquila Biopharmaceuticals, Inc. (USA) ha desarrollado un proceso de cromatografía líquida que separa las fracciones de Quil A que poseen toxicidad variable y poder coadyuvante. QS-21, una de estas fracciones, se ha demostrado segura y efectiva en animales (Kensil et al 1991). Kensil et al. (1995) han reclamado una patente para el proceso de "saponina modificada de *Q. saponaria*" para la Cambridge Biotech Corp. Solicitud número: 5443829.

En prueba de fase I, se observó un efecto coadyuvante limitado, no dosis-dependiente, para la cepa A/H3N2 después de la inyección de la vacuna de influenza QS-21-coadyuvada. Un año más tarde, la revacunación con la vacuna QS-21-coadyuvada de la cepa actual recomendada, se observaba un efecto de estimulación importante tanto para A/H3N2 como para B, de este modo este estudio sugiere que QS-21 puede ser de interés en el desarrollo de vacunas con un esquema de administración de doble dosis (Bouveret Le Cam et al. 1995).

SBAS2: SmithKline Beecham adjuvant system 2: se basa en la asociación de Monofosforil Lípido A (MPL)-una forma detoxificada del Lípido A, la fracción activa del LPS purificado de la bacteria *Salmonella* Minnesota, QS21 (una fracción purificada de saponina extraída de *Q. saponaria*), y un lípido registrado en emulsión en agua.

Agradecimientos

Este artículo fue financiado parcialmente por los proyectos Fondecyt 1980967 (G. Montenegro) y National Health Institute (NIH) 2 U01 TW 00316 08 (B. N. Timmermann).

Bibliografía

- Anónimo 1995. Trees of San Marcos Growers <http://smgrowsers.com/quilsap.htm> con acceso 9.9.2000
- Behboudi, S., Morein, B & Rönnerberg, B. 1995. Isolation and quantification of Quillaja saponaria Molina saponins and lipids in ISCOM matrix and ISCOMs. Vaccine 13, in press.
- Behboudi, S, Morein B, & Villacres-Eriksson MC. 1999. Quillaja saponin formulations that stimulate proinflammatory cytokines elicit a potent acquired cell-mediated immunity. Scand. J. Immunol. 50(4): 371-377.
- Bouveret Le Cam N.N, Ronco, J, Francon, A, Blondeau, C., & Fanget, C. 1995 Adjuvants for Influenza Vaccine <http://www.pasteur.fr/applications/euroconf/vaccins-abstracts.html> con acceso el 9/9/2000.
- Bugg, R. L. 1992. H7abitat manipulation to enhance the effectiveness of aphidophagous hover flies (Diptera: Syrphidae). Pan-Pacific Entomologist 63: 60-64 como citado en URL <http://www.sarep.ucdavis.edu/NEWSLTR/v5n2/sa-11.htm> Con acceso 9.9.2000.
- E A F U S 1995. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/eaufus.html> Con acceso 9.9. 2000.
- Fuller, T & McClintock, E. 1986. Poisonous Plants of California. UC Press.
- Guo S, Kenne L, Lundgren LN, Ronnberg B & Sundquist BG 1998. Triterpenoid saponins from Quillaja saponaria. Phytochemistry 48(1): 175-80.
- Hong-Soeb So, Yoon, H.-S, Choi D.-Y, Kwon Y.-S, Sung H.-H, Lee T.-G, Park, E.-S, Cho H.-S, Lee B.-M, Cho, J. M. & Ryu, W.-S. 1997. Effect of a novel saponin adjuvant derived from Quillaja saponaria on the immune response to recombinant hepatitis B surface antigen. Mol. Cells 7: 178-186.
- Jackson BP & Snowdon DK. 1968. Authentication of some plants materials employed as medicinal agents J & Churchill Ltd, 104 Glovester.
- Kamstrup, S., San Martin, R., Doberti, A., Grande, H., & Dalsgaard, K. 2000. Preparation and characterization of quillaja saponin with less heterogeneity than Quil-A. Vaccine 18: 2244-2249.
- Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M., & Marciani, D 1991. Separation and characterization of Saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. J. Immunol. 146: 431-37.
- Kensil, C. A., Soltysik, S. & Marciani, D.J. 1995 Antiviral Agents Bull. Oct., U. S. patents <http://www.bioinfo.com/aabnov95uspats.html> Con acceso 22.12.2000.
- Kensil CR, Wu JY, Anderson CA, Wheeler DA, & Amsden J. 1998. QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants. Dev. Biol. Stand. 92: 41-47.

- Montenegro, G, Peña R C, Mujica, A.-M, González L, & Timmermann B N 1999 Posibilidades de un control botánico analítico de la hierba de San Juan *Hypericum perforatum* L. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 23(8): 450-460.
- Morein, B, Sundquist, B, Höglund, S, Dalsgaard, K, & Osterhaus, A. 1984. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. Nature 308: 457-460.
- Morein B, Villacres-Eriksson M, & Lovgren-Bengtsson K. 1998. Iscom, a delivery system for parenteral and mucosal vaccination. Dev. Biol. Stand. 92: 33-39.
- Noguchi, Y., Y.-T. Chen, & Old, L.D. 1994. A mouse mutant p53 recognized by CD4+ and CD8+ T cells. Proceedings of the National Academy of Science; USA 91: 3173-3175.
- Nyberg NT, Kenne L, Ronnberg B, & Sundquist BG 2000. Separation and structural analysis of some saponins from *Quillaja saponaria* Molina. Carbohydr. Res. 12; 323(1-4): 87-97.
- Payne, L. G. et al. 1995. Water-soluble phosphazene polymers for parenteral and mucosal vaccine delivery. In Vaccine Design: The subunit and adjuvant approach, Powell, MF, Newman, MJ. (eds), Plenum Press, New York 1995, pp. 473-93.
- Rönnberg, B., Fekadu, M. & Morein, B. 1995. Adjuvant activity of non-toxic *Quillaja saponaria* Molina components for use in ISCOM matrix. Vaccine 13: 1375-1382.
- San Martín, R. & Briones, R. 1999. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* saponins. Economic Botany 53: 302-311.
- Steinbeck, C., Schneider, C., Rotscheldt, K & Breitmaier, E. 1995. A 4-Methyl-7-Hydroxyphthalide Glycoside and Other Constituents From *Quillaja Saponaria* Molina. Phytochemistry 40: 1313.
- Vermeil de Conchard, P. 1998. Estudio de mercado de la corteza y saponina de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.) y perspectivas de desarrollo futuro. Tesis de Ingeniero agrónomo, Universidad de Chile (Resumen). Ciencias forestales 12-13(1-2): 120-129.