



CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE PRODUCTS OBTAINED FROM THE BIOTRANSFORMATION OF 2-PHENYLQUINOLINE (2FQ) BY ASPERGILLUS SPP

Carla Parra Lizarazu*, Gabriela Quiroga Selaez, Efraín Salamanca Capusiri, Esther Flores Quisbert, Alberto Giménez Turba

Faculty of Pharmaceutical and Biochemical Sciences, Biochemical Drug Research Institute IIFB, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 3239, Av. Saavedra 2224, Phone 5912229021, La Paz, Bolivia, farbio@farbio.edu.bo

Keywords: Biotransformation, 2-phenylquinoline, *Aspergillus* spp, Basal Medium.

ABSTRACT

Microorganisms such as filamentous fungi have been widely used in biotransformation studies of drugs and complex molecules of plants.

The alkaloid 2-phenylquinoline obtained from the medicinal plant *Galipea longiflora* was the substrate in biotransformation processes by 114QD, strain identified as *Aspergillus* spp. Chemical characterization was carried out by thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). These techniques allowed to detect the presence of a product derived from a biotransformation. Such product showed to be a more polar compound than the original substrate and exhibited an UV absorption spectrum different from that of the substrate which has a bathochromic shift of the absorption bands due to the replacement by OH. An analysis coupled to mass spectroscopy permitted identify the hydroxylation of the quinoline ring by showing in its mass spectrum a molecular ion at 221 m/z compared to 205 m/z of the 2-phenylquinoline. Chromatographic techniques also allowed establishing that after 360 hours of incubation in Basal Medium, approximately 78% of the substrate was bio-transformed. The analysis of the areas in function of time showed an increase up to 10 times for the product formed regarding the early hours of culture.

Biological activity against promastigotes of *Leishmania* evaluated by XTT showed IC 50 values different from those of the original substrate.

*Corresponding author: carlitaden2309@gmail.com

RESUMEN

Spanish title: Caracterización química y biológica de los productos derivados de la biotransformación del alcaloide leishmanicida 2-fenilquinolina (2FQ) por *Aspergillus* spp. Los microorganismos, como los hongos filamentosos han sido utilizados ampliamente en estudios de biotransformación de fármacos y moléculas complejas provenientes de plantas.

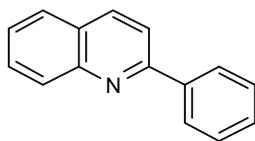
El alcaloide 2-fenilquinolina obtenido de la planta medicinal *Galipea longiflora*, fue el sustrato en procesos de biotransformación por la cepa 114QD, identificada como *Aspergillus* spp. La caracterización química fue realizada por cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (CG). Estas técnicas permitieron detectar la formación de un producto de biotransformación, el cual tiene como característica una mayor polaridad con un espectro de absorción UV diferente al del sustrato original. Dicho producto presenta un desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción por sustitución por OH, un análisis (HPLC y GC) acoplado a espectroscopia de masas identificó de manera inequívoca la hidroxilación del anillo quinolinico al mostrar en su espectro de masas un ión molecular con el pico a m/z 221 comparado con m/z 205 de la 2-fenilquinolina. Las técnicas cromatográficas permitieron además determinar que luego de 360 horas de incubación en Medio Basal para hongos, aproximadamente un 78% de sustrato fue biotransformado. El análisis de las áreas en el tiempo para el producto formado mostró su aumento de hasta 10 veces más al hallado durante las primeras horas de cultivo.

La actividad biológica frente a promastigotes de *Leishmania* evaluada por el método XTT, mostró valores de IC 50 diferentes a los del sustrato original.

INTRODUCCION

Los procesos de biotransformación microbiana en la actualidad representan una poderosa herramienta biotecnológica aplicable al campo de la biomedicina, química e industria. Está basada en la utilización de microorganismos como los hongos filamentosos, los cuales poseen versátiles sistemas enzimáticos que les permiten modificar la estructura química de diversas moléculas para generar no solo nuevos compuestos con propiedades mejoradas, sino también utilizarlos para el estudio del metabolismo de drogas. Hongos del género *Cunninghamella* y *Aspergillus* han sido utilizados ampliamente para estudios de biotransformación de ciertos fármacos como el naproxeno [1-2] y la doxepina [3] obteniéndose metabolitos esencialmente semejantes a los obtenidos en estudios realizados en humanos [4-5] y algunos metabolitos nuevos. Estos procesos pueden ser utilizados como alternativa emergente o complemento al uso de animales de experimentación y a las costosas pruebas en líneas celulares.

La planta medicinal *Galipea longiflora*, conocida como “Evanta” entre las etnias asentadas en la Amazonía Boliviana [6-7], es ampliamente empleada para el tratamiento de leishmaniasis y diarreas causadas por parásitos intestinales. Su actividad biológica es atribuida a un grupo de alcaloides quinolínicos obtenidos de los extractos crudos de corteza del tronco, corteza de raíz y hojas de la planta, siendo la 2-fenilquinolina el alcaloide mayoritario.



2-fenilquinolina

Se han llevado a cabo distintos estudios relacionados a la biodisponibilidad de los alcaloides de Evanta, sin embargo hasta ahora no se ha podido establecer de manera confiable aspectos referentes a la fármaco-cinética y fármaco-dinámica de estos compuestos en concordancia con hallazgos de diversos autores.

El alcaloide 2-fenilquinolina fue el sustrato en procesos de biotransformación por hongos filamentosos. La cepa 114QD (*Aspergillus* spp.) fue seleccionada del cepario del IIFB por su capacidad de utilizar esta molécula como única fuente de carbono y nitrógeno para su desarrollo y crecimiento. Se conoce que distintas cepas de *Aspergillus* presentan versátiles sistemas enzimáticos, lo que permite a estos microorganismos modificar la estructura química de moléculas complejas presentes en una variedad de plantas [8-10] llevando a cabo reacciones de hidroxilación, metilación, reducción e hidrólisis [11].

La biotransformación de 2-fenilquinolina y la formación de productos derivados de este proceso fueron evaluados y analizados por cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (CG). Un análisis acoplado a espectrometría de masas fue realizado con el fin de identificar inequívocamente los productos formados. Un seguimiento de la actividad antiparasitaria de los extractos obtenidos se llevó a cabo para identificar cambios de la actividad biológica con respecto al sustrato original.

RESULTADOS

Identificación de la cepa

Se obtuvieron colonias de color amarillo verdusco que permanecen verdes con el tiempo con aspecto arenoso, el análisis microscópico mostró: Cabezas conidiales radiales, vesículas redondas, esporulación en toda la superficie, conidióforos rugosos, lo cual permitió identificar a la cepa 114QD como *Aspergillus* spp.

La figura 2 muestra el resultado del análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos obtenidos del proceso agitado. Se observa la presencia de bandas con idéntico Rf al patrón del sustrato (1) (Rf 0,94), para el medio basal con 2-fenilquinolina (2 y 3) además de la presencia de otros productos de distinta polaridad (Rf 0,68, 0,64 y 0,3). La presencia de estos productos fue descartada en el control de proceso utilizado (4) (medio basal sin ninguna fuente de carbono), lo que indica que la cepa elegida tiene la capacidad de generar otros productos a partir de la utilización de la 2-fenilquinolina como única fuente de carbono y nitrógeno.

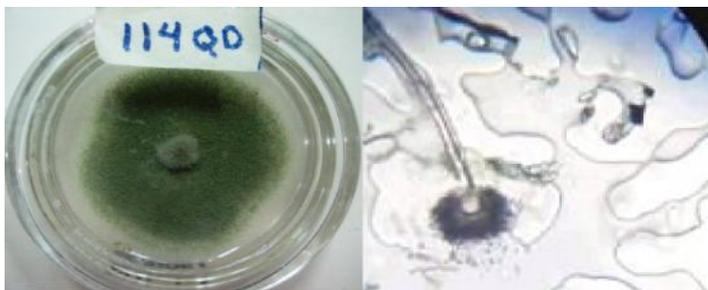


Figura 1. Identificación macro y microscópica de la cepa 114QD.

Caracterización química del proceso de biotransformación

Análisis por cromatografía en capa fina (CCF)

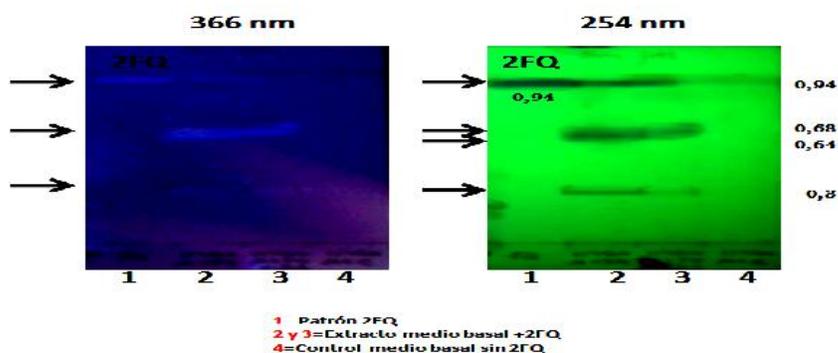


Figura 2. Análisis de los extractos de los cultivos Batch por CCF

Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

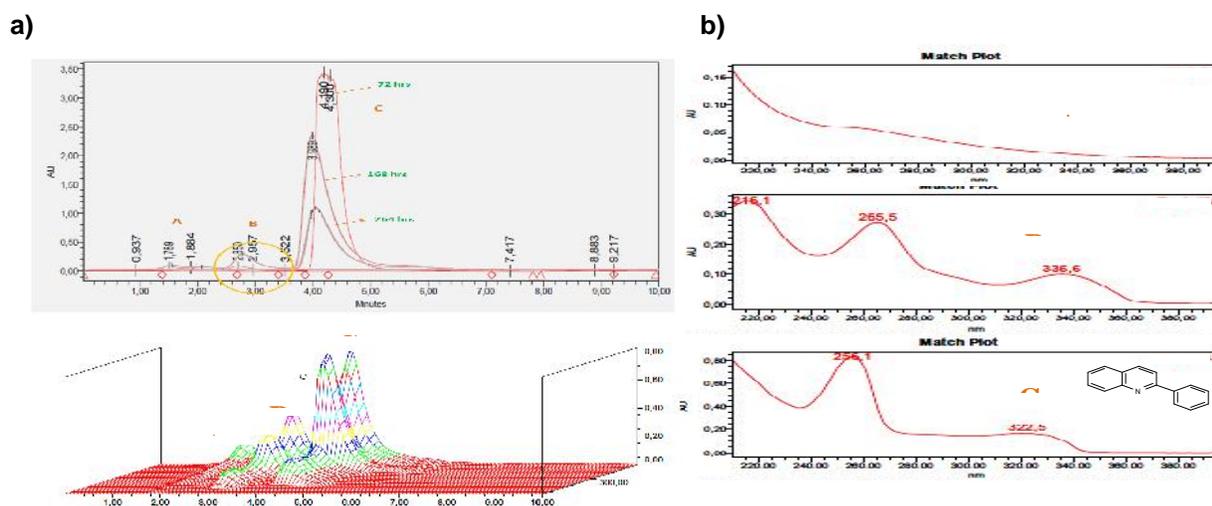


Figura 3. a) Cromatogramas y espectro 3D de los picos de 2-fenilquinolina obtenidos en el tiempo b) Espectros de absorción UV obtenidos por el detector PDA Espectro pico A (Tr: 1.79 min), Espectro pico B (Tr: 2.85 min), Espectro pico C (Tr: 4.1 min) 2-fenilquinolina

En la figura 3a se observa los cromatogramas obtenidos para las muestras tomadas a las 72, 168 y 264 horas de cultivo. Se puede observar que las áreas de los picos correspondientes a la 2-fenilquinolina pico C, con un tiempo de retención de 4,1 min, disminuyen en el tiempo y aparecen picos de mayor polaridad con áreas que se incrementan a tiempos de retención de 1,79 y 2,85 min denominados A y B respectivamente.

Mediante el detector de arreglo de fotodiodos (PDA) se obtuvo espectros de absorción UV de los tres picos encontrados (Figura 3b). El espectro del pico C genera bandas de absorción a 256,1 y 322,5 nm, las cuales son características de la molécula 2-fenilquinolina. El espectro del pico B enseña bandas de absorción a 216,1, 265,5 y 335,6 nm, presentando características espectrales similares al pico C. Se sabe que las sustituciones por grupos auxóchromos como OH pueden generar un desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción [12-13]. Los datos de los cromatogramas y espectros de absorción UV obtenidos permiten inferir que el producto B y no así el A resulta ser un producto de biotransformación de la 2-fenilquinolina. El análisis por HPLC permitió también determinar el consumo de sustrato y la formación del metabolito B con relación al tiempo, dando un estimado de la eficacia del proceso.

Los datos hallados con las áreas obtenidas permiten determinar un consumo de 2-fenilquinolina a 264 horas del 77% quedando un remanente aproximadamente de un 23%. (Figura 4).

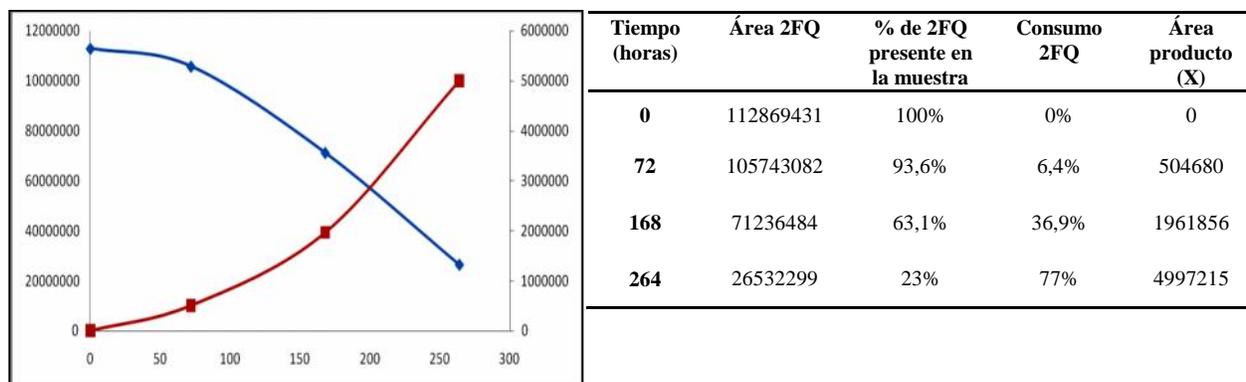


Figura 4. Relación de la disminución del área de la 2-fenilquinolina y el incremento del área del pico B con relación al tiempo de cultivo

Análisis por cromatografía de gases (CG) y acoplamiento a espectroscopia de masas (CG-EM)

El análisis por cromatografía de gases permitió encontrar en las muestras el pico correspondiente a la 2-fenilquinolina a un tiempo de retención de 38,66 minutos (Figura 5) comparando con el patrón puro. Se hallaron también otros picos minoritarios, siendo el pico encontrado a 44,01 minutos el único de interés al pertenecer a los medios con alcaloide y no así a los controles del medio procesados.

Un análisis de las áreas de 2-fenilquinolina obtenidas reveló una disminución de éstas en el tiempo, mientras que las áreas del producto de interés (Tr: 44,01) como se muestra en la figura 6 se incrementaron. El análisis de las áreas permitió dar un estimado del consumo de sustrato (2-fenilquinolina) en el proceso, siendo éste de aproximadamente un 78%.

El análisis por espectroscopia de masas confirmó que el pico al tiempo de retención de 38,66 min corresponde a la 2-fenilquinolina, ya que éste muestra en su espectro de masas un ión molecular a 205 m/z correspondiente a una fórmula molecular $C_{15}H_{11}N$ (Figura 7), se observó además un fragmento significativo a 102 m/z [C_8H_6] característico del patrón de fragmentación de este compuesto [14].

En la figura 8 se observa el análisis del pico obtenido a 44,01 min, este compuesto muestra en su espectro de masas un ion molecular a 221 m/z correspondiente a $C_{15}H_{11}NO$, el patrón de fragmentación obtenido muestra un fragmento significativo a 204 m/z [$C_{15}H_{10}N$] que sugiere la pérdida de un grupo OH [$M-17$], lo cual indica según comparación con la base de datos del CTA (UMSS) que el compuesto analizado puede ser un derivado hidroxilado de la 2-fenilquinolina.

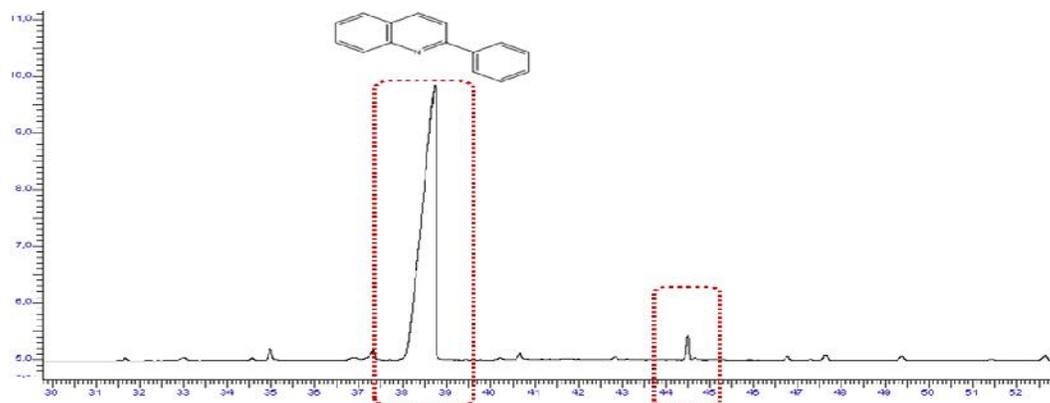
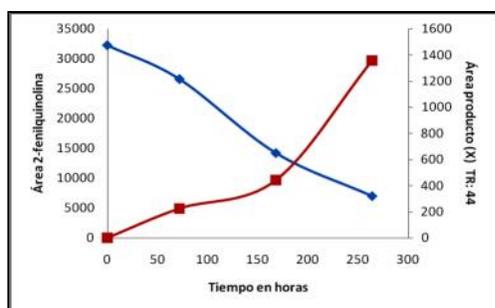


Figura 5. Relación de la disminución del área de la 2-fenilquinolina Figura y el incremento del área del pico de interés (Tr: 44,01) con relación al tiempo de cultivo



Tiempo (horas)	Área 2FQ	% de 2FQ presente en la muestra	Consumo de 2FQ	Área producto (X)
0	32245	100%	0%	0
72	26592	82%	18%	225
168	14243	44%	56%	441
264	7041	22%	78%	1356

Figura 6. Relación de la disminución del área de la 2-fenilquinolina Figura y el incremento del área del pico de interés (Tr: 44,01) con relación al tiempo de cultivo

Tr: 38,66

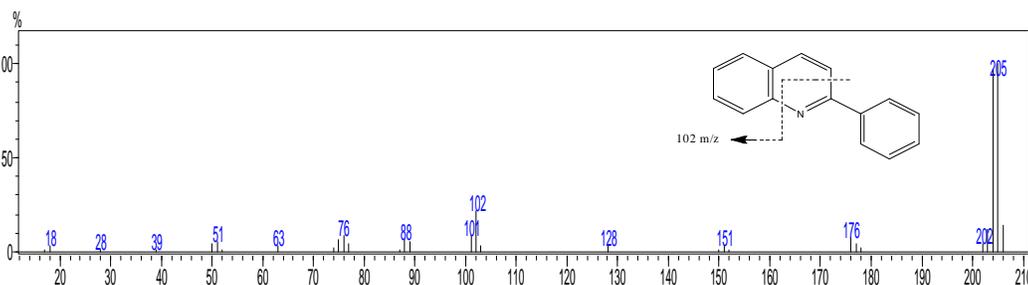


Figura 7. Espectro de masas de la 2-fenilquinolina

Tr: 44.01

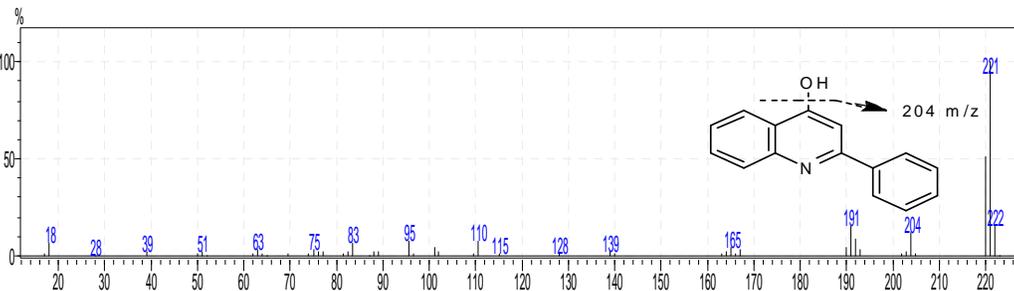
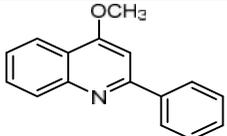
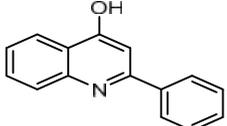


Figura 8. Espectro de masas de la 2-hidroxifenilquinolina

Mediante la comparación del espectro de masas de este compuesto con el de 2-fenil-4 metoxiquinolina [14], se sugiere que la hidroxilación de la molécula 2-fenilquinolina se da en el carbono 4.

Compuesto	Principales Fragmentos	Estructura
2-fenil-4 metoxiquinolina (Ticona, 2008)	m/z 235,204,191,165,156,143,128,117,102	
Derivado 4-hidroxilado de la 2-fenilquinolina Base de datos	m/z 221,204,191,165,139,128,110,95	

Sin embargo, por no tener la cantidad de producto suficiente no se pudo realizar el análisis de RMN para confirmar o determinar la posición real del grupo hidroxilo sobre la estructura de la 2-fenilquinolina.

En estudios realizados con hongos del genero *Aspergillus* spp. se encontró que estos tienen la capacidad de hidroxilar moléculas como cumarinas, terpenos y flavonoides [8-10], porque poseen un sistema enzimático de monooxigenasas, como parte importante del metabolismo de xenobióticos [10-11].

Es importante la obtención de estos compuestos hidroxilados porque estos pueden ser intermediarios de valor para procesos de síntesis química de compuestos con mayor actividad biológica.

Caracterización biológica del proceso de biotransformación

La actividad biológica de todos los extractos fue evaluada frente a promastigotes de *Leishmania* spp. por la técnica XTT, los valores de IC 50 hallados se muestran a continuación:

Tabla 1. Valores de IC 50 de los extractos obtenidos evaluados por la técnica XTT. 2FQ: 2-fenilquinolina, CAT: Alcaloides Totales de Corteza (*G. longiflora*). *Anfotericina B como control positivo.

Extracto analizado	Lma	M2904
Control sin 2FQ	>100	>100
Cultivo Batch con 2FQ	66,3±6	57,1±7
2FQ	38,5±1,5	23±0,5
CAT	17,8	14
Anfotericina B	0,25	0,07

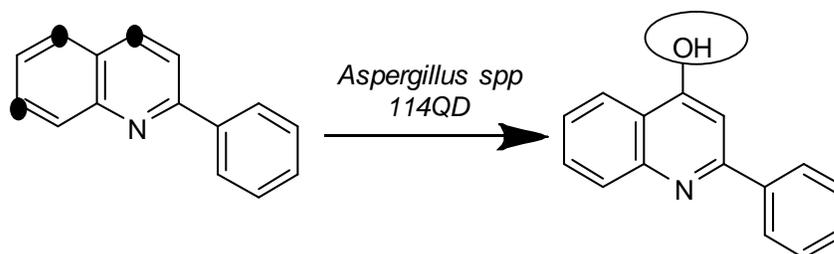
La tabla 1 muestra una comparación de la actividad de los extractos sobre promastigotes de *Leishmania*: complejo *L. amazonensis* clon 1 Lma (MHOM/BR/76/LTB-012) y complejo *L. braziliensis* (M2904 C192 RJA), los valores hallados se compararon con el de un patrón puro de 2-fenilquinolina y con el del complejo de alcaloides totales CAT. Los valores de IC50 hallados fueron diferentes al del sustrato original, se determinó una mejor actividad sobre el complejo (M2904 C192 RJA) Se procesaron de igual manera los controles del proceso sin alcaloide los cuales no presentaron actividad leishmancida.

DISCUSIÓN

Se empleó a la cepa 114QD para estudios de biotransformación del alcaloide 2-fenilquinolina, esta cepa fue identificada como *Aspergillus* spp. por el análisis macro y microscópico realizado.

La caracterización química de los productos obtenidos de los procesos de biotransformación fue realizada por métodos analíticos bastante selectivos como la CCF que permitió evaluar la modificación del sustrato; HPLC y GC permitieron determinar la eficacia del proceso mediante la evaluación de la biotransformación del sustrato que fue de un 77 y 78% respectivamente, demostrando que ambos métodos son bastante congruentes. Los espectros de absorción UV obtenidos por HPLC demostraron la presencia de la 2-fenilquinolina y de un producto que presentó un desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción debido a la sustitución del anillo quinolínic por un grupo OH.

Mediante el análisis GC se obtuvo a un tiempo de retención de 44.01 minutos un pico que resulto de interés al no estar presente en los controles procesados, el acoplamiento a espectroscopia de masas determino que el pico correspondiente a ese tiempo de retención presenta en su espectro de masas un ión molecular a m/z 221, el patrón de fragmentación de este compuesto muestra un fragmento significativo a m/z 204 que sugiere la pérdida de un OH $[M-17]^+$, demostrando la hidroxilación de la molécula. Una comparación del patrón de fragmentación obtenido para este compuesto con el hallado en estudios anteriores para el compuesto 2-fenil-4-metoxiquinolina sugiere que la sustitución se pudo dar en el carbono 4, aunque existen otros posibles sitios de ataque enzimático.



La actividad biológica evaluada sobre promastigotes de *Leishmania* por el método XTT, mostro valores de IC 50 diferentes a los valores hallados para el patrón 2-fenilquinolina, teniendo una mejor actividad frente al complejo *L. braziliensis* (M2904 C192 RJA) que frente al complejo *L. amazonensis*. Gracias a este trabajo se dio un gran paso en la elucidación del proceso de biotransformación de la 2-fenilquinolina y se demostró además el potencial de *Aspergillus* spp para modificar moléculas complejas como son los alcaloides y otros presentes en plantas lo que hace a este microorganismo un excelente candidato a futuro para la evaluación de dichos procesos en una gama de principios activos de plantas.

EXPERIMENTAL

Obtención de la cepa

La cepa 114QD proveniente del I.I.F.B. fue reactivada e identificada mediante un examen macro y microscópico en placa.

Proceso de biotransformación

Los procesos de biotransformación fueron llevados a cabo en cada oportunidad en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de Medio Basal para hongos (comp. KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.6g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g). Se alcanzó una concentración final de 2-fenilquinolina de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los matraces se inocularon con una solución de esporas a una concentración de 1×10^6 esporas/ml. Todos los cultivos fueron incubados a 30°C y en agitación constante a 100 rpm por un periodo máximo de 360 horas. Controles del proceso fueron realizados de la misma forma.

Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos el micelio se separó de los medios de cultivo mediante filtración, los filtrados obtenidos se extrajeron en un sistema continuo líquido-líquido con acetato de etilo por 3 veces, el extracto orgánico obtenido se seco con NaCl, se filtró y concentró por evaporación del solvente en rotavapor (Janke&Kunkel IKA)



Análisis por Cromatografía en capa fina

Los extractos obtenidos fueron analizados por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas cromatográficas de gel de sílice con fluorescencia UV 254nm de 25µm de espesor con base de aluminio (Whatman); utilizando un sistema de elusión CH₂Cl₂: MeOH (95:5).

Análisis por cromatografía líquida de alta resolución

Los extractos se analizaron en el I.I.F.B. por HPLC en un equipo Waters serie 1525 de bomba binaria con detector PDA modelo 2996 bajo las siguientes condiciones experimentales: Columna C18 (150 mm x 4,6 mm) 5 µm, fase móvil MeOH/Agua (85:15 v/v) con un flujo de 1 ml/min (isocrático), un volumen de inyección de 20 µl y tiempo de corrida de 10 min.

Análisis por cromatografía de gases

Los metabolitos volátiles y semivolátiles presentes en los extractos se analizaron en un cromatógrafo de gases CLARUS 500 (Perkin Elmer), sobre una columna SUPELCO (0.32 mm x 0.52 µm x 30 m), bajo las siguientes condiciones: horno con una temperatura inicial de 50°C por 5min ascendiendo a una razón de 5°C/min hasta los 250°C manteniéndose por 10min, el inyector se mantuvo a 250°C, gas carrier H₂ programado en modo flujo 0,5ml/min., utilizando un detector de ionización a flama (FID) a 270°C.

Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas de impacto electrónico.

La identificación de los productos obtenidos se realizó por cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas en el CTA de la UMSS empleando un equipo (Shimadzu) con una columna Carbowax (0,25 µm x 30m). La programación de temperatura fue la siguiente: 40°C (inicial), 220°C (final), gradiente: 2°C/min. Espectro de masas inicio 2 min, final 120 min, scan 15 a 400 m/z, ganancia del detector 0,7 KV

Evaluación de la actividad leishmanicida: Método colorimétrico XTT

La evaluación de la actividad leishmanicida de los extractos se realizó sobre promastigotes de dos especies de *Leishmania L. braziliensis* (M2904 C192 RJA) y *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012) utilizando como blancos, un control de parásitos y DMSO al 1%, un control de parásitos con Anfotericina B y otro con una muestra patrón de alcaloides totales de corteza de Evanta (CAT) y 2-fenilquinolina (2FQ). Las placas se incubaron durante 72hrs. Para determinar la CI₅₀ se utilizó una solución de XTT con Fenasin metosulfato (PMS)

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA ADICIONAL *

1. Zhong, D.F., Sun, L., Liu L, Huang, H. H. **2003**, Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species, *Acta Pharmacol Sin.*, 24 (5), 442-447.
2. Montoya, M., Tataje, J. Biotransformación del Naproxeno con *Aspergillus niger* y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos formados, **2004** [Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
3. Moody, J., Freeman, J., Cerniglia, C. **1999**, Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. *Rev. Drug Metab. Dispos.*, 27 (10), 1157-1164.
4. Pinder, R.M., Brogden, R.N., Speight, T.M., **1977**, Avery GS. Doxepin up to date: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy with particular reference to depression. *Drugs.*, 13, 161-218.
5. Shu, Y.Z., Hubbard, J.W., Mckay, G., Midha, K.K., **1990**, Identification of phenolic doxepin glucuronides from patient urine and rate bile. *Drug Metab Dispos.*, 18, 1096-1099.
6. Shu, Y.Z., Hubbard, J.W., Cooper, J.K., Mckay, G., Korchinski, E.D., Kumar, R., et al. **1990**, The identification of urinary metabolites of doxepin in patient. *Drug Metab Dispos.*, 18, 735-741.
7. Bourdy, G., De Walt, S. J., Chávez de Michel, L.R., Roca, A., Deharo, E., Muñoz, V., et al. **2000**, "Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group" *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 87-109.
8. Fournet, A., Barrios, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Cavé, A., Brumeton, J. **1993**, 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 37, 859-863.



9. Suchita, S., Suaib, L., Atiya, F., Mohendra, P.D., Arvind, S.N., Kumar, J.K., et al. **2009**, Biotransformation of Artemisinin mediated through fungal strains for obtaining derivatives with novel activities. *Sci Pharm.*, *77*: 87-95.
10. Corrêa, M., Nunes, F., Bitencourt, H., Borges, F., Guilhonm, G., Arruda, M., et al. **2011**, Biotransformation of chalcones by the endophytic fungus *Aspergillus flavus* isolated from *Paspalum maritimum* Trin. *J Braz Chem Soc.*, *22* (7), 1333- 1338.
11. Aguirre- Pranzoni, C., Furque, G., Ardanaz, C., Pacciaroni, A., Sosa, V., Tonn, C.E., **2011**, Biotransformation of dihydrocoumarin by *Aspergillus niger* ATCC 11394. *ARKIVOC.*, *7*: 170-181.
12. Velasco, R., Montenegro, D., Vélez, J., García, C., **2009**, Review: Biotransformación de compuestos aromáticos sustituidos mediante hongos filamentosos fitopatógenos de los géneros *Botryodiplodia* y *Colletotrichum*. *Rev. Soc. Quím Perú.*, *75* (1):94-111.
13. Velasco, R., Valverde, I., Durango, D., García, C., **2007**, Biotransformación de los compuestos 2 feniletanol y acetofenona mediante el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*. *Rev.VITAE.*, *14* (2) :43-50.
14. Lizalda, C. Estudio fitoquímico y alelopático de extractos de las hojas de *Swinglea glutinosa* Merr. (Rutaceae). **2008** [Trabajo de grado]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología.
15. Skoog, D. A., Leary, J., Holler, F. J. Principios de análisis instrumental, 5° ed, **1998**. McGraw-Hill., pp. 353-367.*
16. Ticona, J.C. Estudio químico de dos plantas bolivianas de la Etnia Tacana: *Galipea longiflora* y *Bowdichia virgilioides*. **2008** [Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas, Mención BIOLOGIA DE POBLACIONES]. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.*
17. Aislabie, J., Bej, A., Hurst, H., Rothenburger, S., **1990**, Atlas R. Microbial degradation of quinoline and methylquinoline. *Applied and Environmental Microbiology.*, *56* (2), 345-351.*
18. Moody, J., Freeman, J., Cerniglia, C. **1999**, Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. *Rev. Drug Metab. Dispos.*, *27* (10), 1157-1164.*

*Sin llamada en el texto