



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**INFLUENCIA DE LA MORFOGÉNESIS *in vitro* EN EL
CONTENIDO DE ALCALOIDES QUINOLÍNICOS EN PLANTAS
DE *Cinchona officinalis* L.**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: MARILYN LIZBETH SALCEDO ANDI

TUTOR: YANET TIBAIRE VILLASANA AGUILERA, PhD.

Napo - Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Marilyn Lizbeth Salcedo Andi, con documento de identidad N° 1500972144, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Ciencias del Agua, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 26 de septiembre de 2023



Marilyn Lizbeth Salcedo Andi

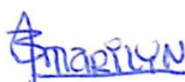
1500972144

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Marilyn Lizbeth Salcedo Andi, con documento de identidad N°1500972144, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: **Influencia de la morfogénesis *in vitro* en el contenido de alcaloides quinolínicos en plantas de *Cinchona officinalis* L.**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 26 de septiembre de 2023



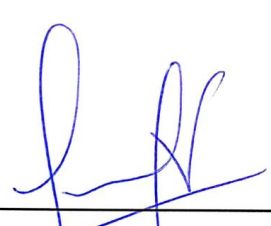
Marilyn Lizbeth Salcedo Andi
1500972144

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: **Influencia de la morfogénesis *in vitro* en el contenido de alcaloides quinolínicos en plantas de *Cinchona officinalis* L**, en la modalidad: Tesis formato artículo, fue realizado por: Marilyn Lizbeth Salcedo Andi, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 26 de septiembre de 2023



Yanet Tibaire Villasana Aguilera
1757250046

DEDICATORIA

A mis padres y a mi familia, quienes me han brindado su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera. Su inmenso amor, confianza, dedicación y sacrificio han sido fundamentales para alcanzar este logro. Especialmente su compañía a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A mi tutora, Yanet Tibaire Villasana Aguilera, por su invaluable orientación y dedicación a lo largo del desarrollo de mi proyecto de investigación.

A mi cotutor, Jose Antonio Moreno Serrano, por su significativa contribución a mi trabajo de investigación. Sus conocimientos y asesoramiento adicional han sido fundamentales para alcanzar los objetivos establecidos.

A la Universidad Regional Amazónica Ikiam, por el respaldo académico que me ha brindado a lo largo de mi carrera. Especialmente por la calidad educativa y recursos que me ha proporcionado para mi formación y crecimiento profesional.

A la Universidad Nacional de Loja, por brindarme la oportunidad de realizar mi investigación en sus instalaciones.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE DERECHO, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. METODOLOGÍA.....	2
2.1 Germinación de semillas de <i>Cinchona officinalis</i>	2
2.2 Inducción de procesos morfogénicos <i>in vitro</i> en <i>Cinchona officinalis</i>	3
2.3 Análisis de la producción de alcaloides mediante UHPLC/ESI-qTOF-MS	4
2.3.1 Extracción de material vegetal.....	4
2.3.2 Identificación y cuantificación de alcaloides de <i>C. officinalis</i> por UHPLC/ESI-q-TOF-MS	5
2.3.3 Procesamiento y análisis de datos	5
3. RESULTADOS	7
3.1 Identificación de alcaloides quinolínicos.....	7
3.2 Estimación del contenido de alcaloides quinolínicos	9
4. DISCUSIÓN	12
5. CONCLUSIÓN	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regeneración morfogénica <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i> para la cuantificación de alcaloides.....	4
Figura 2. Espectros de masas de estándares comerciales de alcaloides mayoritarios de <i>C. officinalis</i> , detectados por espectrómetro de masas microTOF-Q II.....	6
Figura 3. Espectros de masas de alcaloides quinolínicos (quinina/quinidina) en distintos tipos de explantes <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i>	7
Figura 4. Espectros de masas de cinchonina/cinchodinina en distintos tipos de explantes <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i>	8
Figura 5. Contenido de alcaloides quinolínicos (quinina/quinidina & cinchonina/ cinchonidina) según vía de regeneración <i>in vitro</i> en <i>C. officinalis</i>	11

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo para inducir la proliferación de brotes y callos con diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas en <i>C. officinalis</i>	3
Tabla 2. Contenido de alcaloides quinolínicos (quinina/quinidina) según la vía de regeneración <i>in vitro</i> en <i>C. officinalis</i>	9
Tabla 3. Contenido de alcaloides quinolínicos (cinchonina/cinchonidina) según la vía de regeneración <i>in vitro</i> en <i>C. officinalis</i>	10

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de *Cinchona officinalis* L, es considerado como una técnica alternativa de conservación de la especie en Ecuador. Por tal motivo, la identificación, cuantificación y el análisis de fidelidad genética cumplen un rol importante en el cultivo *in vitro* y pueden ser analizadas por técnicas bioquímicas analíticas como por UHPLC/ESI-qTOF-MS. El objetivo del estudio fue analizar la variación del contenido de alcaloides quinolínicos en cada proceso morfogénico *in vitro* en explantes de *C. officinalis*. Se utilizó 200 mg de material vegetal fresco por cada vía de regeneración *in vitro* (brotamiento directo e indirecto, callo organogénico y embriogénico), con 2 repeticiones. 5 μ L de extracto fueron analizados a través de un Sistema Ultimate3000 RSLC (columna Acquity UPLC BEH C18 con 5 mm x 2.1 mm diámetro interno y Acquity UPLC BEH C18 VanGuard pre-columna con 0.2 μ m x 2.1 mm diámetro interno). Los compuestos eluidos se detectaron por microTOF-Q II operado en modo positivo de electrospray. Se identificó preliminarmente la presencia de alcaloides quinolínicos en explantes de *C. officinalis*. El contenido de los alcaloides de interés varió según la vía de regeneración: en brotamiento-directo (quinina/quinidina = 2.82 ± 0.68 mM g⁻¹; cinchonina/cinchonidina = 3.82 ± 1.09 mM g⁻¹) y brotamiento-indirecto (quinina/quinidina = 2.27 ± 0.68 mM g⁻¹; cinchonina/cinchonidina = 4.50 ± 1.09 mM g⁻¹); en callo organogénico (quinina/quinidina = 0.07 ± 4.68 mM g⁻¹; cinchonina/cinchonidina = 0.25 ± 1.09 mM g⁻¹) y callo-embriogénico (quinina/quinidina = 0.00 ± 4.68 mM g⁻¹; cinchonina/cinchonidina = 0.05 ± 1.09 mM g⁻¹).

Palabras clave: Identificación, cuantificación, reguladores de crecimiento, vías de regeneración, alcaloides.

ABSTRACT

The *in vitro* cultivation of *Cinchona officinalis* L, is considered as an alternative technique of conservation of the species in Ecuador. For this reason, the identification, quantification and analysis of genetic fidelity play an important role in *in vitro* culture and can be analyzed by analytical biochemical techniques such as by UHPLC/ESI-qTOF-MS. The aim of the study was to analyze the variation of quinolinic alkaloid content in each *in vitro* morphogenic process in *C. officinalis* explants. 200 mg of fresh plant material was used for each regeneration pathway (direct and indirect budding, organogenic and embryogenic callus), with 2 replicates. 5 μ L of extract were analyzed through an Ultimate3000 RSLC System (Acquity UPLC BEH C18 column with 5 mm x 2.1 mm internal diameter and Acquity UPLC BEH C18 VanGuard pre-column with 0.2 μ m x 2.1 mm internal diameter). The eluted compounds were detected by microTOF-Q II operated in positive electrospray mode. The presence of quinoline alkaloids was preliminarily identified in *C. officinalis* explants. The content of the alkaloids of interest varied according to the regeneration pathway: in budding-direct (quinine/quinidine = 2.82 ± 0.68 mM g⁻¹; cinchonine/cinchonidine = 3.82 ± 1.09 mM g⁻¹) and budding-indirect (quinine/quinidine = 2.27 ± 0.68 mM g⁻¹; cinchonin/cinchonidine = 4.50 ± 1.09 mM g⁻¹); in organogenic callus (quinine/quinidine = 0.07 ± 4.68 mM g⁻¹; cinchonin/cinchonidine = 0.25 ± 1.09 mM g⁻¹) and callus-embryogenic (quinine/quinidine = 0.00 ± 4.68 mM g⁻¹; cinchonin/cinchonidine = 0.05 ± 1.09 mM g⁻¹).

Key words: Identification, quantification, growth regulators, regeneration pathways, alkaloids.

1. INTRODUCCIÓN

Cinchona officinalis L., una especie endémica del valle de Loja perteneciente a la Región Sur del Ecuador, destaca por su alto contenido de alcaloides ampliamente utilizados en la producción de medicamentos (1). Esta especie pertenece al género *Cinchona*, el cual ha sido objeto de numerosos estudios por sus principales alcaloides: quinina, quinidina, cinchonina y cinchonidina, compuestos que hicieron posible el control y cura del paludismo y enfermedades febrífugas por cerca de cuatro siglos (2), principalmente la quinina, ya que su característica química distintiva despertó el interés de investigadores y motivó cambios en la química orgánica, síntesis enantio-selectiva y en la química industrial moderna (3). Este poderoso fármaco, se convirtió en un modelo para sintetizar nuevos agentes antimaláricos como la cloroquina, amodiaquina, mefloquina, primaquina, quinidina, pamaquina y mepraquina (4,5); A pesar de que estos productos sintéticos se establecieron para el control y cura del paludismo, la quinina siguió siendo utilizada para tratar casos de paludismo grave debida a cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes (6); disminuyendo así las poblaciones del género *Cinchona*, siendo difícil encontrarlas en la actualidad. Especialmente por la sobreexplotación, así como la baja tasa de germinación y regeneración natural (7). En consecuencia, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha clasificado a esta especie como amenazada (8). A pesar de la quina ha sido considerada como la única cura para controlar la malaria durante casi 350 años, se cuenta con escasa información acerca de su diversidad química presente tanto entre y dentro de las especies de alcaloides antipalúdicos de la corteza (9). Durante los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para mejorar los métodos de producción, aislamiento y cuantificación de los alcaloides de *C. officinalis* (1,9–11). En Ecuador, la propagación de especies forestales ha sido limitada a métodos convencionales de propagación sexual y asexual. Sin embargo, técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos *in vitro* para la regeneración y multiplicación masiva resulta una alternativa prometedora para contribuir a la conservación y manejo de la especie (12). Este tipo de propagación masiva *in vitro* debe generar individuos que sean genéticamente idénticos a la planta madre, sin embargo, se ha demostrado que es posible observar modificaciones genéticas en las plantas regeneradas bajo estos esquemas, también llamados variación somaclonal (13).

Esta condición puede surgir bajo ciertas condiciones de estrés que aparecen a lo largo del proceso de cultivo *in vitro*, es importante preservar la integridad genética de aquellas

plantas que son objeto de estudio (14,15). El análisis de la variación somaclonal o fidelidad genética cumple un rol importante en cultivo *in vitro* y puede ser analizada a diferentes niveles: morfológico, citológico, citoquímico, bioquímico y molecular (16). Entre las técnicas bioquímicas analíticas más eficientes y usadas actualmente para identificar y cuantificar metabolitos secundarios están principalmente cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La combinación de estas técnicas, especialmente la de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), se ha establecido como una herramienta muy útil para separar, identificar y cuantificar diversos compuestos, debido a su capacidad para manejar compuestos polares, evitar la degradación térmica, no requerir derivatización y proporcionar una alta selectividad, sensibilidad y precisión (17). Es por ello que la importancia de *C. officinalis* en el sector forestal de la Región Sur del Ecuador y los pocos o no existentes estudios en morfogénesis *in vitro*, así como, de sus principales alcaloides quinolínicos a nivel de laboratorio, despierta el interés de estudiar a profundidad los mecanismos necesarios para la optimización de diversas técnicas de cultivo *in vitro* en esta especie, la importancia de la selección del explante y en particular de los reguladores de crecimiento aplicados al medio de cultivo a la hora de desencadenar una respuesta morfogénica satisfactoria, y cómo influye esta, en el contenido de sus principales alcaloides quinolínicos. El propósito de esta investigación fue analizar la variación de alcaloides inducida en los procesos morfogénicos *in vitro* en *C. officinalis*, mediante UHPLC/ESI-qTOF-MS. La hipótesis de este estudio fue que, dependiendo de la vía de regeneración *in vitro* empleada en explantes de *C. officinalis*, se anticipaba encontrar diferencias en el contenido de alcaloides.

2. METODOLOGÍA

2.1 Germinación de semillas de *Cinchona officinalis*

Se tomaron 30 semillas del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Loja. Dentro de una cabina de flujo laminar, se desinfectaron las semillas con alcohol etílico al 70% por 1 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente, se sumergieron las semillas en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 50% en un tiempo de inmersión de 5 min. Una vez desinfectadas las semillas, se procedió a sembrar las

semillas en un medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) (18) suplementado con 1 mg / L⁻¹ de tiamina y 100 mg/L⁻¹ de m-inositol (vitaminas), sacarosa al 2 % como fuente de carbohidratos, agar al 0.6 % como agente gelificante y 1.0 mg/L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃), fueron sembradas 2 semillas por cada tubo de ensayo a una temperatura de 23 ± 2°C con un fotoperiodo de 16-8 horas (19).

2.2 Inducción de procesos morfogénicos *in vitro* en *Cinchona officinalis*

Se utilizaron como explantes los ápices caulinares y segmentos nodales de la planta madre proveniente de los ensayos de multiplicación *in vitro*, los cuales fueron subcultivados en medio de cultivo con las sales minerales MS (18), suplementado con vitaminas (1 L⁻¹ de tiamina y 100 L⁻¹ de mio-inositol), sacarosa como fuente de carbohidratos al 2 %, agar 0.6 % como agente gelificante y se adicionó 0.5 mg L⁻¹ ANA + 2.5 mg L⁻¹ BAP para inducción de brotamiento directo; 1.5 mg L⁻¹ ANA + 3.0 mg L⁻¹ BAP para brotamiento indirecto; 1.5 mg L⁻¹ ANA + 3.0 mg L⁻¹ BAP para inducción de callo organogénico y 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ BAP para callo embriogénico. El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio (NaOH) 1N (19)(Tabla 1).

Tabla 1. Medios de cultivo para inducir la proliferación de brotes y callos con diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas en *C. officinalis*.

Vía de proliferación	Medio de Inducción	Respuesta obtenida
Brotamiento directo	0.5 mg L ⁻¹ ANA + 2.5 mg L ⁻¹ BAP	Brotes
Brotamiento indirecto	1.5 mg L ⁻¹ ANA + 3.0 mg L ⁻¹ BAP	Callo/brotes
Callo organogénico	1.5 mg L ⁻¹ ANA + 3.0 mg L ⁻¹ BAP	Callo/brotes
Callo embriogénico	1.0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L ⁻¹ BAP	Callo

Elaborado por: Marilyn Salcedo, 2023

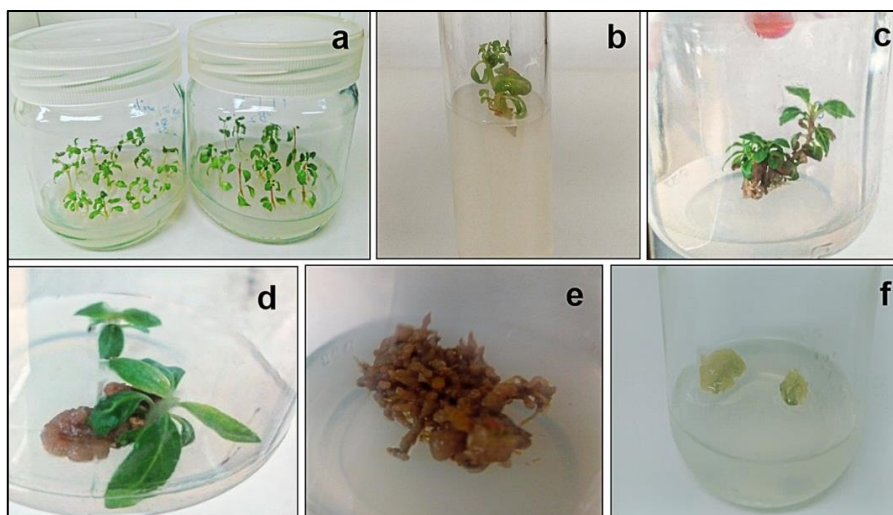


Figura 1. Regeneración morfogénica *in vitro* de *C. officinalis* para la cuantificación de alcaloides.
Elaborado por: Marilyn Salcedo, 2023

En la figura 1 se señala: a) obtención de ápices caulinares y segmentos nodales para ensayos de propagación *in vitro*; b) y c) muestra de brotamiendo directo en ápices caulinares y segmentos nodales con 0.5 mg L^{-1} ANA + 2.5 mg L^{-1} BAP; d) muestra de brotamiendo indirecto con 1.5 mg L^{-1} ANA + 3.0 mg L^{-1} BAP; e) muestras de callo organogénico con 1.5 mg L^{-1} ANA + 3.0 mg L^{-1} BAP; f) muestra de callo embriogénico con 1.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} BAP.

2.3 Análisis de la producción de alcaloides mediante UHPLC/ESI-qTOF-MS

2.3.1 Extracción de material vegetal

Un total de 200 mg de material vegetal para cada tipo de muestra (brotamiendo directo e indirecto y callo organogénico y embriogénico) cultivado bajo condiciones *in vitro*, fueron pesados y transferidos a tubos de microreacción. Se añadió 1 mL de cloroformo: metanol: agua (20:60:20), las muestras se incubaron durante 5 min a 50°C , seguido de una incubación adicional de 1 hora a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron (10 min a 14000 rpm) y se tomaron alícuotas de 750 μL del sobrenadante a continuación fueron llevadas a sequedad y se disolvieron en 300 μL de MeOH + 0.1 % de ácido fórmico para ser analizadas por LC-MS (20).

2.3.2 Identificación y cuantificación de alcaloides de *C. officinalis* por UHPLC/ESI-q-TOF-MS

Se separaron 5 μ L de extracto usando un Sistema Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Sunnyvale, EE. UU), la columna utilizada fue de 50 mm x 2.1 mm d.i., 1.7 μ m., columna Acquity UPLC BEH C18 con 5 mm x 2.1 mm d.i. Acquity UPLC BEH C18 VanGuard pre-columna 0.2 μ m x 2.1 mm d.i. (Waters, Milford, EE. UU). Se aplicó el siguiente gradiente binario: de 0 a 2 minutos isocrático 98 % de solvente A (agua con 0.1 % [v / v] de ácido fórmico), 2 % de B (acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% [v / v]); gradiente lineal de 2 a 25 minutos a 5 % de A, 95 % de B; en el paso de 25 minutos gradiente a 100 % B; isocrático durante 1 minuto a partir de entonces, la columna se ajustó a 98 % A, 2 % B y acondicionado durante 2 minutos antes de la siguiente inyección; el caudal fue de 400 μ L/min, todos los solventes fueron de calidad LC-MS (20). El tiempo total de corrida cromatográfica fue de 28 min.

Los compuestos eluidos fueron detectados por un espectrómetro de masas microTOF-Q II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) operado en modo positivo de electrospray; las configuraciones fueron las siguientes: voltaje capilar, 4500 V; temperatura del gas seco, 200 °C; flujo de gas seco, 10 l/min; embudo, RF 200 Vpp. Los iones se detectaron desde m/z 50 a 1000 en una tasa de repetición de 2 Hz. El instrumento fue operado en modo MRM (Multiple Reaction Monitoring), la calibración de masa se realizó usando agrupaciones de formiato de sodio (10 mM solución de NaOH en 50/50 % v/v isopropanol/agua que contiene ácido fórmico al 0.2 %) (20).

2.3.3 Procesamiento y análisis de datos

Se utilizó 200 mg de material vegetal fresco por cada vía de regeneración *in vitro* (brotamiento directo, brotamiento indirecto, callo organogénico y callo embriogénico), con 2 repeticiones (Cuadro 1). Se llevó a cabo la fragmentación por espectrometría de masas de los estándares comerciales puros de los alcaloides: quinina/quinidina y cinchonina/cinchonidina. Para el procesamiento de datos, se utilizó el software DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) operando en modo MRM; registrando las siguientes transiciones para identificar y determinar el contenido de alcaloides quinolínicos: quinina/quinidina m/z = 325.2 (ion molecular) y cinchonina/cinchonidina m/z = 295.20; la cuantificación se realizó mediante una curva de calibración externa registrada con los estándares antes mencionados. Para el

análisis estadístico de ANOVA con los datos obtenidos, se utilizó el software InfoStat (21) estableciendo diferencias significativas con el test de Tukey a un nivel de significancia de 0.05 (22).

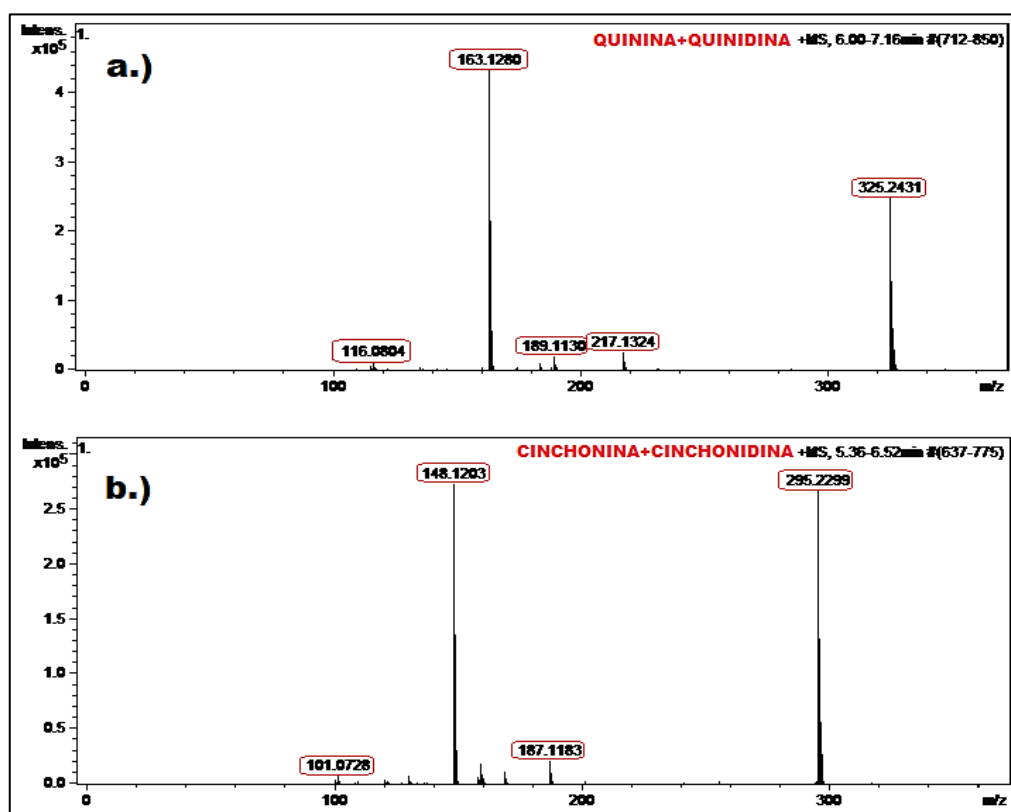


Figura 2. Espectros de masas de estándares comerciales de alcaloides mayoritarios de *C. officinalis*, detectados por espectrómetro de masas microTOF-Q II
Elaborado por: Marilyn Salcedo, 2023

En la figura 2 se señala: a) quinina/quinidina y b) cinchonina/cinchonidina.

3. RESULTADOS

3.1 Identificación de alcaloides quinolínicos

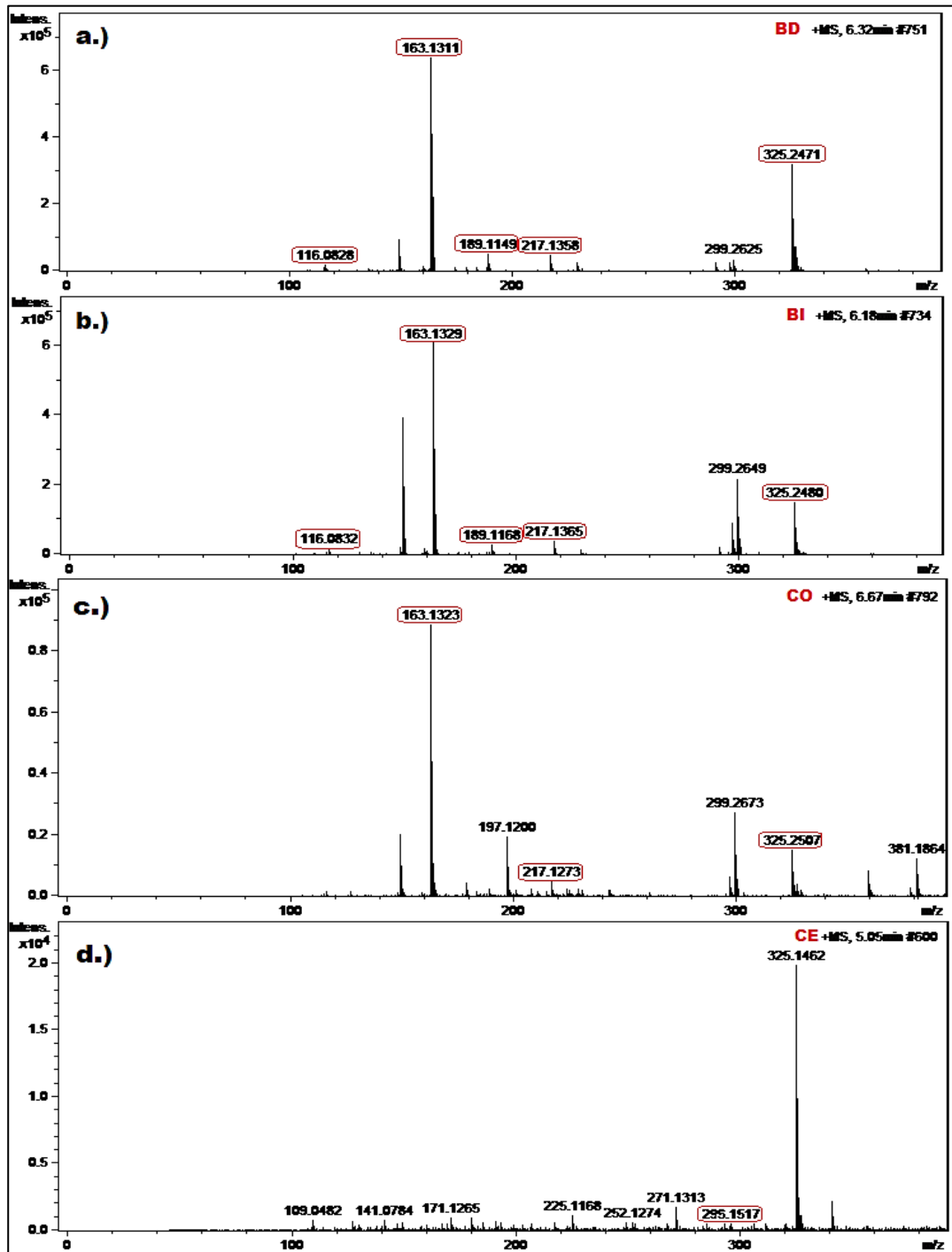


Figura 3. Espectros de masas de alcaloides quinolínicos (quinina/quinidina) en distintos tipos de explantes in vitro de *C. officinalis*.

Elaborado por: Marilyn Salcedo, 2023

Se señalan en la figura 3 los fragmentos identificados en la fuente (a) brotamiento-directo, (b) brotamiento-indirecto, (c) calo-organogénico y (d) calo-embriogénico.

En los cromatogramas de la figura 3 se puede evidenciar la fragmentación de eluidos de alcaloides quinolínicos con fragmentaciones de iones moleculares de $m/z = 116, 163, 189, 217, 299$ y 325 .

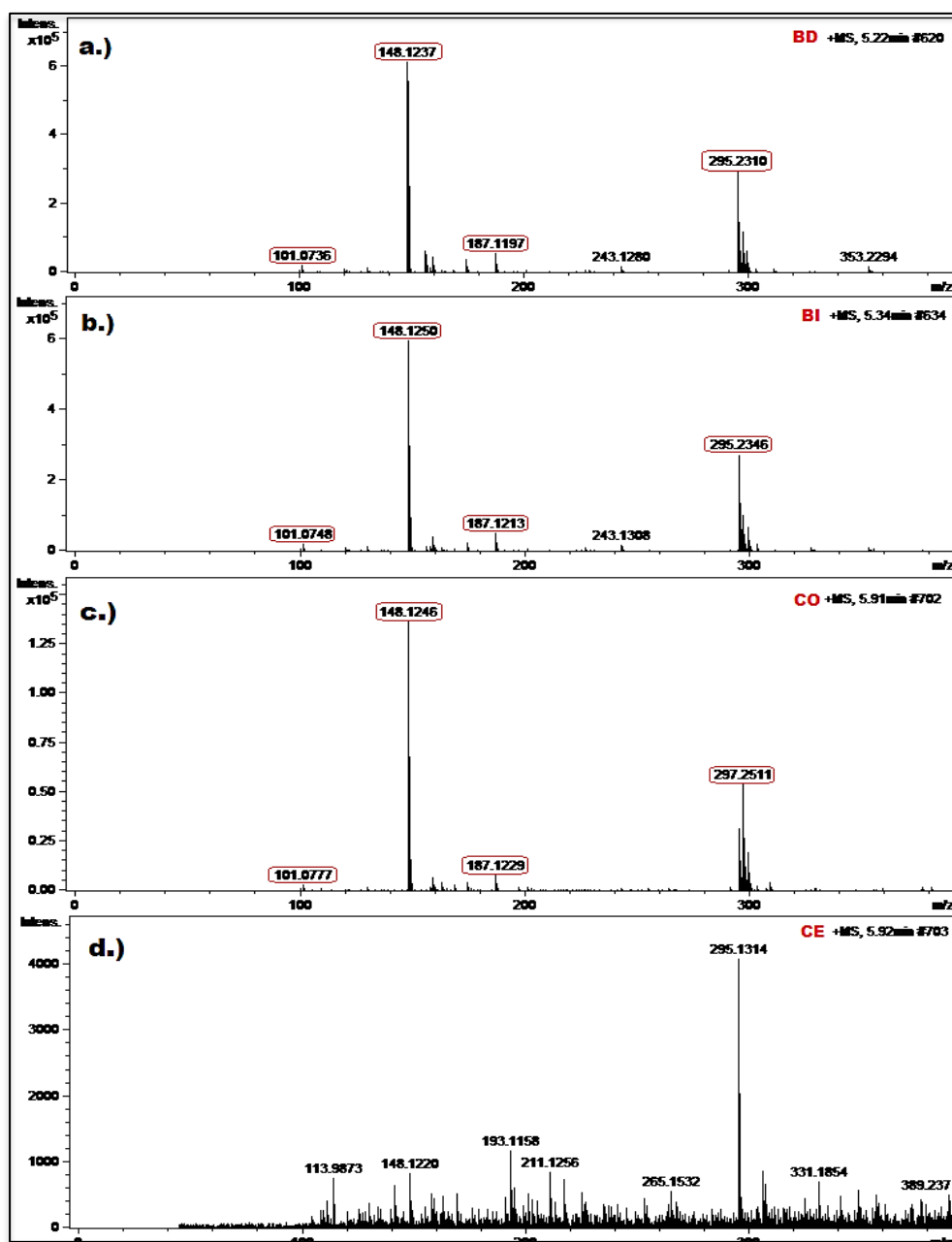


Figura 4. Espectros de masas de cinchonina/cinchonina en distintos tipos de explantes *in vitro* de *C. officinalis*.

Elaborado por: Marilyn Salcedo, 2023

Se señalan en la figura 4 los fragmentos identificados en la fuente (a) brotamiento-directo, (b)

brotamiento-indirecto, (c) callo-organogénico y (d) callo-embriogénico.

De la misma forma, en esta figura se puede evidenciar fragmentaciones de iones moleculares de $m/z = 101, 148, 187, 243, 295, 297$ y 353 .

3.2 Estimación del contenido de alcaloides quinolínicos

Con respecto al contenido de alcaloides quinolínicos (quinina/quinidina) identificados preliminarmente, no se evidenció diferencias significativas según la vía de regeneración ($p = 0.0847$), pero la vía de regeneración de brotamiento directo dio lugar al porcentaje más elevado de contenido de alcaloides quinolínicos con $2.82 \pm 0.68 \text{ mM g}^{-1}$; seguida por brotamiento indirecto con $2.27 \pm 0.68 \text{ mM g}^{-1}$. En el caso de callo organogénico y embriogénico los explantes presentaron menor contenido de alcaloides con $0.07 \pm 4.68 \text{ mM g}^{-1}$ y $0.00 \pm 4.68 \text{ mM g}^{-1}$ respectivamente.

Tabla 2. Contenido de alcaloides quinolínicos (quinina/quinidina) según la vía de regeneración *in vitro* en *C. officinalis*

Vía de Regeneración	Peso mM g ⁻¹ fw	Área de Pico Quinina + Quinidina	Quinina + Quinidina	Quinina + Quinidina mM g ⁻¹ fw	Media	p-value
Brotamiento directo	207.6	2968529	0.31536351	1.5190920	2.82 ± 0.68 A	0.0847
Brotamiento directo	193.4	7506273	0.79743354	4.123234		
Brotamiento indirecto	196.3	4898374	0.52038178	2.6509515	2.27 ± 0.68 A	
Brotamiento indirecto	197.1	3522632	0.37422898	1.8986757		
Callo organogénico	219.1	68175	0.00724261	0.0330561	0.07 ± 0.68 A	
Callo organogénico	198.2	196791	0.02090621	0.1054803		
Callo embriogénico	209.4	0.0000	0.00000000	0.0000000	0.00 ± 0.68 A	
Callo embriogénico	212.8	0.0000	0.00000000	0.0000000		

† Media $\pm$ E.E; las letras en común indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores $p > 0.05$ según *test* de Tukey.

Elaborado por: Marilyn Salcedo, 2023

Asimismo, los resultados de contenido de alcaloides quinolínicos (cinchonina/cinchonidina) según la vía de regeneración, no presentaron diferencias significativas ($p = 0.0872$), la vía de regeneración de brotamiento directo presentó también el porcentaje más elevado de contenido de alcaloides con $3.82 \pm 1.09 \text{ mM g}^{-1}$; seguida

por brotamiento indirecto con $4.50 \pm 1.09 \text{ mM g}^{-1}$; en el caso de callo organogénico y embriogénico los tratamientos presentaron menor contenido de alcaloides quinolínicos con $0.25 \pm 1.09 \text{ mM g}^{-1}$ y $0.05 \pm 1.09 \text{ mM g}^{-1}$ respectivamente.

Tabla 3. Contenido de alcaloides quinolínicos (cinchonina/cinchonidina) según la vía de regeneración *in vitro* en *C. officinalis*

Vía de Regeneración	Peso mM g ⁻¹ fw	Área de Pico Cinchonina cinchonidina	Cinchonina + cinchonidina	Cinchonina + cinchonidina mM g ⁻¹ fw	Media	p-value
Brotamiento directo	207.6	3370027	0.35522	1.71111	3.82 ± 1.09 A	0.0872
Brotamiento directo	193.4	10877922	1.14661	5.92873		
Brotamiento indirecto	196.3	9347050	0.98525	5.01910	4.50 ± 1.09 A	
Brotamiento indirecto	197.1	7436900	0.78390	3.97720		
Callo organogénico	219.1	248344	0.02617	0.11947	0.25 ± 1.09 A	
Callo organogénico	198.2	708400	0.07467	0.37674		
Callo embriogénico	209.4	89285	0.00941	0.04494	0.05 ± 1.09 A	
Callo embriogénico	212.8	107592	0.01134	0.05329		

† Media ± E.E; las letras en común indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores $p > 0.05$ según *test* de Tukey.

Elaborado por: Marilyn Salcedo, 2023

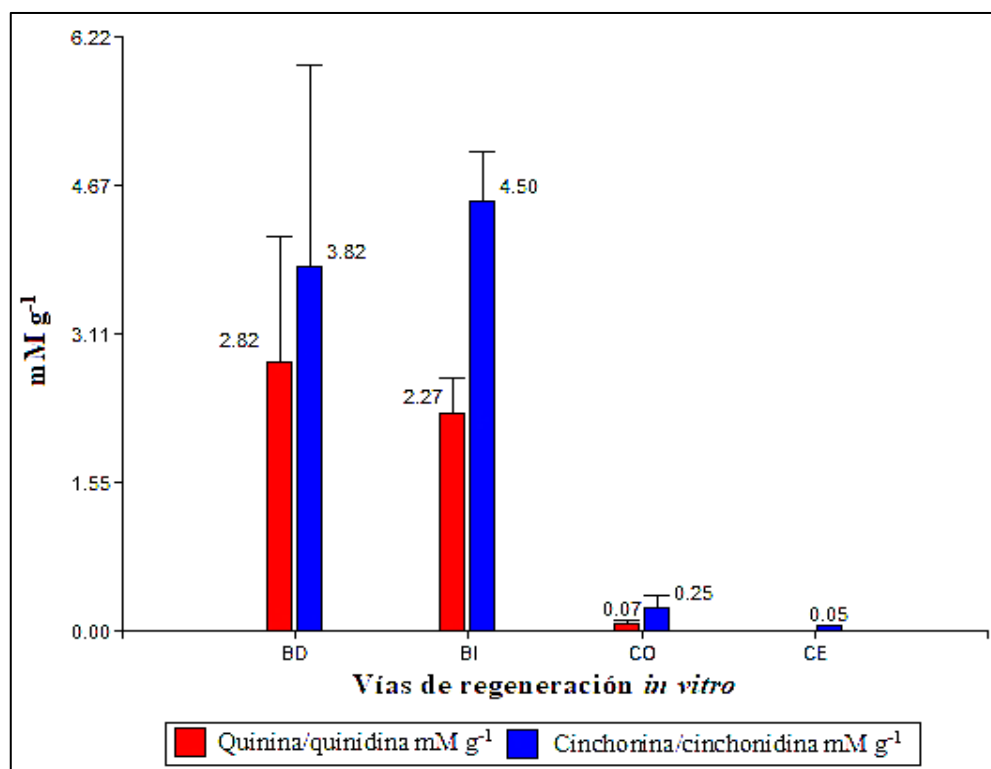


Figura 5. Contenido de alcaloides quinolínicos (quinina/quinidina & cinchonina/cinchonidina) según vía de regeneración *in vitro* en *C. officinalis*.

Elaborado por: Marilyn Salcedo, 2023

4. DISCUSIÓN

En base a los resultados de los espectros de masas obtenidos en brotamiento-directo, brotamiento-indirecto, callo-organogénico y callo-embriogénico, se logró identificar preliminarmente fragmentos típicos de $m/z = 325$ (ión molecular) y 163, además de otros fragmentos 116, 189, 217 y 299 comunes en alcaloides de este tipo (Figura 3). Lo que sugiere la posible presencia de alcaloides quinolínicos en las muestras analizadas. Como criterio para identificar los alcaloides se utilizó el pico base (ión molecular) y las fragmentaciones con mayor intensidad. Al comparar los espectros de masas con los estándares puros y su ión molecular 325.2 y 160.10 (Figura 2a), se evidenció similitud con quinina y su enantiómero, quinidina. Sin embargo, la identificación y diferenciación entre quinina y quinidina en las muestras analizadas a través de espectrometría de masas se ha visto obstaculizada por la similitud estructural de estos compuestos, su condición de isómeros y enantiómeros (23), y la fragmentación selectiva en el proceso. En el caso del fragmento 163 observado, este no tiene relación masa/carga con los fragmentos típicos de quinina y quinidina observados en el espectro de los estándares comerciales encontrados en la base de datos de PubChem (24).

Con respecto al análisis de los espectros de masas de cinchonina/cinchonidina, del mismo modo se logró identificar fragmentos típicos a $m/z = 295$ y 148, además de otros fragmentos 101 y 187 comunes en alcaloides de este tipo (Figura 4); los resultados obtenidos fueron similares a los observados en el espectro de masas del estándar puro con ión molecular $m/z = 295.20$ (Figura 2b), por tanto, es probable que exista la presencia de alcaloides cinchonina y su enantiómero cinchonidina en los 4 tipos de explantes *in vitro* de *C. officinalis*. Sin embargo, no se puede confirmar con exactitud su que se trate de dichos compuestos, debido a que existe una fragmentación con alta intensidad $m/z = 148$ que probablemente se trate de un alcaloide no identificado, ya que no coincide con los estándares comerciales mencionados anteriormente.

Mesa-Vanegas et al. (2013)(25) reportaron compuestos similares e identificaron un ión molecular de $[M+1] = 325.2$ con un tiempo de elusión inferior a 20 min en muestras de corteza y tallos de *C. pubescens*;

Por otro lado, Condor (2009) (26) identificó la quinina en tallos de *C. pubescens* mediante sus espectros de masas: $m/z = 325.5$ (ión molecular, $M^+ + 1$), 304.4 ($M^+ - H_2O$),

además de otros fragmentos 255.1, 188.1, 172.1, 160.1 y 81.1. Dawidowicz et al. (2018) (27) analizaron el proceso de transformación de la quinina y/o degradación, en extractos acuosos, metanólicos y alcalinos empleando LC-MS-PDA. De la fragmentación reportaron un pico que corresponde a quinina con peso molecular: $m/z = 325$. Asimismo, Marcsisin et al. (2013) (28) identificaron metabolitos de quinina mediante análisis UPLC-MS obtenidos tras la fragmentación de toda la molécula y observaron metabolitos múltiples con masas: $m/z = 321.16$, $m/z = 341.18$, $m/z = 357.18$. Otros autores, en cultivos de tejidos y de células de *Cinchona* sp también han reportado fragmentos de masas similares a los obtenidos en el presente estudio, Mulder-Krieger et al. (1982)(29) en cultivos de callos de *C. ledgeriana*, revelaron la presencia de alcaloides de quinolina en las raíces y en las hojas y tallos analizados juntos encontraron alcaloides de quinolina y de indol, quinina, quinidina, con fragmentos principales a m/z (70 eV, 250 °C): 327, 326, 325, 308, 296, 295, 217, 214, 213, 186, 176, 175, 174, 173, 136, 122, 121, 111 y 105; Verpoorte et al. (1984)(30) también identificaron todos los alcaloides de quinolina en *Cinchona* sp en tejidos cultivados *in vitro*. Por lo tanto, el espectro de masas de estos alcaloides quinolínicos es similar a los espectros de masas que han sido encontrados y reportados en el género *Cinchona* sp.

Con respecto al contenido de alcaloides quinolínicos (quinina/quinidina) identificados preliminarmente, no se evidenció diferencias significativas según la vía de regeneración ($p = 0.0847$), pero la vía de regeneración de brotamiento directo dio lugar al porcentaje más elevado de contenido de alcaloides quinolínicos con $2.82 \pm 0.68 \text{ mM g}^{-1}$; seguida por brotamiento indirecto con $2.27 \pm 0.68 \text{ mM g}^{-1}$. En el caso de callo organogénico y embriogénico los explantes presentaron menor contenido de alcaloides con $0.07 \pm 4.68 \text{ mM g}^{-1}$ y $0.00 \pm 4.68 \text{ mM g}^{-1}$ respectivamente (Tabla 2; Figura 5).

Asimismo, los resultados de contenido de alcaloides quinolínicos (cinchonina/cinchonidina) según la vía de regeneración, no presentaron diferencias significativas ($p = 0.0872$), la vía de regeneración de brotamiento directo presentó también el porcentaje más elevado de contenido de alcaloides con $3.82 \pm 1.09 \text{ mM g}^{-1}$; seguida por brotamiento indirecto con $4.50 \pm 1.09 \text{ mM g}^{-1}$; en el caso de callo organogénico y embriogénico los tratamientos presentaron menor contenido de alcaloides quinolínicos con $0.25 \pm 1.09 \text{ mM g}^{-1}$ y $0.05 \pm 1.09 \text{ mM g}^{-1}$ respectivamente (Tabla 3; Figura 5).

Además, la vía de regeneración morfogénica de brotamiento fue la que presentó mayor concentración de alcaloides quinolínicos con respecto a callogénesis. En callo pareciera

indicar que la organogénesis favorece más la presencia de alcaloides que la embriogénesis, sin embargo, es necesario realizar estudios más profundos de estas estructuras y el grado de diferenciación en cada una de ellas. Resultados similares se han reportado en algunos estudios sobre la presencia de alcaloides en diferentes cultivos *in vitro* de órganos y células de *Cinchona* sp. Chung y Staba (1987) (31) observaron en cultivos de *C. ledgeriana* y *C. succirubra* que en estructuras organizadas como: brotes, tallos y hojas es donde se encuentran presentes en mayor cantidad los alcaloides de quinina/quinidina y por lo contrario, en la raíz o en cultivos de células en suspensión no identificaron la presencia de alcaloides de quinolina. Anderson et al. (1982) (32) en estudios de *C. ledgeriana* demostraron que la quinina y otros alcaloides de quinolina se pueden encontrar en órganos como hojas, raíces y cultivos de células en suspensión de raíz.

Los resultados obtenidos en el presente estudio y de estudios relacionados, indican claramente que la producción de alcaloides por *Cinchona* sp en cultivo *in vitro* es influenciado en gran medida por factores ambientales y genotípicos, por ejemplo, composición del medio de cultivo (33), reguladores de crecimiento (34); edad de los cultivos y especies de cinchonas utilizadas (31).

Kilby et al. (1992) (35) realizaron estudios de influencia del método de suministro de nutrientes en los perfiles de alcaloides de quinolina en cultivos *in vitro* de brotes de 125 días de cultivo en *C. ledgeriana*, observaron que dentro de cualquier población de *Cinchona* sp la variación en el perfil de alcaloides entre las plántulas es probable que ocurra como una resultado de la heterocigosidad inducida por outbreeding, tal variación plantea la posibilidad de la existencia de las plántulas productoras de alcaloides de élite. Así también, Geerlings et al. (1999) (36) observaron que los niveles de quinina y quinidina aumentan hasta 500 y 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco respectivamente, utilizando mecanismos reguladores que controlan la expresión de los genes en raíces peludas de *C. officinalis*, expresando las enzimas de triptófano descarboxilasa (TDC) y strictosidine sintasa (STR), dos enzimas clave en la biosíntesis de alcaloides de quinoline.

Los medios de cultivo para las distintas vías de regeneración morfogénicas en el presente estudio fueron específicos para brotamiendo directo (0.5 mg L⁻¹ ANA + 2.5 mg L⁻¹ BAP), brotamiendo indirecto (1.5 mg L⁻¹ ANA + 3.0 mg L⁻¹ BAP), callo organogénico (1.5 mg L⁻¹ ANA + 3.0 mg L⁻¹ BAP) y callo embriogénico (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ BAP) (Figura 1). De esta manera, se pudo estimar que la composición del medio de

cultivo utilizando diferentes reguladores de crecimiento en distintas concentraciones tuvo un efecto en la variación de los niveles de contenido de alcaloides quinolínicos.

Además, Wijnjsma et al. (1986) (37) estudiaron la influencia de las concentraciones iniciales de dos de los principales componentes del medio, sacarosa y nitrato en la producción de alcaloides y antraquinonas en cultivos de suspensión celular de *C. ledgeriana*, encontraron que el rendimiento máximo de alcaloides se obtuvo con nivel normal de nitrato y 4 % de sacarosa, mientras que la antraquinona el rendimiento máximo con 8 % de sacarosa, con nivel normal de nitrato. Kilby et al. (1992) (35) en estudios de perfiles de contenido de quinina, quinidina, cinchonina y cinchonidina en cultivo de brotes *in vitro* de *C. ledgeriana*, encontraron un aumento de cuatro veces en la producción de cinchonidina concomitante con una disminución de cuatro veces en la producción de cinchonine entre plántulas.

También se pudo evidenciar que la combinación de estas hormonas afecta a los cambios fisiológicos en el material vegetal. La combinación de ANA y BAP es comúnmente empleada para promover el crecimiento de brotes. La auxina (ANA) se utiliza para estimular la formación de raíces, mientras que la citoquinina (BAP) se encargan de estimular el crecimiento y formación de brotes, lo cual se convierte en un aporte exógeno de las citoquininas BAP (19), por lo que se podría decir BAP podría inducir una mayor especialización en la producción de alcaloides en cada uno de los brotes generados durante el cultivo *in vitro*, ya que las citoquininas a menudo están relacionadas con la diferenciación de tejidos especializados (38). Así también, Hoekstra (1990) (39) analizó el efecto de la auxina en el crecimiento y producción de alcaloides en estructuras globulares compactas de *C. ledgeriana*, observó que en un medio de cultivo con 2,4-D y BAP podría inducirse cantidades significativas de alcaloides de quinolina reemplazando 2,4-D por bajas cantidades de ANA.

Se ha demostrado que los reguladores de crecimiento, especialmente aquellos con naturaleza auxínica pueden tener efecto en la metilación del ADN, lo cual causa cambios epigenéticos (40–42). Además, en investigaciones previas, se ha identificado que el 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), el AIA y el ANA son responsables del incremento en la metilación de la citosina durante el proceso de cultivo *in vitro*, sin embargo, las citoquininas no parecen tener algún efecto en este proceso (43).

De modo que, la variación inducida mediante las técnicas *in vitro* no solo se encuentra

asociada a modificaciones en las secuencias de nucleótidos, sino que también podría estar relacionada con alteraciones que generan esta variación en la expresión de los genes debido a modificaciones en la secuencia del ADN (44).

5. CONCLUSIÓN

Se han identificado fragmentos característicos comunes en alcaloides del grupo quinolínicos, sin embargo, se necesitan análisis más profundos para poder ratificar la presencia de estos componentes. Por otro lado, se logró estimar el contenido medio de estos alcaloides, el cual no presentó variaciones significativas, pero se observó una considerable variación en la concentración de los mismos en estructuras organizadas; la vía de regeneración de brotamiento registró mayor concentración de alcaloides quinolínicos con respecto a callogénesis que fueron menores. De esta forma se puede mencionar que la variación en los contenidos de estos alcaloides inducida por las vías de regeneración *in vitro* en *C. officinalis* podría estar influenciada en gran medida por los reguladores de crecimiento y su concentración. Por tanto, la cuantificación de alcaloides mediante UHPLC/ESI-qTOF-MS podría considerarse como un método adecuado para la determinación de alcaloides presentes en los órganos de las plantas obtenidos a través del cultivo *in vitro*.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Armijos-González R, Pérez-Ruiz C. *In vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L (Rubiaceae). *Journal of Forestry Research* (Harbin). 2016 Dec 4;27(6):1229–36. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11676-016-0272-8>.
2. Aymard C. GA. Breve reseña de los aspectos taxonómicos y nomenclaturales actuales del género *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). *Revista de la Academia Colombiana Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2019 Nov 5;234–41. Available at: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1079>.
3. Raheem IT, Goodman SN, Jacobsen EN. Catalytic Asymmetric Total Syntheses of Quinine and Quinidine. *J Am Chem Soc*. 2004 Jan 28;126(3):706–7. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja039550y>.
4. Mesa Vanegas AM. Potenciales candidatos antimaláricos y antiplasmodiales de origen natural y sintético. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2018 Sep 1;47(3):375–99.
5. Santafé GG, Sánchez EL, Torres OL. Síntesis y Actividad Antimalárica de Estirilquinolinas sobre *Plasmodium falciparum*. *Información tecnológica*. 2016;27(2):97–104. Available at: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000200012>.
6. Holmfred E, Cornett C, Maldonado C, Rønsted N, Hansen SH. An Optimised Method for Routine Separation and Quantification of Major Alkaloids in Cortex *Cinchona* by HPLC Coupled with UV and Fluorescence Detection. *Phytochemical Analysis*. 2017 Sep;28(5):374–80. Available at: <https://doi.org/10.1002/pca.2684>.
7. Buddenhagen CE, Renteria JL, Gardener M, Wilkinson SR, Soria M, Yáñez P, et al. The Control of a Highly Invasive Tree *Cinchona pubescens* in Galapagos. *Weed Technology* . 2004 Dec 1;18(sp1):1194–202.
8. Pucha D, Rodríguez J, Rey J, Macas F, Aguiñaga F, Chocho A. El consumo de *Cinchona officinalis* L. durante la emergencia sanitaria COVID-19 en la provincia de Loja, Ecuador. *Bosques Latitud Cero* vol 10 (2). 2020 Dec 22;10(2).
9. Canales NA, Gress Hansen TN, Cornett C, Walker K, Driver F, Antonelli A, et al. Historical chemical annotations of *Cinchona* bark collections are comparable to results from current day high-pressure liquid chromatography technologies. *Journal of Ethnopharmacology* Ethnopharmacol. 2020 Mar;249:112375. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112375>.
10. Geerlings A, Hallard D, Martínez Caballero A, Lopes Cardoso I, van der Heijden R, Verpoorte R. Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* “Ledgeriana” hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*. 1999 Dec 30;19(2):191–6. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002990050732>.

11. Holmfred E, Cornett C, Maldonado C, Rønsted N, Hansen SH. An Optimised Method for Routine Separation and Quantification of Major Alkaloids in Cortex *Cinchona* by HPLC Coupled with UV and Fluorescence Detection. *Phytochemical Analysis*. 2017 Sep;28(5):374–80. Available at: <https://doi.org/10.1002/pca.2684>.
12. Espinosa CI, Ríos G. Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis* *in vitro* y *ex vitro*; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. 2017 Aug 14;35(1–2):73–82. Available at: <https://doi.org/10.26807/remcb.v35i1-2.250>.
13. Martínez I, Arzate A. Analysis of the somaclonal variation *in vitro* regenerated agave species. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2022;25:050.
14. Regalado JJ, Carmona Martín E, Castro P, Moreno R, Gil J, Encina CL. Study of the somaclonal variation produced by different methods of polyploidization in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC). 2015 Jul 25;122(1):31–44. . 1007/s11240-015-0747-x
15. Sharma MM, Verma RN, Singh A, Batra A. Assessment of clonal fidelity of *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill “*in vitro*” plantlets by ISSR molecular markers. *Springerplus*. 2014 Dec 3;3(1):400. Available at: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-400>.
16. Chandrika M, Ravishankar Rai V, Thoyajaksha T. ISSR marker based analysis of micropropagated plantlets of *Nothapodytes foetida*. *Biología Plantarum*. 2010 Sep 1;54(3):561–565. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0100-5>.
17. Mukherjee PK. LC–MS: A Rapid Technique for Understanding the Plant Metabolite Analysis. In: *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*. Elsevier; 2019. p. 459–79. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00011-9>.
18. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum*. 1962 Jul;15(3):473–97. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
19. Moreno Jose, Pérez C, Moreno I, Moreno J. Efecto del medio de cultivo en los procesos morfogénicos *in vitro* en *Cinchona officinalis* L. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo*. 2018 Dec 11;51:55–68.
20. Corrales AR, Nebauer SG, Carrillo L, Fernández-Nohales P, Marqués J, Renau-Morata B, et al. Characterization of tomato Cycling Dof Factors reveals conserved and new functions in the control of floweri. *Journal of Experimental Botany*. 2014 Mar;65(4):995–1012. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/ert451>.
21. Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Tablada M, Gonzales L, Robledo C. InfoStat: software para análisis estadístico. Argentina : Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba.; 2010.

22. Alejandro J, Rienzo D, Casanoves F, Mendoza SV. Qeco-Quantitative ecology software: A collaborative approach [Internet]. 2010. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/47522807>
23. Jain A, SISODIA J. Quinidine. 2023.
24. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D1373–80. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>.
25. Mesa-Vanegas A, Quinto-Quinto A, Blair-Trujillo S. Cuantificación de quinina en extractos de *Cinchona pubescens* y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica. *Boletín Latinoamericano Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2013 Apr 9;12(6):592–602.
26. Córdor Cuyubamba E, H. de Oliveira B, Loayza Ochoa K, Reyna Pinedo V. Estudio químico de los tallos de *Cinchona pubescens* Vahl. *Revista de la Sociedad Química del Perú.* 2009;75(1):54–63.
27. Dawidowicz AL, Bernacik K, Typek R, Stankevič M. Possibility of quinine transformation in food products: LC–MS and NMR techniques in analysis of quinine derivatives. *European Food Research and Technology.* 2018 Jan 5;244(1):105–16. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2940-0>.
28. Marcisin SR, Jin X, Bettger T, McCulley N, Sousa JC, Shanks GD, et al. CYP450 phenotyping and metabolite identification of quinine by accurate mass UPLC-MS analysis: a possible metabolic link to blackwater fever. *Malar Journal.* 2013 Dec 21;12(1):214. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-214>.
29. Mulder-Krieger Th, Verpoorte R, de Water A, van Gessel M, van Oeveren B, Svendsen A. Identification of the Alkaloids and Anthraquinones in *Cinchona ledgeriana* Callus Cultures. *Planta Medica.* 1982 Sep 29;46(09):19–24. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2007-970010>.
30. Verpoorte R, Mulder-Krieger T, Wijnsma R, Verzijl JM, Svendsen AB. HPLC Analysis of Alkaloids in Extracts of Callus Cultures of *Cinchona* Species. *Zeitschrift für Naturforschung C.* 1984 Jun 1;39(6):680–2. Available at: <https://doi.org/10.1515/znc-1984-0625>.
31. Chung CT, Staba E. Effects of Age and Growth Regulators on Growth and Alkaloid Production in *Cinchona ledgeriana* Leaf-Shoot Organ Cultures. *Planta Medica.* 1987 Apr 24;53(02):206–10. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2006-962673>.
32. Anderson L, Keene A, Phillipson J. Alkaloid Production by Leaf Organ, Root Organ and Cell Suspension Cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Planta Med.* 1982 Sep 29;46(09):25–7.
33. Harkes PAA, Krijbolder L, Libbenga KR, Wijnsma R, Nsengiyaremge T, Verpoorte R. Influence of various media constituents on the growth of *Cinchona ledgeriana* tissue cultures and the production of alkaloids and anthraquinones therein. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 1985;4(3):199–214. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00040194>.

34. Rhodes M, Payne J, Robins R. Cell Suspension Cultures of *Cinchona ledgeriana* ; II. The Effect of a Range of Auxins and Cytokinins on the Production of Quinoline Alkaloids. *Planta Medica*. 1986 Jun 26;52(03):226–9. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2007-969129>.
35. Kilby NJ, Griggs DL, Berry SF. Assessment of inter- and intra-population variation in quinoline alkaloid profile of juvenile shoot cultures of *Cinchona ledgeriana*: effect of method of nutrient delivery on alkaloid profile. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1992 Mar;28(3):275–80. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00036124>.
36. Geerlings A, Hallard D, Martinez Caballero A, Lopes Cardoso I, van der Heijden R, Verpoorte R. Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* “Ledgeriana” hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*. 1999 Dec 30;19(2):191–6. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002990050732>.
37. Wijnsma R, Verpoorte R, Harkes PAA, Van Vliet TB, Ten Hoopen HJG, Svendsen AB. The influence of initial sucrose and nitrate concentrations on the growth of *Cinchona ledgeriana* cell suspension cultures and the production of alkaloids and anthraquinones. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1986 Jan;7(1):21–9. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00043917>.
38. Jordán M, Casaretto J. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. . In: Squeo F, Cardemil L, editors. *Fisiología Vegetal* . Ediciones Universidad de La Serena; p. 1–28.
39. Hoekstra SS, Harkes PAA, Verpoorte R, Libbenga KR. Effect of auxin on cytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant Cell Reports*. 1990 Mar;8(10):571–4. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00270055>.
40. Us-Camas R, Rivera-Solís G, Duarte-Aké F, De-la-Peña C. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2014 Aug 2;118(2):187–201. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0482-8>.
41. Sahijram L, Soneji JR, Bollamma KT. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* [Internet]. 2003 Nov;39(6):551–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1079/IVP2003467>
42. Neelakandan AK, Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports*. 2012 Apr 17;31(4):597–620. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1202-z>.
43. Cardone S, Olmos S, Echenique V. Variación somaclonal. In: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, editors. *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA; 2010. p. 229–41.

7. ANEXOS

Glosario

UHPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento.

ESI: Electrospray Ionization, técnica de espectrometría de masas.

qTOF-MS: Espectrometría de masas de cuadrupolo de tiempo de vuelo.

MicroTOF-Q II: Un tipo de espectrómetro de masas.

ANA: Ácido Naftalenoacético, una hormona vegetal.

BAP: 6-Benzilaminopurina, hormona vegetal.

2,4-D: 2,4-Diclorofenoxiacético, una auxina.

LC-MS-PDA: Técnica analítica que combina cromatografía líquida, espectrometría de masas y detección de matriz de fotodiodos.

UPLC-MS: Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas.

Outbreeding: Reproducción entre individuos no relacionados genéticamente.