

CULTIVO *in vitro* DE RAÍCES EN MATRACES Y BIORREACTORES: ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE FÁRMACOS

In vitro CULTURE OF ROOTS IN FLASKS AND BIOREACTORS: BIOTECHNOLOGICAL ALTERNATIVES FOR THE PRODUCTION OF DRUGS

Sampayo-Maldonado, S.¹; Montiel-Montoya, J.²; Cortés-Ruiz, J. A.³; Gómez-de Jesús, A.⁴; Reyes, C.¹;
Díaz-Bautista, M.¹; Sánchez-Herrera, L. M.⁵; López-Valdez, L. G.⁶; Barrales-Cureño, H. J.^{1*}

¹Universidad Intercultural del Estado de Puebla, División de Procesos Naturales. Ingeniería Forestal Comunitaria. Calle Principal a Lipuntahuaca s/n, Lipuntahuaca, Huehuetla, Puebla, México. ²Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joachin, Guasave, Sinaloa, México. ³Instituto Tecnológico de Mazatlán, Ingeniería Bioquímica. Calle Corsario 1 No. 203, Colonia Urias, Mazatlán, Sinaloa, México. ⁴CONACYT-Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agronómicas. Carretera Ocozocoautla-Villafloras km 84.5. Villafloras, Chiapas, México. ⁵Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Tecnológica de Alimentos. Ciudad Universitaria de la Cultura "Amado Nervo", Tepic, Nayarit, México. ⁶Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Preparatoria Agrícola. Laboratorio de Productos Naturales. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México.

*Autor para correspondencia: hebert.jair@uiep.edu.mx

ABSTRACT

Objective: To describe and analyze the importance of secondary metabolism in roots, on main drugs in *in vitro* root cultures, as well as in different configurations of bioreactors, and in the use of biotic and abiotic elicitation, in order to contribute to the expansion of the production of secondary metabolites in each system at a molecular level.

Design/methodology/approach: A review of updated literature was made regarding secondary metabolism, the pharmaceutical production from *in vitro* root cultures in flasks, as well as the production of drugs from roots grown in bioreactors, and performing *in vitro* elicitation.

Results: Manipulation of plant roots in bioreactors was found to be attractive, making it an excellent alternative for conducting further research on increased pharmaceutical production at an industrial level. Elicitation represents a strategy that induces a genetic response to secondary metabolites.

Limitations on study/implications: In genetics terms, *in vitro* cell and callus cultures are less stable when compared to *in vitro* organ and root cultures.

Findings/conclusions: *In vitro* culture of roots in flasks is a successful alternative to drug production by using plant biotechnology. With the purpose of promoting a greater production and commercialization of drugs, these crops motivate a greater production in bioreactors. In addition, the biochemical and genetic stability of secondary metabolites produced in roots through *in vitro* cultures may favor a higher demand in the pharmacological field. There is also a significant differentiation in morphological terms of the metabolites, a condition that would lead to a feasible and sustainable alternative under commercial terms.

Keywords: Secondary metabolites, *in vitro* elicitation, hairy roots.

RESUMEN

Objetivo: Describir y analizar la importancia del metabolismo secundario en las raíces, los principales fármacos en cultivos *in vitro* de raíces y en distintas configuraciones de biorreactores y el uso de la elicitación biótica y abiótica, a fin de contribuir a incrementar la producción de los metabolitos secundarios a nivel molecular en ambos sistemas.

Diseño/metodología/aproximación: Se realizó una revisión bibliográfica actualizada con respecto al metabolismo secundario, producción de fármacos a partir de cultivos *in vitro* de raíces en matraces, producción de fármacos a partir de raíces cultivadas en Biorreactores y elicitación *in vitro*.

Resultados: Se encontró que la manipulación de las raíces vegetales en biorreactores es atractiva y la convierte en una excelente opción para realizar investigaciones de máxima producción de fármacos a nivel industrial. La elicitación es una estrategia que permite inducir la expresión genética de los metabolitos secundarios.

Limitaciones del estudio/implicaciones: Los cultivos *in vitro* de células y callos son menos estables genéticamente que los cultivos *in vitro* de órganos y raíces.

Hallazgos/conclusiones: Los cultivos *in vitro* de raíces en matraces son una exitosa alternativa de producción de fármacos en biotecnología vegetal y sirven como un indicador importante para calcular el escalamiento en biorreactores con el objetivo de lograr una mayor producción y comercialización de fármacos. La demanda de los metabolitos secundarios de interés farmacológico producidos en raíces mediante el cultivo *in vitro* en un futuro será cada vez mayor dada su estabilidad bioquímica y genética, así como su diferenciación morfológica, siendo una alternativa comercialmente factible y sustentable.

Palabras clave: Metabolitos secundarios, elicitación *in vitro*, raíces pilosas.

la producción sea rentable y que se produzca en mayores cantidades utilizando análisis dimensional, semejanza geométrica, relaciones empíricas a partir de un conjunto de datos y en modelos con apoyo de relaciones empíricas. Ambos tipos de cultivos tienen un enfoque alternativo para aumentar la productividad de los fármacos basados en las raíces de las plantas. Algunos fármacos de gran importancia obtenidos a partir de raíces en cultivo *in vitro* son: taxol a partir de *Taxus* spp., vincristina, vinblastina a partir de *Catharanthus*, ginsenósidos de *Panax* (Hea et al., 2005), glicósidos cardíacos a partir de *Digitalis*, forskolina de *Coleus*, alcaloides indólicos de *Cinchona*, escualina de *Cichorium*, antraquinonas de *Cassia*, alcaloides del tropano a partir de *Hyocyamus* y *Atropa*, artimisina de *Artemisia*, tiofenos de *Ambrosia* y de *Tagetes*, hidroxiecdisona a partir de *Ajuga*, withanólidos de *Withania*, valeopotriato de *Valeriana*, diosgenina de *Trigonella*, tricosantina a partir de *Trichosanthes*, esteroides de *Solanum*, daidzeina a partir de *Psoralea*, verbascósidos de *Paulownia*, shikoinina de *Lithospermum*, lignanos de *Linum*, lawsona de *Lawsonia*, flavonoides isoprenilados y glicirrhizina a partir de *Glycyrrhiza* (Eapen y Mitra, 2001). En cultivos *in vitro*, existen 3 tipos de función de respuesta que presentan las raíces: 1) aquéllas que pueden desarrollarse de modo indefinido en cultivo (como tomate, clavo y el género *Datura*); 2) las que pueden crecer por periodos prolongados en el medio de cultivo, pero no de forma perenne (chicharo, trigo) limitándose la velocidad de crecimiento, así como la formación de raíces laterales débiles e insucientes y 3) las raíces que difícilmente crecen debido a que requieren condiciones hasta ahora poco estudiadas

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de biomasa de plantas medicinales a escala mundial refleja los problemas y las crisis originadas por la disminución de los recursos renovables y el aumento del número de consumidores (Baque et al., 2012). Ante esta situación, el cultivo *in vitro* se perfila como una alternativa de producción vegetal, debido a sus diversas ventajas, como la posibilidad de inducir cultivos independientemente de la localización geográfica o estación, de cultivar meristemas apicales libres de plagas o enfermedades y de cultivar especies en peligro de extinción (Barrales-Cureño et al., 2017). Las aplicaciones del cultivo de raíces contribuyen a descubrimientos y aplicaciones en fisiología vegetal, metabolismo de carbohidratos, nutrición, hormonas, entre otros. Los matraces agitados son los biorreactores más utilizados en el área de la biotecnología vegetal para el desarrollo de nuevos bioprocesos (Reyes et al., 2017). La ventaja de los cultivos *in vitro* realizados en matraces agitados es su bajo costo y factibilidad de manejo. En biorreactores, el escalamiento permite que

(especies leñosas). Por lo tanto, el presente trabajo trata sobre la importancia del metabolismo secundario; los principales fármacos producidos en cultivos *in vitro* de matraces y biorreactores así como los tipos de elicitación: biótica y abiótica.

Metabolismo secundario

El metabolismo secundario se define como la biosíntesis, transformación y degradación de compuestos endógenos mediante proteínas de especialización (Orozco et al., 2002). Los productos de este metabolismo se denominan metabolitos secundarios y tienen aplicaciones como esencias en perfumería, colorantes, insecticidas, aditivos nutritivos o productos farmacéuticos. Se consideran tres grandes grupos de metabolitos secundarios: terpenos, fenoles y alcaloides, de éstos compuestos sólo un número reducido es producido por síntesis química (Orozco et al., 2002). En virtud de su estructura, los metabolitos secundarios son químicamente reactivos; es decir, son aptos para ingresar en los sistemas vivos, interactuar y cambiar la estructura de un receptor o blanco molecular, y penetrar celularmente donde pueden afectar varios procesos fisiológicos. De allí deriva su actividad biológica o farmacológica (Anaya y Espinosa, 2006). Las plantas producen decenas de miles de metabolitos secundarios, algunos se consideran productos naturales o drogas (con sus derivados y análogos) y representan alrededor del 25% de los productos con uso medicinal. Su empleo puede ser directo o bien como precursores y modelos para la síntesis o semi-síntesis de fármacos (Anaya y Espinosa, 2006). Las raíces acumulan, secretan y sintetizan una gama diversa de metabolitos secundarios. Se conoce que la actividad de biosíntesis en las raíces también se mantiene en cultivos *in vitro*. El cultivo *in vitro* de órganos representa una alternativa interesante para la producción de metabolitos secundarios de plantas. Dos tipos de órganos son considerados de mayor importancia: los brotes y las raíces (Bourgau et al., 2001), los cuales pueden ser cultivados a gran escala (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Los factores que permiten la acumulación de los metabolitos secundarios son: presencia de determinados tipos de células, presencia de ciertos organelos y la expresión y regulación de genes biosintéticos o catabólicos (Kreis, 2007). Una desventaja del cultivo de brotes es precisamente que no puede producir todos los metabolitos que se obtienen en las hojas de las plantas en condiciones naturales. Según Kreis (2007) si el compuesto de interés se sintetiza en las raíces, entonces no aparecerá en el cultivo de brotes. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que

aunque el compuesto se sintetice en las hojas puede que su patrón y concentración sean diferentes a los que se obtienen en plantas intactas. Como principal ventaja, se señala que el cultivo de órganos, como las raíces, es más estable genéticamente comparado con el cultivo de suspensiones celulares y callos.

Producción de fármacos a partir de cultivos *in vitro* de raíces en matraces

Los matraces agitados son los biorreactores más utilizados en el área de la biotecnología vegetal para el desarrollo de nuevos bioprocesos (Reyes et al., 2017). La ventaja de los cultivos *in vitro* realizados en matraces agitados es su bajo costo y factibilidad de manejo (Reyes et al., 2017). Las grandes compañías que trabajan en el campo de la biotecnología realizan desde 10,000 hasta 1,000,000 de experimentos en matraces agitados anualmente (Reyes et al., 2016). Los siguientes factores intervienen en el éxito de un cultivo *in vitro* de raíces: la composición del medio de cultivo (sales inorgánicas, vitaminas y fuente de carbono), temperatura, pH y radiación luminosa. Se han llevado a cabo exitosos cultivos *in vitro* de raíces en matraces para la producción de fármacos de interés médico. Por ejemplo, estudios realizados a partir de cultivos *in vitro* de raíces de *Solanum trilobatum* para producir solasodina (precursor para la producción de complejos esteroideos tales como píldoras anticonceptivas) podrían explotarse para escalarse en biorreactores (Pandurangan et al., 2010). Además, se han realizado cultivo *in vitro* de raíces de *Cannabis sativa*, los cuales se indujeron a partir de cultivo de callos en medio sólido B5 suplementado con 4 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético en oscuridad a 25 °C (Faray y Kayser, 2015). El análisis del contenido de cannabinoides se realizó por HPLC y se confirmó por espectrometría de masas, el contenido fue de 2.0 µg g⁻¹ peso seco (Faray y Kayser, 2015). Algunos metabolitos secundarios producidos en cultivos *in vitro* de raíces son: alcaloides a partir de *Atropa belladonna* (Yang et al., 2011), saponinas y ginsenósidos de *Panax ginseng* (Kim et al., 2009), isoflavonoides a partir de *Pueraria tuberosa* (Rathore y Shekhawat, 2009), antraquinonas a partir de *Morinda royoc* (Borroto et al., 2008), entre otros. En la Figura 1 se muestran las estructuras químicas de los principales metabolitos secundarios obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de raíces en matraces agitados.

Producción de fármacos a partir de raíces cultivadas en Biorreactores

El cultivo *in vitro* de raíces a nivel matraz limita la obtención de biomasa necesaria para la producción de

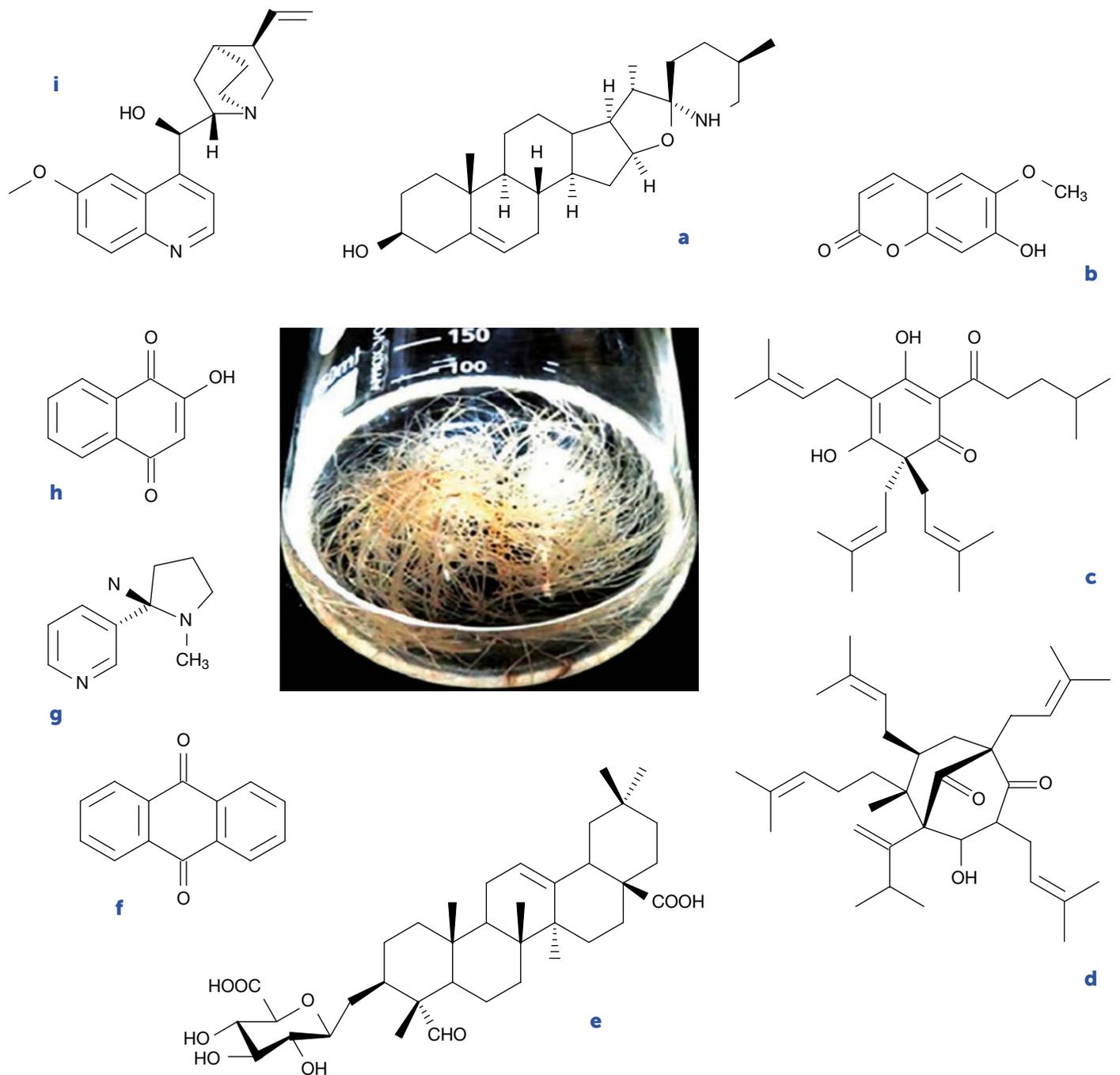


Figura 1. Esqueletos químicos de fármacos obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de raíces crecidas en matraces. a) Solasodina (P. M.: 413.64 g mol⁻¹); b) Escopoletina (P. M.: 192.16 g mol⁻¹); c) Lupulona (P. M.: 414.586 g mol⁻¹); d) Hiperforina (P. M.: 536.78 g mol⁻¹); e) Sapogenina tal como la gipsogenina 3-O-glucurónido (P. M.: 660.83 g mol⁻¹); f) Antraquinona (P. M.: 208.22 g mol⁻¹); g) Nicotina (P.M.: 162.23 g mol⁻¹); h) Lawsonia (P. M.: 174.15 g mol⁻¹); e i) Quinina (P.M: 324.42 g mol⁻¹).

metabolitos y un mayor nivel de absorción de sustancias, de tal forma que se hace necesario el escalamiento en biorreactores (Giri y Narasu, 2000). El biorreactor es el equipo central de todo bioproceso. Los biorreactores se clasifican en función del criterio que se utilice para ello: tipo y forma del biocatalizador, configuración del biorreactor, modos de operación, forma en que se suministra la energía para la agitación, entre otros (Rangel

et al., 2001). En un biorreactor, algunos factores importantes que afectan la producción de biomasa y la acumulación de metabolitos secundarios y que se deben tomar en cuenta son: la composición química del medio, la densidad del inóculo, el periodo de iluminación y las tasas de aireación (Thakore *et al.*, 2017). Diversos cultivos *in vitro* de raíces se utilizan para producir fármacos a través del uso de distintas configuraciones de

biorreactores. Entre los biorreactores de mayor uso se tienen los de columna de burbujas, tambor giratorio, columna de burbuja modificada con soporte de malla de polipropileno y columna de burbuja modificada con soporte de espuma de poliuretano (Thakore et al., 2017). Un valioso ejemplo de la producción de un fármaco producido en biorreactor, es el que se obtiene a partir de raíces de *Catharanthus roseus*, las cuales producen ajmalicina, utilizada en el tratamiento de trastornos circulatorios. En un biorreactor de tambor rotatorio se obtuvo $4.6 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ de ajmalicina (Thakore et al., 2017). Por otro lado, la producción de metabolitos secundarios de tipo alcaloide del tropano utilizados como fármacos, tales como la hiosciamina (utilizada para con-

trolar la enfermedad de Parkinson, alivio de trastornos gastrointestinales y cardiopatías), anisodamina (utilizada en el tratamiento de enteritis agudas) y escopolamina (antiparkinsoniano, analgésico local, antiespasmódico y provoca dilatación de la pupila en exámenes de fondo de ojo), se han obtenido a partir de cultivos *in vitro* de raíces de *Brugmansia candida*, las cuales fueron crecidas en biorreactor agitado de 1.5 L (Cardillo et al., 2010). La anisodamina fue el alcaloide predominante de *B. candida* alcanzando una concentración de $10.05 \pm 0.76 \text{ mg/g}$ peso seco (Cardillo et al., 2010). En la Figura 2 se muestran las estructuras químicas de los principales metabolitos secundarios obtenidos a partir de cultivo *in vitro* de raíces en biorreactores.

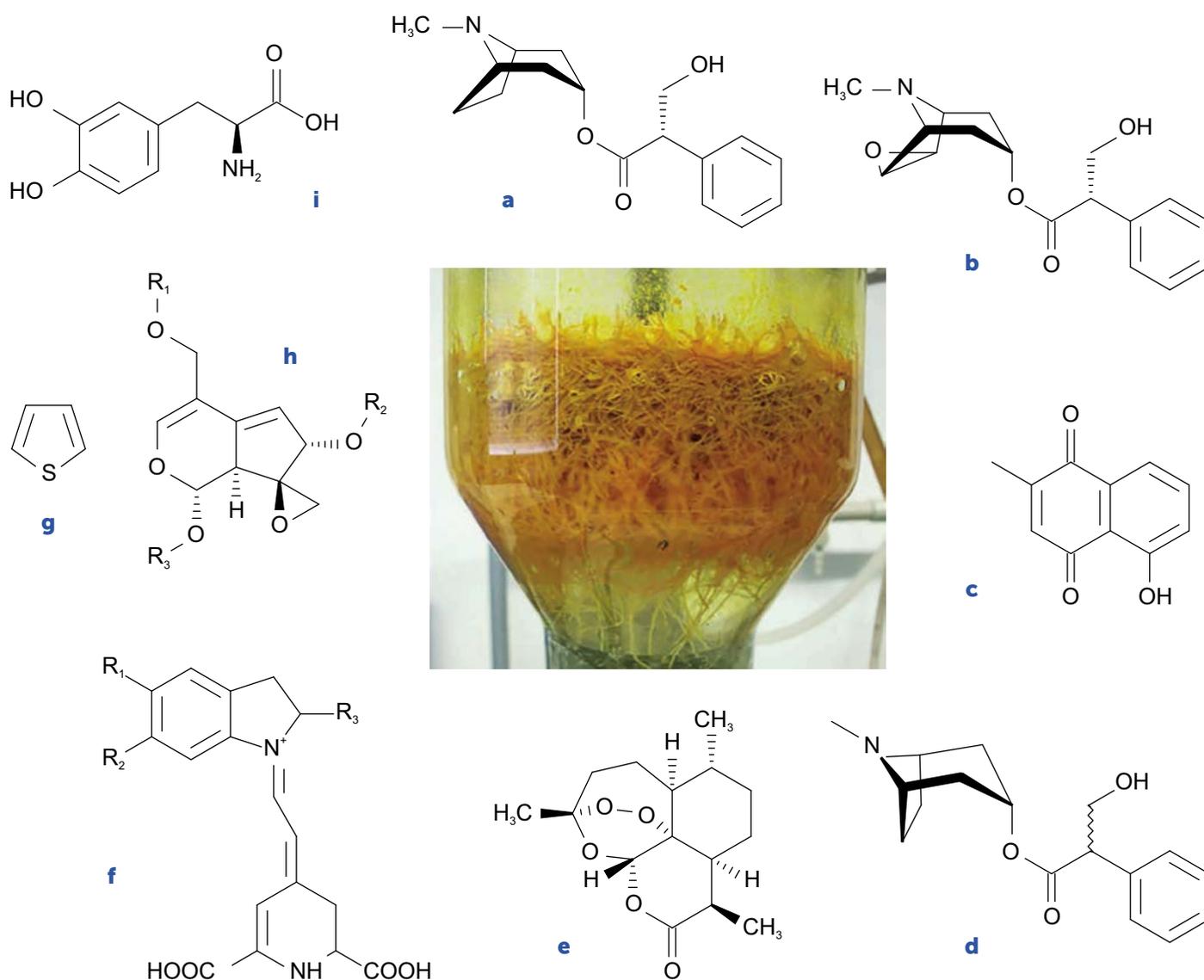


Figura 2. Esqueletos químicos de metabolitos secundarios obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de raíces crecidas en biorreactores. a) Hiosciamina (P. M.: $289.37 \text{ g mol}^{-1}$); b) Escopolamina (P. M.: $303.35 \text{ g mol}^{-1}$); c) Plumbagina (P. M.: $188.18 \text{ g mol}^{-1}$); d) Atropina (P. M.: $289.40 \text{ g mol}^{-1}$); e) Artemisinina (P. M.: $282.33 \text{ g mol}^{-1}$); f) Betacianina (P. M.: $726.60 \text{ g mol}^{-1}$); g) Tiofeno (P. M.: 84.14 g mol^{-1}); h) Valepotriato (P. M.: $422.47 \text{ g mol}^{-1}$); e i) Levodopa (L-DOPA) (P. M.: $197.19 \text{ g mol}^{-1}$).

La producción de hiosciamina y escopolamina fue significativamente mayor cuando se cultivaron raíces y brotes de *Atropa belladonna* y *Duboisia* sp. en un biorreactor dual (dos recipientes diferentes conectados con un tubo entre ellos) con respecto a un solo biorreactor que contenía ambos tipos de órganos en un mismo recipiente. El tubo conector permite la traslocación de la hiosciamina producida en las raíces hasta los brotes, donde se bio-transforma a escopolamina (Subroto *et al.*, 1996).

Elicitación *in vitro*

La técnica de elicitación es una estrategia efectuada por un elicitor adicionado (en concentraciones micromolar) al medio de cultivo *in vitro* líquido para inducir, estimular o mejorar la producción de los metabolitos secundarios (Namdeo, 2007). Las estrategias de elicitación se pueden llevar a cabo mediante elicitores bióticos o abióticos siendo una alternativa eficiente y factible en sistemas de cultivos *in vitro* de raíces (Barrales-Cureño *et al.*, 2016). Algunos factores importantes que afectan la producción de metabolitos secundarios son la concentración y el tiempo de exposición del elicitor (Dini *et al.*, 2014). Algunos ejemplos típicos de elicitores bióticos son: quitosano (Figura 3a), micelio fúngico, paredes celulares de bacterias, glicoproteínas, levaduras, moléculas que actúan como señales endógenas: ácido salicílico (Figura 3b) y ácido jasmónico (Figura 3c); mientras que los elicitores abióticos son: la temperatura, pH, luz UV, sales de metales pesados e iones metálicos.

Algunos ejemplos de elicitación realizados en cultivos *in vitro* son: la plumbagina, una naftoquinona producida por las plantas con propiedades farmacológicas de tipo antimicrobiana, se produjo en un biorreactor a los 20 días, obteniéndose 13.16 ± 1.72 mg/g peso seco de plumbagina mediante elicitación de 200 mg L^{-1} y $80 \mu\text{M}$ de jasmonato de metilo (Gangopadhyay *et al.*, 2011). También, minerales como el magnesio y el calcio se han utilizado como elicitores abióticos para sobreexpresar la

producción de ácido valerónico en *Valeriana officinalis* (Dini *et al.*, 2014). Los elicitores actúan en los mecanismos de transducción de señales, los estímulos externos (elicitores) causan un aumento en el nivel de Ca^{2+} citoplásmico a través del ciclo del fosfatidilinositol y sistema de la adenilato ciclasa. Se ha acumulado evidencia que sugiere que las células vegetales contienen los principales componentes del ciclo del fosfatidilinositol, y de AMPc (Kaplan *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

Los cultivos *in vitro* de raíces en matraces son una exitosa alternativa de producción de fármacos en biotecnología vegetal y sirven como un indicador importante para calcular el escalamiento en biorreactores con el objetivo de lograr una mayor producción y comercialización de fármacos. La manipulación de las raíces vegetales en biorreactores es atractiva y la convierte en una excelente opción para realizar investigaciones de máxima producción de fármacos a nivel industrial. En un futuro la demanda de los metabolitos secundarios de interés farmacológico producidos en raíces mediante el cultivo *in vitro* será cada vez mayor dada su estabilidad bioquímica y genética, así como su diferenciación morfológica, siendo una alternativa comercialmente factible y sustentable.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRO-DEP), el apoyo UIEP-PTC-039 otorgado al Proyecto de investigación: "Análisis de Metabolitos Secundarios con Enfoque Anticáncer y Nutricional en Árboles y Plantas Medicinales en Comunidades de la Sierra Norte de Puebla" realizado en la Universidad Intercultural del Estado de Puebla.

LITERATURA CITADA

- Anaya L.A.L., Espinosa G.F.J. 2006. La química que entretiene a los seres vivos. Ciencias. 83:4-13.
- Baque M.A., Sang-Hyun M., Eun-Jung L., Jian-Jiang Z., Kee-Yoeup P. 2012. Production of biomass and useful compounds from

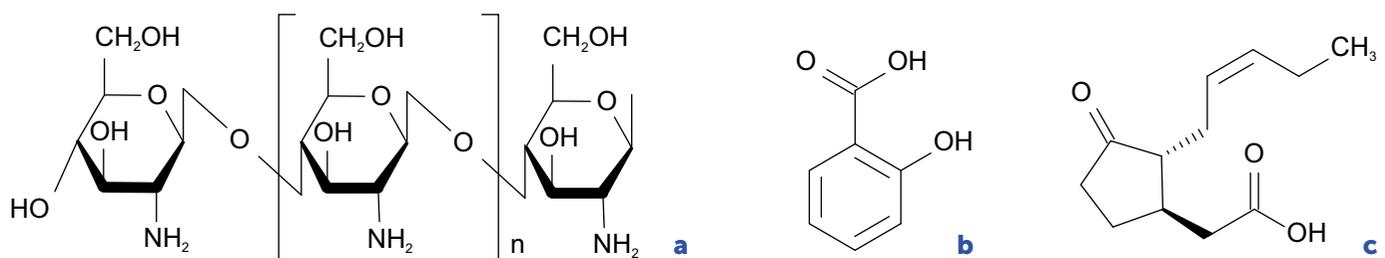


Figura 3. Estructuras químicas de: a) quitosano, b) ácido salicílico y c) ácido jasmónico.

- adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*. 30(6): 1255-1267.
- Barrales-Cureño H.J., Reyes-Reyes C., Díaz-Bautista M., Pérez R.A., Castañeda M.A., Zaragoza R.J.E., Andrade H.P., Luna C.A., Osuna-González Jordi Orlando, López V.L.G., Chávez S.S. 2017. Diseño de bioprocesos y bioproductos en ingeniería de células vegetales. *Mexican Journal of Biotechnology* 2(2): 11-39.
- Borroto J., Coll J., Rivas M., Blanco M., Concepción O., Tandron Y.A., Hernández M., Trujillo R. 2008. Anthraquinones from in vitro root culture of *Morinda royoc* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 94: 181-187.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
- Cardillo A.B., Rodriguez T.J., Giulietti A.M. 2016. Establishment, culture, and scale-up of *Brugmansia candida* hairy roots for the production of tropane alkaloids. *Methods in Molecular Biology*. 1391: 173-186.
- Dini T.M.R., Abbaspour N., Jafari M., Samadi A. 2014. Elicitation of Valeric Acid in the Hairy Root Cultures of *Valeriana officinalis* L (Valerianaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutic Research* 13(6): 943-949.
- Eapen S., Mitra R. 2001. Plant hairy root cultures: Prospects and limitations. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 4: 107-120.
- Farang S., Oliver Kayser. 2015. Cannabinoids production by hairy root cultures of *Cannabis sativa* L. *American Journal of Plant Sciences* 6: 1874-1884
- Gangopadhyay M., Dewanjee S., Chakraborty D., Bhattacharya S. 2011. Role of exogenous phytohormones on growth and plumbagin accumulation in *Plumbago indica* hairy roots and conservation of elite root clones via synthetic seeds. *Industrial Crops Products*. 33: 445-450.
- Giri A., Narasu M. L. 2000. Transgenic hairy roots. Recent trends and applications. *Biotechnology Advances*. 18(1): 1-22.
- Kaplan B., Sherman T., Fromm H. 2007. Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters*. 581(12): 2237-2246.
- Kim Y.K., Yoo D.S., Xu H., Park N.I., Kim H.H., Choi J.E., Park S.U. 2009. Ginsenoside content of berries and roots of three typical Korean ginseng (*Panax ginseng*) cultivars. *Natural Product Communications*. 4(7): 903-906.
- Kreis W. 2007. *In-vitro* culturing techniques of medicinal plants. In: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology*. From basic research to industrial application, pp. 157-185. Wiley Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Maynard L., Loosli J.K., Hintz, H.F., Warner, R.G. 1981. *Nutricion animal*. 4a edicion. Mc Graw-Hill. Mexico: Pp. 640.
- Namdeo AG. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*. 1(1): 69-79.
- Orozco S.F., Hoyos S.R., Arias Z.M.E. 2002. Cultivo de células vegetales en biorreactores: Un sistema potencial para la producción de Metabolitos secundarios. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 55(1): 1473-1495.
- Pandurangan A., Khosa R.L., Hemalatha S. 2010. Antinociceptive activity of steroid alkaloids isolated from *Solanum trilobatum* Linn. *J Asian Nat Prod Res*. 12(8): 691-695.
- Pérez-Alonso N., Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal*. 11(4): 195-211.
- Rangel J.H., Pradilla M.A., Burgos C.V. 2001. Biorreactores: Modelos Matemáticos y su Simulación sobre una Hoja Electrónica. *Revista Ingeniería e Investigación*. 48: 20-23.
- Rathore M.S., Shekhawat N.S. 2009. Micropropagation of *Pueraria tuberosa* (Roxb. Ex Willd.) and determination of puerarin content in different tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99:327-334.
- Reyes C., Terrón K., Reynoso R., Rubí H., Chávez S., Barrales-Cureño H.J., López-Valdez L.G. 2016. Desarrollo de un software para la caracterización de matraces y fermentadores agitados mecánicamente. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 3: 42-58.
- Reyes R.C., López V.L.G., Chávez, S.S., Terrón M.K.A., Díaz B.M., Barrales C.H.J. 2017. *Status quo* de la Ingeniería de matraces agitados. In: Instituciones de Educación Superior. La labor investigadora e innovadora en México. Chavira J.G., Ortiz O.M., Montoto G.A., Díaz J.J.L. Cheyenne, Estados Unidos de América. Science Associated (Ed). p. 182.
- Subroto M.A., Kwok K.H., Hamill J.D. 1996. Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 481-494.
- Thakore D., Srivastava A.K. 2017. Production of biopesticide azadirachtin using plant cell and hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences*. 17: 997-1005.
- Yang C., Chen M., Zeng L., Hang L., Liu X., Tang, K., Liao Z. 2011. Improvement of Tropane alkaloid production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by over expressing Pmt and h6h genes. *Plant Omics*. 4: 29-33.