

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

ESCALAMIENTO DEL CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Azadirachta indica* (NEEM) EN  
BIORREACTOR TANQUE AGITADO PARA LA PRODUCCIÓN DE AZADIRACTINA

Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología.

Laura Sánchez Calvo

Cartago, Junio 2016

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

ESCALAMIENTO DEL CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Azadirachta indica* (NEEM) EN  
BIORREACTOR TANQUE AGITADO PARA LA PRODUCCIÓN DE AZADIRACTINA

Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología.

Laura Sánchez Calvo

Cartago, Junio 2016

## RESUMEN

*Azadirachta indica* es un árbol conocido por su capacidad de sintetizar metabolitos secundarios. Entre estos metabolitos destaca la azadiractina (Aza), triterpenoide ampliamente utilizado como un potente insecticida natural. La producción de este compuesto por métodos tradicionales no cumple con la demanda del mercado y la síntesis química aún no es posible, debido a la complejidad de esta molécula. Debido a ello, se ha buscado nuevas herramientas biotecnológicas que permitan la producción de azadiractina. El objetivo de este proyecto fue evaluar la producción de azadiractina en el cultivo celular de *Azadirachta indica* en biorreactor tipo tanque agitado.

Para ello se establecieron suspensiones celulares a partir de callo friables, inducidos a partir de semillas colectadas en Bagaces, Guanacaste, Costa Rica, empleando como regulador de crecimiento el TDZ suplementado con caseína hidrolizada, lo cual permitió un crecimiento de biomasa máximo de 10,71mg/L en 18 días de cultivo. Además, las suspensiones celulares se escalaron a un volumen de 3L en un biorreactor tipo tanque agitado.

Se evaluó además, el mejor solvente y método de extracción, con lo cual el metanol y la agitación con temperatura mostraron los mejores coeficientes de extracción. Por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) se analizaron muestras de campo, plantas *in vitro* y suspensiones celulares (en matraz y biorreactor) para cuantificar la cantidad de azadiractina producida en los diferentes sistemas, con lo cual se mostró una alta producción de azadiractina en semilla, alcanzando valores de 18,4mg/g seco de muestra, mientras que en hoja de campo se obtuvo 8,8mg/g seco. Adicionalmente, en hoja *in vitro* se produjo 0,8mg/g de Aza, mientras que las raíces *in vitro* no presentaron este compuestos en cantidades cuantificables por el método.

En suspensiones celulares se alcanzó una producción máxima de 167,85mg/L de cultivo, mientras en biorreactor se obtuvo 42,13mg/L. En ambos casos la producción de Aza se relacionó directamente con el crecimiento en biomasa.

Las concentraciones obtenidas al analizar el material, sugieren la presencia de material élite en campo y, por ende, buenos rendimientos en la producción de Aza en material *in vitro*, lo cual perfila el uso de esta herramienta biotecnológica como viable para satisfacer la demanda del compuesto en el mercado, considerando la necesidad de realizar ajustes y optimizaciones del proceso.

**Palabras clave:** *Azadirachta indica*, suspensiones celulares, insecticida, escalamiento, biorreactor, tanque agitado, azadiractina, HPLC.

## ABSTRACT

*Azadirachta indica* is a tree known for its ability to synthesize secondary metabolites. Among these metabolites highlights azadirachtin (Aza), triterpenoid widely used as a potent natural insecticide. The production of this compound by traditional methods do not meet market demand and chemical synthesis is not yet possible due to the complexity of this molecule. Because of this, has been sought new biotechnological tools that make possible the production of azadirachtin. The objective of this project was to evaluate azadirachtin production in cell culture of *Azadirachta indica* in stirred tank bioreactor type.

For this, cell suspensions were established from friable callus, induced from seeds collected in Bagaces, Guanacaste, Costa Rica, using as a growth regulator TDZ supplemented with hydrolyzed casein, allowing maximum growth of biomass 10,71mg / L in 18 days of culture. In addition the cell suspensions were scaled to a volume of 3L stirred tank bioreactor type.

It also evaluated the best solvent and extraction method. Methanol and stirring with temperature showed the best extraction coefficients. Through high-performance liquid chromatography (HPLC) field samples, plants *in vitro* and cell suspensions (in flask and bioreactor) were analyzed to quantify the amount of azadirachtin produced in different systems. There was a high production of azadirachtin in seed, reaching values of 18,4mg/g dry sample, whereas in field sheet was obtained 8,8mg / g dry. Additionally, *in vitro* leaf occurred 0.8mg / g. *In vitro* roots did not show quantifiable amounts of Aza by the method. Compounds quantifiable by the method employed.

Cell suspensions in flasks, reached a maximum production of 167,85mg/L of culture, while in bioreactor was obtained 42,13mg/L. In both cases Aza production was directly related to biomass growth.

The concentrations obtained by analyzing the material, suggesting the presence of elite material and, therefore, good production rates of Aza *in vitro* material. This allows to consider that the use of this biotechnological tool is viable to meet the demand of the compound on the market, considering that the process requires adjustments and optimizations.

**Keywords:** *Azadirachta indica*, cell suspensions, insecticide, scaling, bioreactor, stirred tank, azadirachtin, HPLC.

## ACREDITACIÓN

### ESCALAMIENTO DEL CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Azadirachta indica* (NEEM) EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO PARA LA PRODUCCIÓN DE AZADIRACTINA

Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología.

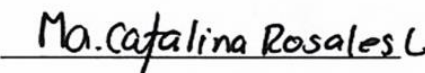
#### Miembros del Tribunal

  
\_\_\_\_\_

Ph.D. Gina Porras Brenes  
Asesora - CENIBiot

  
\_\_\_\_\_

M.Sc. Silvana Alvarenga Venutolo  
Profesora Asesora - ITCR

  
\_\_\_\_\_

M.Sc. Catalina Rosales López  
Lectora

Cartago, Junio 2016

## DEDICATORIA

A Dios por su misericordia y amor.

A Jedreck, mi hijo, por ser mi motivo.

*Laura*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot-CeNAT), por abrir las puertas a esta investigación. Al Dr. Sergio Madrigal, por el apoyo en la realización de este proyecto. A Daniel Esquivel y Karla Montero, por su colaboración administrativa. Sumamente agradecida con ustedes.

A mis tutoras, Silvana Alvarenga, Gina Porras y Catalina Rosales, por todos sus valiosos aportes y acompañamiento en este proceso.

A Rodrigo Muñoz y Magdalena Viquez por su ayuda invaluable. Gracias por ser pilares en este proyecto.

Al personal de la Unidad de Organismos Fototróficos, por la ayuda brindada siempre, en cada detalle, en especial a Mónica Rojas.

A mi gran familia por el apoyo en todo momento, mis padres, hermanas y sobrinos que siempre han estado presentes. Todo es gracias a ustedes.

A mi hijo, por ser el motor de mi lucha, mi campeón que también se sacrificó conmigo en este proceso y ahora merece más que yo este triunfo.

A mis compañeros de licenciatura, donde encontré amigos de por vida.

A las hermanas Madres de los Desamparados y Asociación Divina Misericordia por el crecimiento personal y apoyo emocional. Por ser mi segundo hogar. Mi agradecimiento eterno a ustedes y todos los niños. Sus enseñanzas son un gran tesoro, en especial a las hermana Rosario y Caridad.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	I
ABSTRACT .....	II
ACREDITACIÓN.....	III
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XI
ABREVIATURAS.....	XII
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
1. Bioprospección y Metabolismo Secundario.....	4
2. <i>Azadirachta indica</i> .....	6
3. Técnicas Biotecnológicas para la producción de compuestos .....	17
4. Recuperación y cuantificación de compuestos.....	18
III. OBJETIVOS .....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos.....	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Obtención del material vegetal.....	22
2. Multiplicación de plantas <i>in vitro</i> .....	24
3. Establecimiento de suspensiones celulares .....	25
4. Escalamiento del cultivo celular en biorreactor.....	27
5. Análisis químicos .....	29
V. RESULTADOS .....	34
1. Obtención del material vegetal.....	34
2. Multiplicación de plantas <i>in vitro</i> .....	35
3. Establecimiento de suspensiones celulares.....	41



4.	Escalamiento del cultivo celular en biorreactor.....	44
5.	Análisis químicos .....	46
VI.	DISCUSIÓN.....	51
1.	Obtención del material vegetal.....	51
2.	Multiplicación de plantas <i>in vitro</i> .....	54
3.	Escalamiento del cultivo celular en biorreactor.....	61
4.	Análisis químicos .....	62
VII.	CONCLUSIONES .....	68
VIII.	RECOMENDACIONES .....	69
IX.	LITERATURA CITADA.....	70
X.	ANEXOS.....	79

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo para inducción de callo de <i>A. indica</i> .....	16
Cuadro 2. Condiciones cromatográficas empleadas por diversos autores para la cuantificación de azadiractina mediante HPLC .....	20
Cuadro 3. Tratamientos de subcultivo de callo de <i>Azadirachta indica</i> . .....	22
Cuadro 4. Tratamientos de desinfección de semilla para la introducción <i>in vitro</i> .....	23
Cuadro 5. Tratamientos de multiplicación de plantas <i>in vitro</i> de <i>A. indica</i> con el empleo de diferentes reguladores de crecimiento. ....	24
Cuadro 6. Métodos estadísticos empleados para el análisis de datos de los tratamientos de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>A. indica</i> . .....	25
Cuadro 7. Condiciones de operación para el escalamiento de suspensiones celulares de <i>A. indica</i> en biorreactor. ....	28
Cuadro 8. Solventes utilizados para la extracción de limonoides intracelulares. ....	29
Cuadro 9. Condiciones cromatográficas empleadas para la cuantificación de azadiractina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia .....	33
Cuadro 10. Análisis de varianza de los tratamientos para subcultivo de callo de <i>A. indica</i> con base en peso fresco y seco .....	34
Cuadro 11. Porcentaje de contaminación y germinación de embriones de <i>A. indica</i> . ....	35
Cuadro 12. Valores de p de las diferentes pruebas estadísticas para en el análisis de las variables de respuesta empleadas para el ensayo de multiplicación de <i>A. indica</i> .....	36
Cuadro 13. Comparaciones estadísticas para la variable número de nudos de vitroplantas de <i>A. indica</i> .....	38
Cuadro 14. Análisis no paramétrico de la cantidad de nudos en plantas <i>in vitro</i> de <i>A. indica</i> .....	38
Cuadro 15. Comparaciones múltiples de Kruskal Wallis para el número de brotes de plantas <i>in vitro</i> de <i>Azadirachta indica</i> . ....	39
Cuadro 16. Longitud de plantas <i>in vitro</i> de <i>A. indica</i> analizadas mediante prueba ANOVA.....	39
Cuadro 17. Peso fresco de las plantas <i>in vitro</i> de <i>A. indica</i> analizadas mediante prueba ANOVA	40
Cuadro 18. Peso seco de plantas <i>in vitro</i> de <i>A. indica</i> analizadas mediante prueba ANOVA.....	41
Cuadro 19. Volumen celular sedimentado y peso seco máximo en los tratamientos de suspensiones celulares. ....	44
Cuadro 20. Producción de azadiractina en suspensiones celulares de <i>A. indica</i> a nivel de matraz, empleando diferentes variables .....	65
Cuadro 21. Producción de azadiractina en suspensiones celulares de <i>A. indica</i> a nivel de matraz, empleando diferentes variables .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Origen de algunos grupos de metabolitos secundarios de plantas. ....	5
Figura 2. Distribución mundial de <i>Azadirachta indica</i> . ....	7
Figura 3. Ruta sintética de los terpenos y su clasificación .....	9
Figura 4. Estructura química de la azadiractina. ....	10
Figura 5. Biorreactores en operación (controlador y frasco de cultivo), bajo condiciones de oscuridad.....	28
Figura 6. Hoja compuesta de neem.. ....	31
Figura 7. Vitroplanta con hojas neem empleadas para el análisis químico.....	32
Figura 8. Tratamientos de multiplicación de <i>A. indica</i> . ....	35
Figura 9. Plantas de <i>A. indica in vitro</i> procedentes de los diferentes tratamientos de multiplicación .....	36
Figura 10. Longitud, número de brotes y número de nudos de plantas <i>in vitro</i> empleando cuatro medios de cultivo .....	37
Figura 11. Peso Fresco y Peso Seco en plantas <i>in vitro</i> empleando cuatro medios de cultivo.....	37
Figura 12. Agregados celulares de <i>A. indica</i> formados en cultivos en suspensión a nivel de matraz. ....	41
Figura 13. Cinética de crecimiento de células en suspensión de <i>A. indica</i> en matraz con medio de cultivo SN1 .....	42
Figura 14. Cinética de crecimiento de células en suspensión de <i>A. indica</i> en matraz con medio de cultivo SN2.....	42
Figura 15. Índices de crecimiento de células en suspensión de <i>A. indica</i> en matraz con medios de cultivo SN1 y SN2. ....	43
Figura 16. Células en suspensión de <i>A. indica</i> en matraz con medio de cultivo SN2, en fase estacionaria. ....	43
Figura 17. Cinética de crecimiento de células en suspensión de <i>A. indica</i> en biorreactor tipo tanque agitado con medio de cultivo SN2. ....	44
Figura 18. Biorreactores con cultivo celular de <i>A. indica</i> en fase exponencial.....	45
Figura 19. Variación de DO, agitación y pH del medio de cultivo durante el tiempo en el cultivo de <i>A. indica</i> en biorreactor de tanque agitado. ....	45
Figura 20. Células de <i>A. indica</i> cultivadas en biorreactor en fase exponencial. ....	46
Figura 21. Determinación del factor de cuantificación de limonoides utilizando diferentes solventes de extracción.....	46

Figura 22. Determinación del factor de cuantificación de limonoides utilizando diferentes métodos de extracción.....	47
Figura 23. Concentración de azadiractina en dos muestras de plantas en condiciones de campo e <i>in vitro</i> ..	48
Figura 24. Concentración de azadiractina por gramo de masa seca en cultivos celulares de <i>A. indica</i> a nivel de matraz..	48
Figura 25. Concentración de azadiractina por litro de cultivo celular de <i>A. indica</i> en a nivel de matraz. ....	49
Figura 26. Concentración de azadiractina por gramo de masa seca en cultivos celulares de <i>A. indica</i> en biorreactor tipo tanque agitado..	49
Figura 27. Concentración de azadiractina litro de cultivo celular de <i>A. indica</i> en biorreactor tipo tanque agitado..	50

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de cultivo M&S (1962).....	79
Anexo 2. Supuestos estadístico de las variables del tratamiento de multiplicación .....	80
Anexo 3. Análisis Estadístico de medios de cultivo de suspensiones celulares .....	83
Anexo 4. Curva de calibración de azadiractina .....	84
Anexo 5. Medición de Volumen Celular Sedimentado y Peso Seco de cultivo en biorreactor en fase exponencial .....	85

## **ABREVIATURAS**

**CENIBiot:** Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas

**ITCR:** Instituto Tecnológico de Costa Rica

**CIB:** Centro de Investigación en Biotecnología

**TS:** Tripticasa y soya

**TDZ:** Tiazurón

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography

**ANA:** Ácido Naftalenacético

**BAP:** Ácido Bencilaminopurínico

**Aza:** Azadiractina

**CDKs:** Quinasas dependientes de ciclinas

**AIA:** Ácido Indol acético

**AIB:** Ácido Indol butírico

**KIN:** Kinetina

**2,4-D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos fototróficos, que tienen la capacidad de producir su propio alimento a partir de la energía lumínica que obtienen del sol, mediante varios procesos y reacciones químicas conocidas como fotosíntesis. Además de producir su propio alimento, las plantas producen gran cantidad de compuestos que favorecen su sobrevivencia y les confiere cualidades específicas que les han permitido adaptarse al ambiente o sobrevivir ante condiciones de estrés. Estos compuestos se denominan metabolitos y se clasifican en primarios o secundarios (Chawla, 2009).

Los metabolitos secundarios vegetales son compuestos orgánicos producidos por las plantas, los cuales no son esenciales para el funcionamiento de la célula vegetal y no participan en procesos bioquímicos comunes. Aunque no muestran ninguna función en los procesos de crecimiento y desarrollo de las mismas, son imprescindibles en las plantas que los producen, generalmente para mejorar su adaptabilidad o como respuesta a diversos tipos de estrés (Mbuga, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007).

Algunos de estos compuestos se emplean en el control biológico de insectos, en la cosmetología, industria alimenticia, así como para la elaboración de productos farmacéuticos y terapéuticos (Karuppusamy, 2009).

A lo largo de la historia, se han descubierto algunas plantas capaces de producir compuestos con efecto insecticida y/o antimicrobiano, lo cual se proyecta como una excelente opción para el control de plagas por medio de productos naturales, reduciendo la contaminación ambiental por efectos residuales y tóxicos de los plaguicidas químicos convencionales.

Los esfuerzos por evitar las pérdidas económicas en la producción agrícola a causa de insectos plaga, han conducido al uso masivo de insecticidas sintéticos. Esto ocasiona problemas de contaminación en suelo y agua, efectos tóxicos sobre organismos benéficos, personas y otros vertebrados e incluso, un aumento potencial de la resistencia de insectos plaga (Rossetti *et al.*, 2008; Zapata *et al.*, 2009).

El uso extensivo e indiscriminado de insecticidas sintéticos conduce a la necesidad de aplicar estrategias para el control de plagas que no afecten el medio ambiente, entre los que destaca el uso de extractos vegetales, por ser biodegradables y no crear resistencia en insectos. El estudio de la actividad insecticida de extractos vegetales y fitoquímicos se ha intensificado debido a la demanda de alimentos orgánicos y a las exigencias actuales de la defensa fitosanitaria de los productos hortícolas (Delgado, 2011).

Entre las plantas conocidas con propiedades insecticidas por la producción de terpenoides, se encuentran *Azadiracta indica*, conocida comúnmente como Neem y responsable de la elaboración de azadiractina (aza), compuesto con propiedades comprobadas en el control de numerosas especies de insectos y microorganismos, sin causar efectos dañinos en mamíferos (Fernández y González, 2008).

Debido a la importancia comercial de la azadiractina, se requiere su producción en grandes cantidades, por lo cual se ha recurrido a estrategias biotecnológicas para la producción del metabolito en condiciones *in vitro*, principalmente con el objetivo aumentar la escala productiva con fines investigativos y aplicados.

La producción por métodos tradicionales de estos metabolitos, requiere amplias extensiones de terreno y empieza a entrar en conflicto con el uso de terreno cultivable para la producción agrícola o bien, promueve la expansión de dichos territorios lo cual implica la deforestación de selva, ocasionando pérdidas irreversibles en la biodiversidad o daños ambientales significativos (Makunga y van Staden, 2008; Pérez y Jiménez, 2011).

Por esta razón es de suma importancia el uso de herramientas biotecnológicas para la producción de compuestos naturales, provenientes de plantas, lo cual evita el uso destructivo de las mismas, disminuye los espacios físicos de producción del compuesto y permite un cultivo celular con condiciones controladas para aumentar la producción del compuesto de interés (Vanisree y Tsay, 2007).

En el caso de *Azadirachta indica*, ha crecido el interés de los investigadores debido las propiedades insecticidas e incluso medicinales, que posee esta planta, las cuales han sido ampliamente utilizadas y probadas mediante bioensayos de laboratorio y en condiciones de campo.

Entre los principales inconvenientes que se han presentado en la producción convencional de este compuesto, destaca el requerimiento de gran cantidad de material vegetal (hoja y semilla), que los árboles pueden tardar hasta diez años para llegar a su estado productivo y finalmente, la cantidad y la calidad necesaria para asegurar el alto contenido de los compuestos activos puede variar dependiendo de las condiciones agroclimáticas en que se encuentre la planta cultivada. Por otra parte, la estructura compleja de la azadiractina, dificulta la síntesis por métodos químicos (Pavón, 2010).

En los últimos años se ha estudiado el cultivo de células de *A. indica* y su escalamiento en biorreactores, los cuales son recipientes en los que se llevan a cabo procesos bioquímicos de manera controlada, es decir, que provee al cultivo las condiciones necesarias para su crecimiento o la formación de producto, y en principio, es posible obtener producción mayor o comparable a las producidas en campo, reduciendo los inconvenientes de la extracción *in vivo* (Eibl *et al.*, 2009).

Estudios similares se han venido desarrollando en diferentes países, por grupos de investigación diversos; sin embargo, surge la iniciativa de realizar el escalamiento de *A. indica* con material proveniente de Costa Rica, concretamente del cantón de Bagaces perteneciente a la provincia de Guanacaste. Salazar (2012) realizó ensayos en el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) para la inducción de callo y el establecimiento de suspensiones celulares a partir de material de *A. indica* colectado en Guanacaste Costa Rica, obteniendo resultados muy diversos a los reportados en la literatura, principalmente en cuanto a los reguladores de crecimiento empleados. En sus ensayos determinó que la mejor parte de la planta para la inducción de callo es el cotiledón, en presencia del regulador de crecimiento Tidiazurón (Alvarenga *et al.*, 2014).

Para el escalamiento del cultivo en biorreactores es necesario contar con protocolos para el establecimiento y cultivo de suspensiones celulares a partir de callo friable, así como conocer con detalle las condiciones físicas y químicas que permitan la multiplicación de la biomasa celular necesaria para la inoculación del sistema biorreactor. Además, es necesario determinar la cinética de crecimiento de las células en suspensión, lo cual permite establecer el momento adecuado en que el cultivo debe ser inoculado en el sistema biorreactor o bien, subcultivado en medio fresco (Chawla, 2009).

La producción de metabolitos secundarios en sistemas de biorreactor, puede desarrollarse en una sola etapa, donde se obtiene la biomasa y síntesis del compuesto de interés; o bien, en



etapas diferentes, una de producción de biomasa y otra de elicitación del compuesto mediante algún tipo de estrés o precursor (Pérez y Jiménez, 2011).

Además, es importante estandarizar los protocolos de extracción y cuantificación de los compuestos de interés para así tener condiciones de cultivo de biomasa en el sistema biorreactor, para obtener alta producción de células con potencial de producción de azadiractina mediante técnicas de elicitación físicas y/o químicas.

El presente trabajo constituye parte de los esfuerzos que ha desarrollado el IITCR en los últimos años por evaluar la producción de azadiractina en material vegetal proveniente de la provincia de Guanacaste, Costa Rica y la aplicabilidad de técnicas biotecnológicas para la producción de este compuesto. El Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) y el ITCR han unido esfuerzos para realizar investigación que permita implementar una estrategia biotecnológica para la producción de azadiractina mediante cultivo celular a partir de material colectado en Costa Rica.

En el 2012, en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) se definió un protocolo para la inducción de callo a partir de cotiledones de *A. indica*, y durante el 2013 y 2014 se iniciaron pruebas en biorreactor, sin embargo se obtuvo muy baja producción de biomasa (Alvarenga *et al.*, 2014).

Con el fin de lograr el escalamiento del cultivo celular de *A. indica* en biorreactor, se empleará la metodología descrita por otros autores, los cuales han trabajado con células de *A. indica* y especies relacionadas, así como los protocolos de cultivo *in vitro* y de callogénesis generados en CIB referentes a esta especie y la experiencia y equipamiento del CENIBiot tanto en el campo de bioprocesos con respecto a la operación de sistemas de biorreactores de tanque agitado específicamente en la Unidad de Células Vegetales, como la experiencia de la Unidad de Bioprospección para la extracción y la cuantificación de los metabolitos secundarios, mediante el empleo de técnicas cromatográficas, en los diferentes sistemas de producción.

La presente investigación, pretende evaluar la producción de azadiractina mediante el cultivo celular en suspensión de *Azadirachta indica* en biorreactor tipo tanque agitado con el fin de comparar la producción de compuesto de interés con otros sistemas de cultivo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. Bioprospección y Metabolismo Secundario

Desde los inicios de los pueblos, la biodiversidad ha constituido un recurso de supervivencia para los seres humanos, quienes han aprovechado las propiedades de los organismos vivos con fines diversos. Con el avance de la biotecnología en los países desarrollados, se ha dado un valor mercantil incalculable a la biodiversidad para la obtención de gran cantidad de materias primas y compuestos a partir de los recursos genéticos (Alarcón, 2011).

De esto deriva el término de bioprospección, que se define como la búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos que posean un valor económico actual o potencial y que se encuentran en la diversidad biológica (Duarte y Velho, 2008).

Las plantas tienen la capacidad de producir gran cantidad de compuestos como parte de su metabolismo secundario. En la mayoría de los casos, estos compuestos no son necesarios para el funcionamiento de las células ya que no participan en procesos bioquímicos vitales, sin embargo, generan a las plantas propiedades que las caracterizan y les confiere una serie de beneficios (Verpoorte y Hoopen, 2006; Zeiger y Taiz, 2006).

Durante muchos años hubo poco conocimiento acerca de la función y el valor adaptativo de la mayoría de los metabolitos secundarios, por lo que fueron considerados como productos de desecho de las plantas. Fue hasta el siglo XIX y principios del XX que se inició el estudio de estas sustancias, ya que descubrieron y reconocieron su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otras materias primas industriales (Taiz *et al.*, 2006; Valares, 2011).

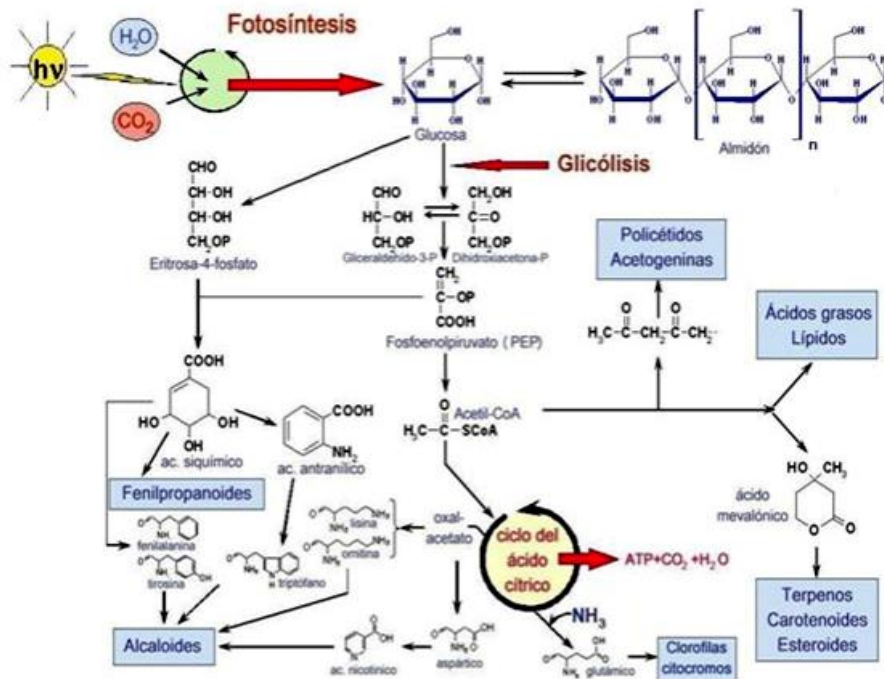
Actualmente se conocen más de 20,000 estructuras de metabolitos secundarios que han sido clasificados de manera diversa. Algunos autores los dividen por la presencia o ausencia de nitrógeno en su estructura química y los llaman nitrogenados y no nitrogenados. Entre los nitrogenados se encuentran los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos, mientras que los no nitrogenados incluyen terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Sepúlveda, *et al.*, 2003).

Por otra parte, Croteau (2000), clasificó los metabolitos secundarios producidos por las plantas en cinco grandes grupos:

- Terpenoides: Poseen un precursor de 5 carbonos (C) denominado isopreno, sin embargo, los compuestos de este grupo presentan gran diversidad estructural. Se conocen unos 25.000 diferentes.
- Alcaloides: Son compuestos que poseen al menos un átomo de nitrógeno en su estructura. Se han descrito alrededor de 12.000 en total.
- Fenoles: Estos compuestos provienen de la ruta del ácido shiquímico. Se conocen unos 8000 compuestos fenólicos tales como quinonas, cumarinas, ligninas y taninos.

- Policetometilenos: Proviene de la ruta biosintética del acetato y vía malonil-coenzima A. Se conocen alrededor de 6000 compuestos de este tipo.
- Metabolitos de biogénesis mixta: Como su nombre lo indica, provienen de la unión de dos o más rutas metabólicas mencionadas anteriormente. Algunos muy conocidos que pueden citarse son flavonoides, alcaloides, entre otros.

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono y suelen restringirse a estados específicos del desarrollo y a períodos de estrés (figura 1) (Ávalos y Pérez, 2009).



**Figura 1.** Origen de algunos grupos de metabolitos secundarios de plantas (alcaloides, fenilpropanoides y terpenos) con respecto a las rutas de metabolismo primario.

Las variaciones en la estructura de los compuestos generan perfiles metabólicos que difieren entre especies, poblaciones y órganos de las plantas, lo cual representa una estrategia de adaptación natural de éstas al ambiente y condiciones de estrés (Sepúlveda, *et al.*, 2003).

La presencia de determinados metabolitos secundarios en las plantas puede ser exclusiva de ciertas familias, géneros o especies. No todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas, sino que, por lo general, se sintetizan en pequeñas cantidades y en especies determinadas. En ocasiones, la síntesis de estos compuestos también depende de las condiciones ambientales en las que se encuentra la planta (Ávalos y Pérez, 2009).

Como consecuencia de la variedad de metabolitos secundarios existentes, también son diversas sus aplicaciones. Directamente en las plantas, los metabolitos secundarios desempeñan funciones ecológicas y de interacción planta-entorno, tales como protección de depredadores, actividad alelopática, atracción de polinizadores, protección de la planta de los rayos UV, así como resistencia a virus (Valares, 2011).

De igual forma, los metabolitos secundarios han demostrado tener un importante y significativo valor medicinal y económico, siendo empleados en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica, entre otras. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, insecticidas naturales y muchas otras aplicaciones más.

Entre las plantas productoras de metabolitos secundarios, se encuentra la especie *Azadirachta indica*, la cual es ampliamente conocida por producir más de 300 metabolitos secundarios, entre los que destacan los tetratriterpenoides o limonoides con diferentes aplicaciones biológicas y comerciales (Rodrigues, *et al.*, 2014).

## **2. *Azadirachta indica***

La familia *Meliaceae* incluye 600 especies distribuidas en 52 géneros diferentes (El-Hawary *et al.*, 2013). Las plantas pertenecientes a este género se caracterizan por ser leñosas y tener tejidos secretores de exudados aceitosos, resinosos y otras sustancias aromáticas en las hojas, ramas y tallos (Varela, 2010).

Esta familia ocupa gran variedad de hábitats, que van desde bosques lluviosos hasta áreas semidesérticas. Su importancia económica radica principalmente en la producción de madera de alta calidad, como plantas ornamentales, así como también se reconocen sus propiedades medicinales e insecticidas, debido a la producción de metabolitos secundarios biológicamente activos (Lannacone y Lamas, 2003; Varela, 2010).

Entre los géneros más estudiados recientemente de la familia *Meliaceae*, se encuentra *Azadirachta* sp., el cual se ha investigado por su capacidad de producir metabolitos secundarios con importancia medicinal e insecticida.

*Azadirachta indica*, conocido comúnmente como neem, margosa o paraíso de la India, es un árbol de tamaño de mediano a grande, con fuste recto y corto. Posee una copa densa y redondeada y una corteza arrugada de color marrón oscuro a gris (Parrotta y Chaturvedi, 2011).

### **a. Descripción taxonómica**

La taxonomía de *Azadirachta indica*, descrita por Adrein Henri Laurent de Jessieu (1830) se presenta a continuación:

- Reino: Plantae
- División: *Magnoliophyta*
- Orden: Rutales
- Suborden: Rutiniae
- Familia: Meliaceae
- Subfamilia: Melioideae.
- Género: *Azadirachta*
- Especie: *Azadirachta indica* A.Juss.

### **b. Descripción anatómica**

Es un árbol de hoja perenne y con ramas muy extendidas que puede alcanzar una altura de 5 a 15 metros (El-Hawary *et al.*, 2013). Su tronco es cilíndrico, relativamente corto y recto, con un

diámetro aproximado de 0,8 a 1,63 metros y una longitud de 6,5 a 25 metros. Posee una corteza dura, con duramen de color marrón rojizo y albura color rojo pálido (Reyes *et al.*, 2003).

Las hojas son compuestas y pueden medir de 2 a 4 dm de longitud, con 20 a 31 hojas verde oscuras de 3 a 8 cm de longitud. Frecuentemente no posee el foliolo terminal y el peciolo es corto. Las hojas jóvenes son de color rojo o púrpura y la forma de las hojas maduras es menos asimétrica y sus márgenes están dentados (Girish y Shankara, 2008).

Cada flor individual está compuesta de 5 lóbulos del cáliz, redondeados y de color verde pálido, 5 pétalos blancos, oblongos y redondeados de 0,5 cm de largo y 10 estambres unidos en un tubo y un pistilo con un ovario redondeado y un estilo delgado (Parrotta y Chaturvedi, 2011).

Las estructuras florales son hermafroditas, pequeñas, blancas y fragantes y aparecen en panículas estrechas y ramificadas que miden generalmente de 5 a 15 cm de largo (El-Hawary *et al.*, 2013).

Los frutos de neem son drupas con forma de aceitunas de 1,0 a 2,0 cm de largo, son lisos y de un color de amarillo verdoso a amarillo cuando alcanzan la madurez. Generalmente cada fruto contiene una sola semilla, ocasionalmente dos, con forma elíptica, rodeadas de una pulpa dulce, con olor fuerte. La fructificación empieza cuando los árboles tienen de 3 a 5 años de edad, siendo más abundante en árboles maduros de aproximadamente 10 años de edad (Pal, 2007).

El sistema radical se compone de una raíz principal que desarrolla raíces laterales que pueden alcanzar hasta 18 metros de longitud, lo cual le permite obtener agua de zonas profundas del suelo (Girish y Shankara, 2008).

### c. Origen y Distribución

El origen del árbol de Neem no se conoce con exactitud, sin embargo los primeros registros proponen que es nativo del sur de Asia y regiones del continente Africano (Pal, 2007). Se cree que su origen se presentó en países como Pakistán, India, Sri Lanka, Myanmar, Tailandia, Malasia e Indonesia (figura 2) (Cruz y del Ángel, 2004).

Esta planta se ha naturalizado en muchos países tropicales y subtropicales, tales como Australia, islas del Caribe y América principalmente en Brasil y Colombia aunque también existen pequeñas poblaciones en Nicaragua, Costa Rica, Honduras y El Salvador (Cruz y del Ángel, 2004).



Figura 2. Distribución mundial de *Azadirachta indica*. Fuente: Bin, 2011

Este árbol crece principalmente en zonas semiáridas, con precipitaciones entre 200 hasta 1200 mm y a alturas desde los 0 a los 1500 metros sobre el nivel del mar. Es resistente a temperaturas extremas, incluso pueden crecer desde cerca de los 0°C hasta los 49°C. En su hábitat original, crece en llanos bajos, con una elevación de 850 msnm y en otros países se han encontrado hasta una elevación de 1500 msnm. Es tolerante a muchos tipos de suelos incluyendo suelos poco profundos, secos y pedregosos, los vertisoles, arenas lixiviadas y las arcillas. Esta planta se adapta bien a suelos con un rango de pH entre 5,0 y 8,5, sin embargo se ha notado que crecen mejor si se encuentra en valores de pH de 6,0 a 6,5 y en un suelo profundo, poroso y bien drenado (Parrotta y Chaturvedi, 2011).

En Costa Rica existen cultivos en zonas secas, que presentan poca precipitación al año y con altas temperaturas tales como Santa Cruz y Bagaces de Guanacaste, Alajuela y Atenas (Rojas, 2010).

#### **d. Metabolismo Secundario de *Azadirachta indica***

Entre las plantas que han proporcionado mayor cantidad de terpenoides activos con efecto insecticida se encuentran las especies de las familias Meliaceae y Labiatae. La primera, se caracteriza por la biosíntesis de triterpenos altamente oxidados comúnmente conocidos como tetranortriterpenoides, meliacinas o limonoides, de reconocida actividad frente a insectos (Fernández y González, 2008).

El árbol de *A. indica*, destaca entre las especies más estudiadas y utilizadas de la familia de las Meliáceas, debido su capacidad de producir, principalmente, limonoides, y compuestos bioactivos tales como nimbidina, nimbidato de sodio, nimbolida, gedunina, azadiractina, ácido gálico, margolona y polisacáridos, entre otros (Parmar *et al.*, 2004).

Los terpenoides suelen ser insolubles en agua y derivan de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen, así pues, los terpenos de 10 carbonos (C) contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (figura 3) (Avalos y Pérez, 2009).

Por su parte, los limonoides son triterpenoides que carecen de cuatro de los 30 carbonos provenientes de seis unidades isoterpénicas, por lo tanto, son sustancias de 26 carbonos a cuyo esqueleto hidrocarbonado le faltan cuatro carbonos de la cabeza de la última unidad de isopentenilo. Estos compuestos son las sustancias amargas de los cítricos que actúan como anti herbívoros, el más conocido es por ser altamente efectivo en el control de insectos plaga, es la azadiractina que posee múltiples aplicaciones en la medicina, industria alimentaria, agronómica, entre otros (Caballero, 2004).

La actividad biológica de los limonoides ha sido revisada por Champagne *et al.*, citado por Avalos y Pérez, 2009 y Caballero, 2004), donde se informa de los efectos de 78 limonoides, sobre la alimentación y el desarrollo en ocho órdenes de insectos. Se sabe que solo la azadiractina tiene efecto sobre más de 200 especies de insectos y ácaros.

Se han aislado aproximadamente otros 24 principios activos con actividad biológica sobre artrópodos. En las semillas se han identificado además salanina, meliantriol, nimbina,

nimocinolida e isonimocinolida, con probable actividad antialimentaria, de inhibición del crecimiento y de la oviposición. La diversidad de principios activos reduce la aparición de resistencia, por ello varios investigadores señalan la necesidad de información precisa sobre los principios químicos contenidos en los extractos de neem, su mecanismo de acción y eficacia (Isea *et al.*, 2013).

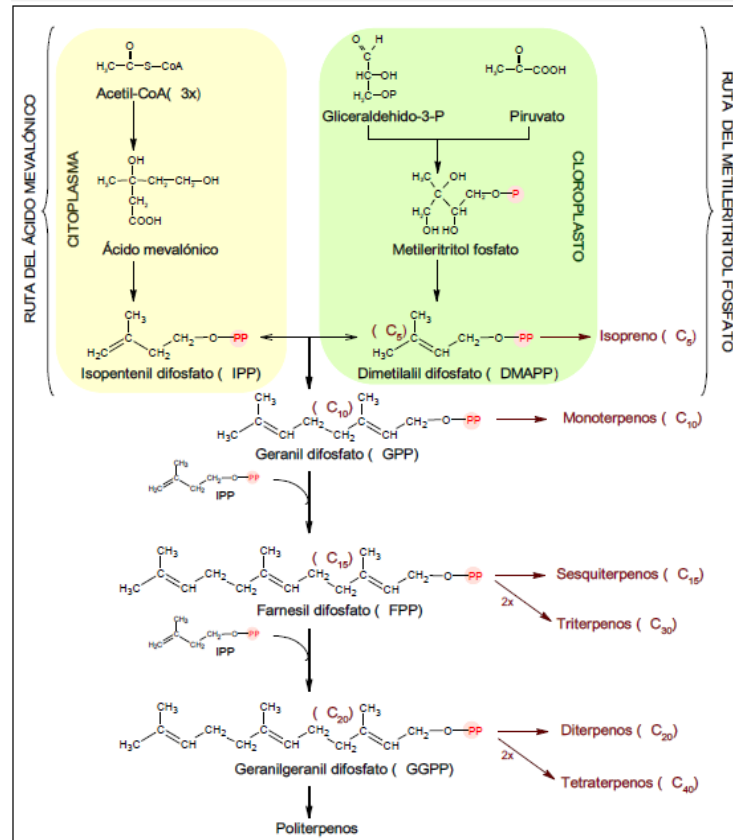


Figura 3. Ruta sintética de los terpenos y su clasificación Fuente: (Avalos y Pérez, 2009)

### e. Azadiractina

La azadiractina (C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>O<sub>16</sub>) pertenece al grupo de los tetrahidroterpenoides conocidos como limonoides y destaca como uno de los 2 principios biocidas más estudiados y de mayor concentración en el árbol de neem (figura 4). Además de ser el compuesto más abundante en este árbol, es biodegradable y su producción es exclusiva de *A. indica*, localizado principalmente en la corteza, hojas, frutas, y especialmente en las semillas (Morgan, 2009; Isea *et al.*, 2013).

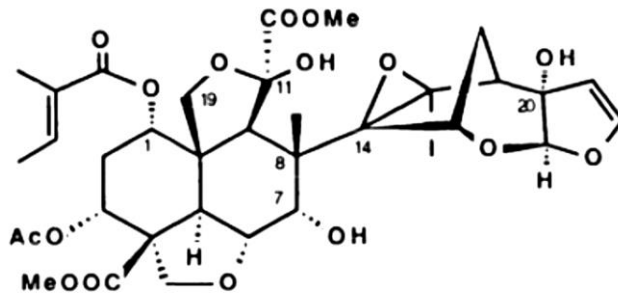


Figura 4. Estructura química de la azadiractina.

La azadiractina se produce en el neem, con alrededor de otros 100 limonoides incluyendo azadiractina B-K con estructuras estrechamente relacionadas, lo cual hace difícil su separación y cuantificación (Thejavathi *et al.*, 1995). En extractos, es posible identificar con facilidad aproximadamente 18 compuestos, siendo la azadiractina el que se encuentra en mayor concentración, conformada por al menos nueve isómeros estrechamente relacionados, de los cuales el tipo A y B son dominantes con concentraciones cercanas al 83% y 16% respectivamente (Orozco y Rodríguez, 2007).

La azadiractina es un agente quimioterapéutico eficaz para controlar algunas plagas ya que posee un efecto antialimentario, que afecta el patrón de nutrición de insectos y larvas. Adicionalmente, interrumpe su ciclo de vida e inhibe el desarrollo de los huevos, larvas y pupa, así como altera los apareamientos y la comunicación sexual, y bloquea la muda de las larvas o ninfas (Orozco y Rodríguez, 2007).

Thejavathi *et al.* (1995) probaron la estabilidad de la azadiractina en seis disolventes orgánicos: cloroformo, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, metanol y etanol en concentración de 0,025% p/v y después de 7 días de incubación a temperatura ambiente se determinó que la azadiractina es razonablemente estable en todos los disolventes ensayados (95-99%). Adicionalmente, estos mismos autores determinaron la estabilidad de la azadiractina después de ser sometida a tratamiento de sonicación durante 30 minutos (100%; n = 5), así como mencionan su susceptibilidad a la luz y a la variación en el pH.

#### **f. Importancia y Usos**

El árbol del Neem (*Azadirachta indica* A Juss), ha sido ampliamente estudiado ya que posee gran importancia, en virtud de sus características reconocidas, de uso milenario en culturas antiguas, principalmente en el sur de Asia (Leos y Salazar citados por Ledesma y Ledesma, 2012).

El término neem proviene de nimba, en lengua clásica india, en la cual era conocido como *Sarva Roga Nivarini*, que significa curador de todas las enfermedades, debido a sus múltiples usos en la medicina tradicional del sur Asiático (Royal Botanic Gardens, citado por Orozco y Rodríguez, 2007).

La importancia de este árbol es muy variada, debido a las múltiples aplicaciones que se han encontrado para todas las partes de la planta: semillas, cáscara de la semilla, hojas y tronco (Pavón, 2010).



Entre los usos principales se encuentran:

- *Reforestación y protección de suelos contra la erosión*

El neem puede ser usado para reforestar terrenos erosionados o desérticos debido a su capacidad para crecer en diferentes tipos de suelos, pobres en nutrientes, con un amplio rango de pH y en zonas cálidas y bajas desde el nivel del mar hasta más o menos los 900 metros de altura (Biswas *et al.* 2002). En el Ecuador el árbol de neem fue introducido en la provincia de Manabí en 1978 a través de semillas provenientes de Nigeria como especie forestal para emplearse en la reforestación de las zonas secas de esta provincia (Ledesma and Ledesma, 2012).

- *Uso Ornamental*

Principalmente es zonas costeras, se ha sembrado a la orilla de carreteras y caminos como decorativo y para el aprovechamiento de la sombra que produce (Ledesma and Ledesma, 2012).

- *Especie maderable*

La madera de neem es fragante, moderadamente dura y pesada; se asemeja a la caoba cuando seca y tiene una textura de mediana a tosca, con una fibra estrecha. Los maderos se secan bien, son durables incluso bajo condiciones expuestas y son resistentes al ataque de gran cantidad de insectos. La madera de neem se usa para la construcción general, mueblería, carretas, implementos agrícolas, botes, postes, mangos de herramientas, tambores, entre otros. En la India se usa comúnmente para planteles de sombra y de ornamento particularmente a lo largo de las carreteras en las ciudades y los pueblos (Parrotta y Chaturvedi, 2011; Reyes *et al.*, 2003).

- *Uso medicinal*

El neem posee muchas propiedades medicinales, muy conocidas y utilizadas a lo largo de los años en la medicina ayurvédica, las cuales han sido comprobados por la ciencia actual (Gualtieri *et al.*, 2004).

Las hojas de neem son utilizadas como coadyudante en problemas digestivos, estimulan el funcionamiento del hígado, combaten algunas afecciones pulmonares y disminuyen los niveles de glucosa en la sangre de pacientes diabéticos (Parmar *et al.*, 2004).

Se conoce que el neem funciona como antiinflamatorio, antipirético, analgésico, estimulante del sistema inmunológico, antihelmíntico, antiemético, antitumoral, antiulceroso, hepatoprotector, antioxidante, hipoglicemiante y diurético (Biswas *et al.* 2002).

En el sistema cardiovascular actúa reduciendo la presión sanguínea, el colesterol y las irregularidades cardíacas, mientras que se ha comprobado, de igual manera, su efecto en el tratamiento del acné, debido a sus propiedades antibacteriales, y antiinflamatorias (Parmar *et al.*, 2004).

Adicionalmente, limpiar la piel con productos derivados del neem contribuye a equilibrar los niveles de grasa de la piel (Productos de Neem, 2008).

Se ha probado su eficacia en el tratamiento de la úlcera de estómago debido a sus componentes antihistamínicos y antibacterianos, que reducen la inflamación y destruyen las bacterias que la causan. Esto, aunado a que su acción interna no elimina la flora intestinal

beneficiosa y no tiene efectos secundarios, le brinda grandes ventajas en comparación con otros métodos de tratamiento químico o tradicional (Gualtieri *et al.*, 2004).

- *Insecticida*

Las sustancias producidas por el neem afectan entre 400 y 500 especies de diferentes órdenes de insectos, algunos de los cuales han evidenciado resistencia de insecticidas sintéticos (Lindquist *et al.* y García citados por Pavón, 2010). Entre los órdenes susceptibles a los extractos de neem pueden citarse Blattodea, Caelifers, Dermaptera, Diptera, Ensífera, Hetroptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Phasmida, Phthiraptera, Siphonoptera y Thysanoptera (Neem Foundation, 2006 citado por Orozco and Rodríguez, 2007).

Estas sustancias son utilizadas en la agricultura biológica por ser biodegradables y no tóxicas; se cree que podrían sustituir a los insecticidas petroquímicos debido a que son muy efectivas contra los insectos fitófagos e inactivas contra abejas y fauna auxiliar (Gualtieri *et al.*, 2004).

Las propiedades insecticidas de los extractos de neem se deben principalmente a los tetranortriterpenoides o limonoides que contienen, entre los cuales destaca la azadiractina como el principal compuesto con efecto insecticida (David, *et al.* 2000).

Se ha comprobado que algunos compuestos presentes en las semillas de neem como la azadiractina, salanina, meliantriol, nimbina, nimocinolina e isonimocinolina poseen efecto antialimentario en las larvas de los insectos, lo cual provoca una disminución en su crecimiento o retraso en las etapas del ciclo biológico, así como efectos tóxicos, inhibición de la ovoposición de las hembras o malformaciones en insectos adultos (Isea *et al.*, 2013 y Pavón, 2010).

Estudios realizados por Pavón (2010) demuestran que el uso de compuestos a base de *A. indica* producidos *in vitro* representan una alternativa para el control de *Copitarsia decolora*, un lepidóptero que ataca a cultivos de importancia agronómica en México.

El efecto de la azadiractina depende de la dosis, la plaga a controlar y el método de extracción del compuesto. Por ejemplo, Esparza *et al.*, (2010), determinaron que el proceso de extracción en frío con metanol de la semilla molida con endocarpio de *Azadirachta indica* A. Juss., concentró más azadiractina que otros procesos de extracción acuosa y hexánica, y produjo mayor efecto insecticida en *Aphis gossypii* Glover, sin causar fitotoxicidad asociada en *Ixora coccinea* L.

Adicionalmente se ha obtenido resultados exitosos de efecto antialimentario sobre larvas de *S. frugiperda*, por medio de la aplicación de extractos intra y extra extracelulares producidos *in vitro* de las suspensiones de *A. indica* (Capataz *et al.*, 2007).

- *Antimicrobiano:*

El aceite de Neem afecta el crecimiento de muchas especies de bacterias patógenas tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella paratyphi* y *Vibrio cholerae* (Rao, 2005).

- *Otros usos:*

El aceite que se extrae de la semilla de neem es usado como combustible para lámparas o como lubricante para maquinaria (Ozuna, 2000).

Por otra parte, se ha encontrado en los extractos de neem una opción alternativa para el tratamiento antihelmíntico, que puede sustituir el uso de los productos comerciales sintéticos empleados hasta el momento para este fin, los cuales son caros y se encuentran poco disponibles para los campesinos en las áreas rurales. Esto representa un gran beneficio para el control de enfermedades parasitarias en animales, tomando en cuenta que algunos de estos productos sintéticos pueden tener efecto residual en los productos alimenticios de origen animal (Dublín y Roque, 2012).

La aplicación semanal de extractos acuosos de semilla de neem en las áreas anatómicas preferidas por las garrapatas es eficaz para el control de este ácaro en el ganado caprino, disminuyendo los costos y el peligro potencial para los seres humanos (Schwalbach *et al.*, 2003). Complementariamente, se ha determinado que los extractos de hojas o semillas de neem parecen tener efectos tóxicos dosis-dependientes, letales y directos, sobre garrapatas adultas, ninfas, larvas y huevos; así como sobre el ciclo reproductivo, disminución de la masa de huevos y modificación del número y tiempo de eclosiones de parásitos en diferentes animales (Isea *et al.*, 2013).

Los compuestos de neem se han utilizado como ingrediente útil en jabones, desinfectantes, productos farmacéuticos y cosmetológicos, así como se ha aprovechado la pasta derivada de la extracción del aceite de la semilla como un excelente fertilizante varias veces más rico en nutrientes para las plantas que el estiércol (NRC, citado por Ozuna, 2000).

Otra de las propiedades de los extractos acuosos de neem es su efecto espermaticida. Khillare y Shrivastav (2003) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de extractos de hojas maduras y tiernas, y encontraron que con el aumento en la concentración, hay una disminución lineal en el porcentaje de motilidad de los espermatozoides, convirtiéndose en cero en un lapso de 20 segundos a una dosis de 3 mg/l.

#### **g. Comercialización**

Actualmente existen en el mercado productos derivados de neem para la agricultura ecológica, tales como Oleorgan, Organihum Neem, Olinim, Azatina 3 EC (comercializado en Costa Rica, entre otros (AgroPro, 2011; Aguilar, 2011). Además se distribuyen los extractos para combatir los piojos, por ejemplo de la marca SwissJust, Champú Bio Neem anticaspas, jabones combinados con Aloe Vera. La marca Parker Neem comercializa productos variados, desde jabones, champú para mascotas, cremas, fertilizantes, aceites y extractos de hoja (Parker Neem, 2013; Swiss Just, 2014).

#### **h. Cultivo Tradicional**

El Neem puede establecerse usando semillas, plántulas, árboles a raíz desnuda, tocones, renuevos, chupones de raíz, esquejes, entre otros, sin embargo, las formas más comunes son por medio de esquejes y semilla debido a que son los métodos más seguros, sencillos y económicos (Osuna, 2000).

Naturalmente, la dispersión y multiplicación de *A. indica* se lleva a cabo por medio de semillas que son esparcidas, en su mayoría, por los pájaros, sin embargo, debido a la importancia de esta especie, se han establecido plantaciones comerciales.

El método de multiplicación por medio de semilla, incluye su recolección y tratamiento de secado respectivo para ser almacenadas hasta el momento de su siembra. Adicionalmente se practica la propagación asexual por medio de estacas, que permite obtener plantas antes de que

el árbol llegue a edad adulta y con características idénticas a las de su donador (Parrotta y Chaturvedi, 2011).

Es importante destacar que las semillas únicamente mantienen su viabilidad durante dos meses, germinan entre los cuatro y diez días después de la siembra y se reportan porcentajes de germinación entre el 60 y el 85% (Tewari, 1992).

#### ***i. Cultivo biotecnológico***

- *Cultivo in vitro para multiplicación de la especie*

El uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* para la multiplicación de material de neem, surge con el objetivo de micropropagar material élite y disminuir la variación que se presenta en la reproducción sexual, así como de reducir los tiempos de producción y solventar los problemas de baja calidad de la semilla (Srivastava *et al.*, 2009).

- *Producción de metabolitos secundarios*

Como se ha dado a conocer, los metabolitos secundarios que produce la planta de neem poseen gran importancia comercial para la elaboración de productos con una amplia gama de usos, lo cual permite ver la necesidad aumentar la producción de este compuesto.

Entre los principales inconvenientes que se han presentado, destaca que se requiere gran cantidad de material vegetal (hoja y semilla), que los árboles pueden tardar hasta diez años para llegar a su estado productivo y finalmente, la cantidad y la calidad necesaria para asegurar el alto contenido de los compuestos activos puede variar dependiendo de las condiciones agroclimáticas en que se encuentre la planta cultivada (Pavón, 2010).

Aunado a lo anterior, la estructura compleja de la azadiractina, hace difícil su producción comercial mediante síntesis química, por lo cual, el suministro de productos elaborados a partir de neem depende de la extracción de las semillas, las cuales son difíciles de obtener en la cantidad y calidad necesarias para asegurar el alto contenido de azadiractina. Las técnicas del cultivo de tejidos y suspensiones celulares de neem, han sido desarrolladas y estudiadas como métodos alternativos para la síntesis del producto (Esparza *et al.*, 2010).

Una de las herramientas biotecnológicas que ha cobrado importancia en los últimos años en la bioprospección de metabolitos secundarios, a partir del cultivo de células vegetales, es el escalamiento de células aisladas en biorreactores.

Los biorreactores son recipientes en los cuales se lleva a cabo un incremento de biomasa celular, para la producción de metabolitos secundarios bajo condiciones controladas, y tienen como objetivo proveer las condiciones químicas y físicas óptimas para el crecimiento del material cultivado (Hvoslef y Preil, 2005).

Los biorreactores de tanque agitado, son recipientes que, como su nombre lo indica, cuentan con un sistema de agitación mecánica que permite una mayor homogeneidad en la distribución de las células y del medio de cultivo, el cual aunado al sistema de aireación, hace posible el control del oxígeno disuelto en el medio (Arias *et al.*, 2009).

Previo al escalamiento de cultivo celular en biorreactores, se requiere la formación de callo para el establecimiento de suspensiones celulares. Los callos son una masa de tejidos con poca organización, producto de la proliferación de células y obtenidos por la transferencia de

segmentos de tejidos de plantas a medios con nutrientes deseables para dicha multiplicación celular (Alvarenga *et al.*, 2002).

El callo se produce por el estímulo de las hormonas endógenas de la planta, así como por los reguladores químicos adicionados al medio de cultivo, generalmente compuesto por sales, vitaminas y fuente de carbono. Dichos compuestos producen una activación metabólica de las células que se encuentran en estado de quiescencia y se inicia una división activa de las mismas (George, 2008).

Entre los reguladores de crecimiento empleados para la formación de callo, se encuentran las auxinas, debido a su capacidad para inducir la división celular. Esta propiedad se encuentra estrechamente relacionada con la participación de las auxinas en la regulación de la mitosis en células vegetales. Las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) en función de sus unidades reguladoras, las ciclinas, son las encargadas de la regulación principal del ciclo celular de las células eucarióticas. La expresión del gen que codifica para la cdc2 (la quinasa dependiente de ciclina principal), está regulado por auxinas (Zeiger and Taiz, 2006).

Para el establecimiento de suspensiones celulares, es deseable que el callo sea friable, es decir que puedan disgregarse fácilmente al ser manipulados o inoculados en medio líquido en movimiento. Esta propiedad favorece la viabilidad en las suspensiones y que las mismas sean aptas para su análisis o posterior escalamiento empleando biorreactores u otros equipos que requieren células disgregadas (Su, 2006).

Las suspensiones celulares se definen como células libres y agregados celulares distribuidos en un medio líquido en movimiento. Estas, generalmente inician a partir de callo, el cual se coloca en medio de cultivo líquido, bajo condiciones de agitación para favorecer la aireación y homogenización del cultivo en el medio. Las células del callo empiezan a separarse mediante división celular, formando pequeños agregados de células que a su vez se fraccionarán, para formar nuevos agregados (George, 2008).

Es común que los investigadores empleen el mismo medio de cultivo de inducción de callo para el establecimiento de suspensiones celulares o, en algunos casos, modifican las concentraciones de los reguladores de crecimiento, por lo general, disminuyen en la concentración en la etapa de suspensiones (Kearney, 1994).

El cultivo de células en suspensión es una alternativa que permite la multiplicación de biomasa, así como la producción continua del metabolito de interés independiente de los cambios climáticos y las condiciones naturales de campo, así como la obtención de material homogéneo y la selección de líneas celulares altamente productivas. Además, esta técnica permite elicitación o manipulación de las células para que produzcan grandes cantidades de metabolitos bajo condiciones específicas, debido a que las células son más fáciles de manipular que plantas completas para incrementar la producción de compuestos conocidos o para inducir la producción de compuestos nuevos (Taticek *et al.*, 1991).

Actualmente, los casos de éxito comercial relacionados con la producción de metabolitos secundarios mediante el escalamiento de células vegetales son escasos. Esto se debe a la baja productividad e inestabilidad de líneas celulares y problemas ingenieriles, relacionados directamente con el escalado y purificación de los compuestos (Su, 2006; citado por Salazar, 2012).

## 2. Avances de cultivo *in vitro* y producción de compuestos mediante métodos biotecnológicos en *Azadirachta indica*.

En los últimos años, se han desarrollado protocolos para el cultivo *in vitro* y micropropagación de plantas, así como para la inducción de callo, establecimiento de suspensiones celulares y escalamiento de *A. indica* en biorreactores.

Wewetzer (1998) indujo callo friables de *A. indica* a partir de segmentos de hoja, empleando medio M&S (1962), suplementado con 100g/L de myo-Inositol, 0,4mg/L de Tiamina-HCl, 0,2 mg/L de AIA y 0,1 mg/L de BAP. Bajo condiciones de oscuridad y una temperatura de 26°C. Por otra parte, se ha logrado la formación de callo utilizando medio MS (1962), con 4 mg/L de BAP y 1mg/L de BAP, y suplementando el medio con 2mg/L de glicina (Kearney, 1994.)

En el cuadro 1, se detalla la composición de reguladores de crecimiento complementarios al medio M&S (1962) empleados para la inducción de callo en *A. indica*.

**Cuadro 1.** Composición del medio de cultivo para inducción de callo de *A. indica*.

Medio	Reguladores de crecimiento (mg/L)						Referencia
	BAP	AIB	KIN	2,4-D	AIA	TDZ	
1	2	4	-	-	-	-	Allan <i>et al.</i> , (1994)
2	4	8	-	-	-	-	Prakash <i>et al.</i> , (2005)
3	-	-	0,5	1	-	-	Veeresham y col., (1998)
4	1	-	-	-	0,2	-	Wewetzer, (1998)
5	0,2	-	0,2	-	-	-	Sujanya y col., 2008
6	-	-	-	-	-	1,5	Salazar, 2012

Fuente: Modificado de Orozco y Rodríguez, 2007.

Con respecto al cultivo de células en matraz, se ha determinado la producción de azadiractina en concentraciones aceptables, con valores cercanos a 72.81 mg/L (Balaji *et al.*, 2003).

Existe gran cantidad de trabajos relacionados con el cultivo de células en suspensiones celulares y el escalamiento en biorreactor, en los cuales se definen diversos parámetros de crecimiento con el fin de describir el comportamiento de las células de *A. indica* y, de esta manera, comprender y mejorar el proceso de producción de los compuestos de interés. En este campo, Orozco y Rodríguez (2007) han logrado grandes avances y han desarrollado investigaciones detalladas con material proveniente de México.

Como es sabido, el comportamiento de las células puede variar entre variedades y zonas de procedencia del material, por lo cual, se considera de suma importancia, analizar la producción de azadiractina en material *in vitro* proveniente de Costa Rica, para evaluar la producción de compuestos de interés, así como comparar los resultados con los obtenidos por otros grupos de investigación de otras regiones geográficas.

La producción de azadiractina en condiciones *in vitro* puede ser aumentada, empleando elicitors, generalmente, precursores de la ruta metabólica (Orozco y Rodríguez, 2007).

Se ha postulado que en términos generales el metabolismo secundario está relacionado con los procesos de diferenciación, niveles de auxina/citocinina y concentración de azúcares. En callos cultivados en M&S (1962), con dos concentraciones de sacarosa, 15 y 30g/L, se produjo mayor concentración de azadiractina (aza) con la adición de 15 g/L (Wewetzer, 1998).

Adicionalmente, se ha propuesto realizar dos etapas para obtención de azadiractina a partir de *A. indica*: una enfocada con la producción de biomasa y otra propiamente para la elicitación, producción y obtención del limonoide (Raval, *et al.*, 2003).

De manera complementaria, Prakash y Srivaskava (2005) lograron alcanzar rendimientos celulares de 15 g de peso seco (PS) de células por litro y 45 mg de aza por litro optimizando la concentración de glucosa, nitrógeno y fosfato.

Debido a la importancia y aplicación de la azadiractina, es importante evaluar y desarrollar protocolos para el escalamiento de células que producen este compuesto empleando material crecido en nuestro país, que permita comparar los rendimientos en diferentes etapas.

### **3. Técnicas Biotecnológicas para la producción de compuestos**

#### **a. Escalamiento en biorreactores**

Los biorreactores son recipientes en el que se lleva a cabo un incremento de biomasa celular para la producción de metabolitos secundarios bajo condiciones controladas, que tienen como objetivo proveer las condiciones químicas y físicas óptimas para el crecimiento del material cultivado (Hvoslef y Preil, 2005).

Existen varios tipos de biorreactores empleados con fines específicos. El tanque agitado destaca como un recipiente de gran utilidad en el establecimiento de bioprocesos, debido a sus características y aplicaciones. Este tipo de biorreactores son aplicables a células vegetales, debido a que desde 1990 se ha comprobado que dichas células no son extremadamente sensibles al estrés hidrodinámico como se creía y pueden crecer fácilmente en este tipo de recipientes, lo cual ha sido respaldado con gran cantidad de reportes de escalamiento de células en biorreactores de tanque agitado (Westphal, 1990 citado por Verpoorte *et al.*, 1999).

### **3. Métodos para la medición de parámetros de crecimiento**

Es de suma importancia conocer los parámetros de crecimiento, requerimientos nutricionales y determinar las diferentes fases de crecimiento del callo y las suspensiones, es decir, aproximar el comportamiento de las células en los diferentes días de cultivo (Santos *et al.*, 2010).

Por lo general, las cinéticas de crecimiento de las células, tanto en callo como en suspensión, muestran las siguientes etapas principales (George, 2008):

- Fase inicial (fase *lag*): es una etapa de inducción de la división celular. Las células se adaptan al medio de cultivo nuevo en el que se encuentran.
- Fase de crecimiento exponencial y lineal: es una etapa de división celular activa y crecimiento del cultivo.
- Fase estacionaria: el cultivo deja de crecer, debido a que la tasa de multiplicación de las células disminuye o, bien, el cultivo se mantiene estable ya que la cantidad de células que se

dividen se compensa con las células que mueren, por lo cual el cultivo se mantiene constante.

- **Fase de muerte:** el número de células viables disminuye. Se presenta cuando los nutrientes del medio de cultivo empiezan a agotarse.

Para determinar el crecimiento en un cultivo celular, se han empleado diferentes métodos, entre los cuales destaca la medición de biomasa fresca y seca, así como el conteo de células, por ser sencillos y efectivos. Estos métodos, han sido empleados en numerosas investigaciones, juntos o de manera individual, para determinar la cinética de crecimiento tanto de células en suspensión como en el cultivo de callo.

- **Peso Fresco:** Consiste en determinar el peso de las células en fresco, sin someterlas a ningún proceso de secado. La medición de este parámetro para callos, se realiza retirándolos del frasco de cultivo y midiéndolos directamente en una balanza analítica o de precisión, o bien en un recipiente (usualmente placas petri) con peso conocido, para luego, por diferencia, calcular el peso de los callos.

En el caso de las suspensiones celulares, la técnica se basa en retirar por completo el medio de cultivo líquido, sin dañar las células para que no pierdan turgencia. Para esto, se han empleado métodos como la filtración al vacío en papel filtro con peso conocido, o el centrifugado de las suspensiones celulares, mediante el cual las células se precipitan y se elimina el sobrenadante (medio líquido) (Bedoya y Hoyos, 2010).

- **Recuento Directo:** Este método es empleado para la determinación de células vegetales y microbianas mediante el uso de un microscopio de luz. El recuento directo consiste en colocar una muestra de la suspensión celular en una cámara de recuento (generalmente cámara de Neubauer), las cuales se encuentran marcadas con pequeños cuadrantes de área y volumen conocidos, por lo tanto, es posible realizar la relación células por unidad de volumen, multiplicando por el valor de conversión que va a depender del volumen del tipo de cámara de conteo utilizada (Madigan *et al.*, 2004).

- **Peso Seco:** Esta técnica se basa en lograr extraer el contenido acuoso tanto del medio de cultivo como del interior de las células y pesar la biomasa total seca del cultivo (Cimino *et al.* 2006). Existen varios métodos para llevar a cabo esta técnica en suspensiones celulares. El más sencillo, es retirar el medio líquido mediante la filtración o centrifugado del cultivo y, posteriormente, secar las células en una estufa a una temperatura entre los 70 y los 80 grados centígrados, durante un mínimo de 24 horas o bien, a 60°C durante 48 horas, o hasta que el peso se mantenga constante (Hermoso y Menéndez, 2000).

#### **4. Recuperación y cuantificación de compuestos.**

Cuando se producen metabolitos a partir de un cultivo celular, es necesario separar el producto de interés de la mezcla de reacción, en la cual es posible encontrar subproductos, sales y otras impurezas. Por esta razón la separación, purificación y cuantificación del compuesto son etapas trascendentales para evaluar la efectividad del sistema productivo. Por lo tanto, además de mejorar las condiciones de reacción buscando un elevado rendimiento de formación del producto deseado, es sumamente importante plantear procesos eficientes de separación que permitan una recuperación máxima del producto a partir de la mezcla de reacción (Angurell *et al.*, 2014).

Cuando el metabolito de interés se produce y mantiene en el interior de las células vegetales, como es el caso de la azadiractina, es necesario realizar una lisis celular para recuperar la mayor



cantidad posible del compuesto. La acumulación intracelular de los metabolitos es desventajoso si se requiere utilizar continuamente o reutilizar la biomasa; además eleva los costos de purificación y disminuye la producción (Arias *et al.*, 2009).

Existen diferentes métodos químicos o físicos para lograr la excreción de los metabolitos secundarios al medio de cultivo. En el primer caso, se emplean surfactantes y solventes, lo cual suele romper o deformar permanentemente la membrana celular (Bassetti *et al.*, 1995). Complementariamente, Orozco y Rodríguez (2007) reportan el uso de Tritón X-100 como agente permeabilizante de las membranas de *Azadiracta indica*, que permite liberar la azadiractina de las células para poder cuantificarla y purificarla.

Los métodos físicos empleados para la ruptura celular, pueden comprender la aplicación de choques térmicos, electroporación, cambio del pH externo, alta presión e inmovilización y ultrasonido, el cual es ampliamente utilizado en la liberación de compuestos intracelulares al medio de cultivo ya que aumenta la penetración del solvente y permeabiliza la pared celular (Arias *et al.*, 2009).

Una vez que el compuesto es liberado al medio de cultivo, se requiere realizar un proceso de separación o recuperación del mismo. La extracción con disolventes es una de las técnicas más utilizada para separar un compuesto a partir de una mezcla sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial. Esta técnica se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde la mezcla hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico (Angurell *et al.*, 2014).

El solvente de extracción debe ser insoluble o soluble en grado limitado en la solución que se va a extraer y el soluto que se va a extraer debe presentar una elevada afinidad por el solvente de extracción (Arias *et al.*, 2009).

Trabajos realizados por Thejavathi *et al.* (1995) comprobaron la solubilidad de la azadiractina en diferentes solventes tales como cloroformo, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, metanol y etanol. Estos mismos autores recomiendan la extracción con metanol y sonicación como método de extracción eficiente para muestras sólidas.

Para la cuantificación de azadiractina, se han empleado diferentes solventes de extracción tales como metanol– agua (90:10), hexano, metanol puro mediante centrifugación a 13 000 rpm, a  $-4^{\circ}\text{C}$  y éter de petróleo, destacando siempre la eficiencia de los solventes con polaridad media o alta (Sankar *et al.*, 2006; Sujanya *et al.*, 2008, Gai *et al.*, 2011; Ávalos, 2014).

Entre las técnicas para la cuantificación de azadiractina más empleadas se encuentra la cromatografía, específicamente la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (por sus siglas en inglés HPLC).

La cromatografía es una técnica analítica basada en la separación de las moléculas debido a las diferencias en su estructura o composición. En general, cromatografía implica mover una muestra a través de un sistema compuesto por una fase estacionaria. Las moléculas de la muestra tendrán diferentes afinidades e interacciones con el soporte estacionario, por lo tanto las moléculas y componentes de la muestra que tengan una interacción más estrecha con la fase estacionaria se moverá más lentamente a través de la columna que los componentes con las interacciones más débiles (Kupiec, 2004).

Las separaciones cromatográficas pueden llevarse a cabo utilizando una variedad de fases estacionarias, incluyendo sílice inmovilizado sobre placas de vidrio (cromatografía en capa

fina), gases volátiles (cromatografía de gases) , papel (papel cromatografía) y líquidos (cromatografía líquida) (Kupiec, 2004).

En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Bajo este concepto, la separación por HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria. A diferencia de la cromatografía de gases, ésta no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra (Skoog y Leary, citados por Hernández, 2009).

La HPLC tiene muchas aplicaciones ya que es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular (Skoog y Leary, citados por Hernández, 2009).

Las condiciones cromatográficas usadas por diversos autores para la cuantificación de azadiractina pueden observarse en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Condiciones cromatográficas empleadas por diversos autores para la cuantificación de azadiractina mediante HPLC

Parámetros	Referencia			
	Esparza <i>et al.</i> (2010)	Bedoya y Hoyos (2010)	Sunjanya <i>et al.</i> 2008	Singh y Chaturvedi (2012)
Columna	C-18 125 × 4 mm	C-18 125 x 4,6 mm	C-18 50 x 4,6mm	C-18 250 ×4.6 mm
Tasa de flujo (ml/min)	2	0,7	1	0,5
Longitud de onda (nm)	214	218	215	210
Sistema de detección	-	-	SPD-10 AVP UV-VIS	UV–visible espectrofotómetro
Volumen de inyección (µL)	20	10	20	20
Fase móvil	acetonitrilo: agua	acetonitrilo: agua (30:70)	acetonitrilo:agua (35:65)	metanol:agua (90:10)
Tiempo de retención (min)	2,504	-	19,5	-
Estándar	azadiractina al 95% de pureza (Sigma A 430)	azadiractina al 95% de pureza (Sigma A 430)	azadiractina al 95% de pureza (Sigma A 430)	azadiractina al 95% de pureza (Sigma A 430)

Fuente: CENIBiot, 2016.

### III. OBJETIVOS

#### **Objetivo general**

Evaluar la producción de azadiractina en el cultivo celular de *Azadirachta indica* en biorreactor tipo tanque agitado.

#### **Objetivos específicos**

1. Establecer suspensiones celulares a partir de callo de *A. indica*.
2. Escalar el cultivo celular de *A. indica* a biorreactor de tanque agitado con 3L de volumen de trabajo.
3. Cuantificar por métodos cromatográficos la producción de azadiractina en semilla de campo, plantas *in vitro*, suspensiones celulares en matraz y células en biorreactor tipo tanque agitado.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), ubicado en San José, Costa Rica específicamente en la Unidad de Células Vegetales y la Unidad de Bioprospección, en colaboración con el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

##### 1. Obtención del material vegetal.

###### 1.1. Recepción y mantenimiento de callo friable

Los callos friables de *Azadirachta indica* fueron obtenidos a partir de semillas (cotiledones) introducidos en el CIB, ITCR. Adicionalmente, se indujo la formación de callo a partir de semillas (cotiledones) provenientes de campo. En ambos casos, el material se obtuvo de Bagaces, Guanacaste.

La callogénesis se desarrolló según la metodología descrita por Salazar (2012). A partir de semilla de frutos inmaduros, específicamente se utilizó el cotiledón como explante. A este material se le realizó pruebas de esterilidad o indexación para descartar su contaminación con hongos o bacterias. Para ello, se sembraron segmentos de tres zonas diferentes de cada callo, en tubos de ensayo con caldo de cultivo, tripticasa y soya (TS) enriquecido con vitaminas, y se incubaron durante dos días en un agitador orbital a 150 rpm y 30°C, incluyendo un control negativo, compuesto únicamente por medio de cultivo. Cada callo se indexó por duplicado y después de este lapso, se evaluó visualmente la turbidez en cada tubo, clasificando los tubos con caldo traslúcido como negativos (libres de contaminación) y los tubos turbios como positivos (contaminados). Éstos últimos fueron retirados de inmediato del cuarto de crecimiento.

Para el mantenimiento de los callos de *A. indica* se utilizó como base el medio de cultivo reportado por Salazar (2012), el cual se denotó como CN1. A este medio se le agregó caseína hidrolizada y extracto de malta para evaluar la influencia de estos suplementos en la formación de callo, tal como se muestra en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Tratamientos de subcultivo de callo de *Azadirachta indica*.

Tratamiento	Medio Basal	Suplementos	Regulador de crecimiento
CN1		-	1,5mg/L de TDZ
CN2	Sales y vitaminas M&S (1962), 3% de sacarosa, 3,5g/L de phytigel. pH de 5,7	100mg/L de caseína hidrolizada	1,5mg/L de TDZ
CN3		100mg/L de caseína hidrolizada y 100mg/L de extracto de malta	1,5mg/L de TDZ

Fuente: CENIBiot, 2016

Para cada uno de los tratamientos se sembraron 12 réplicas con 1,0 g de callo, cada una y se colocaron en la oscuridad, a una temperatura de  $26,5 \pm 2^\circ\text{C}$ . Después de cuatro semanas se evaluó el peso fresco y peso seco del material.

Se realizó un ANOVA de una vía, utilizando el programa estadístico Minitab 17, para el análisis de los datos.

## 1.2. Introducción de embriones *in vitro*.

Se probaron tres metodologías de desinfección de los frutos de campo, adicionales a las reportadas por Salazar (2012), para material proveniente de la misma zona geográfica, con el propósito de reducir el uso de agroquímicos y los costos de este proceso.

Los frutos inmaduros de *A. indica* se colocaron en agitación en agua con jabón antibacterial durante 10 minutos a 300 rpm. Luego se hicieron tres lavados con agua destilada. A continuación, fueron sumergidos en Agry- Gent plus 8WP (Sulfato de gentamicina 2% i.a y clorhidrato de oxitetraciclina 6% i.a) a una concentración de 5g/L durante una hora en agitación constante a 300 rpm. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada en la cámara de flujo laminar y se siguió el protocolo de desinfección correspondiente, los tratamientos se detallan en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Tratamientos de desinfección de semilla para la introducción *in vitro*

Tratamiento	Protocolo
DN1	Alcohol 70º durante 5 min, peróxido de hidrógeno comercial (3%) durante 10 minutos y un lavado final de cinco segundos con alcohol de 95%.
DN2	Alcohol 70º durante 5 min, producto comercial Spor-Klenz® <sup>1</sup> (sin diluir) durante 10 minutos.
DN3	Alcohol de 70º durante 5 minutos y cloro al 2,5% i.a. durante 10 minutos.

<sup>1</sup> Compuesto por peróxido de hidrógeno al 1%, ácido peroxiacético al 0,08% e ingredientes inertes al 98,92%.

Fuente: CENIBiot, 2016

Cabe destacar que en todos los protocolos se incluyeron tres lavados con agua destilada estéril después de cada desinfectante y cuatro lavados finales.

En condiciones asépticas, se extrajeron las semillas de los frutos y a partir de ellas, los embriones, que fueron sembrados en medio de cultivo con sales y vitaminas M&S (1962), suplementado con 3% sacarosa y 0,3% de Phytigel y con pH de 5,7. Se sembraron 20 embriones por tratamiento, los cuales se evaluaron semanalmente para determinar el porcentaje de contaminación y de germinación, durante un lapso de cuatro semanas.

Los epicótilos de las plantas obtenidas a partir de las semillas germinadas *in vitro* fueron subcultivados en medio M&S (1962) con 3% de sacarosa y pH de 5,7.

## 2. Multiplicación de plantas *in vitro*

Se probaron cuatro tratamientos de multiplicación de las plantas de *A. indica* bajo condiciones *in vitro* en medio semisólido (cuadro 5).

Para cada tratamiento se sembraron 33 microestacas de 1 y 2 cm, con dos nudos, en tubos de ensayo con el medio semisólido correspondiente. Dichas estacas provenían de plantas con un ciclo de subcultivo.

**Cuadro 5.** Tratamientos de multiplicación de plantas *in vitro* de *A. indica* con el empleo de diferentes reguladores de crecimiento.

Tratamiento	Sales y Vitaminas	Suplementos		Referencia
		Reguladores de crecimiento (mg/L)	Otros (mg/L)	
MN1	M&S (1962)	-	-	Salazar, 2012
MN2	M&S (1962)	BAP: 0,3	-	Arora <i>et al.</i> , 2011
MN3	M&S (1962)	BAP: 0,3 ANA: 0,05	-	Shahin-uz-zaman <i>et al.</i> , 2008
MN4	NB (1969)	BAP: 0,1 KIN: 0,1	Biotina: 0,05 Ácido Fólico 0,5	Biswas y Gupta, 2007

Fuente: CENIBiot, 2016

Las plantas se colocaron en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad, con temperatura promedio de  $26,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Los tratamientos fueron evaluados a los 40 días, emplearon las variables de respuesta longitud de la planta, número de brotes y nudos, peso fresco y peso seco.

La longitud de la planta se midió desde la base del tallo hasta el ápice, mientras que la cantidad de brotes y nudos se determinó por conteo.

La cuantificación del peso fresco se realizó colocando la planta completa en una balanza analítica, sin retirar segmentos de callo ni raíces. Por otra parte, para determinar del peso seco las muestras se secaron dentro de una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas en láminas de papel aluminio previamente pesadas en seco.

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los tratamientos de multiplicación de neem en condiciones *in vitro*, se verificaron los supuestos estadísticos para la aplicación de la prueba paramétrica de análisis. Como dichos supuestos no fueron cumplidos a cabalidad para las variables en estudio, se aplicaron diversos métodos de análisis para cada una de ellas y ajustes en los datos como se muestra en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Métodos estadísticos empleados para el análisis de datos de los tratamientos de multiplicación *in vitro* de *A. indica*.

Variable	Transformación	Prueba estadística
Número de Nudos	Raíz Cuadrada	ANOVA
	Ninguna	Kruskal Wallis
Número de Brotes	Ninguna	Kruskal Wallis
Longitud	Johnson	ANOVA
	Johnson	ANOVA
Peso Fresco	Box Cox	ANOVA
	Johnson	ANOVA
Peso Seco	Box Cox	ANOVA
	Johnson	ANOVA

Fuente: CENIBiot, 2016

El Análisis de Varianza (ANOVA), se complementó mediante comparaciones de Tukey y Fisher para determinar las diferencias significativas, mientras al realizar pruebas no paramétricas, se aplicó el método de comparaciones múltiples de Kruskal Wallis.

Todas las pruebas se realizaron con un 95% de confianza empleando el programa estadístico Minitab 17.

### 3. Establecimiento de suspensiones celulares

El establecimiento de suspensiones celulares, se basó en el protocolo reportado por Mata (2014) con algunas modificaciones. Se pesó 1,5g de callo y se colocó en un matraz de 125 mL con 25 mL de medio de cultivo. Para la etapa de establecimiento, se emplearon dos medios de cultivo, SN1 y SN2, ambos compuestos por sales y vitaminas M&S (1962), complementado con

0,75mg/L de TDZ, 3% de sacarosa y un pH de 5,8, sin embargo el medio SN2 contenía 100mg/L de caseína hidrolizada. A los 10 días, se tamizaron las suspensiones celulares con un tamiz de 2 mm para retener y eliminar los agregados de mayor tamaño. Las suspensiones tamizadas, se recuperaron y se dejaron sedimentar durante 15 minutos. Al cabo de ese lapso, se conservó el 30% del medio de cultivo con células y se agregó un 70% de medio fresco y se traspasaron a un nuevo matraz estéril.

El subcultivo de las suspensiones celulares se llevó a cabo cada 10 días, de la misma manera, renovando el 70% del medio de cultivo. Cada dos ciclos, se pasó el cultivo por un tamiz de 2mm, para mantener las suspensiones celulares finas, con agregados de menor tamaño.

### 1.3. Cinética de crecimiento

Se establecieron cinéticas de crecimiento con ambos medios de cultivo empleados en el establecimiento: SN1 y SN2.

Las suspensiones celulares debidamente establecidas fueron tamizadas en condiciones de esterilidad a través de una criba de 125µm. De las células retenidas en el tamiz, se pesaron 1,5g y se colocaron en matraces de 125mL con 7,5 mL de medio antiguo y 17,5 mL del medio fresco correspondiente. Los matraces se taparon con papel aluminio, y se colocaron en agitación orbital de 100rpm, en oscuridad y a temperatura aproximada de 25±2 °C.

Para establecer la cinética de crecimiento, se realizó un muestreo sin reemplazo cada tres días, por triplicado. En cada punto de muestreo se midieron las variables volumen celular sedimentado y peso seco.

- *Volumen Celular Sedimentado (VCS)*: Se homogenizó manualmente la suspensión celular y se tomó una muestra de 10mL del cultivo, la cual se colocó en un tubo cónico graduado. Se dejó sedimentar por 30 minutos y calculó el VCS de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%VCS = \frac{\text{Volumen de células sedimentadas (ml)}}{\text{Volumen de la muestra (ml)}} \times 100$$

- *Peso seco (PS)*: Para la determinación del peso seco, las muestras fueron filtradas al vacío a través de un papel filtro de celulosa cuantitativo Sartorius con un poro de 15 µm. Estos papeles filtro tenían un peso seco conocido, registrado después de ser sometidos a un proceso de secado de 24 horas a 60°C previamente en una estufa. Una vez filtradas las muestras, se colocaron en la estufa durante 48 horas a 60°C y, transcurrido ese lapso, se pesaron las muestras en una balanza analítica. El peso seco de las células se determinó aplicando las fórmula que se muestran a continuación:

$$PS_{\text{células}} \left( \frac{mg}{ml} \right) = \frac{PS_{\text{del filtro con células}} (mg) - PS_{\text{del filtro}} (mg)}{\text{Alícuota (ml)}}$$

Adicionalmente, se realizaron observaciones de las células en el microscopio de luz, con los aumentos 20X y 40X.



#### **1.4. Análisis estadístico**

Se analizaron estadísticamente los valores más altos para las variables volumen celular sedimentado y peso seco, mediante una prueba de T Student, empleando el programa estadístico Minitab 17.

#### **4. Escalamiento del cultivo celular en biorreactor**

Se escaló el cultivo celular de Neem en biorreactores tipo tanque agitado marca Applikon de 7L de volumen total y 3L de volumen de trabajo. Se realizó un cultivo batch por duplicado.

##### **4.1 Preparación de los materiales e inóculos**

Previo al escalamiento del cultivo celular de *A. indica*, se calibraron los sensores del biorreactor, empleando las soluciones buffer, controladores y procedimientos especificados en el manual del equipo. Posteriormente, se esterilizaron los biorreactores empleando una autoclave de doble paso, a una temperatura de 121°C durante 30 minutos. El medio de cultivo se esterilizó en botellas y se agregó 2,5L al biorreactor por el puerto de adición, en condiciones de asepsia mediante conexiones rápidas.

Una vez agregado el medio de cultivo, los biorreactores se conectaron al biocontrolador y se tomó una muestra que se indexó por duplicado en medio de cultivo líquido tripticasa y soya. Las muestras de indexación se mantuvieron en agitación orbital a 150 rpm y 30°C durante dos días. Al transcurrir ese tiempo, se verificó la esterilidad de las muestras indexadas así como que el medio de cultivo en el biorreactor no mostrara turbidez ni variaciones en el pH.

Cabe destacar que los ensayos de escalamiento se realizaron por duplicado, empleando el medio del cultivo denotado como SN2 (sales y vitaminas M&S (1962), 3% sacarosa, suplementado con 0,75mg/L de TDZ y 100mg/L de caseína hidrolizada y pH 5,8).

##### **4.2 Cultivo de los biorreactores**

Cada biorreactor fue inoculado con 180g/L de células que se encontraban en etapa de crecimiento exponencial (al día 10 de cultivo), de acuerdo con las curvas de crecimiento establecidas previamente.

Previo a la inoculación, las suspensiones celulares fueron indexadas, tal como se describió en el punto anterior. Una vez confirmado que los cultivos se encontraban libres de microorganismos, se combinaron las suspensiones celulares y se tamizaron con una criba de 125µm, para recuperar las células retenidas. Estas células se pesaron en un matraz estéril y se completaron 500mL con medio de cultivo fresco.

Seguidamente, los biorreactores se inocularon de manera aséptica mediante diferencias de presión empleando una botella de inoculación.

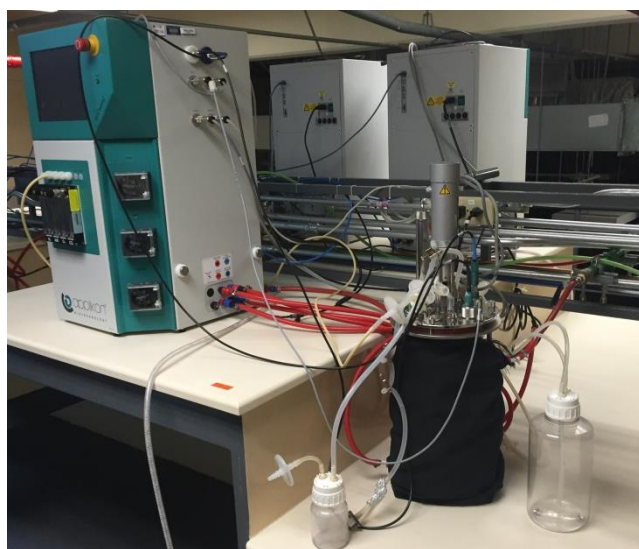
### 4.3 Condiciones de operación

Las condiciones de operación de los biorreactores se muestran en el cuadro 7 y fueron modificadas del trabajo realizado por Bedoya y Hoyos (2010). Los biorreactores se mantuvieron en condiciones de oscuridad durante todo el cultivo (figura 5).

**Cuadro 7.** Condiciones de operación para el escalamiento de suspensiones celulares de *A. indica* en biorreactor.

Variable	Valor
Volumen del biorreactor (L)	7
Volumen de trabajo (L)	3
Agitación (rpm)	100
Aireación (vvm)	0,3
DO2 (%)	30
Agitador	Propela marina

Fuente: CENIBiot, 2016



**Figura 5.** Biorreactores en operación (controlador y frasco de cultivo), bajo condiciones de oscuridad.

### 4.4 Cinética de crecimiento

Se monitoreó cada hora y en tiempo real las variables: pH (unidades de pH), oxígeno disuelto (%), agitación (rpm) y temperatura (°C).

Se tomó muestra cada tres días para determinar la cinética de crecimiento mediante la medición del volumen celular empacado y el peso seco, siguiendo el protocolo descrito en el punto 3,1.

Se calculó el índice y la velocidad de crecimiento de las células en suspensión, para lo cual se emplearon los valores de peso seco de las células a los diferentes días de cultivo.

El índice de crecimiento se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{(X - X_0)}{X_0}$$

Donde: IC= Índice de Crecimiento; X= Concentración celular en un tiempo t; X<sub>0</sub>= Concentración celular inicial.

Por otra parte, la velocidad de crecimiento fue calculada aplicando la fórmula descrita a continuación:

$$K = \frac{(C_f - C_0)}{(T_f - T_0)}$$

Donde: K = Velocidad de Crecimiento; C<sub>f</sub> = Concentración final del cultivo en fase exponencial; C<sub>0</sub>= Concentración inicial del cultivo; T<sub>f</sub> - T<sub>0</sub>= Tiempo de duración de la fase exponencial.

Además, se realizaron observaciones de las células en el microscopio de luz, con los aumentos 20X y 40X.

## 5. Análisis químicos

La concentración de azadiractina se determinó en: semilla y hoja proveniente de campo (colectadas en Bagaces, Guanacaste, Costa Rica), plantas *in vitro*, suspensiones celulares y cultivo en biorreactor. En suspensiones celulares y células en biorreactor, la cuantificación fue intracelular. Para la cuantificación se empleó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

### 4.5 Determinación del mejor solvente de extracción

Se probaron dos solventes de extracción y la combinación de ambos para determinar el más efectivo, tal como se muestra en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Solventes utilizados para la extracción de limonoides intracelulares.

Solvente	Concentración (%v/v)
Metanol	100
Etanol	96
Metanol:Etanol	50:50

Fuente: Cenibiot, 2016

Para ello se pesó aproximadamente 50 mg de muestra de semilla en tubos de ensayo de vidrio y se agregó 3 mL del solvente respectivo. Posteriormente, las muestras se colocaron en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Luego, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se agregó nuevamente el solvente correspondiente y

se repitió el procedimiento hasta completar tres extracciones. Se mezclaron las tres extracciones de una misma muestra en un balón de 10mL y se aforó con el respectivo solvente. Se realizaron diluciones 1:5 y 1:10 del extracto en el disolvente y se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 210nm empleando un espectrofotómetro Lambda 35, marca Perkin Elmer.

Se determinó la relación entre la concentración de limonoides por gramo de muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de cuantificación} = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{Factor de dilución} \times \text{Volumen del balón (mL)}}{\text{masa de la muestra (g)}}$$

Las concentraciones se analizaron con el programa estadístico Minitab 17 para determinar la existencia de diferencias significativas entre los solventes de extracción. Para ello, se verificó el cumplimiento de los supuestos estadísticos y se analizó la varianza de los datos por medio de una prueba ANOVA de una vía empleado comparaciones Fisher y Tukey.

#### 4.6 Determinación de la mejor técnica de extracción

Para evaluar la mejor técnica de extracción de azadiractina, se evaluaron cuatro protocolos: sonicación, agitación, agitación con temperatura y maceración. Para ello, se emplearon tubos de vidrio en los cuales se pesó una masa aproximada de 70mg de semilla de neem previamente triturada y liofilizada durante 48 horas en un liofilizador Christ Gamma 1-16 LSC bajo condiciones de oscuridad. Cabe destacar que cada una de las técnicas se realizó por triplicado.

- *Sonicación*: Las muestras se colocaron durante 10 minutos en baño ultrasónico, con 3mL de metanol cada una. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 1600rpm durante 4 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se realizaron tres extracciones consecutivas empleando el mismo procedimiento, y los sobrenadantes obtenidos se combinaron en un balón de 10mL el cual fue aforado con el mismo disolvente.
- *Agitación*: Se adicionaron 3mL de metanol a cada muestra y colocaron en agitación magnética durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron a 1600rpm durante 4 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se realizaron tres extracciones seguidas y los sobrenadantes obtenidos se combinaron en un balón de 10mL que posteriormente se aforó con el mismo disolvente.
- *Agitación con temperatura*: Se siguió el procedimiento anterior, sin embargo se mantuvo una temperatura de 50°C durante todo el proceso de extracción.
- *Maceración*: En este proceso, las muestras se mantuvieron en reposo durante 5,5 horas con 3mL de metanol. Transcurrido ese lapso, se centrifugaron a 1600rpm durante 4 minutos y se recuperó el sobrenadante. Luego, se renovó el disolvente y se dejaron reposar nuevamente durante 18 horas más. Se centrifugaron nuevamente las muestras y se combinaron los sobrenadantes obtenidos de las dos extracciones en un balón de 10mL el cual fue aforado con metanol.

De todas las muestras obtenidas, se realizaron diluciones 1:30 con metanol, y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 210nm, empleando el espectrofotómetro.

Posteriormente, se calculó la concentración de cada muestra de acuerdo a la fórmula mostrada anteriormente.

Las concentraciones se analizaron con el programa estadístico Minitab 17 para determinar la existencia de diferencias significativas entre los métodos de extracción. Para ello, se verificó el cumplimiento de los supuestos estadísticos y se analizó la varianza entre tratamientos por medio de una prueba ANOVA de una vía utilizando comparaciones de Fisher.

#### 4.7 Cuantificación de azadiractina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

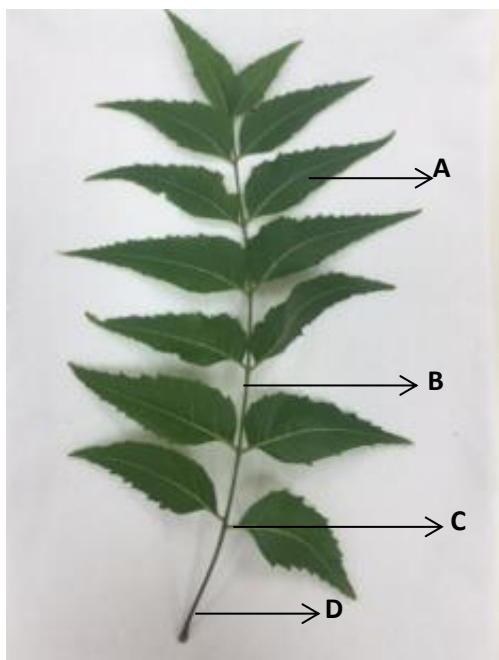
##### 4.7.1 Preparación de las muestras

Todas las muestras se secaron por medio de liofilización durante 48 horas en un equipo Christ Gamma 1-16 LSC. En el caso de las muestras de semilla, hoja (de campo y de vitroplantas) y raíz *in vitro*, una vez liofilizadas fueron trituradas. Todas las muestras se almacenaron debidamente rotuladas en una cámara de desecación, en recipientes de vidrio y condiciones de oscuridad.

- *Muestras de campo*

Las semillas y hojas de campo fueron colectadas en Bagaces, Costa Rica, en el mes de marzo, es decir, durante época seca. Los frutos inmaduros fueron lavados con jabón antibacterial y, seguidamente se extrajeron las semillas.

De las hojas compuestas, se analizaron únicamente los folíolos, eliminando los pecíolos, los peciolulos y los raquis (figura 6).



**Figura 6.** Hoja compuesta de neem. A: foliolo, B: raquis, C: peciolulo, D: pecíolo.

Todas las muestras fueron liofilizadas, trituradas y almacenadas como se mencionó anteriormente.

- *Muestras de plantas in vitro*

Se analizaron plantas de cuatro semanas de cultivo. Para ello, las hojas y raíces se separaron, se liofilizaron y trituraron como se mencionó anteriormente. Las raíces fueron lavadas con suficiente agua destilada, previo a la liofilización, para remover por completo los restos de medio de cultivo semisólido (figura 7).



**Figura 7.** Vitroplanta con hojas neem empleadas para el análisis químico.

- *Cultivos celulares en matraz y biorreactor*

De cada punto de muestreo de la cinética de crecimiento en matraz se tomó una muestra, la cual fue centrifugada en tubos de vidrio con tapa durante 7 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante, y se agregó aproximadamente 15 mL de agua destilada, para lavar las células de restos del medio de cultivo, nuevamente se centrifugaron las muestras bajo las mismas condiciones y se repitió el protocolo realizando dos lavados más con agua destilada. Las muestras fueron congeladas en los recipientes de vidrio, bajo condiciones de oscuridad. Al final de la cinética de crecimiento, se liofilizaron todas las muestras y se almacenaron en cámara de desecación. Para el análisis en biorreactor, se tomó una muestra en las etapas del cultivo: fase lag, exponencial y estacionaria.

#### **4.7.2 Preparación de los extractos**

Para la preparación de las muestras se empleó como solvente de extracción, metanol al 100% y el método de agitación con temperatura descrito en el apartado 6.2.3.

## 4.8 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

### 4.8.1 Elaboración de la curva de calibración

Previo a la cuantificación de azadiractina presente en las diferentes muestras, se procedió a realizar la curva de calibración empleando el patrón de A7430 Sigma-Aldrich. Para ello se disolvieron 5mg del compuesto en 10mL de etanol grado HPCL. Posteriormente se prepararon los diferentes patrones de cuantificación en un rango de concentración de 0,05 hasta 0,5 mg/mL.

Para el desarrollo del método analítico se empleó un cromatógrafo líquido marca Perkin Elmer Series 200 provisto de un detector UV de arreglo de diodos en serie (DAD, LC200D), bajo las condiciones cromatográficas descritas en el cuadro 9.

**Cuadro 9.** Condiciones cromatográficas empleadas para la cuantificación de azadiractina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

<b>Columna:</b>	C <sub>18</sub> 150mm x 4.6mm, 5µm (Luna C <sub>18</sub> de Phenomenex)
<b>Fase móvil:</b>	<b>A:</b> H <sub>2</sub> O/H <sup>+</sup> 0.1% <b>B:</b> CH <sub>3</sub> CN  Composición de gradiente (A:B) 0min (90% A) 7min (75 % A) 6min (60 % A) 8min (30 % A) 4min (0 % A) 3min (90 % A)
<b>Flujo:</b>	1.1 mL/min
<b>Horno:</b>	25°C
<b>Detector:</b>	210nm, DAD
<b>Inyector</b>	90 µL

Fuente: CENIBiot, 2016

Con este método fue determinada la curva de calibración, así como la concentración en cada una de las muestras analizadas.

## V. RESULTADOS

### 1. Obtención del material vegetal.

#### 1.1. Recepción y mantenimiento de callo friable

Las pruebas de indexación permitieron seleccionar el material a utilizar y descartar un 11,11% de callo recibido del ITCR por motivo de contaminación, es decir que presentaron turbidez en el caldo de cultivo microbiológico luego del tiempo de incubación, aparentemente por contaminación bacteriana.

Se obtuvo un total de 16 callos friables y libres de contaminación, cuyos medios de indexación respectivos se mantuvieron translúcidos después de 24 horas de incubación, por lo cual se dedujo que no se presentaba crecimiento de hongos ni bacterias cultivables.

Mediante el análisis estadístico (ANOVA) de los tratamientos para el subcultivo de los callos, es posible afirmar con un 95% de confianza que no existen diferencias significativas para las variables peso fresco y peso seco con valores de  $p$  de 0,858 y  $p=0,240$  respectivamente, tal como se muestra en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Análisis de varianza de los tratamientos para subcultivo de callo de *A. indica* con base en peso fresco y seco

Tratamiento	Peso Fresco		Peso Seco	
	Media	DE	Media	DE
CN1	3990 <sup>a</sup>	1220	165,6 <sup>a</sup>	49,6
CN2	4261 <sup>a</sup>	859	186,7 <sup>a</sup>	55,0
CN3	4060 <sup>a</sup>	1415	202,8 <sup>a</sup>	47,0

DE: Desviación Estándar. Tratamiento CN1: M&S (1962), suplementado con 1,5mg/L de TDZ; CN2: M&S (1962), suplementado con 1,5mg/L de TDZ y 100mg/L de caseína hidrolizada; CN3: M&S (1962), suplementado con 1,5mg/L de TDZ, 100mg/L de caseína hidrolizada y 100mg/L de extracto de malta. **Fuente:** CENIBiot, 2016.

#### 1.2. Introducción de embriones *in vitro*.

Los tres tratamientos de desinfección de frutos de neem empleados para la introducción *in vitro* de embriones, generaron un porcentaje de desinfección de un 100%, es decir, no se encontró contaminación bacteriana ni fúngica en los embriones provenientes de ninguno de los tratamientos.

En cuanto al porcentaje de germinación, mediante el tratamiento DN1, en el cual se empleaba alcohol de 70°, peróxido de hidrógeno (3%) y alcohol de 95°, se obtuvo un menor porcentaje de germinación, como se muestra en el cuadro 11.



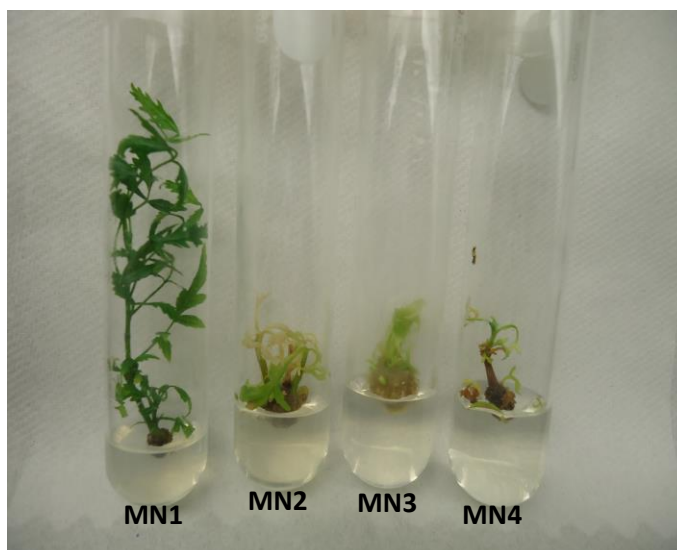
**Cuadro 11.** Porcentaje de contaminación y germinación de embriones de *A. indica*.

Tratamiento	No. de explantes introducidos	No. de explantes contaminados	Contaminación (%)	No. de embriones germinados
DN1	20	0	0%	95%
DN2	20	0	0%	100%
DN3	20	0	0%	100%

DN1: Alcohol 70° durante 5 min, peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y un lavado final con alcohol de 95°. DN2: Alcohol 70° durante 5 min, producto comercial Spor-Klenz® durante 10 minutos. DN3: Alcohol de 70° durante 5 minutos y cloro al 2,5% i.a. durante 10 minutos. **Fuente:** CENIBiot, 2016.

## 2. Multiplicación de plantas *in vitro*

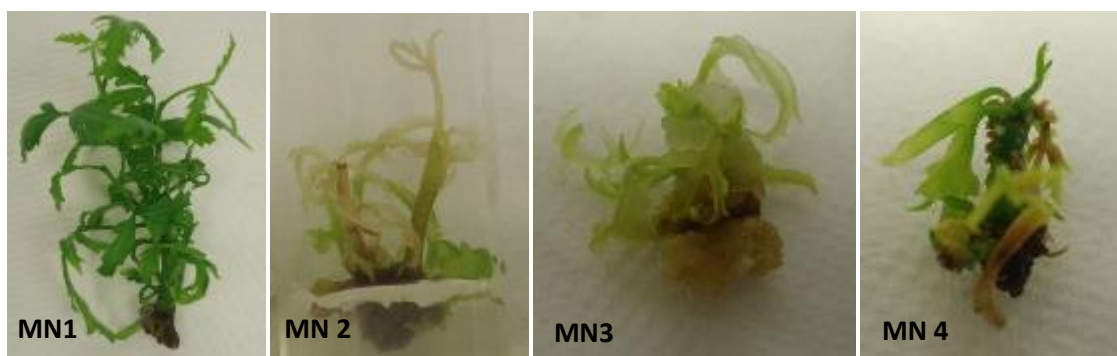
Las plantas crecidas en los diferentes tratamientos de multiplicación presentaron diferencias morfológicas notables, tal como se muestra en la figura 8.



**Figura 8.** Tratamientos de multiplicación de *A. indica*. Medios de cultivo M&S (1962): **MN1** (sin reguladores de crecimiento), **MN2** (0,3 mg/L de BAP), **MN3** (0,3 mg/L de BAP y 0,5mg/L de ANA), **MN4** (0,1mg/L de BAP y Kinetina).

Las plantas que crecieron en el tratamiento denotado como MN1 mostraron una coloración verde, mayor desarrollo foliar y no mostraron formación de callo. Los tratamientos MN2 y MN3 presentaron abundante callogénesis en la zona de corte basal del explante, que se encontraba en contacto con el medio de cultivo, así como vitrificación y hojas cloróticas.

Por su parte, el tratamiento MN4, pese a que no mostró formación de callo, presentó deformidades en las hojas y el tallo, así como tejido foliar clorótico y necrótico (figura 9).



**Figura 9.** Plantas de *A. indica in vitro* procedentes de los diferentes tratamientos de multiplicación MN1 (sin reguladores de crecimiento), MN2 (0,3 mg/L de BAP), MN3 (0,3 mg/L de BAP y 0,5mg/L de ANA), MN4 (0,1mg/L de BAP y Kinetina). **Fuente:** CENIBiot, 2016

#### *Análisis estadístico*

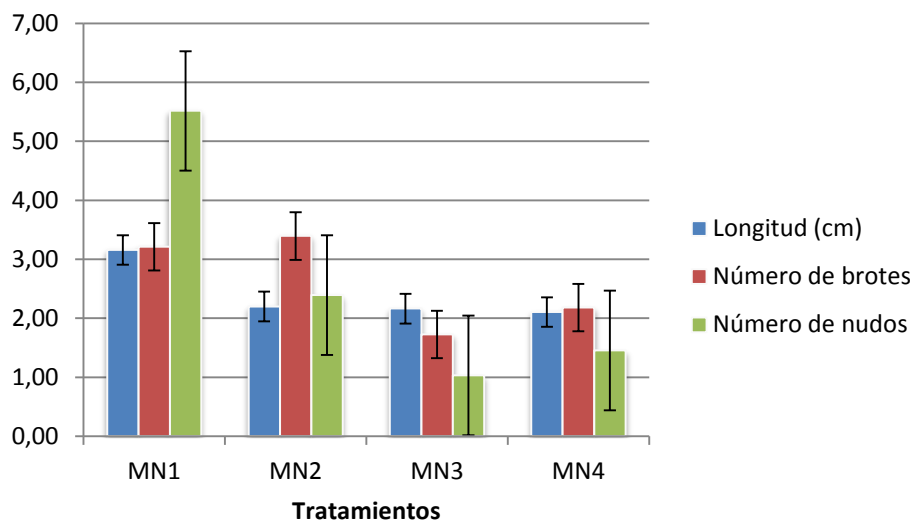
Los datos generados para las diferentes variables en estudio en el ensayo de multiplicación de plantas *in vitro* de neem no siguieron una distribución normal de acuerdo con las pruebas Anderson Darling, Kolmogorov Smirnov y Ryan Joiner, con un 95% de confianza. Tampoco se obtuvo normalidad de los residuos ni homocedasticidad mediante las pruebas de Comparaciones Múltiples ni Levene. Por esta razón se realizaron transformaciones para el ajuste de los datos, así como análisis no paramétricos, para las diferentes variables. Los valores de p para cada prueba se muestran en el cuadro 12.

**Cuadro 12.** Valores de p de las diferentes pruebas estadísticas para en el análisis de las variables de respuesta empleadas para el ensayo de multiplicación de *A. indica*.

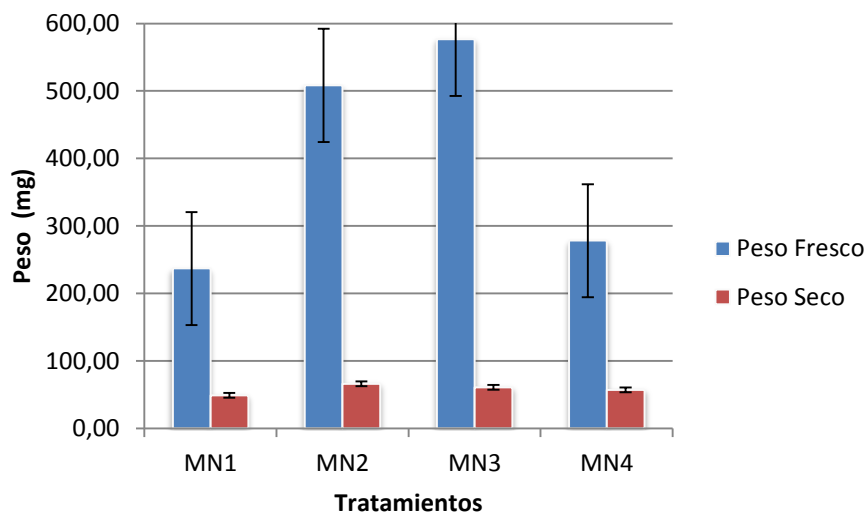
Variable	Transformación	Prueba estadística	Valor de p $\alpha=0,05$
Número de Nudos	Raíz Cuadrada	ANOVA	0,000
	Ninguna	Kruskal Wallis	0,000
Número de Brotes	Ninguna	Kruskal Wallis	0,000
Longitud	Johnson	ANOVA	0,000
	Johnson	ANOVA	0,000
Peso Fresco	Box Cox	ANOVA	0,000
	Johnson	ANOVA	0,039
Peso Seco	Box Cox	ANOVA	0,048

**Fuente:** CENIBiot, 2016

Al evaluar los diferentes medios de cultivo para la multiplicación de plantas *in vitro* se obtuvieron valores de p menores al  $\alpha=0,05$ ; por lo cual se afirma que existen diferencias significativas entre los tratamientos para todas las variables estudiadas, con un 95% de confianza. En la figura 10 se muestran los resultados de las variables longitud, número de nudos y número de brotes; mientras que en la figura 11 se pueden observar los resultados de peso seco y peso fresco.



**Figura 10.** Longitud, número de brotes y número de nudos de plantas *in vitro* empleando cuatro medios de cultivo: MN1 (sin reguladores de crecimiento), MN2 (0,3 mg/L de BAP), MN3 (0,3 mg/L de BAP y 0,5mg/L de ANA), MN4 (0,1mg/L de BAP y Kinetina). **Fuente:** CENIBiot, 2016



**Figura 11.** Peso Fresco y Peso Seco en plantas *in vitro* empleando cuatro medios de cultivo: MN1 (sin reguladores de crecimiento), MN2 (0,3 mg/L de BAP), MN3 (0,3 mg/L de BAP y 0,5mg/L de ANA), MN4 (0,1mg/L de BAP y Kinetina). **Fuente:** CENIBiot, 2016

### Número de nudos

Como los datos obtenidos para esta variable no cumplieron los supuestos estadísticos fue necesario realizar una transformación aplicando raíz cuadrada, mediante la cual se tuvo datos y residuos normalmente distribuidos, así como homogeneidad de varianza.

Al analizar los datos transformados mediante la prueba estadística ANOVA se obtuvo un valor de  $p=0,000$ , por lo cual se afirma que existen diferencias significativas entre los tratamientos con un 95% de confianza. Mediante las comparaciones de Tukey y Fisher, se determinó cuáles tratamientos presentaban diferencias entre sí. Ambas comparaciones reflejan iguales diferencias significativas entre tratamiento, siendo el MN1 el que presenta una media mayor, tal como se muestra en el cuadro 13.

**Cuadro 13.** Comparaciones estadísticas para la variable número de nudos de vitroplantas de *A. indica*

Tratamiento	Media	Medias de datos transformados mediante raíz cuadrada.
MN1	5,515	2,192 <sup>a</sup>
MN2	2,394	1,339 <sup>b</sup>
MN3	1,030	0,819 <sup>c</sup>
MN4	1,455	0,872 <sup>c</sup>

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas  $\alpha=0,05\%$  Fuente: CENIBiot, 2016.

Complementariamente, los datos sin transformar fueron analizados mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, con la cual se obtuvieron los valores mostrados en el cuadro 14.

**Cuadro 14.** Análisis no paramétrico de la cantidad de nudos en plantas *in vitro* de *A. indica*

Tratamiento	Mediana
MN1	5,000 <sup>a</sup>
MN2	2,000 <sup>b</sup>
MN3	1,000 <sup>c</sup>
MN4	1,000 <sup>bc</sup>

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas  $\alpha=0,05\%$ . Fuente: CENIBiot, 2016.

Mediante esta prueba se puede afirmar con un 95% de confianza, que las medianas de los tratamientos difieren significativamente, ya que se obtuvo un valor de  $p=0,000$ , con el cual se tiene suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis de nulidad.

### Número de brotes

Esta variable se analizó por medio de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, al no cumplir los supuestos estadísticos y no ser viable la transformación de los datos. Se obtuvo un valor de  $p=0,00$ ; con lo cual se rechaza con un 95% de confianza la hipótesis nula de la prueba ( $H_0$ ), la cual afirma que las medianas son iguales entre los tratamientos analizados; y se acepta la hipótesis alternativa que ( $H_1$ ) asevera que al menos una de las medianas difiere.

Para determinar los tratamientos significativamente diferentes, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples Kruskal Wallis, cuyos resultados se muestran en el cuadro 15

**Cuadro 15.** Comparaciones múltiples de Kruskal Wallis para el número de brotes de plantas *in vitro* de *Azadiracta indica*.

Tratamiento	Mediana
MN1	3,000 <sup>a</sup>
MN2	3,000 <sup>a</sup>
MN3	2,000 <sup>b</sup>
MN4	2,000 <sup>b</sup>

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas  $\alpha=0,05\%$ . Fuente: CENIBiot, 2016.

### Longitud

Debido al incumplimiento de los supuestos estadísticos de los datos, se realizó una transformación de Johnson, la cual brindó el ajuste para la realización de un Análisis de Varianza (ANOVA). Dicha prueba generó un valor de  $p= 0,00$ , por lo que se puede afirmar con un 95% de confianza que al menos dos varianzas de la data difieren. Por esta razón, se realizó un análisis de comparaciones de Tukey y Fisher para detectar los tratamientos que se atribuyen dichas variaciones. Los resultados de estas pruebas se muestran en el cuadro 16.

**Cuadro 16.** Longitud de plantas *in vitro* de *A. indica* analizadas mediante prueba ANOVA.

Tratamiento	Media	Medias de datos transformados por Johnson
		Valor de $p= 0,000$ Comparación Tukey y Fisher
MN1	3,158	0,800 <sup>a</sup>
MN2	2,200	-0,059 <sup>b</sup>
MN3	2,164	-0,094 <sup>b</sup>
MN4	2,106	-0,222 <sup>b</sup>

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas  $\alpha=0,05\%$ . Fuente: CENIBiot, 2016.

Mediante ambas comparaciones se puede observar que el tratamiento MN1 (sin reguladores de crecimiento), produjo plántulas con una longitud significativamente mayor, comparada con los demás medios de cultivo, que no difirieron entre ellos.

### Peso Fresco

Los datos obtenidos del peso fresco de las plantas *in vitro*, fueron transformados mediante el método de Johnson y Box Cox para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Al aplicar el ANOVA se pudo determinar con un 95% de confianza, que existen diferencias entre el peso fresco de los tratamientos y, mediante las comparaciones estadísticas se evidencia que los tratamientos MN2 (suplementados con 0,3mg/L de BAP) y MN3 (0,3mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA) mostraron medias superiores a los tratamientos MN1 y MN4 (cuadro 17).

**Cuadro 17.** Peso fresco de las plantas *in vitro* de *A. indica* analizadas mediante prueba ANOVA

Tratamiento	Media	Transformación de Johnson	Transformación de Box Cox
		Valor de p= 0,000	Valor de p= 0,000
		Comparación Tukey y Fisher	Comparación Tukey y Fisher
MN1	237,0	-0,676 <sup>b</sup>	3,705 <sup>b</sup>
MN2	508,2	0,448 <sup>a</sup>	4,583 <sup>a</sup>
MN3	576,7	0,566 <sup>a</sup>	4,695 <sup>a</sup>
MN4	278,2	-0,384 <sup>b</sup>	3,9627 <sup>b</sup>

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas  $\alpha=0,05$ . **Fuente:** CENIBiot, 2016.

### Peso seco

Los datos transformados correspondientes al peso seco de las plantas *in vitro*, fueron analizados por medio de un ANOVA y se pudo determinar con un 95% de confianza, que existen diferencias significativas de peso seco entre los tratamientos

Al comparar mediante la prueba de Tukey los datos obtenidos tanto por la transformación de Johnson como por Box Cox, se muestra que los tratamientos MN2, MN3 y MN4 son iguales estadísticamente, y que el tratamiento MN2 difiere con respecto al tratamiento MN1, siendo este último el que presenta una media menor, mas sin embargo esa diferencia no es significativa con los tratamientos MN3 y MN4.

Por otra parte la comparación por el método de Fisher revela que los tratamientos MN2 y MN3 difieren con el MN1, y el tratamiento MN4 no presenta diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos (cuadro 18).

**Cuadro 18.** Peso seco de plantas *in vitro* de *A. indica* analizadas mediante prueba ANOVA

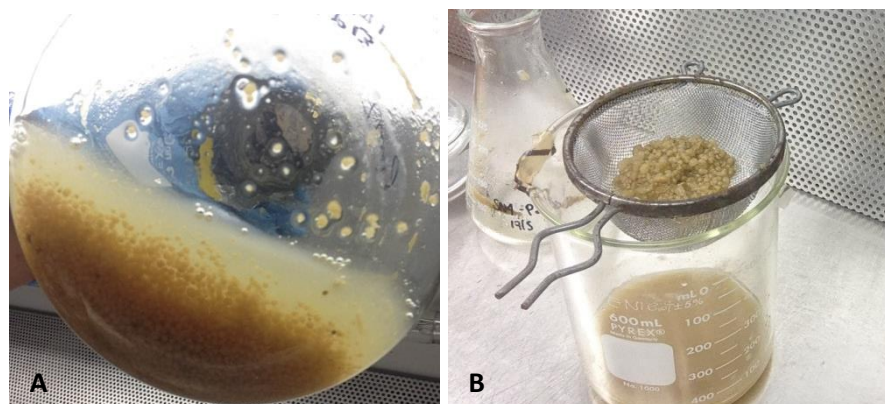
Tratamiento	Media	Transformación de Johnson	Transformación de Box Cox
		Valor de p= 0,039	Valor de p= 0,048
		Comparación Tukey / Fisher	Comparación Tukey / Fisher
MN1	49,15	-0,434 <sup>b/b</sup>	6,438 <sup>b/b</sup>
MN2	66,14	0,257 <sup>a/a</sup>	7,891 <sup>a/a</sup>
MN3	60,91	0,097 <sup>ab/a</sup>	7,596 <sup>ab/a</sup>
MN4	57,24	-0,040 <sup>ab/ab</sup>	7,314 <sup>ab/ab</sup>

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas  $\alpha=0,05\%$ . Fuente: CENIBiot, 2016.

### 3. Establecimiento de suspensiones celulares

Los segmentos de callo empleados para el establecimiento de las suspensiones celulares mostraron friabilidad al disgregarse fácilmente con la agitación orbital a 100rpm. Dicha condición se presentó tanto con el medio de cultivo denotado como SN1, compuesto por sales M&S (1962), 0,75mg/L de TDZ y 3% de sacarosa, como en el SN2, suplementado con 100mg/L de caseína hidrolizada.

En ambos medios de cultivo se produjo una multiplicación de la biomasa y se mostró tendencia a formar agregados, por lo tanto era necesario tamizar las suspensiones cada dos ciclos o subcultivos, tal como se ilustra en la figura 12.

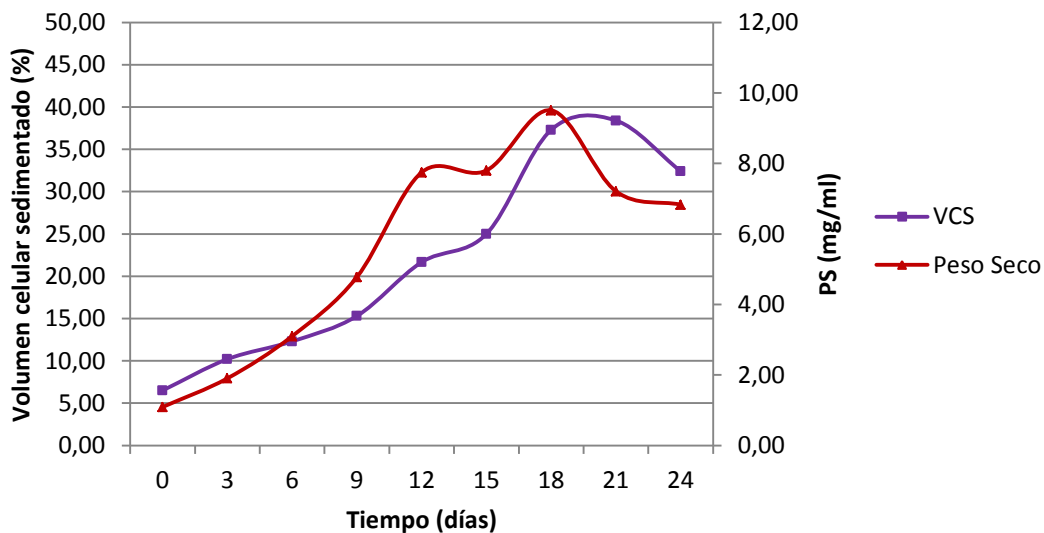


**Figura 12.** Agregados celulares de *A. indica* formados en cultivos en suspensión a nivel de matriz. A: Suspensión celular con agregados. B: Tamizaje de las suspensiones celulares. Fuente: CENIBiot, 2016

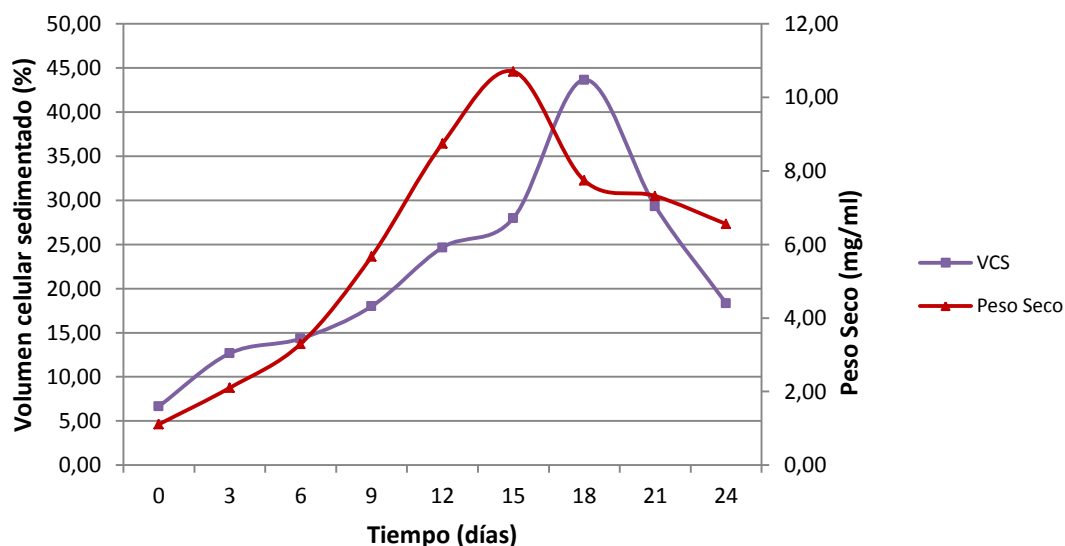
#### 3.1. Cinética de crecimiento

En las cinéticas de crecimiento no fue posible identificar con claridad la fase inicial ni estacionaria, mas sí se identifica una fase exponencial de mayor crecimiento del cultivo, así como una fase de muerte al final de la cinética.

En las figuras 13 y 14 se muestran las cinéticas de crecimiento de las suspensiones celulares en medios de cultivo SN1 y SN2, con base en el volumen celular empacado y el peso seco.



**Figura 13.** Cinética de crecimiento de células en suspensión de *A. indica* en matraz con medio de cultivo SN1 (M&S (1962) suplementado con 0,75mg/L de TDZ). Fuente: CENIBiot, 2016.



**Figura 14.** Cinética de crecimiento de células en suspensión de *A. indica* en matraz con medio de cultivo SN2 (M&S (1962) suplementado con 0,75mg/L de TDZ y 100mg/L de caseína hidrolizada). Fuente: CENIBiot, 2016.

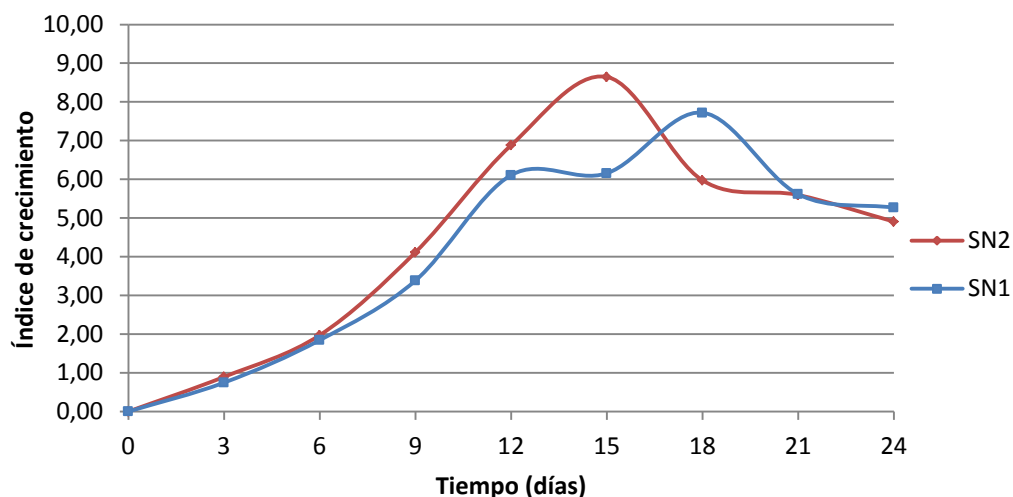
Como se muestra, en las gráficas, se alcanzó un volumen celular sedimentado máximo cerca del día 21 de cultivo, para el medio SN1 un valor cercano a 38,4% mientras que para SN2 se obtuvo al día 18 un valor máximo de 43,67%.

Con respecto al peso seco, el cultivo crecido en medio SN1 alcanzó el valor máximo al día 18 mientras que el SN2 lo hace al día 15 con valores de 9,51mg/L y 10,71 mg/L respectivamente.

En la figura 15, se aprecia el cambio en el índice de crecimiento con respecto al tiempo. En el medio de cultivo SN1 se alcanzó un valor máximo al día 18 de 7,72, mientras que el medio SN2, el índice de crecimiento máximo fue de 8,65 al día 15.

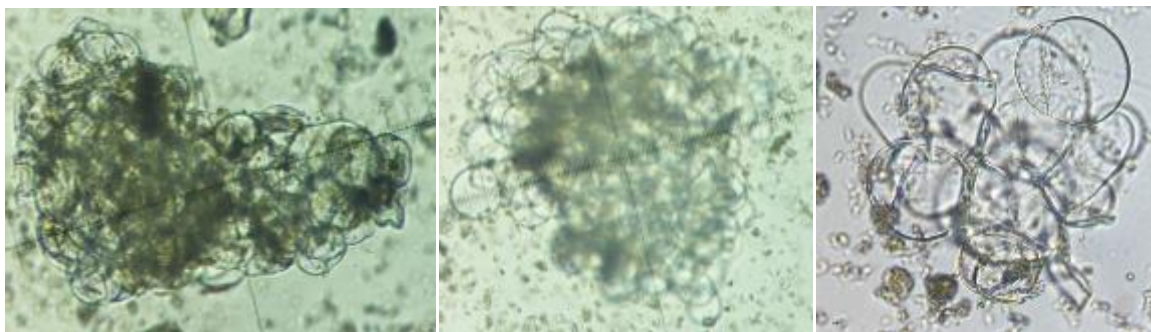


Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial fue de  $0,56 \text{ g/L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  para el medio SN1 y de  $0,8 \text{ g/L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , para el medio de cultivo SN2.



**Figura 15.** Índices de crecimiento de células en suspensión de *A. indica* en matraz con medios de cultivo SN1 y SN2 (suplementado con caseína hidrolizada). **Fuente:** CENIBiot, 2016.

Las células cultivadas en matraz se caracterizaron por ser redondas, con pared celular gruesa. Formaron agregados con un tamaño cercano o superior a los  $10\mu\text{m}$  aproximadamente, con cantidad incontable de células (figura 16).



**Figura 16.** Células en suspensión de *A. indica* en matraz con medio de cultivo SN2, en fase estacionaria. Aumento: 40X. **Fuente:** CENIBiot, 2016.

### 3.2. Análisis estadístico

Al analizar los valores máximos de los tratamientos mediante una prueba t pareada se obtuvo un valor de  $p=0,012$  para peso seco y  $p=0,013$  para volumen celular sedimentado, con lo cual se puede afirmar con un 95% de confianza estadística que existen diferencias significativas entre los tratamientos analizados, siendo el medio SN2 el que muestra valores mayores para ambas variables (cuadro 19).

**Cuadro 19.** Volumen celular sedimentado y peso seco máximo en los tratamientos de suspensiones celulares.

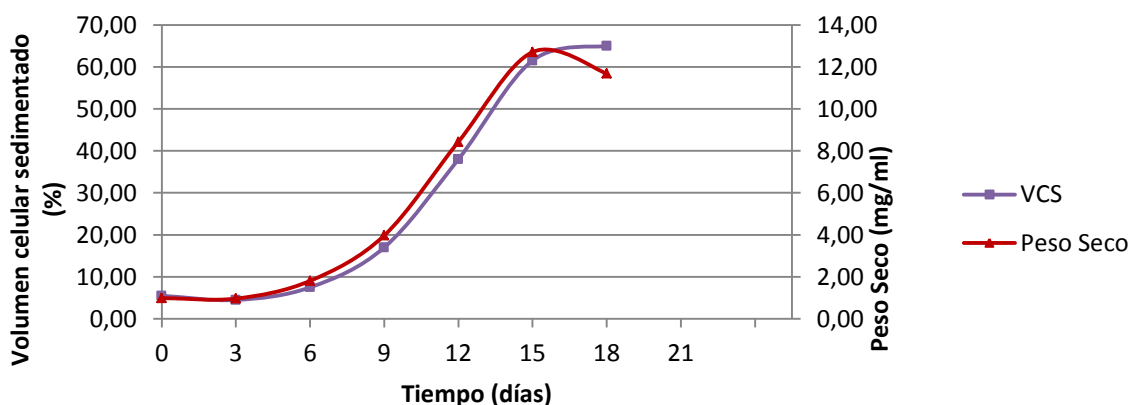
Tratamiento	Volumen celular sedimentado (%)	Peso Seco (mg/ml)
SN1	38,4 <sup>b</sup>	9,51 <sup>b</sup>
SN2	43,67 <sup>a</sup>	10,71 <sup>a</sup>

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas  $\alpha=0,05\%$  analizados con prueba de T Student. **Fuente:** CENIBiot, 2016.

#### 4. Escalamiento del cultivo celular en biorreactor

##### 5.1 Cinética de crecimiento

En la figura 17 se muestra la cinética de crecimiento en biorreactor en el medio de cultivo SN2 basadas en el peso seco y volumen celular sedimentado.



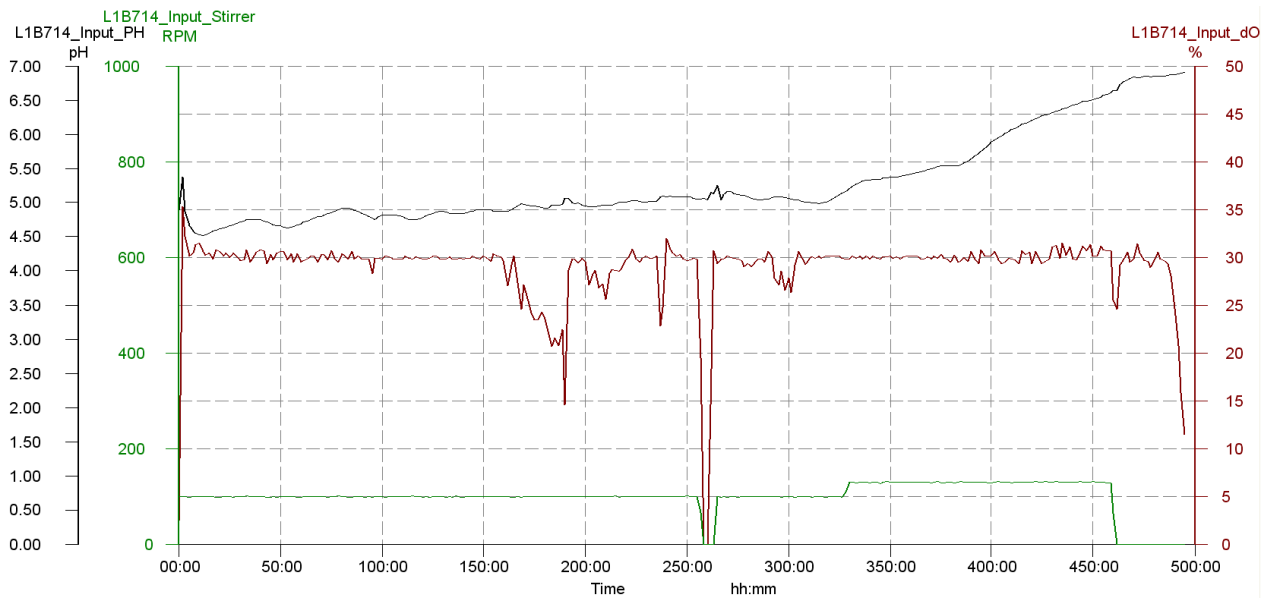
**Figura 17.** Cinética de crecimiento de células en suspensión de *A. indica* en biorreactor tipo tanque agitado con medio de cultivo SN2 (M&S (1962) suplementado con 0,75mg/L de TDZ y 100mg/L de caseína hidrolizada). **Fuente:** CENIBiot, 2016.

El cultivo en biorreactor se mostró bastante denso a partir del día 12, es decir, en aproximadamente la mitad del crecimiento exponencial. Como es común en los cultivos de células vegetales en biorreactor, se mostraron agregados en las paredes del frasco de cultivo, debido a la alta densidad de células (figura 18).



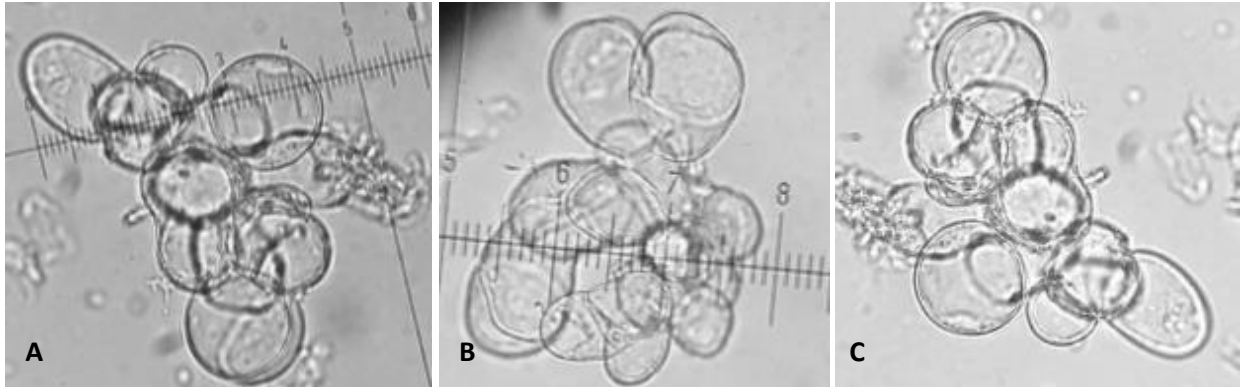
**Figura 18.** Biorreactores tipo tanque agitado con cultivo celular de *A. indica* en fase exponencial. **Fuente:** CENIBiot, 2016

En la figura 19, se muestran las variaciones del pH en el medio de cultivo durante el tiempo, el cual mostró oscilaciones sin embargo, se mantuvo entre 4,5 y 5,5 unidades de pH, hasta el final de la corrida, donde aumenta superando las 6,0 unidades de pH. Además, pudo observarse que los valores de oxígeno disuelto (DO), se mantuvieron entre 20% y 30% con algunos descensos, principalmente en los procesos de toma de muestra.



**Figura 19.** Variación de DO, agitación y pH del medio de cultivo durante el tiempo en el cultivo de *A. indica* en biorreactor de tanque agitado. **Fuente:** CENIBiot, 2016.

Las células en biorreactor mostraron ser redondas, con pared celular gruesa y forman agregados de 10 a 15 células, con un tamaño de 3 a 5 $\mu$ m aproximadamente (figura 20).

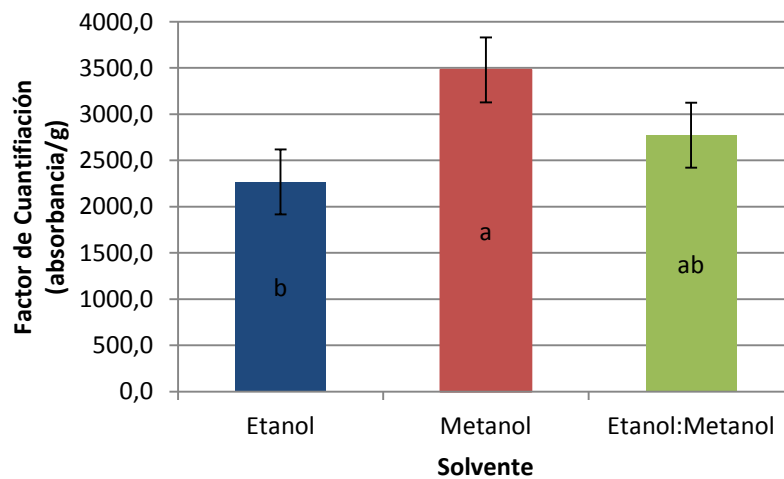


**Figura 20.** Células de *A. indica* cultivadas en biorreactor tipo tanque agitado en fase exponencial. Aumento: 40X.  
**Fuente:** CENIBiot, 2016

## 5. Análisis químicos

### 5.2 Determinación del mejor solvente de extracción

Al analizar los factores de cuantificación de limonoides obtenidos con cada solvente de extracción, mediante una prueba ANOVA con comparaciones de Fisher, se determinó que existen diferencias significativas entre ellos. El metanol presentó una media mayor, por lo cual, se empleó para realizar las extracciones posteriores (figura 21).

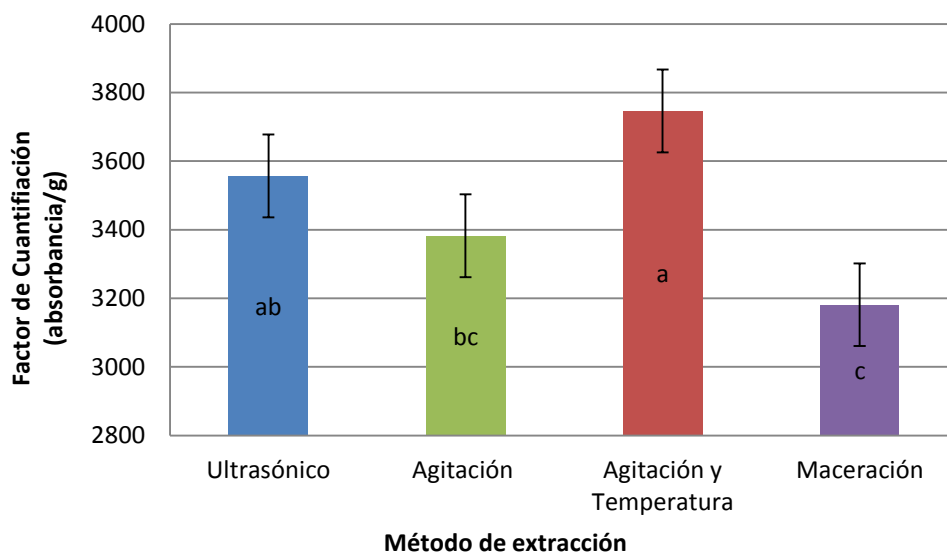


**Figura 21.** Determinación del factor de cuantificación de limonoides utilizando diferentes solventes de extracción.  
**Fuente:** CENIBiot, 2016.

### 5.3 Determinación de la mejor técnica de extracción

La prueba ANOVA aplicada para la determinación del mejor método de extracción de limonoides totales, mostró un valor de  $p = 0,023$ ; razón por la cual se afirma con un 95% de confianza que existen diferencias estadísticamente significativas entre los métodos realizados.

La comparación entre los métodos de extracción mediante la prueba de Fisher mostró que el ultrasonido y la agitación con temperatura presentaron un mayor factor de cuantificación, por lo cual se tomó la decisión de elegir este último, por presentar la mayor media (figura 22).

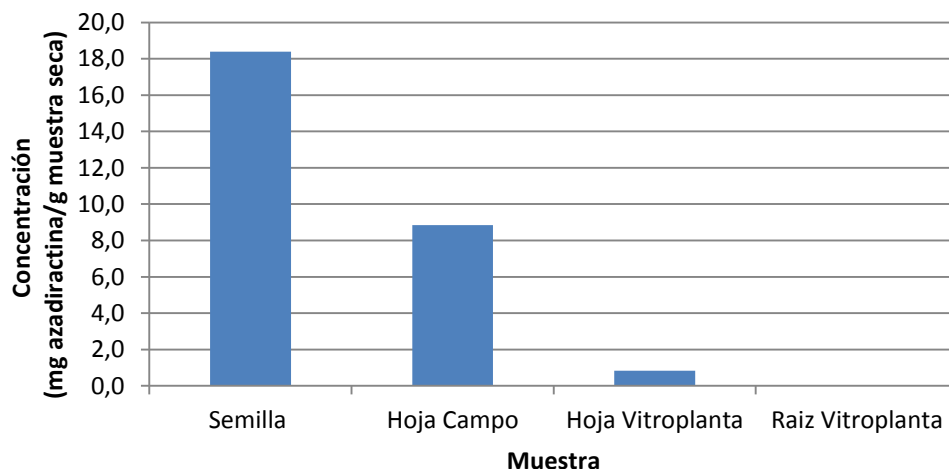


**Figura 22.** Determinación del factor de cuantificación de limonoides utilizando diferentes métodos de extracción. Fuente: CENIBiot, 2016.

#### 5.4 Cuantificación de azadiractina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

- *Muestras de campo y de plantas in vitro*

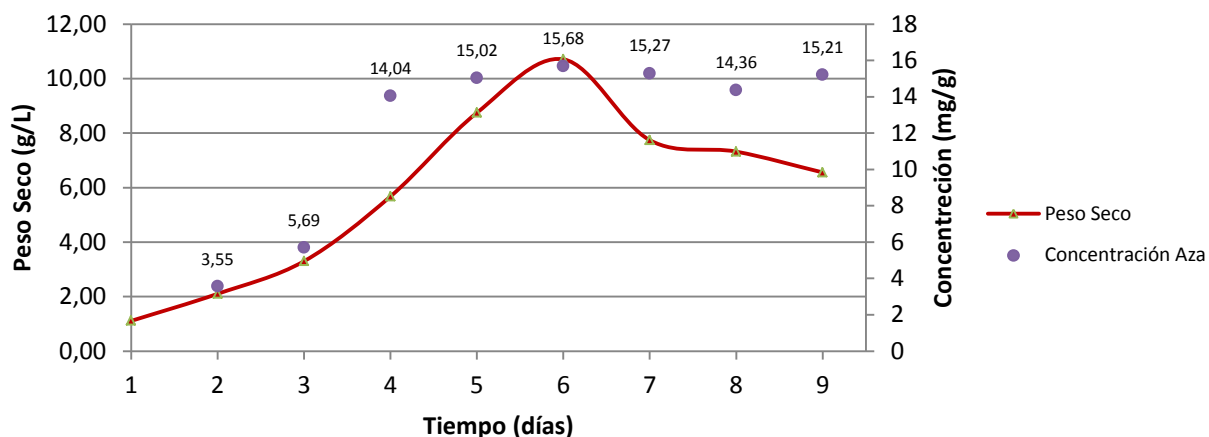
Al cuantificar la azadiractina en las muestras de plantas de campo y en condiciones *in vitro*, fue evidente que la mayor concentración de este metabolito se presentó en muestras de semilla, con un valor de 18,4 mg/g. Las hojas colectadas en campo tuvieron una concentración de azadiractina de 8,8 mg/g mientras que las hojas de vitroplantas contenían cerca de diez veces menos (0,8mg/g). Las muestras de raíz no mostraron un valor cuantificable del limonoide, tal como se muestra en la figura 23.



**Figura 23.** Concentración de azadiractina en dos muestras de plantas en condiciones de campo e *in vitro*. **Fuente:** CENIBiot, 2016.

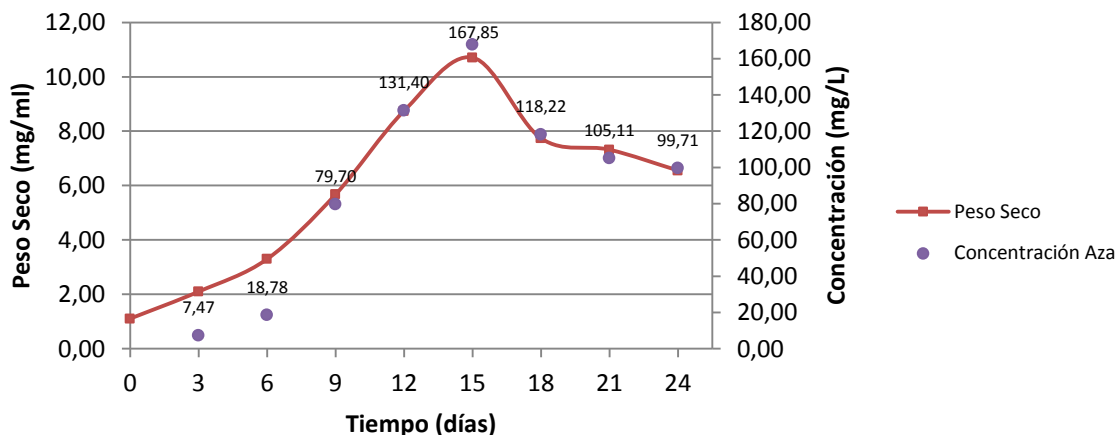
- *Cultivos celulares en matraz*

La producción de azadiractina en las suspensiones celulares se muestra en la cinética de crecimiento de la figura 24. Se pudo observar un aumento en la concentración de azadiractina en la fase exponencial del cultivo, alcanzando el punto máximo de producción (15,58 mg/g) al día 18.



**Figura 24.** Concentración de azadiractina por gramo de masa seca en cultivos celulares de *A. indica* a nivel de matraz. **Fuente:** CENIBiot, 2016.

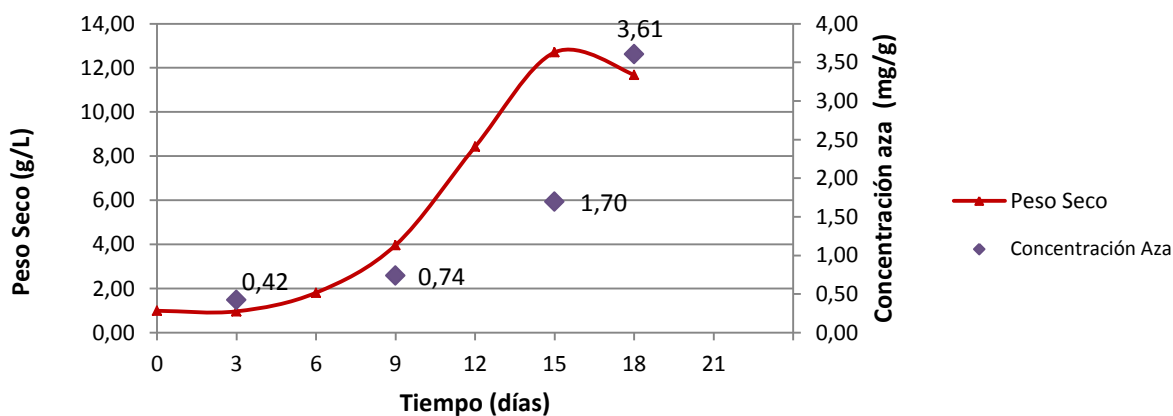
Con respecto a la concentración de azadiractina en el volumen de cultivo, se muestra una producción máxima al día 15, con un valor correspondiente a 167,85mg/L de cultivo (figura 25).



**Figura 25.** Concentración de azadiractina por litro de cultivo celular de *A. indica* en a nivel de matraz. **Fuente:** CENIBiot, 2016.

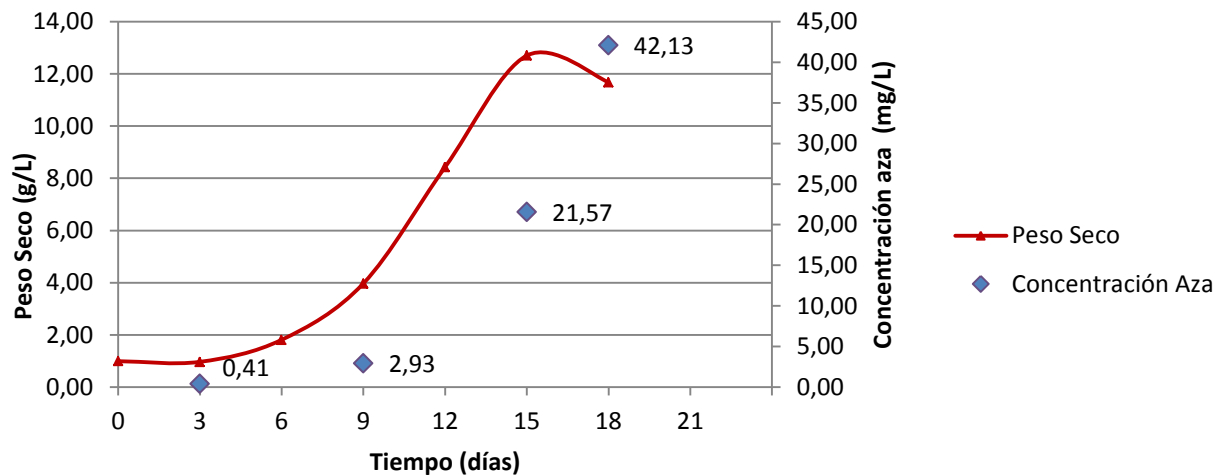
- *Cultivos celulares en biorreactor*

Al escalar el cultivo celular de *A. indica* a biorreactor tipo tanque agitado, se tuvo una producción de aza de 0,42mg/g en el día 3 de cultivo, es decir, en la fase inicial. Esta concentración se fue incrementando con la biomasa, para alcanzar un valor máximo de 3,61 mg/g de azadiractina al día 18, correspondiente al inicio de la etapa de muerte celular (figura 26).



**Figura 26.** Concentración de azadiractina por gramo de masa seca en cultivos celulares de *A. indica* en biorreactor tipo tanque agitado. **Fuente:** CENIBiot, 2016.

Al calcular la concentración de azadiractina por litro de cultivo en biorreactor, tomando en cuenta el crecimiento en biomasa de los sistemas, se tuvo una producción máxima al día 18, de 43,13 mg/L. Tomando en cuenta que el biorreactor tenía un volumen de trabajo de 3L y descartando los volúmenes de las muestras, se puede tener una concentración de 126mg de azadiractina en 3L de cultivo, bajo las condiciones presentadas en este estudio (figura 27).



**Figura 27.** Concentración de azadiractina litro de cultivo celular de *A. indica* en biorreactor tipo tanque agitado.  
**Fuente:** CENIBiot, 2016.



## VI. DISCUSIÓN

### 1. Obtención del material vegetal.

#### 3.3. *Recepción y mantenimiento de callo friable*

Mediante el proceso de indexación del material proveniente del CIB, ITCR, fue posible detectar la contaminación, en su mayoría bacteriana, del 11,11% de los callos recibidos.

Esta contaminación pudo deberse al traslado de los mismos de una institución a otra, o a remanentes de microorganismos del proceso de desinfección de la semilla empleada para la inducción de callo. Hernández y González (2010), reportan entre las principales fuentes de contaminación *in vitro* los explantes, el ambiente de los locales de trabajo, las corrientes de aire y partículas de polvo cargadas de esporas y microorganismos, las cuales pueden ser transportadas por el ser humano, ácaros e insectos. Por este motivo, se cree que el trasladar los frascos con callo entre instituciones pudo ser el causante de la contaminación.

Por otra parte, cabe mencionar que los métodos de desinfección utilizados en la fase de establecimiento no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas in vivo. En el caso de la callogénesis, los cultivos microbianos podrían expresarse en la etapa de inducción del callo, o permanecer sin expresarse por largos períodos de tiempo y mostrarse en las fases de multiplicación (Alvarado *et al.*, 2003).

El método de indexación del material en medio TS, empleado resultó ser efectivo para la detección de contaminantes. El medio TS proporciona nutrientes tales como digeridos enzimáticos de caseína y harina de soja que proporciona los aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas suficientes para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, es comúnmente empleado para la detección y aislamiento de cultivos (Zhurbenko *et al.*, 2006).

El material que al ser indexado mostró turbidez en el medio microbiológico, fue eliminado, debido a que el crecimiento microbiano podría tener efectos adversos para los cultivos vegetales, principalmente porque compiten por los nutrientes del medio y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o liberación al medio de metabolitos tóxicos (Hernández y González, 2010).

En cuanto al subcultivo de los callos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, por lo cual se puede afirmar que el enriquecimiento del medio semisólido con caseína hidrolizada (100mg/L) no posee efectos en el peso fresco y peso seco de los callos, al igual que al agregarla en combinación con extracto de malta a la misma concentración.

La caseína hidrolizada es una mezcla de aminoácidos que funciona como fuente de nitrógeno orgánico para las células vegetales. A pesar de que se ha reportado que esta mezcla favorece el mantenimiento de las células indiferenciadas de algunos cultivos tales como frijol, maíz, pera y manzana, es importante tomar en cuenta que las respuestas de las células dependerán de la especie y condiciones de cultivo (Puche y Rodríguez, 2000).

Investigaciones iniciales realizadas por Beherend y Mateles (1975) sobre el efecto de los aminoácidos en el crecimiento celular, reportan que los estos compuestos podrían incluso reducir el crecimiento del cultivo, debido a un efecto inhibitorio en el proceso de asimilación de nitrato que afecta la acción de la nitrato reductasa, por lo tanto conduciría a la inanición de nitrógeno de las células .

En los resultados obtenidos, no se muestra dicha inhibición, por el contrario, los valores de las medias tanto para peso fresco como para peso seco, son mayores en los tratamientos con caseína hidrolizada, sin embargo las diferencias no son significativas con respecto al medio desprovisto de este compuesto.

Saad y Elshahed (2012), mencionan que la adición de aminoácidos puede ser imprescindible para el establecimiento de cultivos celulares y protoplastos, ya que proveen a las células vegetales de una fuente de nitrógeno fácilmente asimilable por las células, de forma más rápida que las fuentes de nitrógeno inorgánico. Además reporta que usualmente la caseína hidrolizada es empleada en concentraciones de 0,25 a 1 g/L y en este ensayo se utilizó una concentración de 0,1g/L, lo cual sugiere el uso de mayores concentraciones, con el fin de evaluar la posibilidad de encontrar diferencias significativas en el crecimiento de la biomasa fresca y seca con el uso de este suplemento.

La adición de extracto de malta a una concentración de 100mg/L, en combinación con caseína hidrolizada (tratamiento CN3) no mostró diferencias significas con respecto a los otros medios de cultivo. El extracto de malta es una fuente de carbohidratos; que ha sido ampliamente empleada en cultivo de tejidos, para el establecimiento de callo, multiplicación de embriones somáticos y multiplicación de plantas *in vitro* de algunas Rubiáceas (Thorpe *et al.*, 2008; Alvarenga, 2010).

### **3.4. Introducción de embriones *in vitro*.**

Los tres tratamientos de desinfección de frutos de neem empleados para la introducción *in vitro* de embriones, generaron porcentajes de desinfección de 100%, es decir, no se encontró contaminación bacteriana ni fúngica en los embriones provenientes de ninguno de los tratamientos.

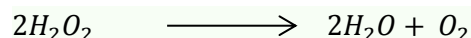
Con estos resultados se evidenció, que tanto el hipoclorito de sodio (NaClO), como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) son efectivos para la eliminación de la carga microbiana de los frutos de neem. Estos compuestos han sido reportados como las más comunes y de fácil acceso para la desinfección de material vegetal, además de otros como el hipoclorito de calcio y el cloruro de mercurio, sin embargo este último posee alta toxicidad, por lo cual se ha limitado su uso (Borges *et al.*, 2009).

Con los resultados obtenidos, se determinó que el uso de peróxido de hidrógeno comercial (al 3%) posee el mismo efecto desinfectante sobre los explantes que el producto comercial Zero Tolerance<sup>®</sup> 27 SL al 50% v/v, empleado por Salazar (2012). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es de menor costo y más fácil acceso, que el producto comercial, por lo cual resulta ventajosa su sustitución en el proceso de desinfección.

El peróxido de hidrógeno tiene fuerte acción destructiva sobre hongos, mohos, bacterias y otros agentes contaminantes. Su mecanismo de acción se debe al efecto oxidante que posee, es decir, la producción de OH y radicales libres que atacan una amplia variedad de compuestos

orgánicos, como los lípidos y proteínas que componen las membranas celulares de los microorganismos (Harper, 2011).

Este compuesto, reacciona con la materia orgánica y se descompone en oxígeno y agua, por la acción de la enzima catalasa, lo cual dificulta la germinación de esporas anaerobias, como se muestra en la siguiente reacción (Harper, 2011).



El tratamiento DSN2, al igual que los demás, produjo buenos resultados. Uno de los agentes desinfectantes que empleó este tratamiento fue el producto comercial SporKlenz®, el cual se compone de peróxido de hidrógeno al 1% y ácido peroxiacético al 0,08% e ingredientes inertes al 98,92%, estos compuestos son muy conocidos por sus propiedades desinfectantes y esporicidas con múltiples aplicaciones. Este producto, tiene baja toxicidad, sin embargo su valor en el mercado es mayor al peróxido de hidrógeno comercial (Steris, 2016).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene más capacidad de oxidación que el cloro debido a sus fuertes propiedades oxidativas, por lo que se emplea como agente desinfectante y sus moléculas son degradables, puesto que liberan oxígeno molecular y agua sin dejar residuos tóxicos (ASTRE, 2004)

Un factor importante cuando se aplica H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la agitación del material, ya que se favorece un suministro adecuado del oxígeno y, por consiguiente, se minimiza la demanda química del oxígeno). Además, este efecto mecánico en presencia de desinfectantes, reduce los grados de infección por bacterias (Flores *et al.*, 2008).

Por otra parte, el tratamiento DN3 que empleaba como agentes desinfectantes alcohol de 70° (5 min.) y cloro al 2,5% i.a. (10 minutos), también evidenció un 100% de material libre de microorganismos. Ospira (2012), obtuvo resultados positivos de desinfección de frutos de neem, empleando los mismos productos, sin embargo realizó una doble desinfección con concentraciones mayores de hipoclorito de sodio (5% durante 25 minutos en semillas con endocarpio) y posteriormente 1% en semilla desnuda).

Es ampliamente conocido que la aplicación de cloro en los procesos de desinfección tiene un efecto positivo en la eliminación de microorganismos resistentes, ya que los inactiva mediante la oxidación del material celular. La muerte de los microorganismos se debe a la combinación directa del cloro con las proteínas de las membranas celulares y las enzimas. Así mismo, en presencia de agua desprende oxígeno nascente (O<sub>2</sub>) que oxida la materia orgánica (Mateos, 2004).

Al comparar los tres tratamientos de desinfección utilizados, es importante mencionar que las semillas desinfectadas mediante el tratamiento DSN1 (Alcohol 70° durante 5 min, peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y un lavado final con alcohol de 95%), tuvo un porcentaje de germinación menor comparado con los otros dos tratamientos. Existen reportes que afirman que el peróxido de hidrógeno puede favorecer la germinación de semillas de especies forestales al ablandar su testa y aumentar la permeabilidad del agua y oxígeno, facilitando a nivel celular la oxidación de grasas y su conversión a carbohidratos. Por esta razón cabe la posibilidad de que la disminución en el porcentaje de germinación se debiera al efecto de la doble desinfección con alcohol, de las cuales la última es al 95% (Flores *et al.*, 2008).

Se ha comprobado que el alcohol actúa desnaturalizando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como agente deshidratante; es letal para bacterias pero irregular para hongos. Sin embargo, el etanol tiene alto poder de penetración en los tejidos y puede ocasionar la deshidratación y muerte de tejidos vegetales, lo cual pudo haber ocasionado una disminución en los porcentajes de germinación de las semillas en condiciones *in vitro* (Mateos, 2004).

Los altos porcentajes obtenidos de desinfección y germinación de las semillas, pueden corresponder a que los embriones y cotiledones, al estar resguardados por la cubierta del fruto (epicarpio, mesocarpio y endocarpio), se protegen tanto de los contaminantes externos, como de la oxidación provocada por los desinfectantes (Pericone *et al.*, citado por Salazar, 2012). Esto sugiere la posibilidad de emplear desinfectantes de bajo impacto ambiental y en concentraciones bajas, tales como el peróxido de hidrógeno y el etanol.

## **2. Multiplicación de plantas *in vitro***

Según la evaluación de las características morfológicas de las plantas de neem multiplicadas *in vitro* en cuatro diferentes medios de cultivo, el tratamiento MN1 mostró las plantas más desarrolladas y con características deseables, como por ejemplo un mayor desarrollo foliar con coloración verde y la escasa proliferación de callo en la base. Los demás tratamientos mostraron hojas cloróticas y poco desarrollo de las plantas.

La clorosis, es el amarillamiento del tejido foliar, causando por la falta de clorofila y usualmente se presenta por deficiencias nutricionales, poca disponibilidad de nutrientes en el medio o que las plantas no pueda absorberlos por un daño en las raíces o en tejido vascular (Schuster, 2016).

Al analizar los datos obtenidos estadísticamente, se encontraron diferencias entre los tratamientos empleados, para todas las variables de respuesta evaluadas.

### *Número de brotes*

La prueba de comparaciones múltiples Kruskal Wallis, mostró que los tratamientos MN1 y MN2 no presentan diferencias significativas entre ellos, mas sí tienen diferencias con el tratamiento MN3 y MN4, siendo los primeros los que muestran una mayor mediana.

En este caso se afirma que el tratamiento sin reguladores de crecimiento (MN1) y el complementado únicamente con citoquinina (0,3mg/L de BAP) tuvieron mejor respuesta para la producción de brotes que los que presentaban la combinación de citoquinina con auxina (MN3 con 0,3 mg/L de BAP y 0,05mg/L de ANA) o la presencia de dos citoquininas (MN4 con 0,1mg/L de BAP y Kinetina).

Estos resultados no coinciden con lo reportado por Biswas y Gupta (2007), quienes concluyen con sus ensayos que la combinación de dos citoquininas, por ejemplo BAP con Kin, favorecen la caulogénesis en *A. indica* procedente de la India. Por otra parte, se ha reportado que 1,11  $\mu\text{M}$  (0,25 mg/L) de BAP, 1,43  $\mu\text{M}$  (0,25mg/L) de ácido indol-3-acético (IAA) y 81,43  $\mu\text{M}$  (15,0 mg/L) de adenina hemisulfato favorecen la brotación de *A. indica* en condiciones *in vitro*.

En este punto es importante mencionar que el material vegetal puede responder de manera diferente de acuerdo a los factores ambientales donde se desarrolla, así como la genética del

material con que se trabaja, por esta razón, pueden encontrarse diferentes respuestas incluso entre las mismas especies, según la ubicación de las mismas y la composición genética de los individuos.

El material proveniente del tratamiento MN3, a encontrarse en medio de cultivo con auxina y citoquinina, mostró formación de callo en la región de corte del explante. Este comportamiento se encuentra ampliamente reportado en dicotiledóneas, donde se ha encontrado que la combinación de estos reguladores de crecimiento favorece la proliferación de tejido indiferenciado (Slater *et al.*, 2008).

De igual manera el tratamiento suplementado MN4, con BAP y Kin (0,1mg/L de ambas), presentó callo en la región basal. La callogénesis primaria alrededor de las zonas de corte, se debe a la tendencia de los tejidos vegetales a formar callo a partir de las heridas como una reacción defensiva natural. En condiciones *in vitro*, los reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas promueven una mayor división celular en las zonas de corte, donde se forma una capa fina de células que, días después, inician la etapa de proliferación masiva y, por consiguiente la formación del callo (Krikorian, citado por Sánchez y Alvarenga, 2015). Esta reacción puede limitar la brotación de los explantes, al concentrar la acción de los reguladores de crecimiento en la división celular indiferenciada.

#### *Longitud*

En cuanto a la longitud, el tratamiento MN1 (sin reguladores de crecimiento) mostró los valores más altos y significativamente mayores a los demás tratamientos, que no difirieron entre ellos, con una media de 3,158 cm.

Estos resultados difieren con los obtenidos por Shahin-uz-zaman *et al.* (2008), quienes reportan una mayor longitud de los brotes (2,79 cm a los 70 días de cultivo) al emplear medio M&S (1962) suplementado con 0,3 mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA. Esa composición de medio de cultivo fue evaluado en este ensayo (tratamiento MN3), obteniendo resultados una longitud promedio de 2,164cm por brote, sin embargo las plantas se mostraban cloróticas y poco desarrolladas.

Por otra parte, Alvarenga *et al.*, (2014) obtuvieron sus mejores resultados en cuanto a longitud de tallos con tratamientos suplementados con 0,3 mg/L de BAP y 0,05 mg/ de ANA, con medias de 2,3 y 1,8 cm respectivamente. Estos valores son inferiores a los obtenidos en este ensayo en medio de cultivo sin hormonas de crecimiento.

El mayor crecimiento de los brotes en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento puede deberse a que las concentraciones endógenas de reguladores de crecimiento de las plantas de neem evaluadas fueron suficientes para el crecimiento de las mismas, en este caso, por el efecto en la elongación de los brotes, se espera que las plantas tuvieran una concentración endógena de giberelinas (GAs), reportadas en el crecimiento en altura de las plantas.

Las giberelinas estimulan la división y elongación celular en la porción sub-apical de los tallos y también en el meristema intercalar. Se ha reconocido un efecto específico causado por las GAs sobre la actividad de la enzima xiloglucano endotransglicosilasa (XET) la cual hidroliza xiloglucanos permitiendo nuevos arreglos de la pared celular que preparan a las células para la división celular (Jan *et al.*, 2004). A nivel génico, estudios en *Arabidopsis thaliana* han reconocido la existencia de algunos factores represores de transcripción que bloquean el crecimiento en altura (RGA, GAI, SLR1), los cuales en presencia de GAs, son degradados, restableciéndose el crecimiento en forma normal (Thomas y Sun, 2004).

### *Número de nudos*

Una mayor longitud en las plantas puede influir directamente con la diferenciación de los nudos. Para esta variable, los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento MN1 (promedio de nudos por planta: 5,515), mismo que presentó la mayor longitud. Estas variables por lo general se encuentran relacionadas y son importantes en la determinación de la calidad de las plantas. Adicionalmente, se ha obtenido buenas respuestas en otras especies en cuanto a la elongación y número de nudos únicamente con el contenido endógeno de hormonas de crecimiento en los explantes, los cuales ha demostrado ser suficientes para obtener indicadores satisfactorios de multiplicación y desarrollo de las plantas *in vitro*, lo cual permite hacer más eficiente el proceso reduciendo los costos de la formulación de los medios de cultivo (Borges *et al.*, 2012).

### *Peso Fresco*

El análisis estadístico de los datos de peso fresco mostró que los tratamientos MN2 (suplementados con 0,3mg/L de BAP) y MN3 (0,3mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA) mostraron medias superiores a los tratamientos MN4 (0,1mg/L de BAP y Kinetina) y MN1 (sin reguladores de crecimiento). Al comparar estos datos con los resultados de las demás variables, así como el análisis visual de las plantas, se puede atribuir estas diferencias al peso del callo generado en la sección basal de los explantes. Pese a que la masa del callo propiamente no fue evaluada de manera individual, se visualiza una callogénesis en mayor proporción en las plantas de los tratamientos MN2 y MN3, seguidas por el MN4, mientras que en el tratamiento MN1 no se presentó.

La formación de callo en la base de los explantes puede producirse tanto por la presencia de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo, como fue el caso del tratamiento MN3, como por el efecto de las citoquininas BAP y Kin en los tratamientos MN2 y MN4 interactuando con las auxinas endógenas presentes en los explantes (Pernisova *et al.*, 2009, Salazar, 2012).

El efecto de las auxinas en formación de callo se encuentra relacionado con la capacidad que tienen estos compuestos de estimular la división celular e influir indirectamente en la regulación del ciclo celular, definido como el proceso molecular durante el cual una célula se divide en dos células idénticas, por acción de múltiples etapas reguladas por proteínas (Arellano *et al.*, 2008).

Las etapas del ciclo celular, principalmente la transición entre ellas, se encuentra regulada por las enzimas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales fosforilan otras enzimas mediante el uso de ATP. Estas quinasas, como su nombre lo indica, requieren de la conjugación con estructuras proteicas llamadas ciclinas, las cuales son específicas para cada etapa del ciclo celular y cada vez que son empleadas son destruidas (Zeiger y Taiz, 2006).

Complementariamente, se reporta que a nivel de la etapa G1 del ciclo, donde las células crecen y acumulan nutrientes, las auxinas y las citocininas estimulan notablemente a nivel transcripcional la expresión de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular (Jurado, 2010).

### *Peso seco*

Los resultados obtenidos para la variable peso seco muestran que los tratamientos suplementados con reguladores de crecimiento (MN2, MN3 y MN4) no presentan diferencias entre sí, a la vez que el tratamiento MN2 sí difiere estadísticamente con el MN1 (sin reguladores de crecimiento).

Pese a que las variables longitud, número de nudos y número de brotes favorece es mayor en el tratamiento MN1, en cuanto al peso seco este tratamiento evidencia ser el menor. Esto puede deberse, de igual manera que para el peso fresco, al callo que los demás tratamientos produjeron en la base del explante.

Las diferencias no fueron significativas en los demás tratamientos, debido a que todos presentaban tejido calloso en la base, que al ser deshidratado, reportaron pesos secos similares y superiores al tejido vegetal diferenciado del tratamiento MN1.

Las células vegetales, poseen en promedio de 85 a 90 % de agua en el protoplasma, principalmente en las vacuolas; inclusive los orgánulos celulares con un alto contenido de lípidos, como cloroplastos y mitocondrias tienen 50% de agua. Al someter el tejido vegetal a elevadas temperaturas, las células se deshidratan y reducen considerable su peso, el cual es conocido como peso seco. Las células indiferenciadas, que se encuentran en constante división por lo general contienen múltiples vacuolas de tamaño moderado o pequeño que contienen la mayor parte del agua de toda la célula (Zeiger, E., Taiz, L. 2006; Hernández, 2007).

Las diferencias del peso fresco son más notorias que las del peso seco, lo cual puede deberse al alto contenido de agua en las células, que aporta masa fresca, sin embargo, al deshidratarlas, se reduce la biomasa al contenido estructural celular y las diferencias entre tratamientos son menores. Esto refuerza el supuesto de que las diferencias entre los tratamientos en cuanto a peso fresco y seco, se deben al contenido de callo en la base y no al tejido diferenciado de tallo y hojas.

Es importante mencionar que la respuesta de material vegetal, depende de la especie, del explante, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas de hormonas, así como el balance entre ellas y diversos factores ambientales que juegan un papel determinante. Por esta razón es necesario optimizar ensayos con los materiales colectados en diferentes zonas geográficas, ya que es posible que no se comporten de igual manera, por factores ambientales y genéticos, y no sea posible generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de desarrollo de un tejido u órgano vegetal en particular (Pérez *et al.*, 2006; Ramos, 2014).

#### **4. Establecimiento de suspensiones celulares**

La friabilidad es un parámetro de medición de la textura del callo que se refiere a la capacidad de los mismos para disgregarse. Esta característica se encuentra relacionada con las propiedades de la pared de las células que conforman el callo, las cuales pueden ser modificadas por acción de las sales minerales, calcio, hierro, azúcares, vitaminas o reguladores de crecimiento, tales como las auxinas, cuyo efecto en la friabilidad puede deberse al “efecto ácido” que provoca en las paredes celulares, con lo cual se activan enzimas como las expansinas, que rompen algunos enlaces de hidrógeno entre los constituyentes de la pared, favoreciendo la friabilidad del callo, así como la plasticidad de la célula y su crecimiento (Freire, 2003; Jordán y Casaretto, 2006).

El callo de *A. indica* mostró gran friabilidad al disgregarse fácilmente con agitación orbital a 100rpm en los medios de cultivo empleados para el establecimiento de suspensiones celulares, denotados como SN1, (compuesto por sales M&S (1962), 0,75mg/L de TDZ y 3% de sacarosa) y (SN2, suplementado con 100mg/L de caseína hidrolizada).

Una vez establecidas las suspensiones celulares, fue necesario tamizar los cultivos cada dos ciclos, debido a la propensión de las células de formar agregados grandes. Mediante la técnica de tamizaje, fue posible mantener las suspensiones más uniformes y en crecimiento activo.

La formación de agregados se debe principalmente a la tendencia de las células de no separarse después de la división celular o bien a la presencia de polisacáridos extracelulares que pueden favorecer la agregación de las células, principalmente en las últimas etapas del crecimiento (Gupta e Ibaraki, 2006).

Esta tendencia también fue observada por Bedoya y Hoyos en cultivos celulares de *A. indica* (2010), quienes mencionan que un aumento en el tamaño de agregados celulares limita la toma de nutrientes del medio de cultivo por parte de las células, siendo más afectadas aquellas que se encuentran en el centro de los agregados, lo cual puede alterar los procesos metabólicos celulares (Zhong et al., 2002).

#### 4.1. Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento de las células vegetales en suspensión usualmente comprende tres fases: (a) Fase Lag o de adaptación al medio, (b) Fase Log o de crecimiento exponencial y (c) Fase Estacionaria. Cada una de estas fases se encuentra condicionada por una serie de factores físicos y químicos, así como condiciones de cultivo tales como densidad inicial y disponibilidad de medio de cultivo (Nagata *et al.*, 2004; Fierros *et al.*, 2010).

En las cinéticas de crecimiento elaboradas para *A. indica* en los dos medios de cultivo evaluados, no se logró distinguir con claridad la etapa lag o de adaptación. Esto pudo deberse a que esta etapa fue muy corta y los muestreos cada tres días no permitieron definirla con claridad.

Otro factor importante, es la adición de un 30% de medio antiguo y un 70% de medio fresco. Esto se realizó debido a que, por experiencia anterior, el renovar por completo el medio de cultivo a las células les causaba una inhibición del crecimiento y no se desarrollaba el cultivo con normalidad. En este caso, es posible que las células acortaran su fase de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo y empezaran su crecimiento desde el día de inoculación, de manera que para el día 3 ya se mostrara un aumento en el volumen celular sedimentado y el peso seco.

En la cinética elaborada con medio de cultivo SN1 (suplementado con 0,75mg/L de TDZ), se muestra una fase de crecimiento exponencial hasta el día 18 para el volumen celular sedimentado y para el peso seco (figura 9). En este punto, se reporta el valor máximo de peso seco (9,51 g/L). Posteriormente, inicia la fase de muerte del cultivo, no apreciándose con claridad una fase estacionaria.

Por otra parte, la cinética trazada con base en el volumen celular sedimentado muestra una fase estacionaria de tres días (del 18 al 21), donde el índice de crecimiento disminuye. Posteriormente se evidencia una fase de muerte donde tanto el VCS como el PS decaen, posiblemente a causa de la pérdida de turgencia de las células y el rompimiento de las mismas.



La cinética de crecimiento trazada para el medio de cultivo SN2 (suplementado con 0,75mg/L de TDZ y 100mg/L de caseína hidrolizada), muestra un comportamiento similar. No se evidencia claramente una fase lag, presentándose una etapa de crecimiento exponencial hasta el día 15 para el peso seco (con un valor máximo de 10,72g/L), y 18 para el volumen celular empacado (con un porcentaje máximo de 43,67%). Inmediatamente inicia la fase de muerte celular, es decir, no se muestra una fase estacionaria, posiblemente debido a que tiene una duración corta y el muestreo cada tres días no permitió visualizarla con claridad en la cinética. En la fase de muerte se presenta una disminución en el PS y VCS.

El índice de crecimiento es un indicador del aumento de la biomasa celular en determinado momento, respecto del "inóculo" inicial. Como es de esperar, los mayores índices de crecimiento se presentaron en la etapa exponencial de la cinética, mostrando un valor máximo de 7,72 al día 18 de cultivo para el medio SN1 y de 8,65 al día 15 de cultivo para el medio SN2 lo cual evidencia que en este día, el cultivo tuvo el mayor crecimiento posible bajo las condiciones dadas, tomando como referencia el valor del peso seco de las suspensiones celulares. El índice de crecimiento promedio para el tratamiento SN1 fue de 4,09 y para SN2 fue de 4,33, lo cual muestra un mayor crecimiento en este último.

Una disminución en el índice de crecimiento del cultivo indican que las células están dejando de dividirse, posiblemente por el agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo o bien, porque se encuentran dañadas a nivel de membrana celular (Sotelo, 2007).

Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial es un indicativo de la velocidad con que ocurre el crecimiento en las suspensiones celulares. Según Caballero y Cardona (2007) es un valor constante que empieza a disminuir en la fase de desaceleración hasta alcanzar la etapa estacionaria, donde el cultivo deja de crecer. En este caso, esta velocidad fue de 0,56 g/L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> para el medio SN1 y de 0,8 g/L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, para el medio de cultivo SN2, con lo cual se demuestra un crecimiento diario mayor en el medio suplementado con 100mg/L de caseína hidrolizada. Esto puede deberse a el efecto de esta fuente de nitrógeno, lo cual se amplía en el apartado 3.2.

La morfología de las células en suspensión ya establecida, muestra que éstas tuvieron forma redonda, propias de células meristemoides en fase de división celular, las cuales son isodiamétricas, con paredes finas y citoplasma denso. Formaron agregados grandes (de 10µm), lo cual es común en células vegetales, las cuales tienen a organizarse y no separarse al dividirse.

Tomando en cuenta que la agitación orbital ejerce una presión leve en los agregados, separándolos en segmentos más pequeños o células individuales, sería importante evaluar el comportamiento de las células con mayor velocidad de agitación, lo cual podría disminuir el tamaño de los agregados y producir un cultivo más homogéneo. Se ha reportado velocidades de agitación a nivel de matraz, hasta de 150 rpm (Chawla, 2009).

En estudios realizados por Muñoz *et al.* (2006), si se mostró una fase lag de aproximadamente 5 días y se obtuvo una densidad máxima de 4,7 g células secas/L. Esto muestra que con los medios probados en esta investigación es posible obtener más del doble de la biomasa seca de lo obtenido por esos autores.

#### 4.2. Análisis estadístico

Mediante el análisis estadístico de los datos, se determinó que existen diferencias significativas entre los medios líquidos empleados para el cultivo de las células. Tomando en

cuenta el valor de las medias, se determinó que la caseína hidrolizada tiene un efecto en el crecimiento celular, al ser evaluado tanto por volumen celular sedimentado como por peso seco. Esto se evidencia en el valor máximo de biomasa producida en ambos sistemas donde se puede observar un mayor crecimiento en medio de cultivo SN2 comparado con el SN1.

Debe tomarse en cuenta que en ambos tratamientos se produce un crecimiento celular, posiblemente por la composición del medio de cultivo, así como por el efecto directo del TDZ en las células.

Este regulador de crecimiento ha sido catalogado como una citoquinina por su actividad, no obstante se distingue de otras fitohormonas ya sean naturales o sintéticas por su eficiencia en la promoción de la división celular ya que produce efectos similares a las citocininas y a las auxinas, pese a que su estructura química es diferente a ambos. Se ha demostrado el efecto sinérgico, del TDZ, debido a que su empleo incrementa la concentración endógena de auxinas, por lo que, adicionalmente, se promueven las funciones de estas hormonas. Este regulador del crecimiento, también se ha utilizado para la formación de callo, adicionado a bajas concentraciones en el medio de cultivo (Guo *et al.*, 2011; Alvarenga *et al.*, 2014).

La diferencia entre el crecimiento de biomasa en ambos tratamientos puede deberse al aporte de nutrientes proporcionado por la caseína hidrolizada, especialmente de nitrógeno.

El nitrógeno es de los elementos minerales más importante para la nutrición de las células vegetales, y que es constituyente de los aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos y por lo tanto es fundamental en el crecimiento, tanto en su fase de división como elongación celular, Además es constituyente de las membranas plasmáticas y de diversos pigmentos y hormonas vegetales.

Existen reportes de que la mezcla de aminoácidos presente en la caseína hidrolizada favorece el mantenimiento de las células indiferenciadas, como en este caso (Puche y Rodríguez, 2000).

Cabe destacar que la presencia de caseína no mostró diferencias estadísticamente significativas en el subcultivo de callo, sin embargo si se muestran dichas diferencias en suspensiones celulares.

Esto puede relacionarse con una mayor disponibilidad de nutrientes para las células en las suspensiones comparado con el callo en medio semisólido. Como su nombre lo indica, las suspensiones celulares consisten de células libres y pequeños agregados celulares en un medio de cultivo líquido en constante movimiento que proporciona un ambiente de cultivo uniforme, eliminando los gradientes de nutrientes que se presentan en los cultivos en medio sólido y garantizando la disponibilidad de nutrientes para todas las células (Casas, 2003; Arias, 2013).

Se ha reportado que la relación de amonio/nitrato y los niveles generales de nitrógeno total afectan el nivel de las proteínas y aminoácidos en los cultivos de células vegetales, principalmente en lo que respecta a su crecimiento y desarrollo.

Numerosas investigaciones han revelado que el amonio podría regular procesos como el crecimiento celular, biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular, síntesis de proteínas, síntesis enzimática y actividad de las enzimas de asimilación de nitrógeno, fijación heterotrófica

de CO<sub>2</sub>, y movilización del nitrato vacuolar y en los procesos de transporte de membrana (Leleu y Vuylsteker, 2004; Günter y Ovodov, 2005; Gómez *et al.*, 2014).

### 3. Escalamiento del cultivo celular en biorreactor

#### 5.5 Cinética de crecimiento

En la cinética de crecimiento, se mostró una fase lag o de adaptación del cultivo de aproximadamente 4 o 5 días.

En ensayos realizados por Bedoyay Hoyos (2010) se tuvo cinéticas con fases iniciales de 9 días, sin embargo, reportan 2g/L de biomasa seca en la muestra inicial, mientras que en este experimento se determinó un 0,99g/L. Esto indica que el inóculo reportado por los investigadores fue el doble del empleado en este trabajo.

Estos resultados no coinciden con lo reportado en la literatura, ya que se espera que cinéticas con menor inóculo inicial tarden más en la fase de adaptación (lag).

Seguidamente se mostró una fase de crecimiento exponencial, que inicia el día 6 y se extiende hasta el día 15. Esta fase es de multiplicación activa de las células, por lo cual es de esperar que el peso seco y el volumen celular sedimentado aumenten, alcanzando el valor máximo al día 18 de cultivo con valores de 12,71g de peso seco/L 65% respectivamente.

En las suspensiones establecidas por Bedoya y Hoyos (2010) se muestra una fase exponencial de 15 días (desde el día 9 hasta el 14), es decir, comparativamente más extensa que la obtenida en este ensayo (duró 9 días) y obtuvieron valores máximos de biomasa de 11,09 g/L, ligeramente menores que es este ensayo.

En la figura 14, se muestra el comportamiento del pH en el tiempo. El cual tiene oscilaciones sin embargo se mantiene entre 4,5 y 5,5 unidades de pH, hasta cerca del día 18, donde ese valor se eleva hasta por encima de 6,0 unidades de pH. Además, puede observarse los valores de oxígeno disuelto (dO), los cuales se mantuvieron entre 20% y 30% con algunos descensos, principalmente en muestreos o interrupción del proceso por algún cambio necesario.

En el caso de la agitación, se mantuvo constante a 100rpm, sin embargo, cuando la concentración celular superó el 60% de volumen celular empacado, se aumentó a 120rpm, debido a que la densidad celular era elevada y empezó a dificultar el proceso de mezclado.

Una variable de importancia, fue el control del oxígeno disuelto en un 30% durante todo el cultivo. En investigaciones previas, se ha reportado que la oferta de oxígeno es de suma importancia para el cultivo de células en suspensión de *A. indica*, debido a que los compuestos activos del neem (limonoides) poseen gran cantidad de grupos funcionales con oxígeno y puede también favorecer el crecimiento y división celular (Orozco, 2009; Ospina, 2012).

Las células en biorreactor mostraron ser redondas, con pared celular gruesa y forman agregados de 10 a 15 células, con un tamaño de 3 a 5µm aproximadamente (figura 15).

La agitación mecánica proporcionada por el biorreactor, causa un efecto de corte sobre los agregados celulares. Esto explica que los cultivos en biorreactor presentaran un menor tamaño de agregado que las suspensiones celulares cultivadas en matraces con agitación orbital. El tamaño de los agregados usualmente disminuye con el transcurso de la cinética del cultivo (Martínez, 2009).

#### 4. Análisis químicos

##### 5.6 Determinación del mejor solvente de extracción

Mediante el análisis estadístico de los datos, fue posible determinar que el mejor solvente de extracción fue el metanol, pese a que no se presentaron diferencias significativas con respecto al tratamiento con la mezcla etanol:metanol (50:50), se eligió como solvente el metanol puro, debido a que presentó una mayor media.

Este resultado es coincidente con Singh y Chatuverdi (2012), Sunjanya *et al.*, (2008), Bedoya y Hoyos (2010) y Esparza *et al.* (2010), quienes emplearon el metanol para la extracción de azadiractina de muestras de campo y suspensiones celulares.

El metanol (también llamado alcohol metílico) pertenece a un grupo de sustancias químicas orgánicas denominadas alcoholes. Es un compuesto altamente polar que se caracterizan por la presencia de uno o más grupos hidroxilo (OH) en su estructura molecular (Navas, 2009).

La azadiractina, al ser un limonoide y poseer una polaridad media, puede ser disuelta en solventes con polaridad media o alta como es el caso del metanol, etanol dietil éter, diclorometano (Melwita *et al.*, 2011).

##### 5.7 Determinación de la mejor técnica de extracción

Es importante mencionar que la azadiractina es un metabolito que se acumula intracelularmente por lo cual es de suma importancia implementar un método de extracción del compuesto del interior de las células. (Orozco y Rodríguez, 2007).

En las extracciones sólido- líquido, es necesario primero liberar los compuestos del interior de las células que los contienen, para luego solubilizarlos a través de la extracción acuosa o con solventes (Avalos, 2014).

La comparación estadística entre los métodos de extracción empleados, mostró que el ultrasonido y la agitación con temperatura presentaron un mayor factor de cuantificación, en comparación con la agitación y la maceración.

Mediante la agitación, se aplicó una fuerza de rompimiento mecánica de las células, lo cual favorece la liberación del contenido intracelular o bien, la penetración de los solventes en las células. Eso aunando al aumento en la temperatura (50°C), puede provocar un rompimiento en las membranas celulares y contribuir a un mejor rendimiento de extracción (Hemwimol *et al.*, 2006).

Por otra parte, la técnica de ultrasonido produce un efecto de cavitación acústica en las células y ocasiona una presión negativa en el solvente ocasionando la formación de microburbujas capaces de separar moléculas y romper membranas y, por ende, aumentan la transferencia de masa (Vongsangnak *et al.*, citado por Moreira, 2015).

Es importante mencionar, que las centrifugaciones realizadas entre extracciones (en todos los métodos probados), permitió remover materiales insolubles tales como restos celulares y otros precipitados (Avalos, 2014).

Tomando en cuenta que para la extracción de los compuestos en muestras de *A. indica* con la técnica de ultrasonido se requiere de equipo especializado y que el método de agitación con temperatura tiene una media mayor, se selecciona este último para el análisis de las muestras posteriores.

### 5.8 Cuantificación de azadiractina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

- *Material de campo e in vitro*

Como es de esperar, la concentración de azadiractina en las muestras de campo fue mayor que en el material *in vitro*. Las muestras de semilla, presentaron los valores de 18,4 mg/g seco (es decir, 18 400ppm).

Foerster y Moser (2000), reportaron un contenido de 5,20 mg/g de azadiractina en semillas de neem procedentes de Tailandia. En este mismo país, Sombatsiri *et al.* (1995), encontraron amplias diferencias en cuanto a la cantidad de azadiractina en semillas colectadas en diferentes provincias con valores de 1,40 a 5,30 mg/g.

En Ghana y Kenia se han reportado valores de 6,2 a 6,9 y 6.8 a 8.8 mg de aza/g seco de semilla, respectivamente. Ensayos realizados por Esparza *et al.* (2010) reportaron que la semilla contenía con endocarpio presentó una concentración promedio de 1 820 ppm de AZA.

Una de las regiones conocidas por tener los mejores rendimientos en cuanto a producción de azadiractina en semillas de neem, es la India. El contenido de azadiractina en semillas colectadas desde 1999 hasta 2001 en diferentes estados de ese país, revelaron grandes variaciones en las concentraciones que, por lo general, oscilaban entre los 200 y los 16.000 ppm. El promedio de contenido de azadiractina reportado fue de 3043 ppm en la semilla, y sólo alrededor de 27 de las 1.500 muestras colectadas reportaron más de 10.000 ppm de contenido de este compuesto (muy por encima del promedio nacional), de las cuales la mayoría provenían de la meseta de Decán (Kaushik, 2007).

La variación tan grande en las concentraciones de azadiractina en semillas provenientes de diferentes sitios de colecta puede deberse a las condiciones ambientales, genotípicas y el efecto de la interacción entre ambas (Kaushik, 2007).

Cabe destacar, que la meseta del Decán, se extiende por la mayor parte del territorio centro-sur del subcontinente indio y tiene una altitud que oscila entre los 79 y 750 msnm, sin embargo en su mayoría es de 450-750 msnm. El clima es variado, comprende una zona de clima tropical húmedo, en el borde de la meseta, mientras que en el interior el clima es semiárido. La temperatura puede alcanzar los 40°C en verano, por lo cual la vegetación es poco exuberante, predomina una vegetación subtropical seca, de tipo sabana así como especies maderables de gran valor.

Estas características no difieren mucho con las condiciones de la región de Guanacaste, específicamente de Bagaces, donde fueron colectadas las semillas que se emplearon en la presente investigación.

Las hojas colectadas en campo, tuvieron una concentración de azadiractina de 8,8 mg/g, lo cual coincide en lo reportado en la literatura donde se indica que las hojas contienen menor cantidad de azadiractina que la semilla, mientras que no fue detectado este metabolito en la raíz *in vitro* (Orozco y Rodríguez, 2007; Ospina, 2012).

- *Cultivos celulares en matraz*

La producción de azadiractina muestra proporcionalidad con el aumento de la biomasa de *A. indica* cultivada en suspensión celular a nivel de matraz, lo cual coincide con trabajos anteriores realizados por Bedoya y Hoyos (2010); por lo cual se puede decir que la azadiractina es un metabolito secundario asociado al crecimiento.

Este tipo de metabolitos, se acumulan de forman intracelular de manera proporcional a la producción de biomasa, incrementando su concentración en la fase exponencial de la cinética de crecimiento. Este comportamiento se ha observado en líneas celulares, para la producción de betalainas, carotenoides y azadiractina (Arias, 2009).

En esta investigación se encontró que la concentración de azadiractina aumentó en la fase exponencial del cultivo, alcanzando el punto máximo de producción (15,58 mg/g) al día 18, lo cual coincide con el valor máximo de volumen celular sedimentado.

Para comparar los datos con investigaciones previas, se calculó la cantidad de azadiractina producida por litro de cultivo, obteniéndose un valor máximo de 167,85mg/L.

Capataz *et al*, (2007) encontraron que las suspensiones celulares de *A. indica* tenía un contenido promedio de azadiractina de 4,25 mg/L en condiciones de oscuridad (Capataz *et al.*, 2007).

De acuerdo con lo citado por Salazar (2012), en ensayos efectuados por Raval y colaboradores (2003) se realizaron dos etapas de cultivo, una para el crecimiento celular y otra para la producción de limonoides, y obtuvieron una producción máxima de 4,5mg/L de Aza.

Por otra parte, Prakash y Srivaskava (2005) lograron rendimientos de 45mg/L de Aza optimizando la concentración de glucosa, nitrógeno y fosfato y éstos mismos autores, en el año 2008, determinaron que el ácido jasmónico y el ácido salicílico por separado eran capaces de estimular la producción de azadiractina en cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica*.

Como se observa, en esta investigación, se presentó una concentración importante de azadiractina en suspensiones celulares, sin elicitar, por lo cual, la elicitación representa una alternativa adicional para aumentar la producción de este compuesto en las suspensiones celulares (Ospina 2012).

Algunos valores de producción de los compuestos reportados en suspensiones celulares a nivel de matraz se observan en el cuadro 20.

**Cuadro 20.** Producción de azadiractina en suspensiones celulares de *A. indica* a nivel de matraz, empleando diferentes variables

Variable	Biomasa (g/L)	Aza (mg/L)	Referencia
<b>Agente permeabilizante</b>	-	10	Kuruvilla <i>et al.</i> , 1999
<b>Precursor: Acetato de Sodio</b>	-	64,94	
<b>Precursor: Esqualeno</b>	-	72,81	Balaji <i>et al.</i> , 2003
<b>Precursor: Isopentenil pirofosfato</b>	-	51,63	
<b>Medio optimizado</b>	15,02	45	Prakash y Srivastava. 2005
<b>Oscuridad 15°C</b>	20,2	27,4	Capataz, 2005
<b>Luz 35°C</b>	24,6	4,4	
<b>Oscuridad 100rpm</b>	10,71	167,85	CENIBiot, 2016

Datos marcados con rojo representan los resultados obtenidos en esta investigación. **Fuente:** Modificado de Orozco y Monroy, 2007.

Los resultados obtenidos mostraron concentraciones muy superiores a las reportadas en la literatura. Esto puede deberse al material genético que se trabajó, el cual fue colectado en Bagaces, Costa Rica, así como a variantes en el medio de cultivo. No existen reportes en la literatura de suspensiones celulares de *A. indica* crecidas con el regulador de crecimiento TDZ ni enriquecido con caseína hidrolizada.

- *Cultivos celulares en biorreactor*

La producción de azadiractina en biorreactor, mostró proporcionalidad con respecto al crecimiento en biomasa. En la fase estacionaria, se presentaron cantidades muy bajas de este compuesto (0,42mg/g en el día 3). Estos valores aumentan y al final de la cinética llega a producirse 3,61 mg/g de azadiractina.

Al comparar la cantidad de azadiractina por litro de cultivo, tomando en cuenta la biomasa producida por el sistema biorreactor tipo tanque agitado, se obtuvo una cantidad máxima del compuesto de 42,13 mg/L de aza al día 18, donde ya se empieza a notar un decrecimiento en la biomasa. Este valor es comparable con el obtenido por Prakash y Srivastava (2006) quienes emplearon el sistema de lote con agitación de 125 rpm y un pH de 5,8, temperatura de 27°C y una aireación de entre los 0,2 y 0,4 vvm, para regular el oxígeno disuelto a 30%. En el cuadro 21 se presenta la comparación con los resultados obtenidos por otros autores, al cultivar células en suspensión de *A. indica* para la obtención de azadiractina en biorreactores bajo diferentes condiciones.

**Cuadro 21.** Producción de azadiractina en suspensiones celulares de *A. indica* a nivel de matraz, empleando diferentes variables

Variable	Biomasa (g/L)	Aza (mg/L)	Referencia
<b>Columna de burbujeo 2-4L</b>	17,8	81,3	Prakash y Srivastava. 2005
<b>Tanque agitado 3L</b>	15,5	50	
<b>Lote</b>	15,52	45	Prakash y Srivastava. 2006
<b>Lote alimentado</b>	20,06	82	
<b>Impulsor Setric</b>	15,0	45	Prakash y Srivastava. 2006
<b>Impulsor Centrífugo</b>	18,7	71	
<b>Tanque agitado 120rpm y 0,3vvm</b>	11,99	6,47	
<b>Tanque agitado 120 rpm y 0,1vvm</b>	12,80	6,71	
<b>Tanque agitado 180 rpm y 0,3vvm</b>	9,14	4,31	Bedoya y Hoyos, 2010
<b>Tanque agitado 240 rpm y 0,3 vvm</b>	5,22	0,83	
<b>Tanque agitado, Lote, propela marina. 100 rpm, 0,3vvm</b>	12,71	42,13	CENIBiot, 2016

Datos marcados con rojo representan los resultados obtenidos en esta investigación. **Fuente:** Modificado de Orozco y Monroy, 2007.

Con respecto a los resultados obtenidos, se observó que el cultivo celular en biorreactor, presentó una menor concentración de azadiractina comparado con las suspensiones celulares. Esto puede estar relacionado con el estrés hidrodinámico, el cual puede afectar la producción de este compuesto ya que, de acuerdo con los datos obtenidos por Bedoya y Hoyos (2010), un aumento en la velocidad de agitación influye negativamente en la producción de azadiractina en biorreactores.

Por otra parte, se ha propuesto que la formación de agregados se relaciona con la organización y cierto grado de especialización de las células, lo cual puede favorecer la producción de metabolitos secundarios, aunque en algunas ocasiones se ha determinado que la producción de estos compuestos es independiente del tamaño de los agregados (Gupta e Ibaraki, 2006).



En este ensayo, se pudo visualizar tamaños de agregados mayores en suspensiones celulares que en biorreactor, por lo cual se considera este factor como una posible variable a considerar posteriormente.

## VII. CONCLUSIONES

La adición de caseína hidrolizada al medio de subcultivo de callo no tuvo influencia significativa en el peso seco y peso fresco de los mismos.

Es posible obtener un 100% de desinfección de semilla procedente de campo mediante el uso de desinfectantes de bajo costo, fácil acceso y bajo impacto ambiental, tales como peróxido de hidrógeno, etanol e hipoclorito de sodio.

Se determinó que la extracción de limonoides empleando como solvente el metanol y el método de agitación con temperatura (50°C) es la más efectiva de los métodos probados.

Se considera más efectivo el uso de un medio M&S (1962) sin suplementos hormonales para la multiplicación de plantas *in vitro* de *A. indica*, debido a que el uso de reguladores de crecimiento en las concentraciones empleadas, mostró formación de callo en los sitios de corte que afectaron el desarrollo de las plántulas.

El enriquecimiento del medio de cultivo con 100mg/L de caseína hidrolizada favorece significativamente la producción de biomasa a nivel de matraz.

Las semillas de campo analizadas presentaron mayor concentración de azadiractina que los reportados en la literatura.

A nivel de matraz se alcanzó una biomasa seca máxima de 10,72g/L así como una producción de azadiractina de 167,85mg/L. Esta concentración del compuesto es superior a los obtenidos por otros autores en investigaciones previas.

La concentración de 42,13mg/L de azadiractina mediante el cultivo de células en bioreactor tipo tanque agitado coincide con los valores obtenidos en investigaciones previas.

## VIII. RECOMENDACIONES

Dados los altos porcentajes de desinfección de los frutos para la introducción *in vitro* de semillas, se recomienda optimizar el protocolo para reducir el impacto ambiental que ocasiona. Podría evaluarse la reducción o eliminación de agroquímicos en el proceso.

Se recomienda repetir la cuantificación de azadiractina en las muestras de semilla para corroborar la alta concentración de este compuesto en las mismas.

Analizar los isómeros de Aza presentes en las muestras para caracterizar en detalle estos limonoides y predecir con mayor exactitud sus usos potenciales, según los reportes en la literatura.

Al ser la azadiractina un metabolito asociado al crecimiento celular, se recomienda realizar nuevos ensayos a nivel de biorreactor para aumentar la producción de biomasa. Estos nuevos ensayos pueden incluir la optimización de las condiciones así como la implementación del sistema de lote alimentado (*fed batch*).

Se recomienda realizar pruebas de elicitación a nivel de matraz y biorreactor para aumentar la producción de azadiractina en los mismos, por medio de elicitors químicos o físicos.

Realizar bioensayos para evaluar el efecto de los extractos de azadiractina provenientes de campo y de material *in vitro*, sobre insectos plaga.

## IX. LITERATURA CITADA

- AgroPro. 2011. Catálogo de Productos. En línea. Consultado 30 de noviembre, 2015. Disponible en: <<http://www.agroproca.com/productos/?producto=8>>
- Aguilar, E. 2011. Determinación del estado sanitario de las plantas, suelo e instalaciones y elección de métodos de control. Editorial Innovación y Cualificación. Málaga. España 1 Ed. 206pp.
- Alarcón, R. 2011. La biopiratería de los recursos de la medicina indígena tradicional en el Estado de Chiapas, México –El caso ICBG-Maya. Revista Pueblos y Fronteras Digital. 6(10): 151-180
- Alvarado, Y., Cruz, M., Portal, N., García, L., Freire, M., Quiala, E., Gómez, R. 2003. Estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar. Biotecnología vegetal. 3(2):77-82.
- Alvarenga, S., Alán, E., Peraza, J., 2002. Estudio de la biología, la propagación vegetativa y el cultivo *in vitro* de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). Fundación Neotrópica-ITCR, Cartago, Costa Rica, pp. 89.
- Alvarenga, S., Salazar, T., Rivera, W., Rosales, C. 2014. Cultivo *in vitro* de células de *Azadirachta indica* con miras al escalamiento para uso medicinal y ensayos preliminares para la producción de un bioinsecticida. Informe de investigación. Vicerrectoría de Investigación y extensión, ITCR, Cartago, Costa Rica. 136pp.
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinarés, I., Llor, N.m Muñoz, D., Nicolás, E., Pérez, M., Pujol, M-, Rosell, G., Seco, M., Velasco, D. 2014. Operaciones básicas en el laboratorio de química: Extracción. En línea. Disponible en: <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio.html> Consultado 23 de mayo, 2016.
- Arellano, Y., García, E., Vázquez, J. 2008. Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. Agrociencia. 42(6):637-644
- Arias, M.; Aguirre, A.; Angarita, M.; Montoya, C.; Restrepo, J. 2009. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. Dyna. 76 (157): 109-121.
- Arias, JP. 2013. Optimización del parámetros de cultivo en suspensión de células de la especie vegetal *Thevetia peruviana* y su efecto en la producción de metabolitos secundarios Tesis de Grado presentada para optar al Título de Magíster en Ciencias – Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Medellín Colombia.
- ASTRE (Agencia para Sustancia Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Atlanta). 2004. Peróxido de hidrogeno. En línea. Consultado 15 de marzo, 2016. Disponible en [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts174.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts174.html)
- Ávalos, A., Pérez, E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal, pp. 27.
- Avalos, J. 2014. Actividad citotóxica y estudio fitoquímico de los extractos de semilla y hoja de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) de origen regional (Ébano, San Luis Potosí) comparada con la comercializada en la India. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Tesis presentada para optar por el grado de Doctor en Ciencias con acentuación en química de productos naturales. 68p.
- Bedoya, J., Hoyos, R. 2010. Efecto de la Relación Agitación-Aireación sobre el Crecimiento Celular y la Producción de azadiractina en Cultivos Celulares de *Azadirachta indica* A. Juss. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 63(1):5293-5305.
- Balaji, K., Veeresham, C., Srisilam, K., Kokate, C., 2003. Azadirachtin, a novel biopesticide from cell cultures of *Azadirachta indica*. Journal of Plant Biotechnology pp. 9.
- Bassetti, L., Hagendoorn, M., Tramper, J. 1995. Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Journal of Biotechnology. 39(2):149-155.
- Beherend, J., Mateles, R. 1975. Nitrogen Metabolism in Plant Cell Suspension Cultures. Plant Physiol. (1975) 56, 584-589
- Bin, M., 2011. A Neem Presentation: Distribution. (En línea). Consultado: 11 de marzo, 2016. Disponible en: < <https://neemtree.wordpress.com/3-distribution/>>.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R., Bandyopadhyay, U. 2002. Biological activities and medical properties of neem (*Azadirachta indica*). Current Science. 82(11):1336–1346.
- Biswas, B., Gupta, S. 2007. Micropropagation of elite neem tree (*A. indica* A. juss.). Chapter 32. S.M. Jain and H. Häggman (eds.), © Springer. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. pp:345–359.
- Borges, M., Destrade, R., Meneses, S., Gómez, R., Malaurie, B., Hamon, P., Demenorval, LC. 2012. Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. Revista Colombiana de Biotecnología. 13(2): 221-228
- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., Meneses, S. 2009. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Rev. Colomb. Biotecnol. 11(2):127-135
- Caballero, C., 2004. Efectos de terpenoides naturales y hemisintéticos sobre *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleóptera: Chrysomelidae) y *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidótera: Noctuidae) Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, pp. 119.
- Capataz, J., Orozco, F., Vergara, R., Hoyos, R., 2007 Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith en condiciones de laboratorio Revista Facultad Nacional de Agronomía, pp. 13.
- Chawla, H.S. 2009. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers CRC Press; 3 ed. Enfield, Estados Unidos. 698pp
- Croteau, R., Kutchan, T., Lewis, N. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites) IN: Biochemistry & Molecular Biology of plants. Eds. B Buchanan; W Gruissem; R Jones. 1250-1318pp.
- Cruz, FM., del Ángel, S. 2004. El Árbol de Nim, Establecimiento y Aprovechamiento en la Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. Folleto Técnico. Número 3. San Luis Potosí, México. 23p.

- David, E., Jarvis, A., Jonesa, G. 2000. Ratio of products formed on photo-oxidation of the neem triterpenoids nimbin and salannin. *Arkivok*. 1(3):312-319
- Delgado, E. 2011. Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua*. Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 71pp.
- Duarte, O., Velho, L. 2008. Análisis del marco legal en Colombia para la implementación de prácticas de Bioprospección. *Acta biol. Colomb.* 13(2): 103 – 122.
- Dublín, D., Roque, E., 2012. Eficacia del extracto de las hojas del Neem *Azadirachta indica* A. Juss en el control de nemátodosgastrointestinales en ovino Pelibuey. *Rev. electrón. vet.*, <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070712/071210.pdf>, pp. 16.
- Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R., Catapano, G., Czermak, P. 2009. *Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice*. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag. 363p
- Esparza, G., López, J., Villanueva, J., Osorio, F., Otero, G., Camacho, E., 2010. Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. JUSS. . *Agrociencia*, pp. 13.
- Fernández, D., González, C., 2008. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica del extracto foliar del árbol *Azadirachta indica* contra algunos hongos fitopatógenos. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, pp. 111.
- Fierros, G., Peña, R., Mellado, M., Beltrán, E. 2010. Crecimiento de las células de *Nicotiana tabacum* NT-1 en suspensión activado por insulina. *Revista Biológicas.* 12(2):82–89
- Flores, A., Álvarez, J., Rodríguez, JL., Corona, A. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana.* 10(2):27-33
- Gai, M., Álvarez, C., Venegas, R., Morales, J. 2011. An HPLC Method for Determination of Azadirachtin Residues in Bovine Muscle. *Journal of Chromatographic Science.* 49:327-331
- George, E., 2008. *Plant Tissue Culture Procedure*. In: George, E., Hall, M., De Kerk, G., Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Netherlands, pp. 29.
- Girish, K., Shankara, B. 2008. Neem tree- a green treasure. *Electronic Journal of Biology.* 4(3):102-111.
- Gómez-Torres, L., Moreno-Gómez, B., Velásquez-Lozano, M., Aguirre-Mancilla, C., Aguado-Santacruz, G. 2014. Cultivos Fotoautotróficos de células vegetales en suspensión: Establecimiento y perspectivas de aplicación. *Rev. Fitotec. Mex.* 37(2): 165-179.
- Gualtieri, M., Villalta, C., Guillén, A.M., Lapenna, E., Andara, E., 2004. Determinación de la actividad antimicrobiana de los Extractos de la *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*
- Günter, E y Ovodov, Y. 2005. Effect of calcium, phosphate and nitrogen on cell growth and biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell culture. *Journal of Biotechnology* 117:385-393
- Guo, B.; Haider, B.; Zeb, A.; Xu, L.; Wei, Y. 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology* 10(45):8984-9000. ISSN 1684–5315

- Gupta, S., Ibaraki, Y. 2006. Plant Cell Tissue Culture Engineering. Springer. Vol.6. Dordrecht. Netherlands. 480pp.
- Harper, A. 2011. The Benefits of Hydrogen Peroxide and its Many Uses. En Línea. Consultado: 3 de mayo, 2016. Disponible en: <<https://docakilah.wordpress.com/2011/12/09/the-benefits-of-hydrogen-peroxide-and-its-many-uses/>>
- Hernández, R. 2007. Relaciones hídricas en las plantas. En línea. Consultado 11 de marzo, 2016. Disponible en <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/relahid/>
- Hernández, M. 2008. Propuesta de apoyo para una gestión eficiente de la biotecnología. Revista REAN. No 62
- Hernández, F. 2009. Análisis de ácido lipóico en diabetes mellitus II por HPLC. Tesis para optar por el grado de licenciado como químico-biólogo con especialidad en análisis químicos. Universidad de Sonora. Sonora. México.
- Hernández, Y., González, M. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales. 31(4):58-69.
- Hvoslef, A., y Preil, W. 2005. Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer. Holanda. 588p.
- Isea, G., Rodríguez, I., Hernández, A., 2013. Actividad garrapaticida de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim). Revista Cubana de Plantas Medicinales, pp. 14.
- Jan, A., Yang, G., Nakamura, H., Ichikawa, H., Kitano, H., Matsuoka, M., Matsumoto, H., Komatsu, S. 2004. Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. Plant Physiology 136: 3670-3681.
- Jurado, S. 2010. Estudio de la proteína *F-box* SKP2A de *Arabidopsis thaliana* en la división celular y en la respuesta a auxina. Tesis Dr. Biol. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. 131p
- Kaushik, N., Singh, B., Tomar, U., Naik, N., Vir, S., Bisla, S., Sharma, K., Banerjee, S., Thakkar, P. 2007. Regional and habitat variability in azadirachtin content of Indian neem (*Azadirachta indica* A. Jusieu). Current Science, 92(10):1400-1406
- Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research 3:1222-1239
- Kearney, M., 1994. Antifeedant effects of *in vitro* culture extracts of neem tree, *Azadirachta indica* against the desert locust (*Schistocerca gregaria* Fosskal). Plant Cell, Tissue and Organ Culture., pp. 5.
- Khillare, B., Shrivastav, T., 2003. Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract., Contraception, pp. 5.
- Kupiec, T. 2004. Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. International Journal of Pharmaceutical Compounding. 8(3): 223-227
- Ledesma, C., Ledesma, W., 2012. Evaluación agronómica de plántulas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), en vivero utilizando cuatro tipos de sustratos y tres dosis de root most en el cantón Echeandia, provincia Bolívar. Escuela de Ingeniería Agroforestal. Universidad

- Leleu, O., Vuylsteker, C. 2004. Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. *Journal of Experimental Botany* 55:815-823.
- Makunga, NP., van Staden, J. 2008. An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92:63-72
- Mbuga, J. 2005. Evaluación del efecto de extractos vegetales de especies del Trópico Húmedo sobre la vaquita (*Diabrotica balteata*). Tesis Ing. Agr. Guácimo. Costa Rica. EARTH. 63p.
- Martínez, R. 2009. Comparación de dos impulsores en un biorreactor para el cultivo de células de *Beta vulgaris* L. y su producción de betalaínas y proteínas arabinogalactanos. Tesis para optar por el grado de Maestría en Ciencias de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec. Morelos. México.
- Mateos P. 2004. Control de las poblaciones microbianas esterilización y desinfección. Departamento de microbiología y Genética, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca. En línea. Consultado 14 de mayo, 2016. Disponible en <<http://www.lenntech.com/español/FAQ-microbiología-del-agua.htm>>
- Melwita, E., Tsigie, YA., Ismadji, S., Ju, YH. 2011. Purification of azadirachtin via silica gel column chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 34(9):.2462-2472
- Moreira, M. 2015. Producción de antraquinonas a partir de cultivos celulares de *Morinda citrifolia* (noni). Informe de Trabajo final de graduación. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. Costa Rica.
- Morgan, E. 2009. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 4096-4105.
- Muñoz, W., Vanegas, O., Guzmán, A., Capataz, J., Hoyos, R., Orozco, F. 2006 Estimación de variables de operación de un biorreactor con células de *Azadirachta indica* A. Juss. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 59(2):3467-3478.
- Murashige, T. and Skoog, G. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Nagata T, Hasezawa S, Inzé D. 2004. When I encountered tobacco BY-2 cells!. Tobacco BY-2 cells. In Nagata T, Lörz H, Widholm JM (eds.), *Biotechnology in agriculture forestry*, Vol 53, pp. 1-5. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag.
- Navas, L. 2009. Evaluación de resinas comerciales de intercambio iónico para la remoción de ácidos nafténicos. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero químico. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia.
- Orozco, F., Rodríguez, M., 2007. Cultivo de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, México D.F., pp. 8.
- Ospina, D. 2012. Actividad antifúngica del extracto crudo de *Azadirachta indica* A. JUSS. De suspensión de células sobre hongos dermatofitos causantes de enfermedades patógenas al hombre. Tesis presentada como requisito para optar al título de: Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.



- Ozuna, E., 2000. Producción de plantas, establecimiento y manejo de plantaciones de Neem (*Azadirachta indica* Juss). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, pp. 29.
- Pal, A., 2007. Production of Insecticides In: Ramawat, K., Merillon, J., Eds.), Biotechnology Secondary Metabolites: Plants and Microbes. Science Publishers, Enfield, U.S.A, pp. 393.
- Parker Neem. 2013. Productos. En línea. Consultado: 30 de noviembre, 2015. Disponible en < <http://www.organicneem.com/products.html>>
- Parmar, B., Balraj, Varshney, M., Shah, D. 2004. Neem oil microemulsion without cosurfactants or alcohols and a process to form the same. United States Patent 6,703,034.
- Parrotta, J., Chaturvedi, A., 2011. *Azadirachta indica* A. Juss. Neem, margosa. Meliaceae. Mahogany family. USDA Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, pp. 8.
- Pavón, L., 2010. Actividad biológica de células de *Azadirachta indica* A. JUSS producidas *in vitro* contra *Copitarsia decolora* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). Centro de desarrollo de productos bióticos. Instituto Politécnico Nacional, pp. 58.
- Pérez, A., Trujillo, I., Vidal M., De Lima, N. 2006. Propagación *in vitro* de *Stylosanthes Capitata* Vogel: una especie de gran potencial forrajero. Acta Bot. Venez. 29(2):335-346
- Pérez, N., Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. Biotecnología Vegetal. 11(4):195-211.
- Pernisova, M.; Klima, P.; Horák, J.; Válková, M.; Malbeck, J.; Soucek, P.; Reichman, P.; Hoyerová, K.; Dubová, J.; Frimi, J.; Zazímalova, E. y Hejatko, J. 2009. Cytokinins modulated auxin induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. PINAS 106(9):3609-3614.
- Prakash, G.; Srivastava, A. 2005. Modeling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. Biochemical Engineering Journal 29(1-2):62-68.
- Puche, A., Rodríguez, P. 2000. Curso-Taller cultivo de tejidos vegetales. Disponible en: <<http://biotecnologia-itca.blogspot.com/2012/02/2-1-4-componentes-del-medio-de-cultivo.html>>
- Quraishi, A., Koche, V., Sharma P., Mishra, S. 2004. *In vitro* clonal propagation of neem (*Azadirachta indica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 281–284.
- Ramos, J.E. 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Informe de especialización en biotecnología agraria. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá. Colombia.
- Rao, K. 2005. Neem tree- A profile. En línea. Disponible en < <http://max pages.com/neem/articles/neem tree profile>> Consultado: 10 setiembre, 2014.
- Raval, K.; Hellwig, G.; Prakash, A.; Ramos, A.; Srivastavaand, J. 2003. Necessity of a two-stage process for the production of azadirachtin-related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. Journal of Bioscience and Bioengineering 96(1):16-22.

- Reyes, E., Valero, S., Garay, D., 2003. Estudio preliminar de las propiedades físicas de la especie *Azadirachta indica* (Neem), procedente del estado Falcón (Venezuela) Revista Forest. Venez., pp. 7.
- Rodrigues, M., Festucci-Buselli, R., Campos, L., Campos, W., 2014. Azadirachtin biosynthesis induction in *Azadirachta indica* A. Juss Cotyledonary Calli with Elicitor Agents. Braz. Arch. Biol. Technol. 57(2): 155-162.
- Rodríguez, J., Sanabria, M., Rodríguez D., Rangel, M. 2007. Determinación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Lippia origanoides*. XVII Con. Ven. Bot. 705-708.
- Rojas, M. 2010. La broca del café en Costa Rica. 10 años de manejo integrado. Revista Informativa. ICAFE. II-2010. pp3.
- Rosseti, M., Defago, M., Carpinella, M., Palacios, S., Valladares, G. 2008. Actividad biológica de *Melia Azedarach* sobre larvas de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 67 (1-2): 115-125.
- Saad, A., Elshahed, A. 2012. Plant Tissue Culture Media. Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. Ed. Annarita Leva. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media>
- Salazar, T., 2012. Establecimiento de cultivos organogénicos y callogénicos de *Azadirachta indica* A. JUSS. Tesis para optar por el grado de licenciada en Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, pp. 101.
- Sánchez, L., Alvarenga, S. 2015. Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). Tecnología en Marcha. 28(1): 105-120.
- Sankar, V., Narasimhan, S., Nairm G. 2006. Bioproduction of azadirachtin-A, nimbin and salannin in callus and cell suspension cultures of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Current Science. 91(1):22-24.
- Schuster, J. 2016. Clorosis. En línea. Consultado el 2 de junio, 2016. Disponible en [http://extension.illinois.edu/focus\\_sp/chlorosis.cfm](http://extension.illinois.edu/focus_sp/chlorosis.cfm)
- Schwalbach, L., Greyling, J., David, M., 2003. The efficacy of a 10% aqueous Neem (*Azadirachta indica*) seed extract for tick control in Small East African and Toggenburg female goat kids in Tanzania. South African Journal of Animal Science, pp. 6.
- Singh, M., Chaturvedi, R. 2012. Statistical optimization of media for enhanced azadirachtin production from redifferentiated zygotic embryo cultures of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant.48:92–98.
- Sotelo, F. 2007. Caracterización morfológica y fractal de cultivos en suspensión de células de betabel (*Beta vulgaris* L. var. "Crosby Egyptian") permeabilizadas con glicerol. Tesis presentada para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Desarrollo de Productos Bioticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec. Morelos. México.
- Srivastava, P., Singh, M., Mathur, P., Chaturvedi, R., 2009. *In vitro* organogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary cultures of *Azadirachta indica* Biologia Plantarum, pp. 5.

- Steris. 2016. SporKlenz. En línea. Consultado 3 de marzo, 2016. Disponible en: <http://www.sterislifesciences.com/Products/Surface-Disinfectants-Cleaners-and-Alcohols/Sporicides-Sterilant/Spor-Klenz-Ready-To-Use-Cold-Sterilant.aspx>
- Su, W. 2006. Biorreactor engineering for recombinant protein production using plant cell suspension culture. EN: Plant Tissue Culture Engineering. Eds. SD Gupta; Y Ibaraki. Netherlands. Springer. 6: 135-159.
- Sujanya, S., Poornasri, B., Sai, I. 2008. *In vitro* production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. *J. Biosci.* 33(1):113–120.
- Swiss Just. 2015. En línea. Consultado: 30 de noviembre, 2015. Disponible en < <http://www.swissjustamerica.com/mx/es/>>
- Taiz, L., Lincoln, L., Geiger, E. 2006. Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology*. 4 Ed. Sinauer Associates. 764 pp.
- Taticek., R., Moo-Young, M., Legge, R., 1991. The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24:139-158
- Tewari, D. 1992. Monograph on neem. Dehra Dun, India: International Book Distributors 236 p. Disponible en: < <http://www.fs.fed.us/global/iitf/Azadirachtaindica.pdf>>. Consultado: 12 octubre, 2014.
- Thejavathi, R., Shirish R. Yakkundi, S., Ravindranath, B. 1995. Determination of azadirachtin by reversed-phase highperformance liquid chromatography using anisole as internal standard. *Journal of Chromatography*. 705: 374-379
- Thomas, SG., Sun TP. 2004. Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol.* 135: 668–676.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G-J., Roberts, A., George, E. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects and Support Sysms. En: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Editado por: George, E., Hall, M., De Klerk, G. 3ra. Edición. Wageningen. Holanda. Springer. pp:115-173.
- Valares, C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis Doctorado en Ciencias. Badajoz, España. Universidad de Extremadura. 216p
- Vanisree, M., Lee, C., Lo, S., Nalawade, SM., Lin, CY., Tsay, HS. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica* 45:1-22
- Verporte, R., Van der Heijden, R., Hoopen, H., Memelink, J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters* 21: 467–479
- Wewetzer, A. 1998. Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of azadirachtin. *Phytoparasitica* 26(1):47-52.
- Zapata, N., Budía, F., Viñuela, E., Medina, P. 2009. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Industrial Crops and Products* 30: 119-125.

- Zeiger, E., Taiz, L. 2006. Fisiología Vegetal. 3ed. Massachusetts. United States. Universitat Jaume. 2v, 1336p
- Zhong, J., Pan, Z., Wang, Z., Wu, J., Chen, F., Takagi, M., Yoshida, T. 2002. Effect of mixing time on taxoid production using suspension cultures of *Taxus chinensis* in a centrifugal impeller bioreactor. Journal of Bioscience and Bioengineering 94(3): 244-250.
- Zhurbenko, R., Rodríguez, C., Díaz, M., Durán, A., López, O., Viera, D., 2006. Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. Rev Cubana Med Trop.58(2):109-118

## ANEXOS

### Anexo 1. Composición del medio de cultivo M&S (1962)

Compuesto	Concentración (mg/L)
<b>Macronutrientes</b>	
$(\text{NH}_4)_2 \text{NO}_3$	1650
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
<b>Micronutrientes</b>	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
KI	0,83
<b>Vitaminas</b>	
Myo-Inositol	100
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Tiamina HCl	0,1
Glicina	2,0

## Anexo 2. Supuestos estadístico de las variables del tratamiento de multiplicación

### *Número de Brotes*

Datos	Prueba de Normalidad Valor de p		Homocedasticidad Valor de p	
	Ryan Joiner	Anderson Darling	Comparaciones Múltiples	Levene
Número de Brotes	<0,010	<0,005	0,028	0,091
Residuos de número de brotes	<0,010	<0,005	-	-
Datos Transformados con Raíz Cuadrada	<0,010	<0,005	0,818	0,887
Residuos de datos transformados	<0,010	<0,005	-	-

### *Longitud*

Datos	Kolmogorov Smirnof	Prueba de Normalidad Valor de p		Homocedasticidad Valor de p	
		Ryan Joiner	Anderson Darling	Comparaciones Múltiples	Levene
Longitud	<0,010	<0,010	<0,005	0,014	0,004
Residuos de longitud	<0,010	<0,010	<0,005	-	-
Datos Transformados con Johnson	>0,150	>0,100	0,335	0,732	0,656
Residuos de datos transformados con Johnson	>0,150	>0,100	0,221	-	-
Datos Transformados con Box Cox	>0,150	>0,100	0,314	0,777	0,694
Residuos de datos transformados con Box Cox	>0,150	>0,100	>0,100	-	-

*Número de nudos*

Datos	Prueba de Normalidad Valor de p		Homocedasticidad Valor de p	
	Ryan Joiner	Anderson Darling	Comparaciones Múltiples	Levene
Número de nudos	<0,010	<0,005	0,000	0,000
Residuos de número de nudos	<0,010	<0,005	-	-
Datos Transformados con Raíz Cuadrada	>0,100	<0,005	0,119	0,065
Residuos de datos transformados	0,045	0,989	-	-

*Peso Fresco*

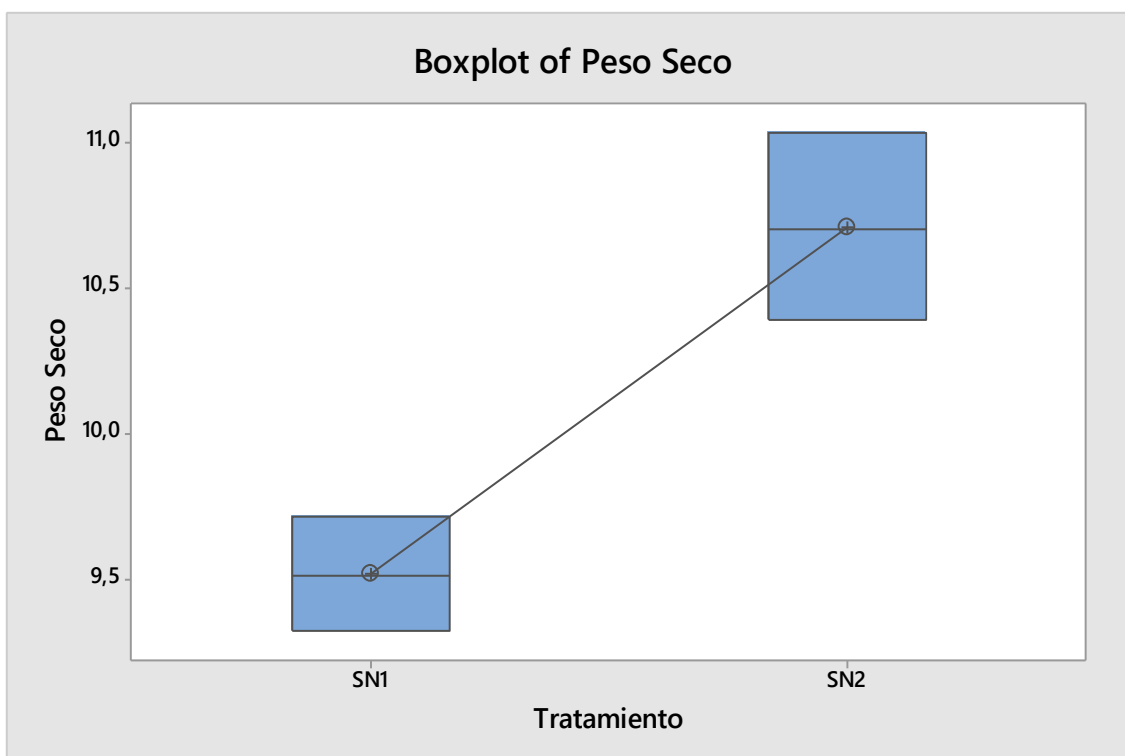
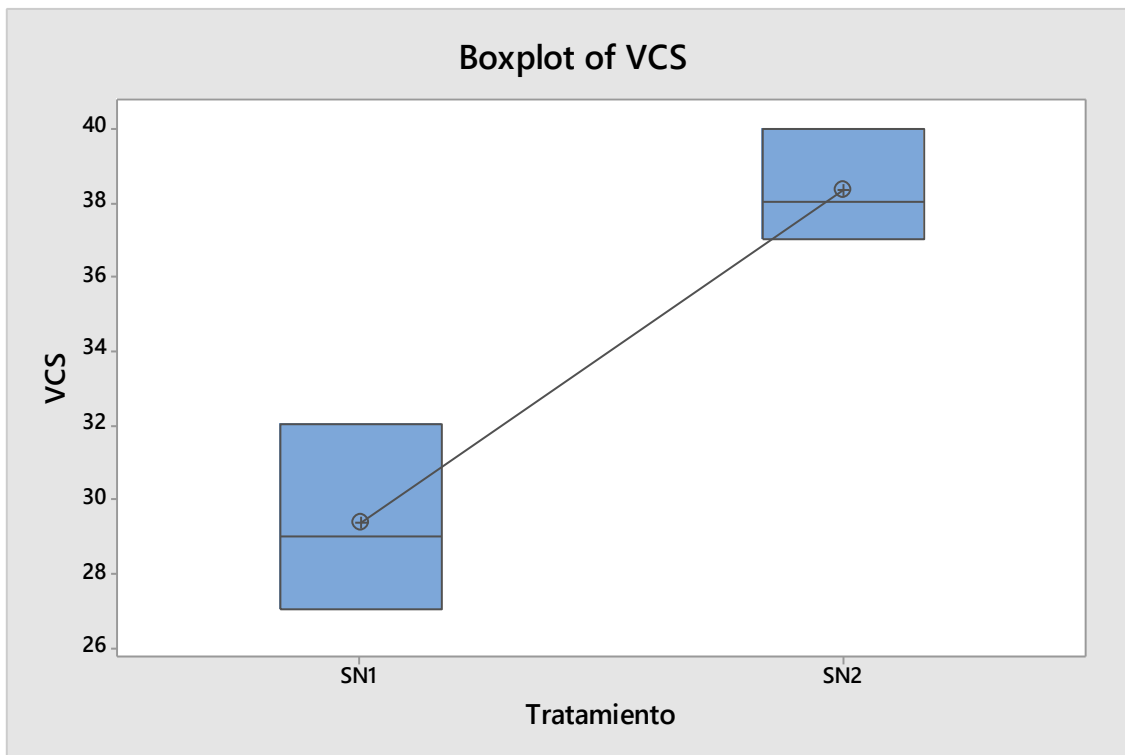
Datos	Kolmogorov Smirnof	Prueba de Normalidad Valor de p		Homocedasticidad Valor de p	
		Ryan Joiner	Anderson Darling	Comparaciones Múltiples	Levene
Peso Fresco	<0,010	0,921	<0,005	0,014	0,000
Residuos de Peso Fresco	<0,010	<0,010	<0,005	-	-
Datos Transformados con Johnson	>0,150	>0,100	0,673	0,128	0,078
Residuos de datos transformados con Johnson	>0,150	>0,100	0,576	-	-
Datos Transformados con Box Cox	0,074	>0,100	0,092	0,183	0,146
Residuos de datos transformados con Box Cox	>0,150	>0,100	>0,100	-	-

Peso Seco

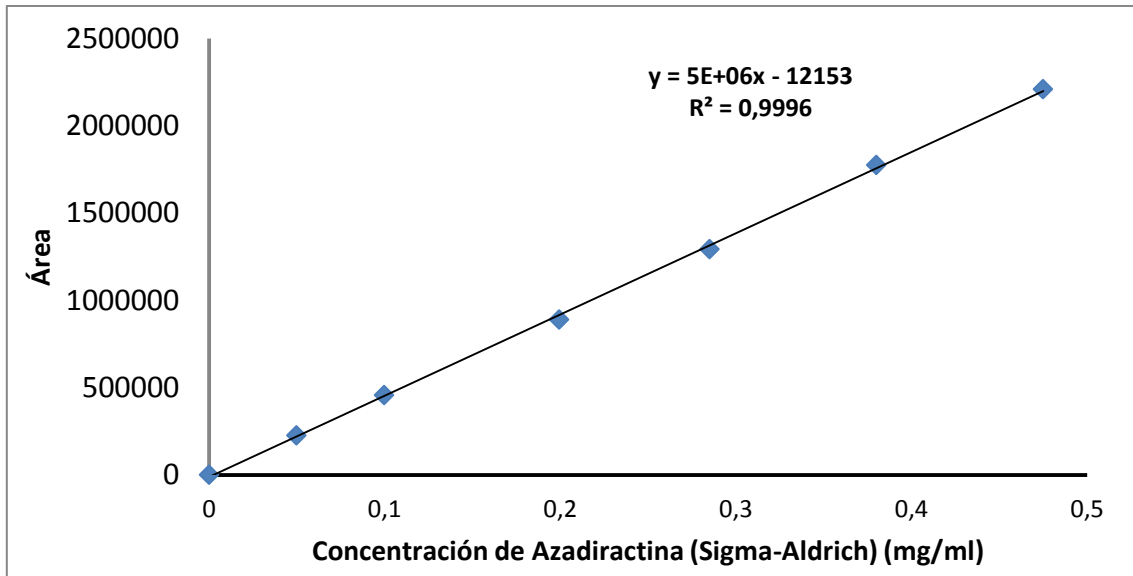
Datos	Prueba de Normalidad Valor de p			Homocedasticidad Valor de p	
	Kolmogorov Smirnof	Ryan Joiner	Anderson Darling	Comparaciones Múltiples	Levene
Peso Seco	<0,010	<0,010	<0,005	0,745	0,577
Residuos de Peso Seco	<0,010	<0,010	<0,005	-	-
Datos Transformados con Johnson	>0,150	>0,100	0,474	0,128	0,078
Residuos de datos transformados con Johnson	0,133	>0,100	0,626	-	-
Datos Transformados con Box Cox	>0,150	>0,100	0,119	0,172	0,069
Residuos de datos transformados con Box Cox	0,120	0,091	0,137	-	-



### Anexo 3. Análisis Estadístico de medios de cultivo de suspensiones celulares



#### Anexo 4. Curva de calibración de azadiractina



**Anexo 5. Medición de Volumen Celular Sedimentado y Peso Seco de cultivo en biorreactor en fase exponencial**

