

CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Azadirachta indica* PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOINSECTICIDA**CELL SUSPENSION CULTURE OF *Azadirachta indica* FOR PRODUCTION OF A BIOINSECTICIDE**F. Orozco-Sánchez¹ y M. Rodríguez- Monroy^{2*}¹*Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín.
Autopista Norte x Calle 65, Bloque 15. Medellín, Colombia.*²*Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional.
Apdo. Postal 24. Yautepec, Morelos. 62731, México.*

Recibido 14 de Noviembre 2006; Aceptado 17 de Julio 2007

Resumen

Azadirachta indica es una planta importante para la obtención de bioinsecticidas y la azadiractina (Aza) es el principal compuesto presente en las semillas que presenta esta actividad biológica. Sin embargo, existen limitaciones agroclimáticas para la producción de las semillas y el cultivo de células vegetales *in vitro* surge como una tecnología alternativa y promisorio para la producción de Aza. En este trabajo, se presenta el estado del conocimiento del desarrollo del cultivo de células de *A. indica* y se analizan las estrategias usadas para mejorar el crecimiento y la producción de Aza. Se destacan los estudios del uso de agentes permeabilizantes de la membrana celular para liberar la Aza intracelular, la adición de precursores biosintéticos, los efectos del régimen de luz, la temperatura y la formulación de medios. A nivel de biorreactores, el tanque agitado se destaca como la configuración más reportada y los estudios abordan la evaluación de impulsores y la posibilidad de operación en un régimen por lote alimentado. Las productividades calculadas de los reportes, muestran una transferencia de los cultivos de matraces a biorreactor satisfactoria tecnológicamente y permiten vislumbrar el escalamiento futuro de los cultivos de células de *A. indica* para la producción de un bioinsecticida.

Palabras clave: *Azadirachta indica*, Azadiractina, biorreactor, bioinsecticida.

Abstract

Seeds of *Azadirachta indica* are an important source for production of bioinsecticides, being Azadirachtin (Aza) the main compound. However, agricultural and climate adversity limit the seed production, thereby plant cell culture *in vitro* is an alternative technology for Aza production. In this work, the state of the knowledge of *A. indica* cell culture is presented and the strategies for improving growth and production of Aza are analyzed. The use of cell membrane permeabilizing agents to liberate intracellular Aza, of biosynthetic precursors, light, temperature, and the effect of media culture are revised. The stirred tank bioreactor has been the most used for cell culture and the studies have been centered on impellers evaluation and the possibility of using the fed-batch regime. Calculated productivities show that the bioreactor is technologically appropriated for cultivation of *A. indica* cell cultures and bioinsecticide production.

Keywords: *Azadirachta indica*, Azadirachtin, bioreactor, bioinsecticide.

1. Introducción

A. indica (árbol del neem) es originario de las zonas áridas de India, Pakistán y África, donde se ha cultivado por miles de años. Su actividad bioinsecticida representa un interés particular para el control de insectos plaga, en este sentido la azadiractina (Aza) es reconocida como el compuesto activo más importante. Sin embargo, existen limitaciones agroclimáticas para su producción tradicional a partir de semillas, por lo que su

producción a partir de cultivos de células vegetales *in vitro* surge como una alternativa promisorio. En el presente documento se presenta una revisión de los usos del árbol del neem, los metabolitos secundarios que produce y del estado que guarda el conocimiento sobre el cultivo de las células de *A. indica*. Además se identifican las estrategias usadas para mejorar el crecimiento y la producción de Aza.

* Autor para la correspondencia: E-mail: mrmonroy@ipn.mx

2. Generalidades de *A. indica*.

El término neem proviene del sánscrito *Nimba* y era conocido como *Sarva Roga Nivarini* o curador de todas las enfermedades. El pueblo indú ha usado este árbol de múltiples maneras y durante miles de años (Royal Botanic Gardens, 2006). Su nombre científico es *Azadirachta indica* A. Juss, y presenta como sinónimos *Antelea azadirachta*, *Melia azadirachta* y *Melia indica*. Este árbol es conocido popularmente como nim, neem, margosa, paraíso, caoba criolla y caoba haitiana, y puede alcanzar una altura de 30 m. El neem crece en diferentes condiciones climáticas, actualmente se cultiva en zonas semiáridas con precipitaciones pluviales de 200 a 1200 mm H₂O y tolera temperaturas de 0 a 49°C. *A. indica* es cultivado en más de 50 países en Asia, África, el Caribe, Centro y Sur América y se han establecido pequeñas plantaciones en Norteamérica (Brechelt y Fernández, 1995; Stoney, 1997; Neem Foundation, 2006; Royal Botanic Gardens, 2006). *A. indica* es usado popularmente de diversas maneras, entre las que se encuentran:

- a) *Reforestación*. El árbol puede utilizarse para reforestar y proteger los suelos de la erosión, debido a su gran adaptabilidad a suelos secos (Brechelt y Fernández, 1995; Stoney, 1997; Neem Foundation, 2006; Royal Botanic Gardens, 2006).
- b) *Uso como combustible*. La madera es moderadamente densa y a partir de las semillas se puede obtener aceite (entre 40 – 50 % de su peso), para usarse como combustible (Neem Foundation, 2006; Royal Botanic Gardens, 2006).
- c) *Usos medicinales*. Las hojas, la corteza y las ramas tienen actividad antimicrobiana, se usan contra las inflamaciones y para sanar diferentes heridas. Los extractos de corteza y ramas se usan para tratar fiebres, anorexia, disentería, vómito y son antihelmínticos; mezclados con *Coriandrum sativum* (cilantro) y *Zingiber officinale* (jengibre) se utilizan para el tratamiento de la malaria (Brechelt y Fernández, 1995; Bandyopadhyay y col., 2002; Royal Botanic Gardens, 2006). El aceite de la semilla es usado para curar la lepra, enfermedades de la piel y artritis (Neem Foundation, 2006). Las hojas son prescritas para ayudar al sistema digestivo, estimular el funcionamiento del hígado, combatir algunas afecciones pulmonares y disminuir los niveles de glucosa en la sangre de pacientes diabéticos. Se reporta también su uso como anticancerígeno, antiviral, antialérgico, antigingivitis, antiséptico y analgésico para dolores de oído y de cabeza (Kintzios, 2006; Parmar y col., 2004; Raveendra y col., 2004).
- d) *Acondicionador y fertilizante de suelos*. La pasta que se forma con la corteza del árbol o la que se

obtiene como subproducto en la elaboración del aceite de las semillas, puede usarse como acondicionador y fertilizante del suelo. Estos productos han mostrado tener efecto nematocida y disminuyen el contenido de patógenos en las plantas (Brechelt y Fernández, 1995; Stoney, 1997; Gajalakshmi y Abussi, 2004; Neem Foundation, 2006; Royal Botanic Gardens, 2006).

- e) *Insecticida y antialimentario*. Las sustancias producidas por el neem afectan algunos ostráceos y entre 400 y 500 especies de diferentes órdenes de insectos, entre los cuales se incluyen Blattodea, Caelifers, Dermaptera, Diptera, Ensifera, Hetroptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Phasmida, Phthiraptera, Siphonoptera y Thysanoptera (Neem Foundation, 2006). Estas sustancias tienen un efecto repelente, antialimentario e insecticida sobre especies herbívoras, el modo de acción es dependiente de la dosis y de la especie (Huang y col., 2004).
- f) *Pesticida*. Los productos derivados del neem no sólo afectan a los insectos peste, sino que también tienen efecto sobre algunas bacterias gram positivas, nemátodos, caracoles y hongos nocivos, incluyendo especies de *Aspergillus sp.* productores de aflatoxinas (Saxena, 2002; Neem Foundation, 2006; Royal Garden Botanic, 2006).

3. Metabolitos secundarios producidos por *A. indica*.

A. indica produce más de 300 metabolitos secundarios, un tercio de los cuales son tetranortriterpenoides (limonoides) de interés comercial y científico por sus efectos biológicos (David y col., 2000; Dai y col., 1999). Muchas de sus aplicaciones se basan en el conocimiento empírico, es decir, se realizan sin identificar los ingredientes activos, tal como se presentó en la sección anterior. Actualmente existen más de 300 patentes relacionadas con *A. indica* (Surf – IP, 2006).

La Aza es uno de los metabolitos principales utilizado especialmente para el control de insectos (Mordue y Blackwell, 1993). Además de la Aza, se reporta que el meliantról y el salanín hacen que los insectos dejen de alimentarse. El nimbin y nimbidin poseen actividad antiviral. El deactilazadiractinol, se encuentra en menor concentración, funciona como antihormona y paraliza el sistema digestivo del insecto. El 3-deacetilsalanín y el salanol, están relacionados químicamente con el salanín y también son antialimentarios (National Research Council, 1992; Royal Garden Botanic, 2006).

La azadiractina, C₃₅H₄₄O₁₆ (Fig. 1) es el metabolito más importante y más abundante y únicamente es producido por *A. indica* (Mordue y Blackwell, 1993; Royal Garden Botanic, 2006). La

mayoría de la investigación se ha enfocado intensamente en este compuesto y se han identificado 9 isómeros, siendo Aza A y Aza B los más abundantes (Brechelt y Fernández, 1995; Sidhu y col., 2003). La Aza no mata inmediatamente al insecto; cuando un insecto ingiere Aza, ésta afecta su patrón de alimentación (efecto antialimentario), el desarrollo de su cuerpo (metamorfosis) y su ciclo reproductivo, actuando como una toxina. Así, se sabe que la Aza interfiere con las glándulas corpora cardíaca y corpora alata, inhibiendo la producción de la neurohormona protoracicotrópica, la cual a su vez regula la biosíntesis de las hormonas de la metamorfosis (ecdisona) y la hormona juvenil. Estas hormonas son esenciales para los insectos, pues determinan la muda y la maduración de huevos y sin ellas, las larvas en sus primeros estadios pueden durar hasta 3 semanas sin cambiar de forma, para finalmente morir. Así, los estados larvales pueden lograr empuparse pero los adultos salen con alas deformadas y otras deficiencias. Los estados adultos que ingieren demasiado Aza muestran una fecundidad reducida (National Research Council, 1992; Lonard y col., 1996).

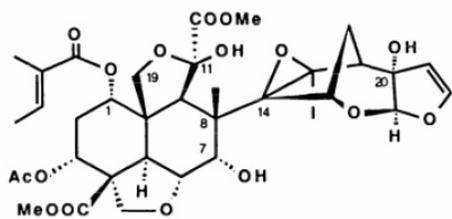


Fig. 1. Estructura de la azadiractina (Aza).

La Aza es efectiva contra cerca de 200 especies de insectos, no afecta a los mamíferos o a los animales que consumen estos insectos, ni tampoco a los insectos útiles para la polinización o que son benéficos para la planta (Dureja y Johnson, 2000; Neem Foundation, 2006; Royal Botanic Gardens, 2006). La Aza se encuentra principalmente en las semillas y su concentración presenta una gran variación, la cual es atribuida a múltiples factores como son: la zona agroclimática donde se produce la variabilidad genética entre árboles, las condiciones ambientales de producción y los procesos mismos de extracción y cuantificación. La concentración de Aza A en las semillas es de 0.56 – 3.03 g/kg y Aza B de 0.04 – 0.59 g/kg (Sidhu y col., 2003). Sin embargo, la Aza es un compuesto termolábil y fotosensible, por lo que se requieren condiciones especiales para su almacenamiento. Prakash y col. (2002) reportaron que la concentración de Aza en las semillas almacenadas por cuatro meses puede reducirse en un 32 %, además que puede presentarse contaminación por hongos.

Para prevenir los problemas de degradación de Aza debido a radiaciones electromagnéticas, se pueden usar algunas sustancias como los absorbedores UV, antraquinona y epilorohidrina,

que prolongan la estabilidad de la Aza en las formulaciones que usan aceite de *A. indica* (Sundaram y Curry, 1996; Kumar y Parmar, 1999). Los procesos de extracción de Aza a partir de semillas, implican varias etapas de recuperación con metanol y diclorometano. También puede realizarse una extracción en condiciones supercríticas con CO₂ (Shaaf, 2000). La Aza puede analizarse mediante HPLC y LC/MS y los limonoides relacionados con la Aza pueden analizarse colorimétricamente (Ambrosino y col., 1999; Dai y col., 1999; Shaaf, 2000).

4. Producción de metabolitos secundarios de *A. indica* mediante cultivos de células

Los metabolitos secundarios de *A. indica* se consideran ambientalmente amigables y la demanda de estos extractos se incrementa continuamente (Prakash y col., 2002). La producción de bioinsecticidas que se formulan con base en Aza se ve limitada por la insuficiente oferta de este compuesto. La concentración de Aza en las semillas varía considerablemente y debido a la complejidad de sus estructuras, la síntesis química completa no ha sido posible (Neem Foundation, 2006). Teniendo en cuenta estos factores, el uso de herramientas biotecnológicas para la propagación, mejoramiento y producción de metabolitos secundarios de *A. indica* mediante cultivo de células, constituyen una alternativa para satisfacer la demanda de estos bioinsecticidas biodegradables.

Durante las décadas de los 70 y 80, se publicaron varios estudios sobre la micropropagación, morfogénesis y organogénesis de *A. indica* (Prakash y col., 2002). Naina y col. (1989) lograron la transformación genética y regeneración de plantas de *A. indica* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Gautam y col. (1993) desarrollaron embriones y raíces en callos derivados de anteras. Kearney y col. (1994) publicaron el primer trabajo demostrando el efecto antialimentario de los metabolitos secundarios producidos por callos y suspensiones de *A. indica* sobre insectos. Desde los años 90 se reportó la producción *in vitro* de Aza y otros limonoides en callos y suspensiones celulares (Allan y col., 1994; Wewetzer, 1998; Prakash y col., 2002). Consecuentemente aparecieron diferentes publicaciones evaluando algunos factores para incrementar la concentración de Aza en los cultivos celulares, tanto en callos como en las suspensiones celulares y se registraron varias patentes de producción *in vitro* de Aza o metabolitos producidos por *A. indica* (Hollowach-Keller y col., 1997; Abraham y col., 2005). Recientemente se reportó la posibilidad de crecer al cultivo de *A. indica* en biorreactores, del tipo tanque agitado (Muñoz y col., 2006; Prakash y Srivastava, 2006; Prakash y Srivastava, 2007) y en columna de burbujeo (Prakash y Srivastava, 2005a).

5. Variables que afectan la producción de Aza en cultivos *in vitro* de *A. indica*.

Las variables que afectan la producción de metabolitos secundarios a partir de células de plantas *in vitro*, pueden agruparse en fisicoquímicas (sistema de crecimiento, composición del medio, luz, temperatura, etc.) y las inherentes al sistema biológico (tipo de explante, genotipo, etc.). Para el caso de *A. indica*, estas variables se estudian desde hace menos de 15 años, mientras que las investigaciones de otras especies como *Cathranthus roseus* para la producción de alcaloides o *Lithospermum erythrorhizon* que produce shikonina, se han realizado desde hace más de 50 años (Sajc y col., 2000).

En la Tabla 1 se resumen los datos de producción de Aza en cultivos de callos, los contenidos de este compuesto son muy variables (0.0005 – 26.8 mg/g). En todos los reportes se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962), sin embargo no hay consistencia en los reguladores de crecimiento, ni en sus concentraciones y se utilizaron explantes de semillas, hojas, flores y corteza. Es importante señalar que en el trabajo reportado por Prakash y col. (2005) usaron como explante semillas provenientes de genotipos con diferente concentración de Aza (0.21 y 5.13 mg/g) y lograron establecer callos que produjeron una concentración de Aza equivalente al de las semillas de origen.

El cultivo *in vitro* tiene la ventaja de que el tiempo de crecimiento (20 a 30 días) es considerablemente menor al que tardaría el proceso de floración y formación de la semilla en los árboles (meses). Por otro parte, el contenido de Aza en cultivos de raíces (“hairy roots”) es muy bajo, 0.004 – 0.070 mg/g PS (Allan y col., 2002) por lo que actualmente no se considera atractivo para la

producción de Aza y se ha optado por investigar con cultivos de células en suspensión.

La Tabla 2 resume los reportes con cultivos de suspensiones de *A. indica* en matraces Erlenmeyer y en biorreactores. Como estrategias para mejorar la producción de biomasa y Aza se han reportado: la adición de agentes permeabilizantes, los precursores metabólicos, la optimización del medio de cultivo y distintas estrategias de cultivo en biorreactores. A continuación se analizan algunos de los resultados presentados.

Dado que el Aza es un metabolito que se acumula intracelularmente, se ha utilizado el detergente Tritón X-100 como un agente permeabilizante para liberarlo de las células (Kuruvilla y col., 1999). Balaji y col. (2003) usaron precursores de la ruta de síntesis de terpenoides (acetato de sodio, escualeno e isopentenil pirofosfato), y lograron incrementar la secreción de Aza al medio de cultivo desde 4.71 mg/L hasta 64.94 y 72.81 mg/L. Raval y col. (2003) propusieron una estrategia de cultivo en dos etapas, usando un medio formulado para el crecimiento celular y otro para la producción de limonoides; no obstante, la producción de Aza alcanzada fue sólo de 4.5 mg/L. En contraste, Prakash y Srivastava (2005b) optimizaron glucosa, nitrógeno y fosfato en un medio y lograron alcanzar rendimientos celulares máximos de 15 g PS de células/L y 45 mg de Aza/L.

Capataz (2005) determinó que la temperatura y la luz juegan un papel importante en el crecimiento celular y en la producción de Aza, estableciendo que una condición de 35°C y luz continua fueron las más favorables para el crecimiento celular (24.5 g PS/L); mientras que para la producción de Aza se necesitaron 15°C en oscuridad, alcanzando producciones de 27.4 mg Aza/L.

Tabla 1. Condiciones de cultivo en callos de *A. indica* para la producción de azadiractina (Aza).

Explante	Regulador de crecimiento	(mg/L)	Aza (mg/g	Peso)	Referencia
Semilla	IBA	4	0.0005		Schaaf y col., (2000)
	BA	2			
Hojas	IBA	4	0.007		Allan y col., (1994)
	BA	2			
Semillas	ANA	2	0.1 – 1.89		Prakash y col., (2005)
	BA	4			
Hojas	IBA	8	0.23		
	BA	4			
Hojas	2,4 D	1	26.8		Veeresham y col., (1998)
	Kin	0.5			
Flores	2,4 D	1	24.6		
	Kin	0.5			
Hojas	IAA	0.2	0.064		
	BA	1			
Corteza	IAA	0.2	0.044		Wewetzar, (1998)
	BA	1			

En todos los reportes fue utilizado el medio basal de Murashige y Skoog (1962), con pH 5.8 y sacarosa 30 g/L.

Tabla 2. Variables estudiadas para el cultivo de células en suspensión de *A. indica*.

Sistema de cultivo	Variable	Descripción	Biomasa máxima (g/L)	Aza máxima (mg/L)	Referencia
Matraz	Agente Permeabilizante	Triton X-100	NR ¹	10	Kuruvilla y col., (1999)
Matraz	Precursor	Acetato sodio Esqualeno Isopentenil pirofosfato	NR ¹	64.94 72.81 51.63	Balaji y col., (2003)
Matraz	Etapas de cultivo	Una etapa/crecimiento Dos etapas/ crecimiento y producción	6,5 16	2.5 4.5	Raval y col., (2003)
Matraz	Medio cultivo	Optimización N, P y C	15.02	45	Prakash y Srivastava, (2005b)
Matraz	Luz y temperatura	Oscuridad 15 °C Luz 35 °C	20.2 24.6	27.4 4.4	Capataz, (2005)
Biorreactor	Tipo biorreactor	Columna burbujeante 2-4L Tanque agitado 3 L	17.8 15.5	81.3 50	Prakash y Srivastava, (2005a)
Tanque agitado 3 L	Modo de cultivo	Lote Lote alimentado	15.52 20.06	45 82	Prakash y Srivastava, (2006)
Tanque agitado 3 L	Tipo de impulsor	Setric Centrífugo	15.0 18.7	45 71	Prakash y Srivastava, (2007)

¹NR. No reportado.

Tabla 3. Productividad de biomasa y Aza en cultivos en suspensión de *A. indica*.

Sistema de cultivo	T (°C)	Luz	Q bio (g cel/ L/d)	Q prod mg Az/L/d	Referencia
Matraz una etapa Matraz 2 etapas	25	16 h luz	0.20 0.82	0.25 0.32	Raval y col., (2005)
Matraz medio optimizado	25	Oscuridad	0.84	3.75	Prakash y Srivastava, (2005b)
Matraz	15 35	Oscuridad Luz	0.70 0.99	3.04 0.49	Capataz, (2005)
Columna burbujeo 2,4 L Tanque agitado 3 L,	27	Oscuridad	1.07 1.05	6.7 5.0	Prakash y Srivastava, (2005a)
Tanque agitado 3 L - Lote Tanque agitado 3 L Lote alimentado	27	Oscuridad	0.75 1.08	3.2 5.8	Prakash y Srivastava, (2006)
Tanque agitado 3 L impulsor Setric Tanque agitado 3 L Impulsor centrífugo	27	Oscuridad	0.83 1.37	3.7 7.1	Prakash y Srivastava, (2007)

Como se puede observar en la Tabla 2, se ha probado el uso de diferentes tipos de biorreactores, tales como la columna de burbujeo y el tanque agitado con diferentes impulsores. Prakash y Srivastava (2005a) hicieron una comparación entre ambos tipos de biorreactores y observaron que los rendimientos de biomasa y Aza fueron superiores en la columna de burbujeo. Estos mismos autores, buscando alternativas para el mezclado con el biorreactor tipo tanque agitado, hicieron una comparación en el desempeño de dos impulsores, setric y centrífugo (Prakash y Srivastava, 2007). Sus resultados demostraron que el impulsor centrífugo provee las características de mezclado que permiten la mejor producción de biomasa (18.7 g PS/L) y Aza (71 mg/L). Prakash y Srivastava (2006) propusieron el uso de un sistema de cultivo por lote alimentado con el biorreactor tipo tanque agitado y lograron

obtener una producción de biomasa de 20 g PS/L y 82 mg/L de Aza, valores comparables a los obtenidos con la columna de burbujeo (Prakash y Srivastava, 2005a).

Con el objeto de poder comparar los resultados de las investigaciones reportadas para *A. indica*, se calculó la productividad de biomasa (Q bio) y la productividad volumétrica de Aza (Q pro). De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 3, las productividades máximas de biomasa y Aza en matraces corresponden a 0.99 g Cel/L/día y 3.75 mg Aza/L/día respectivamente. Mientras que en biorreactores, las productividades máximas alcanzadas son de 1.37 g Cel/L/día y de 7.1 mg Aza/L/día. Lo anterior muestra que al pasar los cultivos de *A. indica* de matraces a biorreactores, se puede mejorar la productividad del proceso. Este comportamiento es similar al reportado

recientemente para el cultivo de *Uncaria tomentosa* productor de alcaloides oxindólicos (Trejo-Tapia y col., 2007). En dicho estudio, se propone que la mayor productividad de los alcaloides en el biorreactor está asociada con el aumento del estrés hidrodinámico y se asume que la producción de los alcaloides podría generarse como una respuesta de las células al estrés. Sin embargo, lo anterior es contrastante con lo reportado para otras especies vegetales, en la que las productividades de biomasa y de metabolitos secundarios disminuyen al pasar los cultivos de matraces a biorreactor (Rodríguez-Monroy y Galindo, 2003).

6. Consideraciones y perspectivas futuras

El cultivo de células de *A. indica* surge como una alternativa para la producción de bioinsecticidas a base de Aza. Se han desarrollado medios de cultivo y propuesto condiciones para operar biorreactores con células de *A. indica*, en los cuales se alcanzan concentraciones de Aza equivalentes a la concentración en las semillas. Sin embargo, aún se puede mejorar este sistema de producción biotecnológica. Por ejemplo, falta información sobre la ruta metabólica de los limonoides en *A. indica* y en particular sobre Aza. Un mejor conocimiento de esta ruta y de los mecanismos de control de la expresión de las enzimas más relevantes, facilitaría el uso de precursores o la construcción de transformantes para incrementar la producción de Aza. En los estudios de Capataz (2005) y Prakash y col. (2005) sobre el efecto de la luz en la producción de Aza, faltó estudiar el efecto de distintas longitudes de onda y de la dosis. En cuanto a la composición del medio de cultivo, a pesar de los resultados satisfactorios de Prakash y Srivastava (2005b), aún no es claro el efecto de las hormonas o la composición del gas suministrado (oxígeno, CO₂, etileno, acetaldehído, etc.), entre otros.

Además, no existen estudios con esta especie en torno a los efectos que podría tener el estrés hidrodinámico sobre el crecimiento y la producción de Aza. Estos estudios podrían estar relacionados con la definición de la configuración del tanque de cultivo, del tipo de impulsor, las velocidades de agitación y de aireación (Rodríguez-Monroy y Galindo, 2003).

Sobre el tipo de biorreactor, se considera que el tanque agitado sigue siendo una de las mejores opciones por presentar menos dificultades técnicas en el proceso de escalado, ya que hay más información disponible, lo cual coincide con las afirmaciones de Prakash y Srivastava (2007).

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACYT (P43861) y a la SIP – IPN (20060039) por su apoyo financiero. F. Orozco S. agradece a la Secretaría de Relaciones

Exteriores del Gobierno de México por su beca para estudios de doctorado.

Referencias

- Abraham, T.; Devaki, N.; Kuruvilla, T. and Joseph, J. (2005). Production of peroxidase from plant cell and callus cultures. International Application published under the Patent Cooperation Treaty. Patent No. WO 2005/116196, PCT/IB2005/001421.
- Allan E. J.; Eeswara J. P.; Jarvis A. P.; Mordue, A. J.; Morgan, E. D. and Stuchbury, T. (2002). Induction of hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss and their production of azadirachtin and other important insect bioactive metabolites. *Plant Cell Reports* 21, 374-379.
- Allan, E. J.; Eeswara, J. P.; Johnson, J.; Mordue, A. J.; Morgan E. D. and Stuchbury, T. (1994). The production of azadirachtin by *in vitro* tissue culture of neem, *Azadirachta indica*. *Pesticide Science* 42, 147-152.
- Ambrosino, P.; Fresa, R.; Fogliano, V.; Monti, S. and Ritieni, A. (1999). Extraction of azadirachtin A from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 5252-5256.
- Balaji, K.; Veeresham, C.; Srisilam, K. and Kokate C. (2003). Azadirachtin, a novel biopesticide from cell cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Plant Biotechnology* 5(2), 121-129.
- Bandyopadhyay, U.; Biswas, K.; Chatterjee, R.; Bandyopadhyay, D.; Chattopadhyay, I.; Kumar, Ch.; Chakraborty, T.; Bhattacharya, K. and Banerjee, R. (2002). Gastroprotective effect of neem *Azadirachta indica* bark extract: possible involvement of H⁺-K⁺-ATPase inhibition and scavenging of hydroxyl radical. *Life Science* 71, 2845-2865.
- Brechelt, A. y Fernández C. L. (1995). *El nim, un árbol para la agricultura y el medio ambiente. Experiencias en la República Dominicana*. Fundación Agricultura y Medio Ambiente. Amigo del hogar, San Cristobal, República Dominicana. 133 p.
- Capataz, J. (2005). *Efecto de elicitores abióticos sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de Azadirachta indica y su efecto sobre Spodoptera sp.* Tesis de Maestría Biotecnología, U. Nacional de Colombia. Colombia. 67 p.
- Dai, J.; Yaylayan, V.; Vijaya G. S. and Pare, J. (1999). Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 3738-3742

- David, E.; Jarvis, A. and Jonesa, G. (2000). Ratio of products formed on photo-oxidation of the neem triterpenoids nimbin and salannin. *Arkivok* 1(3), 312-319
- Dureja, P., Johnson, S. (2000). Photodegradation of azadirachtin-A: A neem-based pesticide. *Current Science* 79(12) 1700 – 1703.
- Gajalakshmi, S. and Abbasi S. A. (2004). Neem leaves as a source of fertilizer-cum-pesticide vermicompost. *Bioresource Technology* 92, 291-296.
- Gautam, V.; Nanda, K. and Gupta, S. (1993). Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A.Juss - a medicinal tree. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34, 13 – 18.
- Hollowach – Keller, L. P; Birman, I. and Patterson D. R. (1997). Method for producing azadirachtin by cell culture of *Azadirachta indica*. *United States Patent* No. 5,693,423.
- Huang, Z.; Shi, P.; Dai, J. and Du, J. (2004). Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 80, 85-93
- Kearney, M.L.; Allan, E; Hooker J. E. and Mordue, J. (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* 37, 67 – 71
- Kintzios, S. E. (2006). Territorial plant derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Critic Reviews in Plant Physiology* 25, 79-113.
- Kumar, J. and Parmar B. S. (1999). Stabilization of azadirachtin A in neem formulations: effect of some solid carriers, neem oil, and stabilizers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 1735-1739.
- Kuruvilla, T.; Kkomaraiah, P. and Ramkrishna, S.V. (1999). Enhanced secretion of azadirachtin by permeabilized margosa (*Azadirachta indica*) cells. *Indian Journal of Experimental Biology* 37, 89-91.
- Lonard, D. M.; Bhasharan, G. and Dahm, R. H. (1996). Control of prothoracic gland activity by juvenile hormone in fourth instar *Manduca sexta* larvae. *Journal of Insect Physiology* 42 (3), 205-213.
- Mordue, A. J. and Blackwell, A. (1993). Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology* 39 (11), 903-924.
- Muñoz-Cruz, W.; Vanegas-Monterrosa, O. A.; Guzman-Rojas, A. A.; Capataz-Tafur, J.; Hoyos-Sánchez, R. A. y Orozco-Sánchez, F. (2006). Estimación de variables de operación de un biorreactor con células de *Azadirachta indica* A. Juss. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 59(2), 3467-3478.
- Murashige, T. and Skoog. F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15, 473-497.
- Naina, N. S; Gupta P. K. and Mascarenhas A. F. (1989). Genetic transformation and regeneration of transgenic neem (*Azadirachta indica*) plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Science* 58, 184 – 187.
- National Research Council. (1992). *Neem: A tree for solving global problems*. Ed. National Academic Press. Washington D.C. 141 p.
- Neem Foundation, (2006). Growing Neem. Disponible en internet: <http://www.neemfoundation.org/contact.htm>. Consultado el 15 de abril de 2006.
- Parmar, B.S; Balraj; Varshney, M and Shah, D.O. (2004). *Neem* oil microemulsion without cosurfactants or alcohols and a process to form the same. *United States Patent* 6,703,034.
- Prakash, G; Bhojwani, S and Srivastava, A. (2002). Production of azadirachtin from plant tissue culture: state of the art and future prospects. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 7, 185-193.
- Prakash, G.; Emmanuel, C.J. and Srivastava, A. K. (2005). Variability of azadirachtin in *Azadirachta indica* (neem) and batch kinetics studies of cell suspension culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 10, 198 – 204.
- Prakash, G and Srivastava, A.K. (2005a). *Production of azadirachtin (biopesticide) by plant cell cultivation of Azadirachta indica in bubble column reactor*. Indian Chem. Eng. Congress, Chemcon 2005. New Delhi, 14- 17 Dec.
- Prakash, G. and Srivastava, A. K. (2005b). Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures. *Process Biochemistry* 40, 3795-3800.
- Prakash, G. and Srivastava, A. K. (2006). Modeling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. *Biochemical Engineering Journal* 29, 62 – 88.
- Prakash, G. and Srivastava, A. K. (2007). Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspension culture. *Process Biochemistry* 42(1), 93-97.
- Raval, K.; Hellwig, S.; Prakash, G.; Ramos-Plasencia, A.; Srivastava, A. and Buchs, 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.

- Raveendra, M; Acharya, L. D. and Udupa, N. (2004). Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel - a 6 week clinical study. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 99-103.
- Rodríguez-Monroy, M. y Galindo, E. (2003). Las células vegetales ¿frágiles para crecer en biorreactores? *BioTecnología* 8 (2), 6 - 17.
- Royal Botanic Gardens. (2006). *Neem. Plant Cultures, exploring plant and people*. Royal Garden Botanic, Kew. Disponible en internet: http://www.plantcultures.org.uk/plants/neem_landing.html. Consultado el 15 de abril de 2006.
- Sajc, L. Grubisic, D. and Vunjak-Novakovic, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal* 4, 89-99
- Saxena, R. C. (2002). Management of insect pests with neem: Global perspective. In: *2002 Neem Proceedings*. Neem Foundation, India.
- Schaaf, O. (2000). Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 886: 89-97.
- Sidhu, O. P.; Kumar, V. and Behl H. M. (2003). Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, 910-915.
- Stoney, C. (1997). *Azadirachta indica* - neem, a versatile tree for the tropics and subtropics. Forest, Farm, and Community Tree Network (FACT Net). Arkansa, USA. Disponible en internet: <http://food-security.info/food-security.info/Winrock%20Archive/neem.htm>. Consultado el 18 de abril de 2006.
- Sundaram, K. M. S. and Curry, J. (1996). Effect of some UV light absorbers on the photostabilization of azadirachtin, a neem-based biopesticide. *Chemosphere* 32 (4), 649-659.
- Surf - IP. (2006). Search Patents for Neem. Surf - IP, A Project of the Intellectual Property Office of Singapore. Singapore Government. Disponible en internet: <http://www.surfip.gov.sg/>. Consultado el 20 de abril de 2006.
- Trejo-Tapia, G.; Sepúlveda-Jiménez, G.; Trejo-Espino, J.L.; García-Rojas, C.; de la Torre-Martínez, M.; Rodríguez-Monroy, M. and Ramos-Valdivia, A. 2007. Hydrodynamic stress induces monoterpenoid oxindole alkaloid accumulation by *Uncaria tomentosa* (Willd) D. C. cell suspension cultures via oxidative burst. *Biotechnology and Bioengineering* 98(1), 230-238.
- Veeresham C.; Kumar M. R.; Sowjanya, D.; Kokate, C. K and Apte, S. S. (1998). Production of azadirachtin from callus cultures of *Azadirachta indica*. *Fitoterapia* 69, 423-424.
- Wewetzer, A. (1998). Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of azadirachtin. *Phytoparasitica* 26 (1),47-52.