

ESTIMACIÓN DE VARIABLES DE OPERACIÓN DE UN BIORREACTOR CON CÉLULAS DE *Azadirachta indica* A. Juss

Walter Muñoz Cruz¹; Oscar Alejandro Vanegas Monterrosa²;
Andrés Alberto Guzmán Rosas³; Jacqueline Capataz Tafur⁴;
Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez⁵ y Fernando Orozco Sánchez⁶

RESUMEN

*Se estudiaron las variables de operación de un biorreactor de tanque agitado para el cultivo de células en suspensión de **Azadirachta indica** A. Juss. Se utilizó carboximetilcelulosa, CMC 0,7 % p/v, para estimar el coeficiente de transferencia de oxígeno, k_La , entre 120 – 400 rpm y entre 0,05 – 0,6 vvm, obteniéndose valores de 0,5 - 8,0 h^{-1} . El k_La para suspensiones de *A. indica* en erlenmeyers fue de 0,6 - 1,2 h^{-1} . Con los resultados anteriores se definieron las condiciones de operación del biorreactor y se evaluó el crecimiento de células de **A. indica** a 200 rpm y 0,2 vvm de aire, alcanzando 9,2 g cel secas/l. El crecimiento celular no fue limitado por el suministro de oxígeno. Los tamaños de aglomerados celulares cultivados en erlenmeyers con baffles agitados magnéticamente y en biorreactor fueron similares, pero menores que los obtenidos en erlemeyers con agitación orbital. El presente estudio establece parámetros para la operación de biorreactores con **A. indica** y confirma que los medios con CMC pueden utilizarse para estimar variables operacionales en biorreactores.*

Palabras claves: biorreactores, *Azadirachta indica*, cultivo de células vegetales, k_La .

¹ Ingeniero Químico. Laboratorio Centrolab. Calle 57 A No. 48-51. Medellín, Colombia. <wmunoz@unalmed.edu.co>

² Ingeniero Químico. Director de Investigación y Desarrollo. ALSEC, S.A. Carrera 54 No. 79 B Sur 55. La Estrella, Colombia. <oscaralejandrov@yahoo.com>

³ Ingeniero Químico. Auxiliar de Investigación. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias, A.A. 3840, Medellín, Colombia.

⁴ Ingeniera Química. Auxiliar de Investigación. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <jcapata@tifon.unalmed.edu.co>

⁵ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <rhoyos@unalmed.edu.co>

⁶ Profesor Asistente. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <feorozco@unal.edu.co >

Recibido: Septiembre 15 de 2005; aceptado Abril 14 de 2006.

ABSTRACT

**ESTIMATION OF OPERATION VARIABLES OF A BIOREACTOR
WITH *Azadirachta indica* A. Juss. CELLS**

Operation variables of a stirred tank bioreactor were studied in order to culture cell suspension of *Azadirachta indica* A. Juss. Carboxymethylcellulose, CMC 0,7 % w/v, was used to estimate the coefficient of oxygen transfer, k_La , between 120 - 400 rpm and 0,05 - 0,6 vvm, obtaining values of 0,5 - 8,0 h^{-1} . The k_La for suspension cultures of *A. indica* in erlenmeyers was 0,6 - 1,2 h^{-1} . Based upon the previous results, the operation conditions of the bioreactor were defined and cell growth of *A. indica* was evaluated at 200 rpm and 0,2 vvm of air, reaching 9,2 g dry cell/l. Cellular growth was not limited by dissolved oxygen. The sizes of cell agglomerates magnetically stirred in erlenmeyers with baffles and in the bioreactor were similar, but smaller than those obtained in erlenmeyers with orbital agitation. The present study establishes parameters for operation of bioreactors with *A. indica* and confirms that CMC can be used to estimate operational variables in bioreactors.

Key words: bioreactors, *Azadirachta indica*, plant cell culture, k_La .

Los cultivos de células vegetales son una alternativa atractiva para la producción de metabolitos secundarios de alto valor agregado. Estos cultivos han sido estudiados para la obtención de compuestos fitoquímicos que tienen actividad antimicrobiana, antibiótica, insecticida o farmacéutica. Presentan amplias ventajas frente a la producción agrícola convencional ya que son independientes de la geografía, variaciones estacionales y ambientales, interferencias políticas y pueden suministrar un producto de calidad uniforme o pueden utilizarse para procesos de biotransformación (Kargi y Rosenberg 1987, Seki *et al.* 1997, Ramachandra y Ravishankar 2002). Se ha logrado incrementar considerablemente la productividad de los cultivos anteriores, estableciendo cultivos de suspensiones celulares en biorreactores (Tanaka 1987, Huang, Shen y Chan 2002, Ramachandra y Ravishankar 2002). Las suspensiones de células vegetales tienden a crecer en forma de aglomerados y aumentan la viscosidad del medio de cultivo; la presencia de estos

aglomerados crea cultivos celulares altamente densos que impiden el paso de nutrientes y de oxígeno, interrumpiendo el desarrollo normal de las células. En la operación con células a nivel industrial es necesario agitar y airear, sometiendo así a las células a estrés hidrodinámico el cual también afecta su normal crecimiento. Otros factores decisivos en el cultivo de suspensiones celulares, son las características operacionales y de diseño de los biorreactores, dimensiones, sistema de aireación, etc. y en especial el tipo de agitador, de gran influencia en el crecimiento celular y en la formación de algunos productos de interés (Tanaka 1987, Hooker, Lee y Gynheung 1989, Pepin *et al.* 1995). Así, trabajos de este tipo exigen el estudio de la respuesta biológica de las células en situaciones de estrés hidrodinámico (Scragg, Allan y Lekie 1988, Yokoi *et al.* 1993, Meijer *et al.* 1994, Tanaka 2000). Debido a los altos costos de las suspensiones de células vegetales, algunas investigaciones pueden realizarse

utilizando medios sintéticos. El uso de soluciones de carboximetil-celulosa (CMC) como sustituto del medio celular se basa en similitudes encontradas en otras investigaciones (Wang y Zhong 1996). Estas soluciones son de bajo costo, fácil manipulación y permiten obtener viscosidades constantes y mayores a las de las sus-pensiones vegetales (Wang y Zhong 1996, Doran 1999).

Las suspensiones celulares se comportan como fluidos altamente pseudo-plásticos, en concentraciones desde 9 hasta 13 g/l en peso seco, al igual que el CMC 0,7 % p/v; las propiedades reológicas de estas soluciones ya han sido evaluadas y comparadas (Tanaka 1987, Wang y Zhong 1996).

La especie *Azadirachta indica* produce importantes metabolitos secundarios con actividad antialimentaria y biopesticida sobre una amplia gama de insectos (Parrota y Chaturvedi 1994). La producción de metabolitos de células vegetales se ha logrado por medio de cultivos celulares en recipientes agitados y reactores (Kearney, 1994, Kuruvilla, Komaraiah y Ramakrishna 1999). En la presente investigación se estimó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, k_{La} , en diferentes condiciones de operación: un biorreactor agitado usando un medio sintético de CMC y erlenmeyers con suspensiones celulares de *A. indica*. Además, se comparó el tamaño de los aglomerados con relación al crecimiento celular de *A. indica* desarrollado en erlenmeyers y en biorreactor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formación de callos y suspensiones celulares. Se formaron callos friables a partir de hojas de *A. indica* sembradas en un medio de cultivo compuesto con sales de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), IBA 4,0 mg/l, BAP 1,0 mg/l, glicina 2 mg/l, vitaminas, sacarosa 30 g/l y phytigel 1,75 g/l, con un pH 5,8 (Kearney 1994). Para el establecimiento de las suspensiones celulares se usó el mismo medio que para la obtención de callos pero sin phytigel. Las suspensiones se conservaron en oscuridad a 25 °C y agitación continua sobre un agitador orbital a 120 rpm. Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Cinética de crecimiento. Las curvas de crecimiento en erlenmeyers y biorreactor fueron construidas en un periodo de 30 días y los experimentos se realizaron por duplicado. Se evaluó el crecimiento mediante la determinación de peso seco de la biomasa contenida en 10 ml de medio, secando durante 24 horas a 60 °C (Torres, 1989). Las curvas de crecimiento construidas para las suspensiones celulares se modelaron en su fase exponencial para hallar el tiempo de duplicación de las células (t_d) y la velocidad específica de crecimiento (μ). La ecuación que describe esta etapa es:

$$X = X_0 e^{\mu * t}$$

Concentración de biomasa en la fase exponencial (g célula seca /l).

- X_0 : Concentración de biomasa al iniciar la fase exponencial (g célula seca /l).
 μ : Velocidad específica de crecimiento (día^{-1}).
 t : Tiempo transcurrido en la fase exponencial (días).

El tiempo de duplicación se obtiene de la relación $t_d = \ln 2 / \mu$ (Duarte, 1998).

Características del biorreactor. Se utilizó un biorreactor de 7 litros (Applikon) con un volumen de trabajo de 2,5 litros. El diámetro interno del tanque era de 0,16 m, se empleó un impulsor de 0,048 m de diámetro del tipo propela marina, 3 baffles de 0,009 m de ancho y un aireador poroso con 0,01 m de diámetro.

Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno. Se realizaron los experimentos para la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno, $k_L a$, tanto en erlenmeyers con suspensiones celulares como en biorreactor con CMC 0,7 % p/v. Se estudió el efecto de la velocidad de agitación, el flujo de aire y sus posibles interacciones sobre el $k_L a$ mediante un diseño factorial de tres niveles y dos factores (3^2). Se realizó el experimento con dos repeticiones, para calcular el error, con un orden aleatorio, para un total de 18 ensayos. Así, se seleccionaron las velocidades de agitación de 120, 250, 400 rpm y aireación de 0,05; 0,10 y 0,60 vvm. La transferencia de oxígeno fue determinada por el método dinámico desgasando (*gassing out*), en el cual el oxígeno primero fue desplazado del medio empleando nitrógeno gaseoso, luego la fase gaseosa sobre la superficie líquida se reemplazó por aire (no se

burbujeó dentro del recipiente) y para asegurar que las fases gaseosa y líquida tuvieran un buen contacto, se agitó magnéticamente la fase líquida. Luego se midió el oxígeno disuelto en la fase líquida. Para esto se emplearon erlenmeyers de 500 ml cubiertos con algodón; el volumen de trabajo fue de 100 ml los cuales se inocularon conservando una relación 1:3. En el biorreactor se empleó el mismo método a diferencia de que el ingreso de aire se hizo burbujeando (Van Suijdam, Kossen y Joha 1978). El valor de $k_L a$ fue calculado como la pendiente de la gráfica $\ln [1 - C/100]$ vs tiempo, siendo C el porcentaje de O_2 disuelto en la solución.

Tamaño de agregados celulares. Para estudiar el efecto de la agitación sobre el tamaño de los aglomerados, se comparó el tamaño de suspensiones incubadas en erlenmeyers en un agitador orbital, con suspensiones incubadas en erlenmeyers con baffles y agitadas magnéticamente usando una barra recubierta de teflón, ambas a 120 rpm. Se midió el tamaño de los aglomerados mediante una serie de tamices con tamaños de malla 100, 60, 50, 40, 14 y 8 equivalentes a 149, 250, 297, 420, 840, 1410 y 2380 μm respectivamente (United States Pharmacopeia Convention 2002). Una vez tamizada la suspensión, se lavó la biomasa con 500 ml de agua destilada y luego fue secada a una temperatura de 60 °C durante 24 horas. Los resultados se presentan como un porcentaje del peso total seco obtenido de células. Estos resultados se compararon con observaciones realizadas al cultivo en el biorreactor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno. La Figura 1 presenta los valores de $k_{L,a}$ promedios para el medio sintético en el biorreactor. Mediante el análisis de varianza del $k_{L,a}$, debido a los factores flujo de aire y velocidad de agitación, se determinó que la velocidad de agitación, el flujo de aire y la interacción entre estos dos

factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre esta variable respuesta, con un nivel de confianza del 99 % (**). La interacción puede apreciarse de la siguiente manera: a bajos niveles de aireación, la velocidad de agitación tiene poco efecto sobre el $k_{L,a}$ y a baja velocidad de agitación, la aireación tiene poco efecto sobre esta respuesta, y viceversa en los niveles altos.

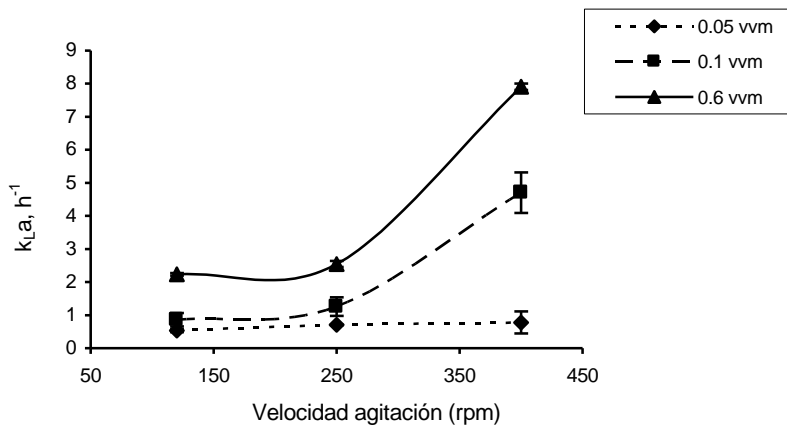


Figura 1. Valores promedios de $k_{L,a}$ para el medio con CMC 0,7 % p/v en un biorreactor agitado de 7 l.

La Figura 2 presenta los valores de $k_{L,a}$ para las suspensiones celulares a diferentes concentraciones de biomasa cultivadas en erlenmeyer y se observa la tendencia general del $k_{L,a}$ a disminuir con el aumento de la concentración celular. Los valores mínimos de $k_{L,a}$ determinados a nivel de erlenmeyer con suspensiones de *A. indica* ($0,6 h^{-1}$), son próximos a los valores de $k_{L,a}$ deter-

minados en la solución de CMC en biorreactor a 0,05 vvm, dando resultados acordes con el de una suspensión celular con concentraciones entre 16 y 18 g células secas/l. Los valores de $k_{L,a}$ en flujos de aire de 0,05 y 0,10 vvm y velocidades inferiores a 250 rpm fueron muy similares a los valores de $k_{L,a}$ obtenidos en erlenmeyers, Figura 2 ($0,6 - 1,2 h^{-1}$).

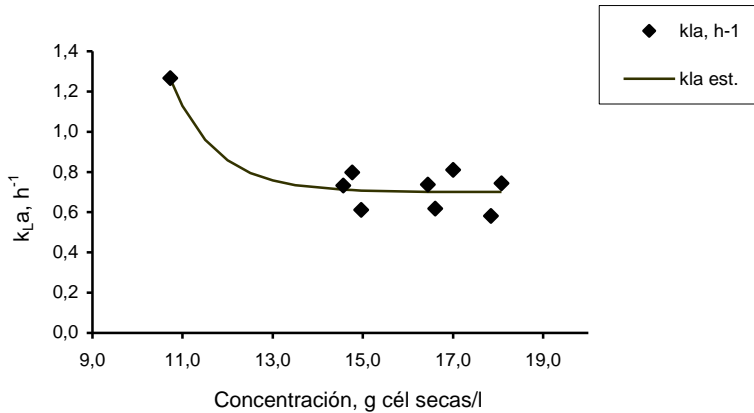


Figura 2. Variación de k_{La} en cultivos de células en suspensión de *A. indica*, en erlenmeyers con agitación orbital a 120 rpm.

Estos resultados concuerdan cuando se opera a flujos inferiores a 0,10 vvm y 100 rpm para soluciones de CMC de iguales características (Wang y Zhong 1996). El orden de magnitud de los resultados en CMC fue similar al obtenido para los cultivos de suspensiones celulares de *Stizolobium hassjoo* Piper & Tracy (Huang, Shen y Chan 2002), *Nicotiana tabacum* L., *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur. ex Lavalle. (Doran 1999) y *Taxus chinensis* (Pilg.) (Zhong *et al.* 2002) en biorreactores de 2,5 l a 5,0 l. A 400 rpm se observa que es mayor el incremento de k_{La} para pequeños cambios en el flujo de aire desde 0,05 a 0,1 vvm, esto sugiere que se podría mantenerse un cultivo celular a velocidades mayores de agitación con bajos flujos de aire. Se ha encontrado que las células de *Taxus chinensis* son fuertemente afectadas de manera negativa por altas velocidades de aireación (0,2 y 0,4 vvm) y se logró obtener mayor concentración de bioma-

a 0,05 vvm, y una velocidad específica de crecimiento mayor (0,082 d⁻¹) conservando los niveles de oxígeno disuelto superiores al 25 % (Pan, Wang y Zhong 2000). Los niveles más altos en concentración de biomasa y del aminoácido L-3,4-dihidroxifenilalanina, L-DOPA, se obtuvieron en suspensiones de *Stizolobium hassjoo* a 0,06 vvm, a la vez que el efecto de un incremento en la velocidad de agitación no fue tan significativo en la producción de biomasa y del metabolito (Huang, Shen y Chan 2002). A velocidades de flujo tan bajas como 0,05 vvm, no se logró romper la resistencia a la difusión de oxígeno en un medio altamente viscoso como la solución de trabajo de CMC. Esto podría explicar la tendencia casi horizontal de esta línea (0,05 vvm) en la Figura 1.

Cinéticas de crecimiento. La Figura 3 presenta la curva de crecimiento de *A. indica* en erlenmeyers. La velocidad

específica de crecimiento en la fase exponencial fue de $0,09 \text{ día}^{-1}$ y el tiempo de duplicación correspondiente

de 7,7 días. Se alcanzó una concentración celular de $4,7 \text{ g células secas/l}$.

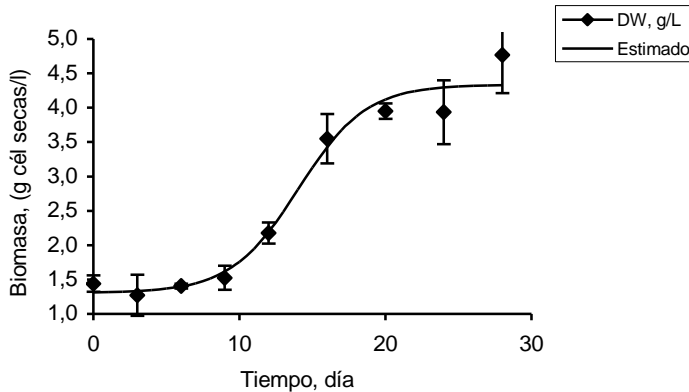


Figura 3. Curva de crecimiento de suspensiones celulares de *A. indica* en erlenmeyers con agitación orbital a 120 rpm.

Comparando las Figuras 1 y 2, y con el propósito de garantizar un adecuado suministro de oxígeno, en cuanto a la capacidad de transferencia de oxígeno ($k_{L,a}$), se seleccionaron las siguientes condiciones de operación para la fermentación en el biorreactor: 120 rpm - 0,4 vvm de aire y 200 rpm - 0,2 vvm. Estas condiciones de operación corresponden a un valor aproximado de $k_{L,a}$ de $1,5 \text{ h}^{-1}$ usando el medio sintético, es cercano al mayor valor de $k_{L,a}$ evaluado a nivel de erlenmeyers para suspensiones de células vegetales y con él se esperaba que el crecimiento celular no fuera limitado por poca disponibilidad de oxígeno disuelto debido a un bajo coeficiente de transferencia de oxígeno. Sin embargo en las primeras condiciones (120 rpm y 0,4 vvm) se presentó una gran sedimentación de los aglomerados celulares y sólo se

incrementó la biomasa 1,5 veces durante el cultivo (datos no mostrados). Esto indica que para la operación del biorreactor, además del $k_{L,a}$, debe garantizarse una adecuada dispersión de sólidos y un suficiente oxígeno disuelto para el crecimiento celular. Adicionalmente, el flujo de aire usado pudo producir un arrastre de metabolitos gaseosos como el CO_2 y el etileno, los cuales juegan un papel importante en el metabolismo de las células vegetales (Pan, Wang y Zhong 2000, Huang, Shen y Chan 2002). Los resultados obtenidos para la operación del biorreactor a 200 rpm y 0,2 vvm se muestran en la Figura 4. Debido a que no se disponía de un electrodo de oxígeno autoclavable, se hizo una medición del sustrato (azúcares reductores) para evaluar si el crecimiento era limitado por el sustrato o por otra

variable en el cultivo. Así, se observó que el crecimiento se detuvo cuando se agotó el sustrato, indicando esto, que el oxígeno no fue el factor limitante para el crecimiento celular. En estas condiciones de operación se alcanzó

una concentración de biomasa de 9,2 g células secas/l, la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial fue de $0,18 \text{ día}^{-1}$ y el tiempo de duplicación correspondiente de 3,8 días.

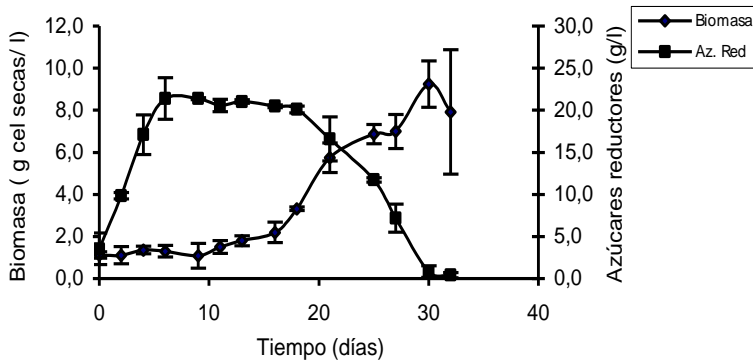


Figura 4. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato de suspensiones celulares de *A. indica* en biorreactor agitado a 200 rpm y 0,2 vvm.

No es claro porqué se obtuvo menor crecimiento en erlenmeyer con respecto al biorreactor, ya que debido al estrés hidrodinámico se esperaría lo contrario. El menor crecimiento a nivel de biorreactor con respecto a erlenmeyers se ha reportado en diferentes cultivos como *Beta vulgaris* L. (Rodríguez *et al.* 2004) o *Taxus chinensis* (Pan, Wang y Zhong 2000). El poco crecimiento de *A. indica* en erlenmeyer probablemente se debió a la insuficiente adaptación de las células al medio líquido. Por el contrario, el material biológico usado en los ensayos del biorreactor tenía mayor edad y una mejor adaptación a la fase líquida. Este fenómeno se ha observado en otros cultivos; así, suspensiones de *E. cinerea*

requirieron inóculos de seis meses de edad antes de adaptarse completamente al medio de cultivo líquido (Orozco, Hoyos y Arias 2002). Otros investigadores han alcanzado concentraciones de biomasa entre 5,5 y 13,0 g células secas/l, en medios dosificados con kinetina y 2,4 D y variando el contenido de fósforo y nitrógeno en el medio de cultivo (Raval *et al.*, 2003), pero no especifican las características morfológicas o la edad de los cultivos.

Tamaño de agregados celulares. La Figura 5 presenta el tamaño de los aglomerados celulares en diferentes condiciones estudiadas. Los resultados se presentan en porcentaje del peso

seco total obtenido. Se observa que las suspensiones agitadas magnéticamente en erlenmeyers con baffles, tuvieron

tamaños de agregados significativamente menores. Estos alcanzaron una concentración de 2,47 g células secas/l.

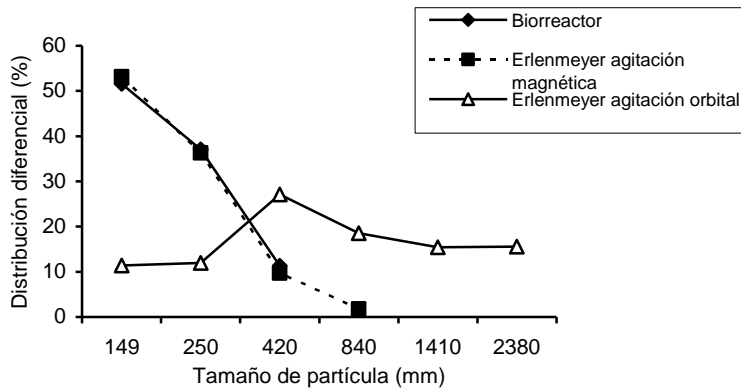


Figura 5. Tamaño de agregados celulares de *A. indica*, 16 días de cultivo en biorreactor, 25 días en erlenmeyers con agitación orbital y con agitación magnética y baffles. 120 rpm, 25°C y oscuridad.

La distribución de tamaño de los aglomerados celulares obtenidos en el biorreactor a 120 rpm, biorreactor a 200 rpm (datos no mostrados) y en erlenmeyers con baffles y agitación magnética son muy parecidos, lo que indica que con este régimen de flujo, prácticamente no se da la formación de aglomerados superiores a 420 μm . La observación microscópica de las células procedentes del biorreactor mostró gran cantidad de fragmentos celulares dispersos en el medio, sugiriendo la sensibilidad de los aglomerados celulares al esfuerzo de cizalladura. En cultivos de células de *Catharantus roseus* se encontró que a velocidades de agitación superiores a 1000 rpm y después de un tiempo de exposición de 5 h, no existían células viables (Scragg, Allan y Lekie 1988). La viabilidad para

Nicotiana tabacum disminuyó del 80 al 70 % variando la velocidad de agitación de 150 a 1000 rpm respectivamente. Cultivos de *Beta vulgaris* conservaron una viabilidad del 80 % con aireación de 0,1 vvm y 400 rpm (Rodríguez y Galindo, 2003). En la actual investigación, esta disminución en el tamaño de agregados no necesariamente está relacionada con la disminución de la viabilidad celular, ya que a 200 rpm se obtuvo un buen crecimiento celular. Sin embargo, el tamaño de aglomerados es un parámetro que debe considerarse para el cambio de escala de los cultivos de *A. indica*, debido a que este parámetro y la morfología celular afectan la reología del cultivo y ésta a su vez, los requerimientos de potencia y la transferencia de masa (Rodríguez *et al.* 2004).

CONCLUSIONES

Las soluciones de CMC pueden ser utilizadas para estudiar variables operacionales de un biorreactor, como $k_{L,a}$, flujo de aire, velocidades de agitación o tiempo de mezclado en biorreactores. Utilizando esta solución, se mostró que la velocidad de agitación y el flujo de aire tuvieron un efecto significativo sobre el $k_{L,a}$ y se propusieron algunas condiciones de operación de un biorreactor de tanque agitado para cultivar células de *A. indica*. A 200 rpm y flujo de aire 0,2 vvm se alcanzó una concentración celular de 9,2 g células secas/L. Sin embargo, el $k_{L,a}$ no debe ser el único criterio a tener en cuenta en las estimación de variables de operación de un biorreactor y también debe considerarse la concentración de oxígeno disuelto, la sedimentación celular y el estrés hidrodinámico. Además, los aglomerados de las suspensiones celulares de *A. indica* mostraron ser sensibles al estrés generado por la agitación y la aireación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a Luisa Fernanda Quintero Cardona, por su apoyo en los experimentos realizados y a los Laboratorios de Bioconversiones y de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

BIBLIOGRAFÍA

Doran, P. M. 1999. Design of mixing systems for plant cell suspensions in

stirred reactors. En: *Biotechnology Progress*. Vol.15, no.3; p. 319-335.

Duarte, A. 1998. Introducción a la ingeniería bioquímica. Bogotá: Unidad de Publicaciones Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, 529 p.

Hooker, B. S., Lee, J. M. and Gynheung, A. 1989. Response of plant tissue culture to a high shear environment. En: *Enzyme and Microbial Technology*. Vol.11, no. 88; p. 484-490.

Huang, S. Y., Shen, Y. W. and Chan, H. S. 2002. Development of a bioreactor operation strategy for L-DOPA production using *Stizolobium hassjoo* suspension culture. En: *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 30, no. 6; p. 779-791.

Kargi, F. and Rosenberg, M. Z. 1987. Plant cell bioreactors: present status and future trends. En: *Biotechnology Progress*. Vol. 3, no. 1; p. 1-8.

Kearney, M. 1994. Antifeedant effects of in vitro culture extracts of neem tree, *Azadirachta indica* against the desert locust (*Schitocerca gregaria* Fosskal). En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 37; p. 67-71.

Kuruville, T., Komaraiah, P. and Ramakrishna, S. V. 1999. Enhanced secretion of azadirachtin by permeabilized mar-gosa (*Azadirachta indica*) cells. En: *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 37, no.11; p. 89-91.

Meijer, J. J., Ten Hoopen, H. J. G., Van Gameren, Y. M., Luyben, K. C. A. M. and Libbenga, K. R. 1994. Effect of hydrodynamic stress on the growth of

plant cells in batch and continuous culture. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 16, no.6; p. 467-477.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. En: Physiologia Plantarum Vol. 15; p. 473-497.

Orozco, F., Hoyos, R. S. y Arias, M. 2002. Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea*. En: Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. 4, no.7; p. 43-48.

Pan, Z. W., Wang, H. Q. and Zhong, J. J. 2000. Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 27; no.9; p. 714-723.

Parrota, J. and Chaturvedi, A. N. 1994. *Azadirachta indica* A. Juss. Margosa, neem. New Orleans, LA: US Department of Agriculture Forest Service, Southern Forest Experiment Station. p. 65-72.

Pepin, M. F., Archambault, J. Chavarie, C. and Cormier, F. 1995. Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: Part I. Shake flask cultures. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 47, no. 2; p. 131-138.

Ramachandra, S. and Ravishankar, G. A.. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. En: Biotechnology Advances. Vol. 20, no. 2; p. 101-153.

Raval, K. N., Hellwig, S., Prakash, G., Ramos-Plasencia, A., Srivastava, A. and Büchs, J. 2003. Necessity of a two stage

process for the production of azadirachtin related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. En: Journal of bioscience and bioengineering. Vol. 96, no. 1; p. 16-22.

Rodríguez-Monroy, M. y Galindo, E. 2003. Las células vegetales frágenes para crecer en biorreactores?. En: Biotecnología (México). Vol. 8, no. 2; p. 6-17.

Rodríguez-Monroy, M., Trejo-Espino, J. L., Jiménez-Aparicio, A., Morante, M., Villarreal, M. L. and Trejo-Tapia, G. 2004. Evaluation of morphological properties of *Solanum chrysotrichum* cell cultures in a shake flask and fermentor and rheological properties of broths. En: Food Technology and Biotechnology. Vol. 42, no. 3; p. 153-158.

Scragg, A. H, Allan, E. J. and Lekie, F. 1988. Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 10; p. 361-367.

Seki, M., Ohzora, CH., Takeda, M. and Furusaki. S. 1997. Taxol (paclitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidata*. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 53, no. 2; p. 214-219.

Tanaka, H. 1987. Large-scale cultivation of plant cells at high density: A review. Process biochemistry. Vol. 22, no. 4; p.106-113.

Tanaka, H. 2000. Technological problems in cultivation of plant cells at high density. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 67, no. 6; p. 775-789.

- Torres, K. C. 1989. Tissue culture techniques for horticultural crops. New York: Van Nostrand Reinhold. 285 p.
- United States Pharmacopeia Convention, Inc. 2002. Particle size distribution estimation by analytical sieving. The Official Compendia USP26-NF21. Vol. 6.2, method 786; p.1-6.
- Van Suijdam, J. C.; Kossen, N. W. F. and Joha, A. C. 1978. Model for oxygen transfer in a sake flask. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 20, no. 5; p.1695-1709.
- Wang, S. J. and Zhong, J. J. 1996. A novel centrifugal impeller bioreactor. Part I. Fluid circulation, mixing, and liquid velocity profiles. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 51, no. 5; p. 511-519.
- Wang, S. J. and Zhong, J. J. 1996. A novel centrifugal impeller bioreactor. Part II. Oxygen transfer and power consumption. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 51, no. 5; p. 520-527.
- Yokoi, H., Koga, J., Yamamura, K., Yasuhiko, S., Seine, Y. and Tanaka, H. 1993. High density cultivation of plant cells in a new aeration – agitation type fermentator, Maxblend Fermentator. En: Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol. 75, no. 1; p. 48 – 52.
- Zhong, J. J., Pan, Z. W., Wang, Z. Y., Wu, J., Chen, F., Takagi, M. and Yoshida, T. 2002. Effect of mixing time on taxoid production using suspension cultures of *Taxus chinensis* in a centrifugal impeller bioreactor. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 94, no. 3; p. 244-250.