



UNIVERSIDAD DEL MAR

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EXTRACTO DE NEEM COMO INDUCTOR EN LA
PRODUCCIÓN DE AMONIO Y ALCALOIDES EN
Fischerella sp TB22.

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO
DE

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA

I.Q. Cynthia Alvarado Alanis

DIRECTORA (INTERNO)

Dra. Ma. Nieves Trujillo Tapia.

CO- DIRECTOR (EXTERNO)

Dr. Roberto Arreguin Espinosa.

Puerto Ángel, Pochutla, Oaxaca, México

Septiembre, 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la jefatura de posgrado de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel, Pochutla, Oaxaca por aceptarme en el posgrado de Maestría en Ciencias Ambientales y ser parte de esta gran familia por dos largos años. En segundo lugar, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (634506, CVU 845213).

Así mismo deseo expresar mi agradecimiento a la directora de esta tesis, Dra. Ma. Nieves Trujillo Tapia, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la guía y la confianza ofrecida desde que llegue al campus, también agradezco su valioso apoyo personal y humano (consejos, risas, etc.), que contribuyeron a mi formación personal y académica.

Por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología y resultados de la extracción de productos naturales mi agradecimiento al Co-Director el Dr. Roberto Arreguin Espinosa y a su pupilo M.C. Esteban López Sampedro, por el material facilitado, las sugerencias recibidas, por sus consejos y apoyo a lo largo de mi pequeña estancia en el laboratorio de biomacromoléculas del instituto de química (I.Q.) de la Universidad Autónoma de México (U.N.A.M.), no resulto como se había planeado pero en verdad gracias por su maravillosa hospitalidad y confianza, fueron pieza clave para el comienzo de este trabajo de tesis.

Gracias al resto de mi comité revisor, Dr. Eustacio, Dr. Estrada y Dr. Edson Robles, por la revisión cuidadosa que han realizado en este texto y sus valiosas sugerencias en momentos de duda.

Dr. Avilés y Dra. Celia Borrero gracias por recibirme y hacerme sentir parte del equipo a lo largo de mi estancia en su Laboratorio de patología vegetal de la Escuela Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Sevilla, España, agradezco el aprendizaje, hospitalidad y la magnífica experiencia (las

pláticas tan amenas, risas, tapas, noches de películas y las mascotas sin dueño del laboratorio).

A mis compañeros de laboratorio los cuales me ilustraron sobre el mundo de las cianobacterias y otros temas, quiero agradecer al M.C. Andrés F. Martínez Rosales, M. en C. Víctor A. Cervantes Urieta y M.C.A. Natividad Tlacotempa Avilés por sus enseñanzas, tips y su valiosa amistad, los aprecio chicos.

Agradezco a mis amigas(os), vecinas(os) y compañeras(os) de posgrado por su apoyo incondicional, consejos y amistad, Alethya, Summer, Daniela, Liliana, Janneth, Perla, Osma, Olivia, Oliva, Laura, Alexander, Luis Enrique, Erick, David, Ángel, Raulito y Lola con quien he compartido proyectos, comidas, aventuras e ilusiones de vida durante estos dos años, por siempre estarán en mi corazón.

A mis profesores de posgrado, mi más sincero agradecimiento a la Dra. Belén Espinoza, Dr. Juan Mentado, Dra. Susana García, Dr. Edson Robles, mi profesor de idiomas M.A. Alexander Lawrence y al personal técnico de laboratorio de la Universidad del Mar la I.Q. Coral, por sus amables comentarios, sugerencias y confianza.

A Dios, gracias por ser mi fiel compañero, te estoy eternamente agradecida por todo lo bueno y lo complicado que viví en esta etapa. Por último, a mi Familia gracias, Ma. Guadalupe, Hector, Hector Iván y Guadalupe por el apoyo incondicional, por su cariño y ánimos, los amo familia nunca me falten.

Atentamente; Cynthia.

RESUMEN

Fischerella sp TB22, es una cianobacteria que pertenece a la familia del Nostoc, subfamilia Hapalosiphonaceae. *Fischerella* sp TB22 habita ríos, lagunas, charcos de agua dulce, presenta ramificaciones en forma de filamentos, es fijadora de nitrógeno atmosférico y generadora de metabolitos secundarios. Actualmente sus metabolitos son utilizados en la agricultura como biofertilizante nitrogenado y plaguicida. A pesar de su importancia ecológica y como biofertilizante no existen suficientes investigaciones acerca de la inducción abiótica en la producción de sus alcaloides y la relación con la fijación de nitrógeno atmosférico en la fase inicial de crecimiento de *Fischerella* sp TB22. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar si el extracto de neem induce la sobre producción de amonio y alcaloides indólicos en *Fischerella* sp TB22. La obtención del extracto crudo de neem se realizó a partir de 10 tratamientos: T1= acetona (C₃H₆O), T2= metanol (CH₃OH), T3= diclorometano (CH₂Cl₂), T4= agua (H₂O), T5= hexano(C₆H₆) y T6= etanol (C₂H₅OH). El T1 presentó un 18% de contenido de extracto y un número de compuestos en el extracto del cual el análisis cromatográfico de gases masas (GC/MS) identificó la presencia de estructuras como el estigmastan-3,5-dieno (C₂₉H₄₈), Fitol (C₂₀H₄₀O), C-sitosterol (C₂₉H₅₀O), estigmasterol (C₂₉H₄₈O) y el 1- monolinoleilglicerol trimetil éter (C₂₁H₃₈O₄). Por lo tanto, la cinética de crecimiento de *Fischerella* sp TB22 se realizó utilizando las siguientes concentraciones C1) 0 mg/L, C2) 50 mg/L, C3) 150 mg/L, C4) 250 mg/L y C5) 500 mg/L de extracto acetónico de neem en medio de cultivo BG11° líquido (Medio sin nitrógeno) y un inóculo al 10% de *Fischerella* sp TB22, distribuidos al azar durante un tiempo de dieciocho días. La producción de amonio se cuantificó por espectrofotometría UV/vis y la producción de alcaloides indólicos intracelulares se cuantificó por el contenido de extracto en peso seco %(p/p) y número de fracciones por cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography). La producción de amonio fue mayor con la concentración de 500 mg/mL de extracto de neem (C5) (138.03 ±0.9 µg/mL) lo que resultó ser 8 veces mayor a los demás tratamientos. La producción de alcaloides indólicos fue a partir del

día 3 de la cinética de crecimiento con la concentración de 0 mg/mL de extracto de neem (C1) (0.041%) y la fracción alcaloide fue de Rf 0.66, pero el mejor rendimiento en peso seco lo obtuvo con la concentración de 500 mg/mL de extracto de neem (C5) (0.087%) sin embargo esta concentración retarda la producción de alcaloides hasta el día 18 de su crecimiento.

A manera de complementar el trabajo se realizó una aplicación *in vitro* con extracto acetónico de neem (T1) y alcaloides indolicos de *Fischerella sp* TB22 (C1) contra los principales hongos patógenos que afectan el crecimiento de la fresa en México y España [*Phytophthora cactorum* (P. 114), *F. oxysporum f. sp fragariae* (F. 74), *Verticillium dahliae* (V. 31) y *Macrophomonia Phaseolina* (M5 mono 04)].

En el control del crecimiento de *Phytophthora cactorum* (P. 114), *F. oxysporum f. sp fragariae* (F. 74), *Verticillium dahliae* (V. 31) y *Macrophomonia Phaseolina* (M5 mono 04) se aplicaron 7 concentraciones de extracto acetónico de neem (T1) (0 ppm, 1000 ppm, 3000 ppm, 5000ppm, 7000 ppm, 6000 ppm y 12000 ppm) y 3 concentraciones de alcaloides indolicos de *Fischerella sp* TB22 (C1) (1000 ppm, 3000 ppm, 6000 ppm), en ambos casos cada concentración se disolvió en medio de agar con dextrosa de patata (PDA), los diámetros de las colonias (cm) se midieron por el método de crecimiento radial y se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR).

La aplicación *in vitro* obtuvo mejores resultados con la concentración de 12000 ppm de extracto acetónico de neem (T1) la cual inhibió el crecimiento de *P. cactorum* (P. 114) (27.8%), *F. oxysporum f. sp fragariae* (F. 74) (29%) y *Verticillium dahliae* (V. 31) (12.7%), y con la concentración de 6000 ppm de alcaloides indolicos producidos por *Fischerella TB22* (C1) se inhibió 6.25% de *F. oxysporum f sp fragariae*, 7.75% de *P. cactorum* y 5.42% de *V.dahliae* incluso se observó el 1.3% de aumento en el crecimiento de *M. phaseolina*.

Se concluye que la concentración C5 es la mejor para la producción de amonio y alcaloides indolicos, además el extracto acetónico de neem (T1) fue el mejor inhibiendo el crecimiento de *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* (F. 74), *Phytophthora cactorum* (P. 114) y *Verticillium dahliae* (V. 31).

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iii
Lista de abreviaturas	ix
i Índice de tablas	x
ii Índice de figuras	xi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	2
2.1 Generalidades de las cianobacterias filamentosas.....	2
2.2 Importancia del nitrógeno.	5
2.2.1 Fijación biológica de nitrógeno por cianobacterias.....	6
2.3 Alcaloides de cianobacterias	7
2.4 Aplicaciones de alcaloides indólicos de <i>Fischerella sp.</i>	10
2.5 Generalidades del árbol de neem (<i>Azadirachta indica A. Juss</i>).....	11
2.5.1 Distribución geográfica.....	11
2.5.2 Terpenos del neem	12
2.6 Aplicaciones de compuestos bioactivos del neem en la agricultura. 15	
2.7 Generalidades de la fresa (<i>fragaria sp</i>).....	17
2.8 Hongos fitopatógenos que atacan a la fresa.....	19
2.8.1 <i>Macrophomina phaseolia</i> (Podredumbre carbonosa del tallo) ..	19
2.8.2 <i>Fusarium oxysporum f. sp. fragariae</i> (fusariosis).....	19
2.8.3 <i>Phytophthora cactorum</i> (Pudrición de la corona)	20
2.8.4 <i>Verticillium dahliae</i> (Marchitez de hojas)	20
3 ANTECEDENTES	21
3.1 Extracción de compuestos activos de neem.....	21

3.2	Crecimiento de cianobacterias.....	22
4	JUSTIFICACIÓN.....	25
5	HIPÓTESIS	26
6	OBJETIVOS.....	27
6.1	Objetivo general.....	27
6.2	Objetivo(s) particular(es).....	27
7	MATERIALES Y METODOS.....	28
7.1	Diseño experimental	28
7.1.1	Cinética de crecimiento de <i>Fischerella sp</i> TB22.	28
7.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
7.3	Zona de recolecta vegetal.....	29
7.4	Preparación del material vegetal	29
7.5	Material biológico.....	29
7.6	Obtención de extracto crudo de neem.....	30
7.7	Detección del número de fracciones en el extracto crudo de neem (Villamil, Naranjo and Van, 2012).	31
7.8	Separación e identificación de terpenos en el extracto de neem.....	32
7.8.1	Purificación de la fracción activa detectada	32
7.8.2	Identificación de los compuestos activos detectados.....	32
7.9	Sistema de cultivo de <i>Fischerella sp</i> TB22	33
7.10	Cinética de crecimiento de <i>Fischerella sp</i> TB22	34
7.10.1	Parámetros evaluados en la cinética de crecimiento	35
7.11	Ensayo <i>in vitro</i> de extracto de neem y alcaloides de <i>Fischerella sp</i> TB22 contra el crecimiento de <i>M. phaseolia</i> (M5 mono 4), <i>F. oxysporum f. sp. fragariae</i> (F. 74), <i>P. cactorum</i> (P. 114) y <i>V. dahliae</i> (V. 31).	39
7.11.1	Sembrado y crecimiento de patógenos.....	39

8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
8.1	Recolecta de material vegetal.....	41
8.2	Determinación del mejor solvente para la obtención de extractos crudos de neem en rendimiento y cantidad de metabolitos.....	41
8.3	Detección del número de compuestos contenidos en el extracto crudo de neem mediante cromatografía en capa fina.	42
8.4	Detección de compuestos tipo terpenos con revelado de vainillina-ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄).....	46
8.5	Identificación de compuestos tipo terpenos mediante cromatografía de gases acoplado a masas.	48
8.6	Efecto del extracto acetónico de neem en el crecimiento y producción de amonio en <i>Fischerella sp</i> TB22.	50
8.6.1	Crecimiento de <i>Fischerella sp</i> TB22 con extracto crudo de neem acetónico.	50
8.6.2	Crecimiento por densidad óptica.....	52
8.6.3	Crecimiento en biomasa peso seco (BPS).....	54
8.6.4	Cuantificación de amonio	56
8.7	Presencia de alcaloides en <i>Fischerella sp</i> TB22.	58
8.8	Determinación de la concentración de extracto crudo de neem que induzca la producción alcaloides de <i>Fischerella sp</i> TB22.....	62
8.9	Aplicación <i>in vitro</i> de extracto de neem y <i>Fischerella sp</i> TB22 para el control de cuatro hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de Fresa de la variedad “Rociera” FNM (Fresas Nuevos Materiales).....	65
9	CONCLUSIONES	68
10	RECOMENDACIONES	69
	LITERATURA CITADA	70
	ANEXOS	83

ANEXO A: Contenido de medio de cultivo BG11°	83
ANEXO B: Preparación de soluciones empleadas.	84
ANEXO C: Precipitaciones de alcaloides en <i>Fischerella sp</i> TB22.....	85
ANEXO D: Curva de calibración de amonio	86
ANEXO E: Preparación de medios de cultivos solidos empleados.	87

Lista de abreviaturas

EBL	Extracto con biomasa liofilizada
EBF	Extracto con biomasa fresca
DCM	Diclorometano
PEP	Fosfoenolpiruvato
E4P	Eritrosa-4-fosfato
DAHP	Ácido-3-deoxy-D-arabinoheptulosónico-7-fosfato
1HCA	Una hora con agitación
PA	Hojas de Puerto Ángel Oaxaca
C #	Concentración No... (1, 2, 3, 4 y 5)
TLC	Thin Layer Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

i Índice de tablas

Tabla 1. Alcaloides de cianobacterias, sus precursores aminoácidos y bioactividad.....	9
Tabla 2. Principales compuestos bioactivos del neem (Gupta et al., 2017)..	13
Tabla 3. Condiciones analíticas del cromatógrafo de gases con acoplamiento a masas JEOL® MS/GC mate (extraído de JEOL USA, Inc.).....	33
Tabla 4. Factor de retención (Rf) de fracciones totales de extractos crudos de neem presentes en placa cromatográfica de 15 cm ²	45
Tabla 5. Factor de retención (Rf) de las fracciones reveladas con vainillina-ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) presentes en placa cromatográfica de 15 cm ²	46
Tabla 6. Rf, Rendimiento total de extractos acetónicos en peso seco % (p/p) y Rf de las fracciones reveladas con vainillina-ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) presentes en placa cromatográfica tamaño de 15 cm ² y 225 cm ²	47
Tabla 7. Distancia de referencia (Rf), compuestos identificación por GC/MS y bioactividad de los extractos de neem.	48
Tabla 8. Factor de retención (Rf) de fracciones totales de extractos crudos de neem presentes en placa cromatográfica de 15 cm ²	59
Tabla 9. Contenido en 100 mL de Stock para el medio de cultivo BG11°.....	83

ii Índice de figuras

Figura 1. Nostocal filamentosa del género Fischerella sp (TB22) (45X). La figura muestra tricomas maduros con ramas laterales (Tric), homogonia (Hom), heterocistos (Het), filamentos (Fil), acinetos (Aci) (Alvarado-Alanis, 2018). ...	4
Figura 2. Terpenos producidos por el árbol de neem y Fischerella sp (imagen personal) (Jahandideh et al., 2017).	12
Figura 3. Síntesis de terpenos en neem (Imagen personal) (Celis et al., 2008; Esparza-Díaz et al., 2010; Garcia, Nicao, González, & Carbonel, 2016; Revathi & Thambidurai, 2017).	15
Figura 4. Cinética de crecimiento con extracto crudo de neem C1(BG11°- N0), C2(BG11°- N50), C3(BG11°-N150), C4(BG11-N250), C5(BG11°-N500) en matraces Erlenmeyer de 500 mL.	28
Figura 5. Rendimientos totales %(p/p) de extracto de neem por un gramo de hoja de neem en peso seco y mayor número de terpenos identificados.	41
Figura 6. Cromatoplaaca con extractos de hojas de neem realizados con solventes de diferentes polaridades, evaluadas con la fase móvil de diclorometano: metanol 19:1 y observadas a) 400 nm (Luz blanca) y b) 254 nm (luz UV).	43
Figura 7. Adición de extracto de neem con las concentraciones; a) C1: 0 mg/L, b) C2: 50 mg/L, c) C3: 150 mg/L, d) C4: 250 mg/L y e) C5: 500 mg/L en 0.15L de BG11° día 9 de crecimiento.	50
Figura 8. Diferencias fisiológicas de los filamentos de Fischerella sp TB22 crecido a 0 mg/L (C1), y 500 mg/L (C5) de extracto acetónico a una escala de 10 µm en el día 9 de crecimiento. La C1 mostró ramificaciones normales vistas a a) 10 X, b) 40 X y c) 100 X. En la C5 no se observaron ramificaciones y aglomeraciones vistas a d) 10 X, e) 40 X y f) 100 X.	51
Figura 9. Cinética de crecimiento por densidad óptica de Fischerella sp TB22 durante un periodo de 18 días con extracto de neem, C1(-○-), C2(--□--), C3(••◇••), C4(-△•) y C5 (—●—).	54

Figura 10. Cinética de crecimiento en biomasa peso seco de <i>Fischerella</i> sp TB22 durante un periodo de 18 días con extracto de neem, C1(-○-), C2(--□--), C3(••◇••), C4(-△•) y C5 (—●—).	56
Figura 11. Cinética de la producción de amonio en <i>Fischerella</i> sp TB22 durante un periodo de 18 días con extracto de neem, C1(-○-), C2(--□--), C3(••◇••), C4(-△•) y C5 (—●—).	58
Figura 12. Fracciones alcaloide de Rf 0.66 con la fase móvil de metanol: etanol: agua (45:45:10) presente en el extracto realizado con metanol al 60% y biomasa liofilizada de <i>Fischerella</i> sp TB22. A) 254 nm (luz corta UV), B) 365 nm (luz alta UV) y C) 400 nm (luz blanca y revelado con Dragendorff's).....	60
Figura 13. Cinética de la producción de alcaloides en <i>Fischerella</i> sp TB22 durante un periodo de 18 días con extracto de neem, C1(-○-), C2(--□--), C3(••◇••), C4(-△•) y C5 (—●—).	64
Figura 14. Efecto in vitro de la adición de extracto de neem sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de <i>M. phaseolina</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> , <i>P. cactorum</i> y <i>V. dahliae</i>	65
Figura 15. Efecto in vitro de la adición de extracto de <i>Fischerella</i> sp TB22 sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de <i>M. phaseolina</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> , <i>P. cactorum</i> y <i>V. dahliae</i>	67
Figura 16. Formación de precipitaciones cristalinas después de la adición de Reactivo Dragendorff's a los extractos de <i>Fischerella</i> sp TB22.	85
Figura 17. Curva de calibración para la determinación de nitrógeno amoniacal (NH ₄ ⁺).	86

1 INTRODUCCIÓN

La industria agrícola requiere de fertilizantes nitrogenados que cumplan con las necesidades de crecimiento y desarrollo como también de protección contra plagas y enfermedades de los cultivos, dicho lo anterior, el producto del crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno como *Fischerella sp* puede aportar compuestos nitrogenados [amonio (NH_4^+)] como también compuestos de control biológico para la defensa de los cultivos (alcaloides y terpenos) y así cumplir con las necesidades de la industria agrícola actuando como sustitutos de los fertilizantes nitrogenados y plaguicidas químicos.

La inducción abiótica en la producción metabólica primaria y secundaria de las cianobacterias por compuestos orgánicos e inorgánicos ha atraído el interés de investigadores. Se ha reportado que la adición de extractos de plantas medicinales, sales inorgánicas (NaOH , NaHCO_3 y CaCO_3) y carbohidratos favorecen principalmente a la producción de metabolitos secundarios como también afectando la producción de metabolitos primarios como es la fijación de CO_2 , clorofila y cantidad de biomasa producida, sin embargo, no en todos los casos ocurre así, en concentraciones altas pueden provocar la muerte del microorganismo (Alonso-Santos, 2015; Chen *et al.*, 2016; Robles Robles, 2017; Solano-Jiménez, 2018). El presente trabajo tiene como objetivo evaluar si el extracto de neem induce la sobre producción de amonio y alcaloides indólicos en *Fischerella sp* TB22.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de las cianobacterias filamentosas.

Las cianobacterias (algas verde azules) son procariotas, gram negativas (Sergeev, Gerasimenko and Zavarzin, 2002) que viven en casi todos los hábitats, desde los océanos, cuerpos de agua dulce, el suelo, superficies de rocas, desiertos, plataformas de hielo, aguas termales, lagos (árticos y antárticos), en forma de endosimbiontes en plantas y varios protistas (Baracaldo, Hayes and Blank, 2005; Quesada and Vicent, 2011). Como resultado de la supervivencia, las cianobacterias ofrecen una variedad de metabolitos con funciones especializadas para competir con éxito en el mundo (Rastogi and Sinha, 2009).

Las cianobacterias presentan diversidad morfológica entre unicelulares (*Chroococcales* y *Pleurocapsales*) y filamentosas con o sin la presencia de heterocistos (*Synechococcales*, *Spirulinales*, *Nostocales* y *Oscillatoriales*) (Fiore *et al.*, 2009).

El grupo de las cianobacterias filamentosas es diverso y morfológicamente complejo. El orden de las Nostocales es el más diversificado, comprende de 11 familias (56 especies): Scytonemataceae (8 especies), Rivulariaceae (5 especies), Tolypothrichaceae (5 especies), Chlorogloeopsidaceae (1 especie), Capsosiraceae (2 especies), Hapalosiphonaceae (10 especies), Stigonemataceae (1 especie), Fortieaceae (5 especies), Gloeotrichiaceae (1 especie), Aphanizomenonaceae (8 especies) y Nostocaceae (10 especies)(Tabla 1) (Komárek and Johansen, 2015).

El orden de las Nostocales son las más estudiadas debido a su diversificación y a que la mayoría de las especies son fijadoras de nitrógeno molecular (N₂) los cuales desarrollan dos tipos importantes de células especializadas: heterocitos y acinetos (Gambacorta *et al.*, 1998).

Los heterocitos: son células especializadas fijadoras de nitrógeno formadas por la necesidad de nitrógeno para su desarrollo, son libres de oxígeno con paredes formadas por cadenas de glucolípidos como el 1-(O-hexosa)-3, 29, 31-dotriacontano triol y 1-(O-hexosa)-29-ceto-3, 31-dotriacontano diol, estas paredes de glucolípidos evitan la inactivación del complejo enzimático nitrógenoasa encargado de la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2) hasta su reducción a amonio (NH_4^+) (Murry and Wolk, 1989). Los heterocitos pueden ser solitarios, en pares o intercalados, así como muestra *Anabaena*, *Fischerella* y *Tolypothrix*, terminales como en *Dolichospermum* incluso en una posición basal como es en el caso de *Dichothrix* y *Gloeotrichia* entre otras (Komárek and Johansen, 2015), morfológicamente seguido de los heterocitos; se encuentran los tricomas los cuales son inversamente proporcionales a los niveles de NH_4^+ y NO_3^- en el producto de su crecimiento de la cianobacteria (**Fig.1**) (Bauersachs *et al.*, 2014).

Los acinetos: son células vegetativas de forma esférica, elipsoidal, cilíndrica cuyas posiciones pueden ser intercaladas o continuas a los heterocitos, se desarrollan a partir de células vegetativas solitarias o por fusión de otros acinetos debido a la resistencia de sus paredes celulares acumulan compuestos fotosintéticos y ADN (ácido desoxirribonucleico) (Rippka *et al.*, 1979) los cuales aumentan durante su desarrollo otorgando la capacidad de sobrevivir en forma aglomerada en condiciones extremas de sequías, temperaturas altas y bajas con la particularidad de desarrollarse cuando las condiciones mejoran (**Fig.1**) (Pineda *et al.*, 2011).

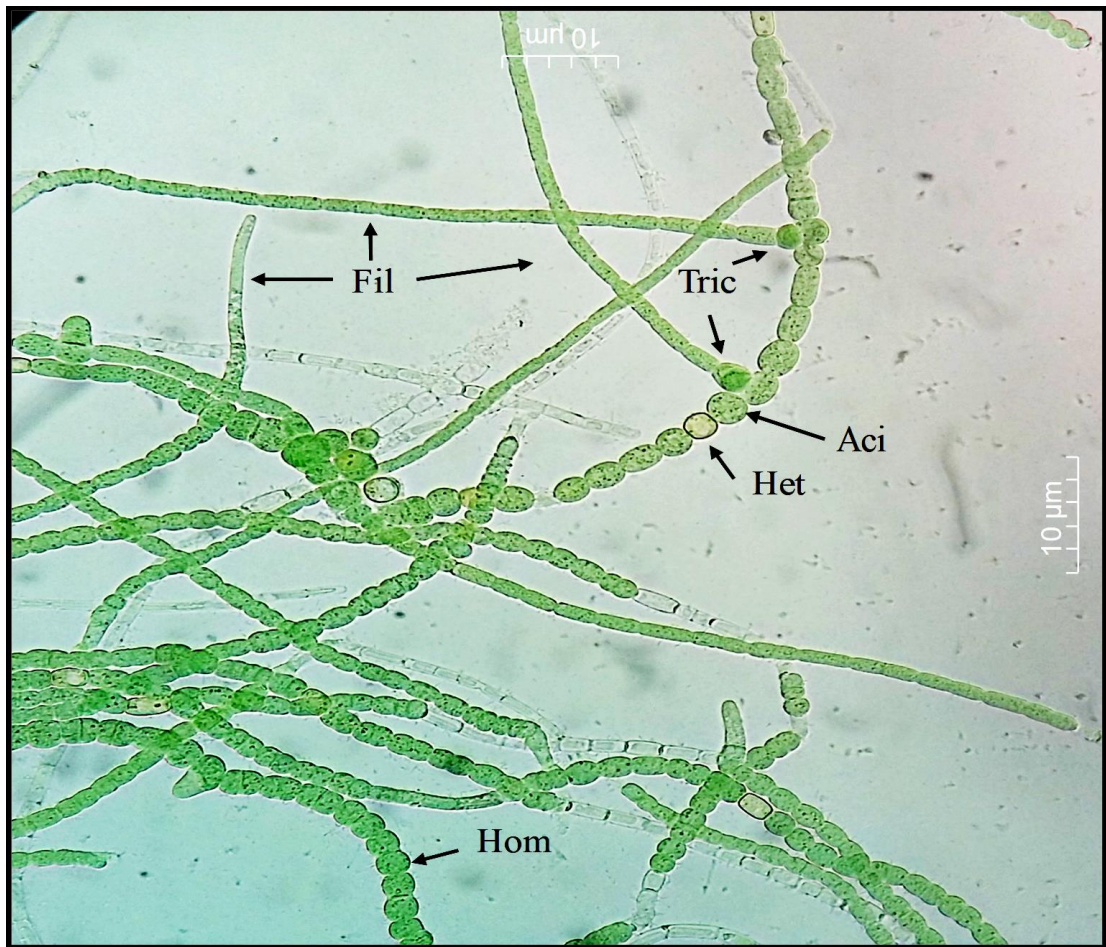


Figura 1. Nostocal filamentosa del género *Fischerella* sp (TB22) (45X). La figura muestra tricomas maduros con ramas laterales (Tric), homogonia (Hom), heterocistos (Het), filamentos (Fil), acinetos (Aci) (Alvarado-Alanis, 2018).

2.2 Importancia del nitrógeno.

Todos los seres vivos requieren de compuestos nitrogenados (CN) (plantas, animales, humanos etc.), los cuales son necesarios para generar ácidos nucleicos (ADN y ARN), sintetizar aminoácidos y proteínas importantes para su desarrollo y permanencia en el mundo. Los CN se adquieren por adsorción a través del suelo y la ingesta de plantas o animales, sin embargo, el 78% del nitrógeno se encuentra de forma no disponible (N=N) en la atmósfera terrestre. El nitrógeno atmosférico (N₂) puede ser convertido por fijación abiótica (luz, radiación UV, erupciones volcánicas y catálisis) o biológica (bacterias y cianobacterias) y de esta manera integrarlo al suelo en forma de amonio (NH₄⁺), amoníaco (NH₃), nitrito (NO₂⁻) o nitrato (NO₃⁻).

En la fijación biológica de nitrógeno, algunas bacterias de las familias *Rhizobium* y *Azotbacter* y cianobacterias; principalmente de la familia *Nostocales* cuentan con enzimas capaces de romper los enlaces múltiples del N₂ como la nitrogenasa (E.C. 1.18.6.1) y reducir el nitrógeno atmosférico (N₂) en compuestos nitrogenados los cuales son almacenados en células especializadas, que posteriormente pueden ser aprovechados por los seres vivos de manera libre o en simbiosis (Ramírez-López, 2009).

La conversión del nitrógeno presente en grupos amino (-NH₂-) o imino (-NH-) es convertido en amonio por los animales los cuales desechan el exceso de nitrógeno en forma de urea, guanina y ácido úrico. Por otra parte, la nitrificación es realizada por bacterias nitrificantes del género *Nitrosomas* que convierten el amonio (NH₄⁺) a nitrito (NO₂⁻) y las bacterias del género *Nitrobacter* que convierten el nitrito (NO₂⁻) a nitrato (NO₃⁻), ambos productos son necesarios para el crecimiento de las plantas. Por último, en la desnitrificación actúan bacterias nitrificantes como las *Pseudomonas denitrificans* las cuales transforman el amonio (NH₄⁺), nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻) a nitrógeno atmosférico (N₂)(Cerón and Aristizábal, 2012).

2.2.1 Fijación biológica de nitrógeno por cianobacterias

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) por organismos diazotróficos como las bacterias, actinomicetos y cianobacterias en nitrógeno orgánico [amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-)], e incorporarlo a sus estructuras celulares o dejarlo disponible para las plantas y otros microorganismos presentes en el suelo, mejorando así la integridad y la calidad de este (Mayz, 2004).

Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno cuentan con un complejo catalítico enzimático nitrogenasa (E.C. 1.18.6.1) (que es responsable de la fijación de nitrógeno atmosférico que consiste en una proteína de molibdeno-hierro (MoFe: dinitrogenasa reductasa) (E.C. 3.2.2.24) y una proteína de hierro-azufre (4Fe-4S: dinitrogenasa reductasa) (E.C. 2.4.2.37) que catalizan la conversión del N_2 a NH_4^+ bajo la reacción general: $N_2 + 10H^+ + 8e^- + nMg\ ATP \rightarrow 2NH_4^+ + H_2 + nMg\ ADP + nPi$ ($n \geq 16$) (Bauersachs *et al.*, 2014) a su vez utilizan típicamente 16 moléculas de ATP para reducir una molécula de nitrógeno atmosférico, metabólicamente tiene un costo energético alto (Smitka *et al.*, 1992). El complejo enzimático nitrogenasa es muy sensible al oxígeno, por ello las cianobacterias del orden *Nostocales*, presentan células especializadas que proporcionan un entorno libre de oxígeno conocidos como heterocitos (Apdo. 2.1 párr. 5) (James, 2017). El nitrógeno fijado biológicamente por cianobacterias genera compuestos como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), estos son asimilados a través de la superficie de hojas y raíces de las plantas (Shariatmadari *et al.*, 2013) estimulando su crecimiento y mejorando la movilización de nutrientes claves (fosforo, potasio y hierro) para su desarrollo (Rashid *et al.*, 2016). Por tal motivo, actualmente la FBN por cianobacterias ha sido aplicada en cultivos agrícolas, aumentando la floración y reduciendo el aborto floral (Hashtroudi *et al.*, 2013), incrementando el desarrollo y el rendimiento de los cultivos y de manera paralela mejora la calidad del suelo (Riahi *et al.*, 2013).

2.3 Alcaloides de cianobacterias

Las cianobacterias, debido a su capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales pueden metabolizar sustancias inorgánicas u orgánicas en productos orgánicos durante su ciclo de vida celular que son utilizados con fines específicos (Calderon, Trujillo and Ramírez, 2016). Estos productos, son asociados a la gran diversidad de actividades encontradas en la producción de sus metabolitos primarios y secundarios (Juárez-Chávez, 2012).

La fijación biológica de nitrógeno y fotosíntesis son considerados metabolitos primarios producidos por cianobacterias; pero la mayoría de los compuestos biológicamente activos producidos por cianobacterias son metabolitos secundarios que pertenecen a grupos de policétidos, amidas, alcaloides, terpenoides, ácidos grasos y péptidos (Ghasemi *et al.*, 2004) que tienen la función de defensa contra otros microorganismos.

Los alcaloides son compuestos secundarios orgánicos sintetizados por células eucariotas y procariontas, nitrogenados (intracíclicos) de carácter básicos de distribución restringida que suelen reaccionar con ácidos orgánicos para formar sales con propiedades alcalinas (Lang, 2003), utilizados en el tratamiento, defensa o prevención de diversos padecimientos humanos como antialérgicos, anticancerígenos, anticoagulantes, antiinflamatorios y antivirales a dosis bajas de concentración (Levitsky *et al.*, 2016). El reconocimiento de las propiedades biológicas que presentan los alcaloides, ha alentado el desarrollo del campo agrícola, por ejemplo, en la búsqueda de nuevas formulaciones de fungicidas, insecticidas, bactericidas y herbicidas (Bhat *et al.*, 2014). Además, la reciente apreciación de diversos efectos biológicos de los alcaloides ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas (Loyola-vargas *et al.*, 2004).

Se conoce un total de 15000 alcaloides, muchos de estos se derivan de los aminoácidos como: la lisina, tirosina y triptófano siendo este último el precursor para los alcaloides de tipo indol representativos o producidos solo por las cianobacterias (**Tabla 1**). Sin embargo, debido a la estructura carbonada inestable de algunos de estos; contienen un componente como es el isopentil fosfato ($C_5H_{12}O_7P_2$) derivado de la ruta de los terpenos para mejorar la estabilidad de la molécula (Lang, 2003; Taiz and Zeiger, 2006).

Los alcaloides indolicos de cianobacterias son de interés múltiple debido a que presentan actividad antibacteriana (Ravi, Srivastava, Singh, et al., 2006a), antitumoral (D'Agostino *et al.*, 2006), alguicida (Volk, 2005), antifúngica (Smitka *et al.*, 1992; Ghasemi *et al.*, 2007), herbicida (Hagmann and Jüttner, 1996), e incluso toxicidad provocando apoptosis en vertebrados de agua dulce (Wright *et al.*, 2006), marinos (Walton and Berry, 2016). Hasta el momento se sabe que la versatilidad de los alcaloides indolicos se deben al isociano ($R-N=C=O$) y al isotiocianato ($R-N=C=S$) que presentan algunas de las estructuras de cianobacterias (Levitsky *et al.*, 2016) por ejemplo el welwitindolinone A, hapalindole (U y Q), ambigua G nitrilo, ambigua D isonitrilo, el 4,4- dihidroxibifenilo, las criptoficinas (A-H), la calothixina A y el 9H-pirido (3,4-b) indol. La aplicación de los alcaloides indolicos de cianobacterias ha resultado ser constante para la defensa de cultivos agrícolas contra enfermedades producidas por bacterias [Pseudomonas (peca de tomate) y Streptomyces (sarna de papa)] y hongos [Fusarium (fusariosis), Colletotrichum (antracnosis), Phytophthora (pudrición de raíces) y Botrytis cinerea (moho gris)] (**Tabla 1**). Sin embargo, hay que considerar que algunos alcaloides indolicos producidos por cianobacterias pueden ser tóxicos por ejemplo la Anatoxina-a, Aplysiatoxina, Lyngbyatoxina-a y Saxitoxina las cuales provocan daños en la piel, hígado y neuronas en seres humanos, por lo tanto se deben identificar y eliminar antes de ser empleados con fines farmacéuticos, nutricionales, agroindustriales etc. (Llopiz, 2016).

Tabla 1. Alcaloides de cianobacterias, sus precursores aminoácidos y bioactividad.

Especie	Alcaloide	Clase de alcaloide	Precursor biosintético	Bioactividad (Levitsky <i>et al.</i> , 2016)	Referencia
<i>Fischerella musicula</i>	Hapalindol (U y Q)	Indol	Triptófano	Antibacterial	(Baran, Maimone and Richter, 2007)
<i>Hapalosiphon welwitschii</i>	Welwitindolinone A	Indol	Triptófano	antibacterial	(Hillwig <i>et al.</i> , 2014)
<i>Hapalosiphon delicatulus</i>	Ambiguina G nitrilo	Indol	Triptófano	Antibacterial y antifúngico	(Huber, Moore and Patterson, 1998)
<i>Hapalosiphon sp</i>	Ambiguina D isonitrilo	Indol	Triptófano	Antifúngico y herbicida	(Koodkaew <i>et al.</i> , 2012)
<i>Nostoc insulare</i>	4-4-dihidroxibifenilo	N/A	Fenol	Alguicida, antibacterial y antifúngico	(Volk and Furkert, 2006)
<i>Nostoc</i>	Criptoficinas (A-H)	N/A	Fenol	Anticancerígeno	(D'Agostino <i>et al.</i> , 2006)
<i>Calothrix</i>	Calothixina A	Indol	Triptófano	Antibacterial	(Doan <i>et al.</i> , 2000)
<i>Nodularia harveyana</i>	9H-pirido-(3.4-b)indol	Indol	Triptófano	Alguicida, antibacterial y antifúngico	(Volk and Furkert, 2006)

2.4 Aplicaciones de alcaloides indolicos de *Fischerella sp.*

Debido a las diversas funciones de los alcaloides indolicos de *Fischerella sp* se han aislado, identificado y aplicado por su actividad como insecticida (12-epi-hapalindol E isonitrilo), fungicida (Fischerindol G isonitrilo), alguicida (Fischerillina B), herbicida (Fischerillina A) y bactericida (Ambiguina H). El alcaloide 12 - epi-hapalindol J isonitrilo ($C_{23}H_{16}N_2$) tiene funciones en el sector farmacéutico como anti-protozoal, anti-neoplásico, anti-eczemático, inmunomodulador del VIH y anti-plasmodium (Levitsky *et al.*, 2016), sin embargo, el 12 - epi-hapalindol J isonitrilo ($C_{23}H_{16}N_2$) no solo ha tenido aplicación en la farmacéutica, también se ha aplicado como insecticida; ya que ataca la pro-hormona esteroide de la 20 - hidroxí - ecdisona (ecdisona) del *Chironomus riparius* (mosquito arlequín) generando una función anti-alimentaria en el individuo (Becher *et al.*, 2007).

Otro tipo de alcaloide indolico es la Fischerellina A ($C_{23}H_{32}N_2O_2$), este, presenta una función antimicótica que actúa sobre la membrana celular de fitopatógenos como el *Uromyces appendiculatus* (Roya), *Erysiphe graminis* (Mildiu del trigo), *Phytophthora infestans* (Mildiu de la papa), *Pyricularia Oryzae* (Tizón del arroz), *Monilinia fructigena* (Monilinia) y *Pseudocercospora herpotrichoides* (Mancha ocular del trigo); por lo que tiene importancia en la agricultura como fungicida orgánico. Así mismo, la Fischerellina A ($C_{23}H_{32}N_2O_2$) actúa como alguicida inhibiendo el fotosistema II de organismos y microorganismos fotosintéticos como: *Synechococcus PCC6911*, *Anabaena PCC 7120*, *Anabaena P-9*, *Scenedesmus subspicatus y obliquus*, *Brachionus calyciflorus*, *Thamnocephalus platyurus* y *Lemna minor* (Hagmann and Jüttner, 1996). Es importante mencionar que, además de ser fungicida y herbicida; Fischerellina A ($C_{23}H_{32}N_2O_2$) tiene usos en la farmacéutica como antineoplásica, antimicrobacterias, antieczemática y antifúngico (Levitsky *et al.*, 2016).

Por otro lado, el alcaloide indolico Hapalindol T actúa como bactericida lo que resulta favorable para la inhibición de *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberculosis), *Enterobacter aerogenes* (otitis media, celulitis y sepsis neonatal), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (neumonía, endocarditis y osteomielitis) y *Salmonella typhi* (Salmonella) (Ravi, Srivastava, Kayastha, Nath, & Singh, 2006b).

2.5 Generalidades del árbol de neem (*Azadirachta indica* A. Juss)

Azadirachta indica A. Juss es nativa de la India, pertenece a la familia Meliaceae; contiene compuestos bioactivos utilizados en sistemas tradicionales de medicina para el tratamiento de enfermedades y, su uso en el control de plagas en cultivos agrícolas (Puri, 1999; Drabu, Khatri and Babu, 2012; Lokanadhan, Muthukrishnan and Jeyaraman, 2012). El árbol de neem se desarrolla mejor en suelos con un pH de 5 a 7.0, en áreas subhúmedas con 1, 200 mm y en áreas húmedas hasta de 2, 000 mm de lluvia anual. Además, tiene la versatilidad de crecer en condiciones semiáridas, cálidas y secas donde se presentan sequías de 6 a 9 meses o años extremadamente secos con 350 mm de lluvia anual (SAGARPA, 2014). El intervalo de temperatura que tolera el árbol es de los 10°C a 50°C, aunque se ha registrado su crecimiento en zonas por debajo de los 10°C, sin embargo; en estas condiciones el árbol reduce su fructificación y la presencia de heladas puede ocasionar su muerte (Patel *et al.*, 2016).

2.5.1 Distribución geográfica

El árbol de neem (latitud 20°39'59.35"N y longitud 78°56'32.42"E) presenta una amplia adaptación en África, Australia, México, Sur de América y en la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Benge, 1989). En México se distribuye en los estados de Yucatán (Nimbiná), Veracruz (Neem), Oaxaca (Neem), Morelos (Neem), Chiapas (Neem), Guanajuato (Neem), Sonora (Margosa), Tabasco (Nim), Tamaulipas (Neem), Durango (Neem o Margosa), Baja California Sur (Neem), San Luis Potosí (Neem) y Nuevo León (Neem) (Xuan *et al.*, 2004).

2.5.2 Terpenos del neem

Al igual que en la cianobacteria *Fischerella sp*, la planta del neem sintetiza compuestos bioactivos durante todo su ciclo de vida; los cuales, presentan una amplia actividad biológica. Los metabolitos primarios destinados al crecimiento (carbohidratos, lípidos y fotosíntesis), mientras que; los secundarios que mejoran su capacidad de sobrevivencia durante y después de su crecimiento (alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos) (**Fig.2**) (Harborne, 1993; Bernhoft, 2010).

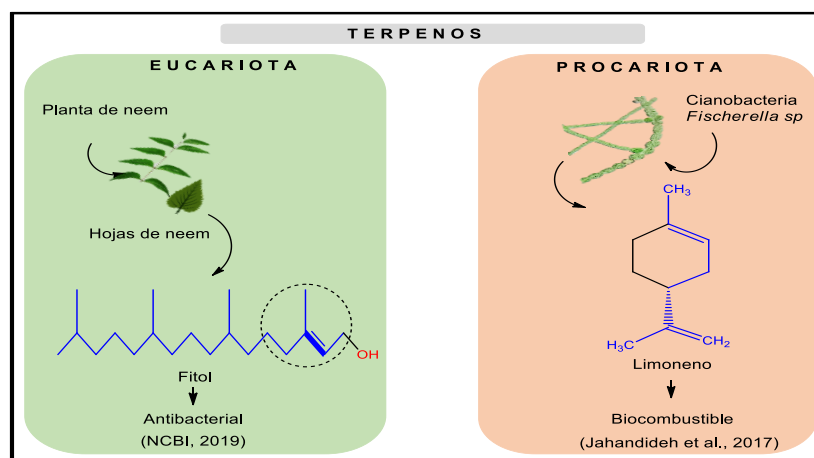


Figura 2. Terpenos producidos por el árbol de neem y *Fischerella sp* (imagen personal) (Jahandideh *et al.*, 2017).

Hasta el 2017, se han identificado alrededor de 300 compuestos bioactivos del árbol de neem, entre los que destacan: sequiterpenos, flavonoides, monoterpenos, terpenos, policétidos y alcaloides (**Tabla 2**) (Gupta *et al.*, 2017) entre ellos los más utilizados son los terpenos también llamados isoprenos debido a que sus estructuras están constituidas por unidades de isopreno seguidas por la ciclación y los reordenamientos del esqueleto de carbono con una característica empírica conocida como regla de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno (C₅H₈)) (Ludwiczuk, Skalicka-Woźniak and Georgiev, 2016).

Tabla 2. Principales compuestos bioactivos del neem (Gupta *et al.*, 2017).

Nombre del compuesto	Tipo de compuesto	Bioactividad
Azadirona	Triterpeno	Citotóxico Insecticida
Azadiractina	Tetraterpeno	Bactericida
Sugiol	Diterpeno	Antiviral Antineoplásico Antioxidante
Estigmasterol	Esterol	Citotóxico
beta-sitosterol	Esterol	Anticancerígeno
Quercetina	Flavonol	Anticancerígeno
Nimbolide	Triterpeno	Anticancerígeno
Dipropil sulfuro	Sulfuro	Irritante
Nimbina	Triterpeno	Insecticida Fungicida

2.5.2.1 Biosíntesis de terpenos en neem.

La mayoría de los terpenos del neem se forman a través de la vía del ácido mevalónico (MEV) y la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que operan dentro del citosol y en los cloroplastos, respectivamente. En la vía del ácido mevalónico (MEV) tres moléculas de acetil-CoA generan difosfato de isopentenilo (IPP) (C5) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP)(C5), la condensación de ambos compuestos forma terpenos de mayor tamaño por otra parte, en la ruta del metileritritol fosfato (MEP) se produce a partir del ácido pirúvico y del gliceraldehido 3-fosfato el 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato precursor para la formación de difosfato de isopentenilo (IPP)(C5) (Taiz and Zeiger, 2006).

La acción de las preniltransferasas en conjunto con el difosfato de isopentenilo (IPP)(C5) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP)(C5) sintetizan precursores de terpenos como: geranil difosfato (GPP), farsenil difosfato (FPP) y geranilgeranil difosfato (GGPP), que son los precursores de los monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15) y diterpenoides (C20), respectivamente.

Por otro lado, los sesquiterpenos (C25), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40) tienen como precursores al difosfato de isopentenilo (IPP)(C5), monoterpenoides (C10) y diterpenoides (C20) (Muffler *et al.*, 2011). Los carotenoides, son los tetraterpenos más comunes; sin embargo, el árbol de neem sintetiza limonoides (C40), y la “azadiractina” es su principal representante; y hasta hoy en día es el compuesto bioactivo más estudiado por su gran versatilidad en el control de patógenos del cual existen alrededor de 28 variantes diferentes (**Fig.3**) (Ludwiczuk *et al.*, 2017).

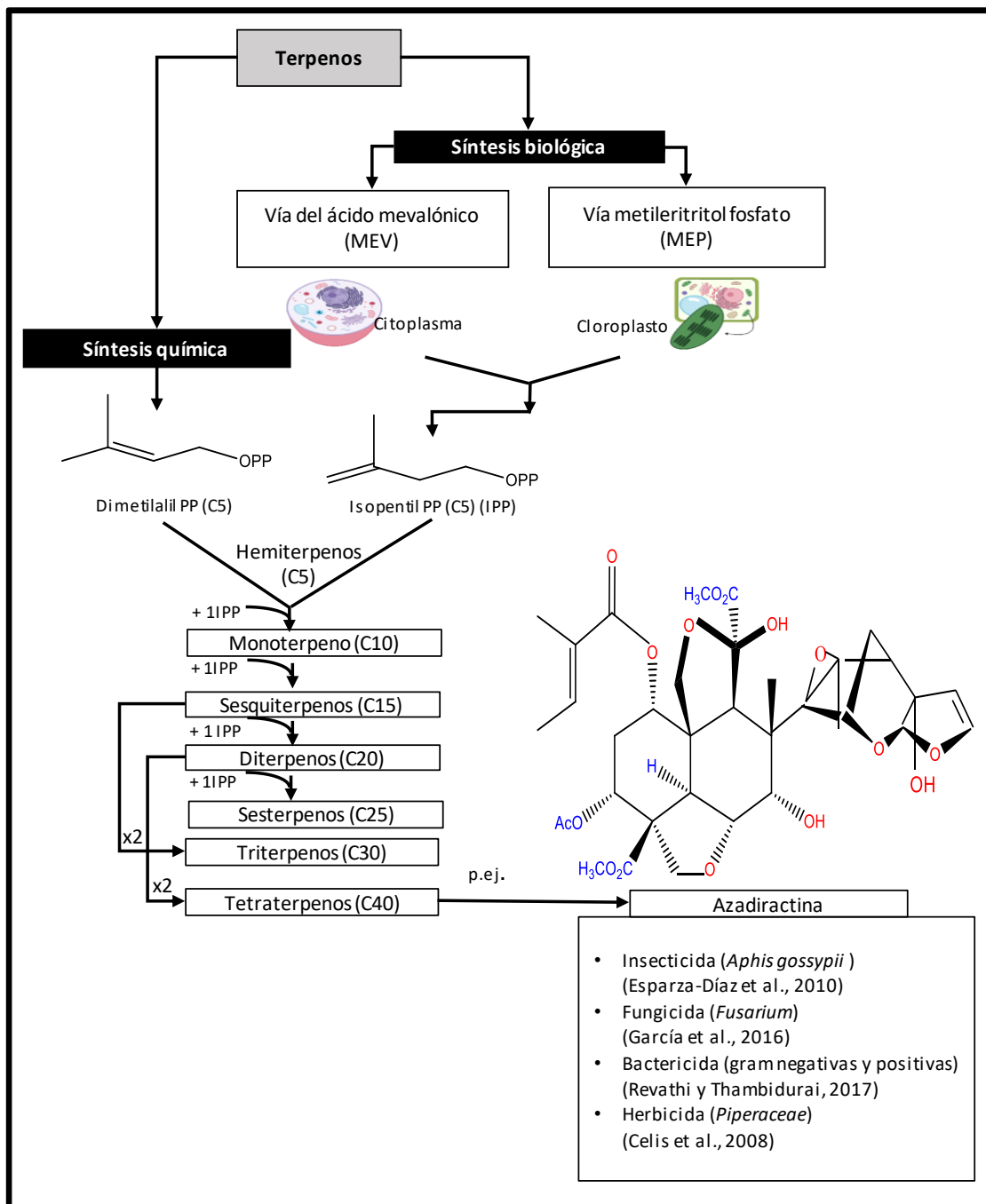


Figura 3. Síntesis de terpenos en neem (Imagen personal) (Celis et al., 2008; Esparza-Díaz et al., 2010; Garcia et al., 2016; Revathi and Thambidurai, 2017).

2.6 Aplicaciones de compuestos bioactivos del neem en la agricultura.

El árbol de neem es reconocido por ofrecer diversas soluciones de problemas agrícolas, ambientales y de salud. En la agricultura las propiedades naturales

del neem en cantidades pequeñas no tienen ninguna reacción tóxica, por lo cual son útiles para la protección y el manejo de las plantas.

Los terpenos producidos por el neem son utilizados para formular una amplia variedad de productos agrícolas como: aceites insecticidas (Grow Depot ®) y fungicidas (Productos de neem ®), fertilizantes (Organic Fertilizer- Orgo Neem ®), compostas (tortas de neem) (Orgo Neem cake ®), agentes de recubrimiento con urea y para el acondicionamiento de los suelos con deficiencias nutricionales (Neemle Agro UREA-NEEM BG ®) (Lokanadhan, Muthukrishnan and Jeyaraman, 2012)

La aplicación de los productos fungicidas a base de terpenos de neem en cultivos de arroz (*Oryza sativa*) y trigo (*Triticum sp*) promueve el aumento de la eficiencia y sostenibilidad de los nutrientes del cultivo, mejorando el control de enfermedades como la quemazón (*Pyricularia grizae*) y la roya (*Puccinia triticina*) que se observan después de la cosecha evitando el daño fisiológico, patológico y económico (Gupta *et al.*, 2017; Shabana *et al.*, 2017).

2.7 Generalidades de la fresa (*fragaria sp*).

Fragaria sp. llamada comúnmente como fresa o frutilla es nativa de los Alpes, es una planta de tipo herbáceo, pertenece al género de plantas rastreras estoloníferas de la familia Rosaceae: contiene vitamina C (ácido ascórbico), vitamina B1 (Tiamina), vitamina B2 (Riboflavina), vitamina B3 (Niacina), vitamina B5 (Ácido pantoténico), vitamina B6 (Piridoxina), potasio (K), hierro (Fe), vitamina B9 (ácido fólico), vitamina E, vitamina K, Fosforo (P), y minerales (Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Manganeso (Mn), Sodio (Na), Zinc (Zn) (Arroyo *et al.*, 2018). La fresa se desarrolla mejor en los meses de enero a abril en áreas con una humedad del 70% al 74 %, en un rango de temperatura de 18°C a 25°C con un fotoperiodo 12:12 horas de luz solar y oscuridad (Bolda *et al.*, 2015).

Fragaria sp. está extendida en los cinco continentes, siendo España y México los mayores exportadores del mundo (SAGARPA, 2017). España es el primer exportador mundial de fresa con una exportación anual de 344.2 miles de toneladas (Mt), la cual genera una importación anual del 55.21% en Francia, 50.46% en Reino Unido, 61.85% en Italia, 59.16% en Suiza, 19.39% en Bélgica y 0.42% en otros [Estados Unidos (0.01%), Canadá (0.04%), Brasil (0.31%), China y Hong Kong (0.09%)] y su producción prevalece en la zona de Andalucía, Huelva, España (El Rompido (*fragaria FMN*), Cartaya, la Barca y el Rincón) (Chamorro-Rodríguez, 2014).

Por otra parte, México es el segundo exportador mundial de fresa, con una producción anual de 468.25 miles de toneladas (Mt) de las cuales 232.25 Mt (49.59%) es para consumo nacional y 253.66 Mt (52.20%) se exportan principalmente a Estados Unidos (247.9 Mt), Canadá (4.1 Mt), Brasil (0.7 Mt) y otros (1.1 Mt) (España, China y Hong Kong) y su producción del tipo *Fragaria L.* prevalece en zonas del norte (Baja California Sur y Baja California Norte), centro (Colima, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nayarit, Querétaro, Zacatecas, Aguascalientes, CDMX, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Tlaxcala) y sur (Oaxaca) de México (SAGARPA, 2017).

En México la fresa se ve afectada por diversos microorganismos principalmente los hongos patógenos (*Macrophomina phaseolia*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora fragariae*, *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Cylindrocladium* spp., *Ramularia* spp. y *Verticillium dahliae*, entre otros...) que provocan síntomas como el marchites de hojas y pudrición del tallo y raíces en la planta de fresa y pérdidas mayores al 50 %, equivalente a 156.083 Mt un tercio de lo que se produce actualmente en México por año (Mariscal-Amaro *et al.*, 2017).

2.8 Hongos fitopatógenos que atacan a la fresa.

Los principales cuatro hongos patógenos que residen en el suelo y atacan a *Fragaria sp.* son *Macrophomina phaseolia* (Podredumbre carbonosa del tallo), *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* (Marchites de raíces), *Phytophthora cactorum* (Podredumbre de la corona) y *Verticillium dahliae* (Marchites de hojas).

2.8.1 *Macrophomina phaseolia* (Podredumbre carbonosa del tallo)

M. phaseolina es un hongo patógeno que posee una alta capacidad saprófita, que lo convierte en un patógeno competitivo, frente a otros organismos (Plantas, bacterias y hongos)(Leyva-Mir *et al.*, 2015). En fresa ocasiona el marchites y/o muerte de las hojas hasta la muerte de la planta, en los tejidos internos de las plantas de fresa se puede apreciar una coloración marrón oscuro a anaranjado en la zona vascular de la corona e incluso, puede provocar necrosis en las raíces (Avilés *et al.*, 2008). La podredumbre carbonosa, puede verse favorecida por condiciones de alta temperatura (25°C a 35°C) y baja humedad en suelo (50% a 70%), así como por la combinación de estrés climático, déficit de agua en suelo, textura de suelo ligera (arenosa), y/o el estrés asociado al desarrollo de su huésped, condiciones que provocan un rápido desarrollo de esta enfermedad en la planta de fresa (Chamorro *et al.*, 2015) La morfología de la colonia de *M. phaseolina* es esponjosa, blanco, micelio aéreo, márgenes estrechos de la colonia, y coloración gris a negro en la parte inferior de la colonia (Pastrana, 2014).

2.8.2 *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* (fusariosis)

F. oxysporum f.sp. fragariae infecta las raíces y crece en el tejido vegetal (xilema). El crecimiento de la fungosis generada por fusarium afecta el tejido vegetal (xilema) y la respuesta de la planta impiden el flujo de agua hacia el brote, lo que contribuye al desarrollo de síntomas, incluidos el retraso del crecimiento, el marchitamiento y la muerte incluso pueden sufrir graves retrasos en el desarrollo y no producir frutos (Henry *et al.*, 2016).

La fungosis generada por *F. oxysporum f.sp. fragariae* se ve favorecida por condiciones de temperatura (20°C a 25°C) y baja humedad en suelo (50% a 70%), la morfología de la colonia de *F. oxysporum f.sp. fragariae* es esponjoso, blanco, micelio aéreo, márgenes estrechos de la colonia, y coloración rosa claro a rojo-morado en la parte inferior de la colonia (Borrero *et al.*, 2017).

2.8.3 *Phytophthora cactorum* (Pudrición de la corona)

La infección por *P.cactorum* se observa en el centro de la corona de la planta, la cual adquiere una coloración rojiza a café oscuro, las lesiones crecen y dejan de ser funcional afectando el flujo de agua y nutrientes de la planta lo cual genera la marchitez y el secado completo de la planta (INDAP and INIA, 2017). La pudrición de la corona se ve favorecido por condiciones de temperatura (19°C a 25°C) y baja humedad en suelo (50% a 70%), la morfología de la colonia es esponjoso, blanco, micelio aéreo, márgenes estrechos de la colonia, y coloración blanca en la parte inferior de la colonia (Alcals, 2008).

2.8.4 *Verticillium dahliae* (Marchitez de hojas)

V. dahliae penetra las raíces de las plantas y crece dentro del tejido vegetal (xilema), produciendo micelio y esporas que generan que el flujo de agua disminuya lo cual conduce al estrés hídrico, también genera achicamiento de la planta, cambios de coloración de las hojas de amarillento a marrón hasta la marchitez de la planta (Bolda and Koike, 2020). La marchitez de hojas se ve favorecida por condiciones de temperatura (21°C a 27°C) y baja humedad en suelo (50% a 65%), la morfología de la colonia es esponjoso, blanco, micelio aéreo, márgenes estrechos de la colonia, y coloración blanca a verde-grisáceo en la parte inferior de la colonia (Gordon and Subbarao, 2007).

3 ANTECEDENTES

3.1 Extracción de compuestos activos de neem.

La extracción de compuestos activos se realiza a través de solventes orgánicos como metanol, acetona, etanol y agua (Villamil, Naranjo and Van, 2012) mediante métodos convencionales [difusión (sólido-líquido), partición (líquido-líquido) y Soxhlet (extracción continua)]. Estos métodos experimentales son inocuos con el medio ambiente debido a su forma de operación. Los métodos no convencionales (ultrasonido, pulsaciones de campo eléctrico, digestión enzimática, extrusión, calentamiento por microondas y óhmico, fluidos supercríticos y aceleradores de disolventes) que a diferencia de los convencionales; mejoran el rendimiento global y la selectividad de los compuestos activos (Azmir *et al.*, 2013). Sin embargo, la eficiencia de la extracción de estos compuestos bioactivos dependerá del tiempo de manipulación, pH, capacidad amortiguadora, temperatura de almacenamiento, y la cantidad y tipo de producción metabólica de compuestos activos de la planta. La combinación de métodos de extracción convencionales y no convencionales surge como alternativa por que mejoran los tiempos de extracción (El tiempo depende del procedimiento) consumo de energía. Al-Hashemi & Hossain, 2016, utilizaron la extracción por difusión obtuvieron 11.15 g de extracto metanólico (140 g de hojas de neem: 250 mL de metanol: 3 días) de los cuales 0.0885 g/mL (10.62 g de extracto de metanólico: 120 mL de agua destilada) fueron empleados para la extracción por partición por lo cual obtuvieron; 2.34 g (butanol), 0.22 g (hexano), 0.24 g (acetato de etilo), 1.28 g (cloroformo) y 1.35 g (agua) de extracto de neem y combinaron los métodos convencionales de difusión y partición con butanol, hexano, acetato de etilo, cloroformo y agua para la identificación de la actividad antioxidante de los extractos de neem. Mediante estos métodos, el extracto butanólico con el 90.97% de actividad antioxidante empleando 200 µg/mL de extracto butanólico de neem. Los compuestos identificados de los extractos de neem fueron alcaloides, esteroides, flavonoides, taninos, saponinas y aminoácidos presentes en todas las polaridades de los extractos crudos de hojas de neem excepto antraquinona y triterpenos. Un mejor manejo del

extracto de neem puede perfeccionar la separación de todos los compuestos activos del neem presentes e incluso poder conocer la estructura del compuesto activo por lo que se hace necesario la detección de los compuestos presentes en el extracto. La detección de compuestos activos es ampliamente utilizada debido a las cantidades menores o igual a ≤ 1 mg de muestra empleado para el análisis, generalmente se realiza por cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography) debido a que el tiempo que se necesita para realizar las separaciones es mucho menor y pueden usarse reveladores corrosivos (Villamil, Naranjo and Van, 2012; Vega-jarquín, 2014), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) (Salazar *et al.*, 2015; De Paula *et al.*, 2016) y por espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) debido a su exactitud sin embargo este último requiere un mayor tiempo ya que aprovecha los núcleos atómicos de cada elemento presente en la molécula sensible a la RMN y perturbar la molécula, lo cual nos permite elucidar la estructura e identificar el compuesto activo (Chatterjee *et al.*, 2010; Kurimoto *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2016).

3.2 Crecimiento de cianobacterias.

Las cianobacterias se cultivan como alimento para consumo humano y animal, así como para la obtención de compuestos activos utilizados en formulaciones para la industria farmacéutica y agrícola. La necesidad de compuestos activos para el desarrollo y protección de los seres vivos requieren de formulaciones más simples, mismas que; pueden ser modificadas con compuestos orgánicos e inorgánicos estimulando el aumento de la producción de compuestos activos con el fin de ofrecer una alternativa biológica y complacer con las demandas de consumo. Los trabajos acerca de la adición de compuestos orgánicos e inorgánicos en el crecimiento de cianobacterias no son comunes y su acceso es limitado, sin embargo, se tienen registros que la adición de azúcares como la glucosa-6-fosfato no es limitante para el crecimiento, pero genera un efecto estimulante sobre la fijación de CO₂ (2.4 $\mu\text{mol/mg Chl-a-h}$) y la capacidad de oxidación de NADPH (30 $\mu\text{mol/mg proteína-h}$) en *Anabaena flos-aquae* lo que

indica que puede ser asimilado por el microorganismo y ser dependiente importante en la fotosíntesis para su captación limitada de energía (Rubin, Zetooney and McGowan, 1977), Por otra parte, la capacidad de asimilación de la glucosa-6-fosfato se le atribuye a la enzima 2-ceto-3-desoxigluconato-6-fosfato (KDPG) aldolasa (E.C. 4.1.2.14), enzima clave de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y Entner-Doudoroff (ED) presentes en eucariotas fotosintéticas como en el caso de *Synechocystis*, siendo la vía Entner-Doudoroff (ED) más eficiente en condiciones mixotróficas (luz/glucosa) (Chen *et al.*, 2016).

Por otra parte, las condiciones ambientales para el cultivo de cianobacterias son importantes; la aireación (4 L/min) y la irradiación (6200 lux) durante el crecimiento de *Fischerella sp* TB22 al día 9 de la cinética de crecimiento promovió un aumento en la producción de amonio, teniendo 34.5 µg/mL (Ramírez-López, 2009). Sin embargo, Alonso-Santos en el 2015 propone el crecimiento de *Fischerella sp* TB22 encapsulada con alginato de *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) y carbonato de sodio (Na₂CO₃) donde obtuvo 45.28 µg/mL de amonio libre en un periodo de 9 días, 30% más que lo obtenido por Ramírez-López (2009) con cianobacterias sin encapsular; la elaboración de encapsulados de *Fischerella sp* TB22 con alginato de sodio, más un recubrimiento de quitosano y la recuperación de medio de cultivo cada tercer día en el crecimiento de *Fischerella sp* TB22 estimuló la producción de amonio a 529.1 µg/mL, doce veces más, que lo obtenido por Alonso-Santos y quince veces más a lo producido por Ramírez-López (Martínez-Rosales, 2020).

Por otro lado, Jahandideh et al., (2017) adicionaron nitrógeno en forma de nitrato de sodio (NaNO_3) en el medio de crecimiento de *Fischerella sp* aumentó de 1.8 a 55.5 mg/L/h la producción del metabolito limoneno cíclico ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$) el cual es utilizado como biogás lo que resultó en una producción anual de 1, 000, 000 L/año y una alternativa prometedora de la aplicación de productos secundarios activos de *Fischerella sp*

En el 2012 Juárez-Chávez, evaluó la actividad antifúngica con los metabolitos presentes en *Fischerella sp* TB22 extraídos, con solventes de distintas polaridades de arrastre. El extracto de *Fischerella sp* TB22, con Metanol: Cloroformo (2:1) inhibió en su totalidad (100%) el crecimiento de *Colletotrichum sp.* presente en guanábana; la presencia y actividad de los metabolitos bioactivos sintetizados por *Fischerella sp* TB22 (Juárez-Chávez, 2012).

Hagmann & Jüttner, (1996) aislaron “Fischerellina A” de *Fischerella muscicola* UTEX 1829 y se probó *in vitro* que inhibe el crecimiento al 100% de *Erysiphe graminis*, 80% de *Phytophthora infestans*, 80% de *Pyricularia sp.*, 30% de *Monilinia fructigena* y 30% *Pseudocercospora herpotrichoides* a una concentración de 1000 ppm y 100% *Uromyces appendiculatus* a una concentración de 250 ppm e *in vivo* inhibió el 74% del crecimiento de *Lemna minor* y el 98% del fotosistema II. Por otro lado, Ravi, Srivastava, Singh, et al., (2006b) identificaron y aislaron Hapalindole T de *Fischerella sp* el cual se probó *in vitro* inhibiendo 40 mm el crecimiento de *S.aureus*, 18 mm el crecimiento de *P. aeruginosa*, 13 mm el crecimiento de *E.coli*, 15 mm el crecimiento de *S. typhi* y 20 mm el crecimiento de *E. aerogenes* a una concentración de 30 g/mL. Sin embargo, en el 2016 Walton y Berry aislaron 12-epi-hapalindole H isonitrilo y 12-epi-ambiguine B nitrilo de *Fischerella* 52-1 los cuales se probaron *in vivo* inhibiendo 100% el embrión de pez cebra (*Danio rerio*) a una concentración del 10 $\mu\text{g/mL}$.

4 JUSTIFICACIÓN

Las cianobacterias, tienen una versatilidad metabólica, que les permite no solo modificar su creciente o decreciente producción de compuestos primarios y secundarios, si no también adaptarse para crecer en diferentes condiciones ambientales. Dicho lo anterior las cianobacterias son consideradas una alternativa favorable para dar solución a problemas agrícolas y biotecnológicos; por lo tanto, los diferentes compuestos producidos por las cianobacterias en combinación con los compuestos producidos por el árbol de neem (*Azadiracta indica* A. Juss) pueden actuar como posibles inductores metabólicos en *Fischerella* sp TB22, o bien potencializar las características de *Fischerella* sp TB22 como biofertilizante y biofungicida.

5 HIPÓTESIS

La adición de extracto crudo de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) inducirá en *Fischerella* sp TB22 un incremento de hasta 10 veces en la producción de NH_4^+ y la producción de alcaloides en la fase inicial de crecimiento.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto de neem en la producción de amonio y alcaloides en *Fischerella sp* TB22.

6.2 Objetivo(s) particular(es)

- 1) Determinar el mejor solvente para la obtención de extractos crudos de neem en rendimiento y cantidad de metabolitos.
- 2) Detectar el número de compuestos contenidos en el extracto crudo de neem mediante cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography).
- 3) Identificar los posibles compuestos terpenoides mediante cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS, por sus siglas en inglés Gas Chromatography–Mass Spectrometry).
- 4) Evaluar el efecto del extracto crudo de neem en el crecimiento y producción de amonio en *Fischerella sp* TB22.
- 5) Determinar la concentración de extracto crudo de neem que induzca la producción alcaloides de *Fischerella sp* TB22.
- 6) Aplicar *in vitro* extracto de neem y alcaloides de *Fischerella sp* TB22 contra el crecimiento de *Macrophomina phaseolia* (M5 mono 4), *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* (F. 74), *Phytophthora cactorum* (P. 114) y *Verticillium dahliae* (V. 31).

7 MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en cuatro etapas, en cuatro laboratorios de tres instituciones académicas diferentes: 1) Laboratorios de Biotecnología ambiental y Acuicultura de la Universidad del Mar (U.MAR) campus Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2) Laboratorio de biomacromoléculas No.3 del instituto de Química (I.Q.) de la Universidad Autónoma de México (U.N.A.M.) y 3) Laboratorio de patología vegetal de la Escuela Superior de Ingeniería Agronómica de Sevilla, España.

7.1 Diseño experimental

7.1.1 Cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22.

Para el crecimiento, producción de amonio (NH_4^+) y alcaloides de *Fischerella sp* TB22 se evaluaron las siguientes concentraciones C1) 0 mg/L, C2) 50 mg/L, C3) 150 mg/L, C4) 250 mg/L y C5) 500 mg/L de extracto crudo de neem (N) en medio de cultivo BG11° líquido (Medio sin nitrógeno) (ANEXO A) (Fig.4); El extracto crudo de neem fue extraído de 10 g de material vegetal. Las condiciones aplicadas en el cultivo de *Fischerella sp* TB22 fueron fotoperiodo (12:12), irradiación (6200 lux), aireación (Flujo 4 L/min), Temperatura (28-30°C) e inóculo del 10% de la cepa.

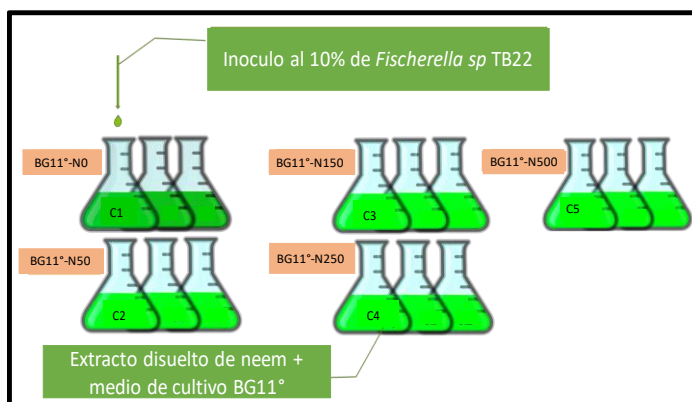


Figura 4. Cinética de crecimiento con extracto crudo de neem C1(BG11°- N0), C2(BG11°- N50), C3(BG11°-N150), C4(BG11°-N250), C5(BG11°-N500) en matraces Erlenmeyer de 500 mL.

7.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó en Statistical versión No.7 donde se aplicó análisis de ANOVA; una vía (rendimientos de extractos), medias repetidas (biomasa peso seco, densidad óptica y producción de amonio) y Kruskal-Wallis (producción de alcaloides).

7.3 Zona de recolecta vegetal

Las hojas de neem se recolectaron en los meses de abril y mayo del año 2018 debido a la temporada de floración y fructificación del árbol de neem. Los árboles de neem se encuentran ubicados dentro de las instalaciones de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel, Oaxaca (Latitud 15°39'59.17"N y Longitud 96°29'28.77"O). El clima predominante de la zona es cálido con una temperatura de 33°C a 35°C, humedad relativa de 66% y vientos de 21 km/h, con pronósticos de lluvias y huracanes en los meses de mayo a noviembre (González, 2005).

7.4 Preparación del material vegetal

Las hojas frescas de neem se lavaron con hipoclorito de sodio (NaClO) (Cloralex® al 43.2%), se secaron a temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas y dentro de un horno (FELISA®) de 50 a 60°C durante 12 horas y se trituraron en un molino (KRUPS® modelo No. F203 70 51 - 4004) hasta tener un polvo fino de hojas secas.

7.5 Material biológico.

El inóculo de *Fischerella sp* empleado en este trabajo fue aislado de un consorcio de cianobacterias, obtenido de un suelo cultivado con papaya en el municipio de Santa María Huatulco, Oaxaca (Martínez Aguilar, 2010) y con número de registro TB22.

Los patógenos utilizados para la aplicación in vitro del extracto acetónico de neem y los alcaloides de *Fischerella sp* TB22 fueron replicados de cultivos puros con dos semanas de crecimiento y se mantuvieron en placas de agar

con dextrosa de patata (PDA) para *Verticillium dahliae* y *Macrophomina phaseolia*, medio de asparagina- malta- agar (AMAP) para *Fusarium oxysporum* sp *fragariae* y medio de 8 vegetales (V8) para *Phytophthora cactorum* a 25 °C (ANEXO D).

7.6 Obtención de extracto crudo de neem

Para la obtención de extracto crudo de hojas de neem se evaluaron 6 tratamientos T1= acetona (C₃H₆O), T2= metanol (CH₃OH), T3= diclorometano (DCM) (CH₂Cl₂), T4= agua (H₂O), T5= hexano(C₆H₆) y T6= etanol (C₂H₅OH) donde se colocó un gramo de polvo fino de hojas de neem en un vaso de precipitado de 50 mL y 5 mL de cada uno de los tratamientos durante una hora en agitación con pastilla magnética en un agitador magnético (THERMO SCIENTIFIC™ CIMAREC™ modelo: SP142025) por duplicado.

Los extractos de cada tratamiento se filtraron a través de una membrana (WHATMAN® No.4 de 20-25 µm de poro) a vacío y se evaporaron hasta sequedad y se cuantificó el porcentaje del rendimiento en peso seco (RPS) %(p/p) donde FPCE es el peso constante del frasco con extracto y FPC es el peso constante del frasco sin extracto (Ec.1). Posteriormente se almacenaron en frascos ámbar a 4°C hasta su uso.

$$\%RPS = \frac{FPCE - FPC}{FPC} \times 100 \dots \text{Ec. 1}$$

7.7 Detección del número de fracciones en el extracto crudo de neem

(Villamil, Naranjo and Van, 2012).

Los extractos crudos de neem se redisolviéron con 5 mL del solvente con el que fueron extraídos; acetona (C₃H₆O), metanol (CH₃OH), diclorometano (DCM) (CH₂Cl₂), agua destilada (H₂O), hexano(C₆H₆) y etanol (C₂H₅OH), respectivamente y se visualizaron en cromatoplasmas de hoja de aluminio recubiertas de sílica gel (SiO₂) (60 F₂₅₄ MERCK®) con tamaño de 15 cm² y un indicador fluorescente a una longitud de onda corta de 254 nm como fase estacionaria, antes de utilizarlas se activaron de 60 a 70°C por 5 minutos en un horno eléctrico (FELISA®).

La separación de las fracciones presentes en los diferentes extractos se emplearon cuatro fases móviles: 1) diclorometano: acetona (9:1), 2) diclorometano: metanol (19:1), 3) hexano: acetona (5:1) y 4) hexano: acetona (7:3). El R_f ("factor de retención") se calculó mediante la siguiente expresión matemática $Rf = \frac{(X)}{(Y)}$ donde (X) es la distancia recorrida por el compuesto sobre (Y) que es la distancia recorrida por la fase móvil. La detección de compuestos tipo terpenos se llevó a cabo con luz UV a una longitud de onda corta (254nm), y se confirmó con un revelado con vainillina-ácido sulfúrico (H₂SO₄) el producto de la reacción refleja una coloración rojiza a morado.

7.8 Separación e identificación de terpenos en el extracto de neem

Para la separación de la fracción reactiva a la vainillina-ácido sulfúrico (H_2SO_4) presentes en el extracto acetónico, se concentró el extracto acetónico hasta su totalidad y se re-disolvió con 5 mL de acetona el cual se colocó en una cromatoplaça de hoja de cristal recubierta de silica gel (SiO_2) (60 F₂₅₄ MERCK®) con tamaño de 225 cm² y un indicador fluorescente a una longitud de onda corta de 254 nm como fase estacionaria y fase móvil de diclorometano: metanol relación 19:1, posteriormente se aplicó un revelador de vainillina-ácido sulfúrico (H_2SO_4) sobre 1 cm del borde de la placa para identificar y corroborar la fracción detectada reactiva, por último se separó y pulverizó el resto de la fracción reactiva que no tuvo contacto con el revelador.

7.8.1 Purificación de la fracción activa detectada

El pulverizado de silica gel (SiO_2) con la fracción reactiva del extracto acetónico se colocó en una columna cromatográfica de 5x50 cm a la cual se le introdujo como empaque una almohadilla de algodón desengrasado donde se realizaron 4 lavados de 5 mL con diclorometano: acetona en una relación 1:1 hasta la separación total de la fracción activa detectada y la fase estacionaria de silica gel (SiO_2). Posteriormente, en un vial de cristal se evaporó hasta sequedad la relación de solventes [diclorometano: acetona (1:1)] de la fracción activa, por último, la fracción activa se re-disolvió con 1 mL de acetona y se resguardo hasta su uso.

7.8.2 Identificación de los compuestos activos detectados

La fracción activa a cetónica previamente purificada se pipeteo 0.5 mL de la fracción activa previamente purificada la cual se evaporó en un vial hasta sequedad y se re disolvió con 10 µL de acetona grado HPLC posteriormente se inyectaron 5 µL de la fracción activa purificada en un cromatógrafo de gases acoplado a masas JEOL® MS/GC mate bajo condiciones analíticas del equipo en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones analíticas del cromatógrafo de gases con acoplamiento a masas JEOL® MS/GC mate (extraído de JEOL USA, Inc.).

Condiciones del cromatógrafo de gases (GC)	
Columna	CP-Sil88 60m x 0.25 m, espesor de película 0.1 µm
Temperatura del horno	56°C (30 min)
Inyección	5 µL de muestra
Condiciones del sistema de masas (SM)	
Resolución	3, 000 (10% altura del valle)
Conmutador	Campo eléctrico
Detector de voltaje	600 V
Preamplificador	X 100
Atenuador	1/16
Tiempo de ciclo	0.44 s
Voltaje de ionización	40 V

7.9 Sistema de cultivo de *Fischerella sp* TB22

El cultivo de *Fischerella sp* TB22 se realizó en dos sistemas de cultivo:

1. Se utilizaron como biorreactores 15 matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapones doblemente horadados a los cuales se les introdujo tubos de vidrio de 15 cm (0.5 cm Ø) y 5 cm (0.35 cm Ø) de largo para la entrada y salida del aire, respectivamente. En la entrada del tubo de aire se colocó un filtro de carbón activado y algodón, posteriormente al extremo final del filtro se colocó una manguera de látex (0.5 cm Ø y 0.05 m L) conectada directamente a la válvula de salida de aire (4 L/min).

2. El segundo sistema de cultivo se hizo un escalamiento de 1000 mL a 5 garrafones de vidrio de 20 L como biorreactores con tapas de plástico horadadas y una manguera de plástico de 1.5 m de largo (1 cm Ø y 0.6 cm Ø), la entrada de la manguera de plástico contaba con un soporte de peso, para asegurar que el burbujeo del aire se distribuya en toda la cavidad del garrafón, el otro extremo de la manguera de plástico se conectó directamente en la válvula de salida de aire (4 L/min).

Para los dos sistemas de cultivo le intervalo de temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ fue medido con un reloj higrotermómetro (EXTECH® 445702), el flujo de 4 L/min de aire fue medido con un flujómetro de acrílico (Cole-Parmer® SS 316 03229-01), y la irradiación de 6200 ± 100 Lux se mantuvo con 6 lámparas de tubo fluorescente de luz blanca y una potencia de 75 Watts (PHILIPS® G75T8) esta irradiación fue verificada con un medidor de luz lux (Luxímetro Sper Scientific® 840020) (Ramírez-López, 2009).

7.10 Cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22

En la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22, cada matraz Erlenmeyer contó con 150 mL de medio de cultivo BG11° líquido (medio sin nitrógeno) (ANEXO A) y un inóculo sonicado del 10% de *Fischerella sp* TB22 (3 mg biomasa/L = 15 mL de inóculo) en la fase exponencial de su crecimiento para favorecer su capacidad de adaptación con la adición del extracto de neem evitando así la muerte celular de la cianobacteria, también se realizó un cultivo semicontinuo (recuperando 5% (v/v) del medio de cultivo BG11°) y se monitorearon cada tercer día durante un periodo de 18 días.

Para el segundo cultivo, cada garrafón conto con 10 litros de medio de cultivo BG11° líquido, un inóculo sonicado del 1% de *Fischerella sp* TB22 (30 mg biomasa/L = 100 mL de inóculo) y se realizó un cultivo semicontinuo (recuperando 10% (v/v) del medio de cultivo BG11°), el crecimiento de *Fischerella sp* TB22 se monitoreo durante un periodo de 32 días y se evaluaron métodos de extracción de alcaloides de cada cultivo.

7.10.1 Parámetros evaluados en la cinética de crecimiento

Los parámetros evaluados durante la cinética de crecimiento fueron: 1) Crecimiento por densidad óptica (Arredondo *et al.*, 2017) y biomasa en peso seco (Tredici *et al.*, 1991), 2) Producción de amonio con la determinación de nitrógeno amoniacal (NH_4^+) (APHA-AWA-WPCF, 1992) y 3) Producción de alcaloides totales intracelulares por cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography) (Hagmann and Jüttner, 1996) los cuales se llevaron a cabo como se describen a continuación.

7.10.1.1 Densidad óptica (Arredondo *et al.*, 2017).

Se colocó 1 mL de cultivo de *Fischerella sp* TB22 y 1 mL de medio BG11° en un tubo falcón de 15 mL, el cual se sónico en un sonicador (Cole-Parmer® Ultrasonic Cleaner 08849 – 00) durante 1 minuto y por triplicado, posteriormente se agitó en un vortex (GENIE® 2 G560-120V) durante 30 segundos. A continuación, se procedió a la lectura de la muestra en un espectrofotómetro PerkinElmer UV/vis Lambda 365 a una longitud de onda de 550 nm una vez finalizada la lectura se resguarda la muestra para su posterior uso.

Las diferentes concentraciones de extracto crudo de neem afectaron la determinación de densidad óptica por lo tanto se optó por restar la absorción equivalente a cada concentración de extracto acetónico de neem disuelto en 150 mL del medio de cultivo (BG11°) a los datos obtenidos durante la cinética de crecimiento.

7.10.1.2 Biomasa en peso seco (Tredici *et al.*, 1991).

En un vaso de precipitado de 100 mL se añadieron 50 mL de agua destilada acidificada con ácido clorhídrico concentrado (HCl) hasta un pH de 4 donde se lavó un papel filtro (WHATMAN® No.1 Ashless (42.5 mm Ø)) con 11 μm de poro y se colocó sobre una charola de aluminio, el cual se secó en una estufa (FELISA®) a 70°C durante 24 horas para obtener el peso constante. Una vez que el peso es constante se procedió a filtrar la muestra resguardada en la determinación de densidad óptica en un sistema de filtración (Thermo Scientific™ Nalgene™ (PFS) 15 PSI modelo 300-4050).

El papel filtro se colocó nuevamente en la charola de aluminio donde se introdujo en la estufa a 70°C durante 24 horas y 2 horas en el desecador. Se tomó el peso del papel filtro y la biomasa en peso seco (BPS) se obtuvo por diferencia de peso en donde P2 es el peso seco constante del filtro en miligramos, P3 el peso seco del filtro con muestra miligramos y VF el volumen de la muestra filtrada en mililitros (Ec. 2).

$$BPS \text{ (mg / mL)} = \frac{(P2-P3)}{VF} \dots \text{ Ec. 2}$$

7.10.1.3 Producción de amonio en *Fischerella sp* TB22.

7.10.1.3.1 Curva de calibración de amonio.

La curva de calibración se realizó con alícuotas de 0, 0.2, 0.4, 0.6, y 0.8 µg/mL de una solución patrón de cloruro de amonio (NH₄Cl) al 0.007 N. Las cinco alícuotas se colocaron por separado en matraces aforados de 10 mL y se aforaron con agua destilada obteniendo así cinco soluciones estándar las cuales se resguardaron para su uso posterior.

7.10.1.3.2 Cuantificación de nitrógeno amoniacal (NH₄⁺)(APHA-AWA-WPCF, 1992).

Se tomaron 5 mL del producto de crecimiento de *Fischerella sp* TB22 y 5 mL de solución estándar (Apdo. 7.10.1.3.1) las cuales se colocaron en 6 tubos de ensayo de 10 mL respectivamente, posterior a esto se añadieron a cada tubo de ensayo 50 µL de sulfato de magnesio (MgSO₄), 500 µL de hipoclorito de sodio (NaClO) y 600 µL de solución fenato (ANEXO B) seguidamente se agitaron (VORTEX-GENIE®2 G560-120V) durante 30 segundos y se dejaron reposar durante 10 minutos. Pasado el tiempo de reposo se observó una coloración azul para los tubos con solución estándar (curva de calibración) y verde azulado para el tubo con producto de crecimiento de *Fischerella sp* TB22, estas coloraciones permanecieron estables por 24 horas. Las lecturas de cuantificación de amonio (NH₄⁺) se realizaron en un espectrofotómetro de UV/vis (PerkinElmer® Lambda 365) a una longitud de onda de 630 nm.

7.10.1.4 Extracción básica de alcaloides (Hagmann and Jüttner, 1996).

Para la extracción básica de alcaloides se utilizó biomasa fresca (EBF) y liofilizada (EBL). La producción de alcaloides en la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22 se utilizó biomasa liofilizada (EBL) en ambos casos se aplicó la metodología siguiente.

Se disolvieron 100 mg de *Fischerella sp* TB22 (fresca o liofilizada) en 10 mL de metanol al 60% y 99.8% respectivamente con pastilla magnética en un agitador magnético (THERMO SCIENTIFIC™ CIMAREC™ modelo: SP142025) durante 30 minutos y por triplicado, inmediatamente después se filtraron a través de un papel filtro (WHATMAN® No.11 con poro de 11 µm) en un sistema de filtración a vacío; con el fin de separar la fase con metanol (fase líquida) y la biomasa (el residuo).

Los extractos metanólicos se colocaron en frascos ámbar a peso constante a los cuales se agregaron 5 mL de éter etílico [(C₂H₅)₂O] al 99.7% y 10 mL de agua destilada respectivamente seguido de una agitación manual durante 30 segundos después los extractos se vaciaron en embudos de separación donde se agitaron manualmente durante 30 minutos separando dos fases.

Las fases de éter etílico se vaciaron en frascos ámbar a peso constante donde se evaporaron hasta sequedad con un flujo de aire constante y se disolvieron con 5 mL de metanol al 99.8% los cuales se almacenaron para su posterior uso. La detección de las fracciones se realizó por cromatografía en capa fina (TLC).

Para la separación de las fracciones se utilizaron cinco fases móviles; 1) hexano: acetato de etilo (1: 1), 2) metanol: etanol: agua (45: 45: 10), 3) tolueno: acetona: metanol: hidróxido de amonio al 28% (170 :60 :12 :1), 4) diclorometano: metanol al 96% (19: 1) y 5) acetona: agua (5: 2) y se procedió a calcular el factor de retención (Rf) (Apdo. 7.7, párr.2) por último con luz UV a una longitud de onda corta (254 nm) y con revelado de reactivo *Dragendorff's* se confirmó la presencia de alcaloides (ANEXO B).

7.11 Ensayo *in vitro* de extracto de neem y alcaloides de *Fischerella sp* TB22 contra el crecimiento de *M. phaseolia* (M5 mono 4), *F. oxysporum f. sp. fragariae* (F. 74), *P. cactorum* (P. 114) y *V. dahliae* (V. 31).

Para el ensayo *in vitro* se emplearon 9 frascos Duran® con capacidad total de 1 L, cada frasco contó con 700 mL de agua destilada y 27.3 g de medio dextrosa-agar-patata (PDA) los cuales se esterilizaron en autoclave (FELISA® FE-398P) con tapón de algodón desgrasado y se dividieron en 9 grupos; 5 con extracto de neem ([1000 ppm], [3000 ppm], [5000ppm], [7000 ppm] y [12000 ppm]), 2 con alcaloides de *Fischerella sp* TB22 ([3000 ppm] y [6000 ppm]) y 2 controles sin extractos.

Para cada grupo se utilizaron 10 placas Petri de plástico estériles (90 mm x 12 mm) con inyección de 10 mL (ICO clara®-Jena glass) del medio de cultivo respectivamente y se mantuvieron en un intervalo de temperatura de 25 ±2°C a 28 ±2°C en frigorífico hasta su posterior uso.

7.11.1 Sembrado y crecimiento de patógenos.

La siembra para cada patógeno se realizó a partir de cultivos puros de dos semanas de crecimiento [medio de agar- dextrosa de patata (PDA) para *Verticillium dahliae* (V. 31) y *Macrophomina phaseolia* (M5 mono 4), medio de asparagina- malta- agar (AMAP) para *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* (F. 74) y medio de 8 vegetales (V8) para *Phytophthora cactorum* (P. 114) a 25 °C (ANEXO D), con una lanceta previamente esterilizada se colocó sobre el agar gelificado un disco del inóculo de 0.5 cm de diámetro cortados con un sacabocados de cobre. Las placas se mantuvieron a 25 ±0.2°C en una incubadora frigorífica (Ing. Climas® Modelo: Grow Chamber) durante un periodo de 7 días para *Macrophomina phaseolia* (M5 mono 4), *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* (F. 74), *Phytophthora cactorum* (P. 114) y durante un periodo de 30 días para *Verticillium dahliae* (V. 31) debido a su lento crecimiento.

El diámetro de las colonias (cm) se midieron por el método de crecimiento radial con una regla graduada así mismo se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) donde “R” es el radio del patógeno en placa Petri sin extracto y “r” el radio del patógeno en placa Petri con extracto (Ec. 3).

$$PICR = \frac{R-r}{R} \times 100 \dots \text{Ec. 3}$$

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Recolecta de material vegetal.

En total se seleccionaron 8 árboles de neem de los cuales, se escogieron y recolectaron al azar 524.25 g de hojas frescas de neem las cuales se secaron y se trituraron hasta tener 184.8 g de polvo fino de hojas de neem.

8.2 Determinación del mejor solvente para la obtención de extractos crudos de neem en rendimiento y cantidad de metabolitos.

Los extractos de neem reflejaron un rendimiento (%p/p) en peso seco, diclorometano (17%), hexano (17%). Sin embargo, la capacidad de interacción de la acetona con los metabolitos presentes en el extracto resultó tener una mejor interacción reflejado en el rendimiento en peso seco con acetona (18%).

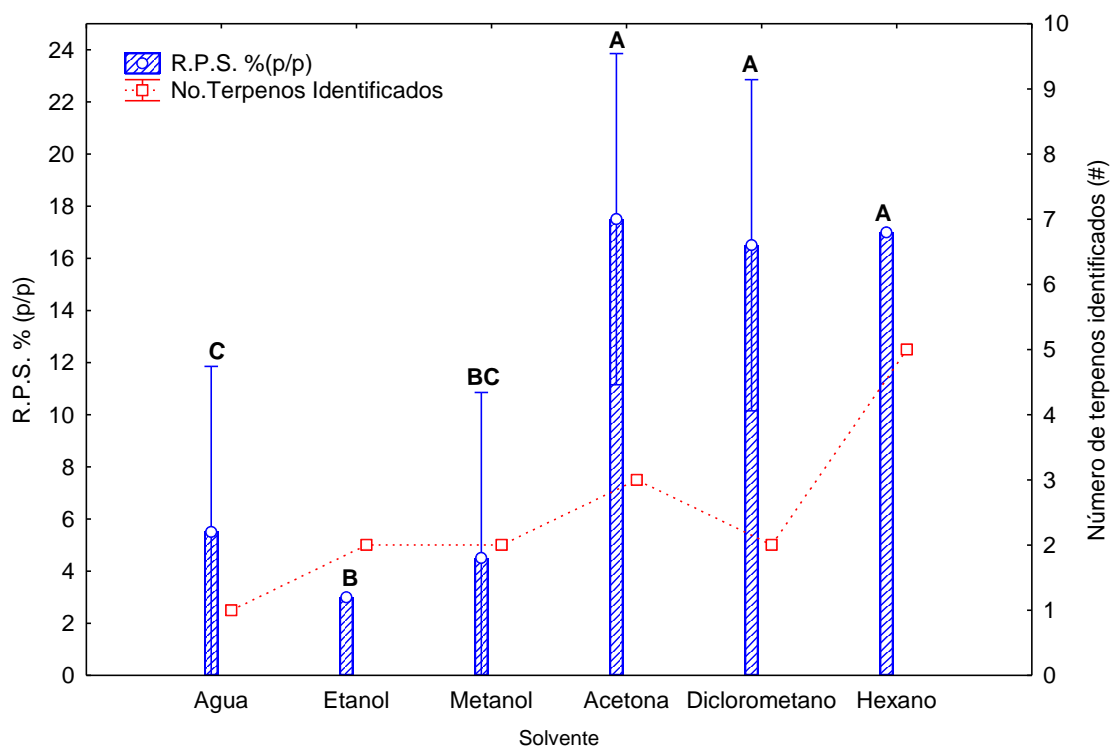


Figura 5. Rendimientos totales % (p/p) de extracto de neem por un gramo de hoja de neem en peso seco y mayor número de terpenos identificados.

En cambio, el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba de tukey de grupos homogéneos no demostró diferencias significativas entre los extractos realizados con acetona, diclorometano y hexano (A) pero si fueron significativas ($p < 0.05$) entre los extractos realizados con etanol (B), agua (C) y metanol (BC) (**Fig. 5**).

Al-Hashemi & Hossain (2016) realizaron extractos metanólicos de neem (140 g de hojas pulverizadas de neem en 260 mL de metanol) empleando el método de maceración durante un tiempo de extracción de 72 horas; con lo anterior obtuvieron un rendimiento de 1.84% (0.0796 g)(%p/p) en peso seco, de manera semejante Hossain, Al-Toubi, Weli, Al-Riyami, & Al-Sabahi, (2018) realizaron un extracto metanólico de neem (127 g de hojas pulverizadas de neem en 500 mL de metanol) bajo las mismas condiciones de tiempo de extracción que Al-Hashemi & Hossain (2016) obteniendo un rendimiento 1.85% (0.0800 g) (%p/p) en peso seco. En ambos casos las hojas de neem fueron recolectadas de Nizwa, Omán, Asia en los meses de marzo (2014) y febrero (2015), respectivamente. Sin embargo, en el presente estudio, los rendimientos en peso seco de los extractos metanólicos con 1 g hojas pulverizadas de neem en 10 mL de metanol y 3 horas de extracción por agitación, se obtuvo un rendimiento de 2.6 veces más que Al-Hashemi y colaboradores en el 2016 y, Hossain y colaboradores en el 2018. Este incremento, es posible que se deba a la época de recolección de hojas de neem (abril y mayo, 2018), periodo de floración y desarrollo de sus frutos o bien, el incremento pudo haberse debido a la agitación constante que facilitó la interacción del metanol con el polvo de neem.

8.3 Detección del número de compuestos contenidos en el extracto crudo de neem mediante cromatografía en capa fina.

Mediante la cromatografía de capa fina (TLC) y de acuerdo con cada una de las fases móviles se observaron un total de 185 fracciones; 40 fracciones con hexano: acetona (7:3), 33 fracciones con hexano: acetona (5:1), 50 fracciones

con diclorometano: acetona (9:1) y 62 fracciones con diclorometano: metanol (19:1), de estas últimas 44 fracciones fueron diferentes entre sí.

El análisis ANOVA Kruskal-Wallis seguido del test de Media para grupos independientes mostró que la fase móvil de hexano: acetona (7:3) no difiere estadísticamente al número de fracciones observadas entre cada uno de los extractos realizados con agua, etanol, metanol, acetona, diclorometano y hexano ($p < 0.05$), sin embargo, con la fase móvil de hexano: acetona (5:1) el análisis estadístico si mostró diferencias significativas al número de fracciones observadas entre los extractos realizados con hexano (8 fracciones) y agua (1 fracción), por otra parte, la fase móvil de diclorometano: acetona (9:1) mostró diferencias significativas en el número de fracciones observadas entre los extractos realizados con diclorometano (11 fracciones) y agua (1 fracción), por último la fase móvil de diclorometano: metanol (19:1) también demostró diferencias significativas en el número de fracciones observadas entre los extractos de acetona (17 fracciones) y agua (3 fracciones)(**Fig.6**).

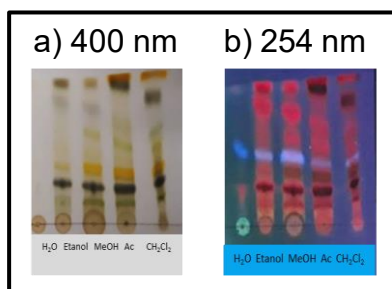


Figura 6. Cromatoplaaca con extractos de hojas de neem realizados con solventes de diferentes polaridades, evaluadas con la fase móvil de diclorometano: metanol 19:1 y observadas a) 400 nm (Luz blanca) y b) 254 nm (luz UV).

En el presente estudio, se observaron fracciones con Rf de 0.2, 0.47, 0.53, 0.57 y 0.6 en el extracto etanólico de neem con las cuatro fases móviles evaluadas, así mismo en el extracto metanólico de neem se observó una fracción de Rf 0.6 con fase móvil de diclorometano: acetona (9:1) y una fracción de Rf 0.5 con fase móvil de diclorometano: etanol (19:1).

Por otra parte, en el extracto con acetona se observaron fracciones de Rf 0.47, 0.5 y 0.6 con fase móvil de hexano: acetona (7:3), Rf 0.47 con fase móvil de hexano: acetona (5:1), fracciones de Rf 0.6 con fase móvil de diclorometano: acetona (9:1) y con fase móvil de diclorometano: metanol (19:1) una fracción de Rf 0.5. En cambio, el extracto de neem realizado con diclorometano mostró fracciones de Rf 0.5, 0.53, 0.57 y 0.6 con fase móvil de hexano: acetona (7:3) y con fase móvil de diclorometano: metanol (19:1) fracciones de Rf 0.5 y 0.6, por otra lado, el extracto de neem realizado con hexano mostró fracciones de Rf 0.57 y 0.5 con la fase móvil de hexano: acetona (5:1), fracciones de Rf 0.53 y 0.57 con la fase móvil de diclorometano: acetona (9:1) y fracciones de Rf 0.5 y 0.6 con fase móvil de diclorometano: metanol (19:1) (**Tabla 4**). Aunque los procedimientos de extracción de Pandey, Verma, & Singh, (2014) son diferentes, se utilizaron como comparación los Rf de los compuestos que obtuvieron de un extracto etanólico de hojas de neem 6 fracciones; las cuales identificaron la presencia de β -sitosterol (Rf 0.53), lupeol (Rf 0.6), rutina (Rf 0.57), ácido elágico (Rf 0.22), quercetina (Rf 0.47) y el ácido ferúlico (Rf 0.5). Los Rf's muestran la presencia de flavonoides, terpenos, taninos y fenoles y coincide con lo reportado cualitativamente por Al-Hashemi & Hossain, (2016).

Tabla 4. Factor de retención (Rf) de fracciones totales de extractos crudos de neem presentes en placa cromatográfica de 15 cm².

Fase móvil Solvente	Hexano: Acetona (7:3)	Hexano: Acetona (5:1)	Diclorometano: Acetona (9:1)	Diclorometano: Metanol (19:1)
Agua	-	0.1	0.43	0.20, 0.33 y 0.97
No. Total de fracciones	0	1	1	3
Etanol	0.10, 0.3, 0.37, 0.47, 0.53, 0.6, 0.63, 0.7 y 0.90	0.13, 0.23, 0.3, 0.4, 0.53 y 0.9	0.1, 0.13, 0.2, 0.3, 0.43, 0.57, 0.73, 0.93 y 1	0.03, 0.1, 0.17, 0.20, 0.23, 0.3, 0.33, 0.43, 0.50, 0.77 y 0.93
No. Total de fracciones	9	6	9	11
Metanol	0.13, 0.33, 0.37, 0.43 y 0.90	0.13, 0.17, 0.23, 0.33 y 0.93	0.1, 0.13, 0.17, 0.33, 0.43, 0.6, 0.73, 0.8 y 0.93	0.07, 0.13, 0.17, 0.2, 0.23, 0.30, 0.33, 0.43, 0.50, 0.77 y 0.93
No. Total de fracciones	5	5	9	11
Acetona	0.13, 0.33, 0.37, 0.43, 0.47, 0.5, 0.6, 0.63 y 0.93	0.10, 0.13, 0.20, 0.30, 0.47 y 0.93	0.13, 0.20, 0.33, 0.43, 0.6, 0.73, 0.8, 0.9, 0.93 y 1	0.03, 0.07, 0.1, 0.13, 0.17, 0.2, 0.23, 0.3, 0.33, 0.43, 0.5, 0.53, 0.63, 0.67, 0.7, 0.93 y 0.97
No. Total de fracciones	9	6	10	17
Diclorometano	0.10, 0.33, 0.37, 0.5, 0.53, 0.57, 0.63 y 0.93	0.07, 0.1, 0.17, 0.23, 0.33, 0.47 y 0.93	0.07, 0.1, 0.13, 0.33, 0.43, 0.5, 0.6, 0.73, 0.8, 0.97 y 1	0.07, 0.17, 0.20, 0.23, 0.3, 0.33, 0.37, 0.43, 0.5, 0.6, 0.83 y 0.97
No. Total de fracciones	8	7	11	11
Hexano	0.1, 0.33, 0.43, 0.5, 0.57, 0.67, 0.73, 0.77 y 0.97	0.03, 0.1, 0.2, 0.27, 0.33, 0.43, 0.67 y 1	0.07, 0.13, 0.37, 0.43, 0.53, 0.57, 0.63, 0.67, 0.77 y 0.9	0.1, 0.23, 0.27, 0.33, 0.4, 0.5, 0.6, 0.67 y 0.93
No. Total de fracciones	9	8	10	9

-: No hubo observaciones ■: β-sitosterol ■: Lupeol ■: Rutina ■: Ácido elá-gico ■: Quercetina ■: Ácido ferúlico.

8.4 Detección de compuestos tipo terpenos con revelado de vainillina-ácido sulfúrico (H₂SO₄).

La identificación de fracciones de terpenos contenidos en los extractos crudos de neem, se utilizó la vainillina-ácido sulfúrico (H₂SO₄), como revelador, después de realizar la separación de las fracciones en cada cromatoplaqueta. Los extractos que resultaron con un mayor número de fracciones revelados fueron los extractos realizados con hexano (5 fracciones), diclorometano (2 fracciones) y acetona (3 fracciones) con la fase móvil de diclorometano: acetona relación 9:1 y diclorometano: metanol relación 19:1 propuestas por Villamil et al., (2012)(Tabla 5).

Tabla 5. Factor de retención (R_f) de las fracciones reveladas con vainillina-ácido sulfúrico (H₂SO₄) presentes en placa cromatográfica de 15 cm².

Solvente Fase móvil	Hexano: Acetona (7:3)	Hexano: Acetona (5:1)	Diclorometano: Acetona (9:1)	Diclorometano: Metanol (19:1)
Agua	-	0.1	0.33	0.43
Etanol	-	0.13	-	0.43 y 0.73
Metanol	-	0.13	-	0.43 y 0.73
Acetona	-	0.1	0.53 y 0.70	0.43, 0.53 y 0.73
Diclorometano	-	0.1	0.6	0.43 y 0.73
Hexano	0.33 y 0.43	0.10 y 0.20	0.27, 0.33 y 0.60	0.37, 0.43, 0.57, 0.63 y 0.77

- : No hubo fracciones reveladas con vainillina-ácido sulfúrico (H₂SO₄).

En el extracto acetónico de neem, se pudieron separar con la fase móvil de diclorometano: metanol (19:1) un total de 17 fracciones de las cuales 3 fracciones (0.43, 0.53 y 0.73) corresponden a las fracciones reveladas con vainillina-ácido sulfúrico (H_2SO_4), siendo el extracto de neem con más fracciones observadas. La vainillina-ácido sulfúrico (H_2SO_4) además de ser un revelador de aceites esenciales, también es utilizado para la identificación de compuestos de tipo terpenos presentes en los extractos del árbol de neem (Villamil, Naranjo and Van, 2012). Una de las fracciones reveladas de Rf 0.53 y comparado a lo obtenido en el extracto con etanol por Villamil et al., (2012) corresponde a la azadiractina (Rf 0.53), terpeno con propiedades anti-fúngicas y debido a su versatilidad; también se ha estudiado su capacidad como herbicida, insecticida y anti-cancerígeno, sin embargo al pesar que los Rf's coincidan no se puede asegurar que la fracción con Rf 0.53 encontrada en el extracto acetónico de neem sea azadiractina por tal motivo es necesario la ayuda de otra técnica de identificación en donde se pueda comprar y asegurar la composición del extracto acetónico de neem.

Las tres fracciones de extractos acetónicos revelados (0.43, 0.53 y 0.73), se separaron y se calculó el rendimiento en porcentaje (% (p/p)) de cada una de ellas; para después confirmar los terpenos presentes en las fracciones reveladas, utilizando cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Rf, Rendimiento total de extractos acetónicos en peso seco % (p/p) y Rf de las fracciones reveladas con vainillina-ácido sulfúrico (H_2SO_4) presentes en placa cromatográfica tamaño de 15 cm² y 225 cm².

Rendimiento por extracto % (p/p)	Rf (TLC 15 cm ²)	Rf (TLC 225 cm ²)	Rendimiento de la fracción separada % (g/g)
18	0.43	0.41	1
	0.53	0.49	15
	0.73	0.59	2

8.5 Identificación de compuestos tipo terpenos mediante cromatografía de gases acoplado a masas.

En el análisis cromatográfico de gases acoplado a masas (GC/MS), realizado a las fracciones (0.43, 0.53 y 0.73), se identificaron nueve compuestos diferentes (**Tabla 7**).

Tabla 7. Distancia de referencia (Rf), compuestos identificación por GC/MS y bioactividad de los extractos de neem.

Rf	Compuestos identificados por GC/MS	Formula	P.M. (g mol ⁻¹)	Actividad
0.73	Fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	850	Antimicrobacterial
	Trimetilpentadecan-2-ona	C ₁₈ H ₃₆ O	268	Antimicrobial y antioxidante
	Ácido ent-kaurenoico		302	Antibacterial, gastroprotectiva y anticancerígeno
	Monolinoleína TMS	C ₂₇ H ₅₄ O ₄ Si ₂	498	Antioxidante
0.43	Fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	850	Antimicrobacterial
	Acetato de β-sitosterol	C ₃₁ H ₅₂ O ₂	456.75	Antibacterial
	Monolinoleína TMS	C ₂₇ H ₅₄ O ₄ Si ₂	498	Antioxidante
	Estigmasta-3,5-dien-7-ona	C ₂₉ H ₄₆ O	410.6	Antiinflamatorio y Antifungico
	Telomicina	C ₅₉ H ₇₇ N ₁₃ O ₁₉	1270	Antibiotico
0.53	Estigmastan-3,5-dieno	C ₂₉ H ₄₈	396.7	Antiinflamatorio y Antifungico
	Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414.7	Anticancerígeno

Referencias: Bases de datos PubChem y UNIIQUIM.

El número y tipo de fracciones identificados en este trabajo difieren con los obtenidos por Xuan et al., (2004), ellos identificaron ácidos carboxílicos de extractos metanólicos, siendo los principales ácidos: benzoico, cafeico, ferúlico, gálico, protocatecúico, p- coumárico, p- clorobenzoico, p -hidroxibenzoico, salicílico, sinápico, sirínico, trans- cinámico, vanílico. La aplicación de los extractos crudos metanólicos de hojas de neem de Japón tuvieron actividad como herbicida (protocatecúico, p-clorobenzoico y p –hidroxibenzoico) en los cultivos de alfalfa, frijol, zanahoria, rabano y seamo (Xuan *et al.*, 2004);sin embargo, los extractos etanólicos de neem de la India presentan compuestos de tipo flavonoides como la quercetina-3-O-rutinosida, kaempferol-3-O-rutinosida y quercetina-3-O-glucopropanosida y un glicolípido como el sulfonoquinovosil-diacilglicérido con actividades anticancerígenas (Chatterjee *et al.*, 2010) esto puede significar que la procedencia de las hojas de neem a pesar que son del mismo género y especie, y metodologías aplicadas para la identificación de los compuestos sean diferentes, pueden existir factores adversos como el clima, área geográfica y las condiciones fisiológicas y morfológicas misma de la planta que intervienen en el desarrollo del árbol lo cual puede variar su producción de compuestos activos (Gahukar, 2014).

8.6 Efecto del extracto acetónico de neem en el crecimiento y producción de amonio en *Fischerella sp* TB22.

8.6.1 Crecimiento de *Fischerella sp* TB22 con extracto crudo de neem acetónico.

A partir del día 3 de la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22 se observó que la adición de extracto acetónico de neem generó cambios en las estructuras de *Fischerella sp* TB22 (Fig. 7). Con las concentraciones añadidas de 50 mg/L (C2), 150 mg/L (C3), 250 mg/L (C4) y 500 mg/L (C5) de extracto acetónico la cepa poseía fisiológicamente estructuras delgadas carecía de ramificaciones y aglomeraciones en comparación con la del cultivo sin extracto de acetónico concentración de 0 mg/L (C1) (Fig. 8). Sin embargo, no se perdió la homogeneidad del cultivo.

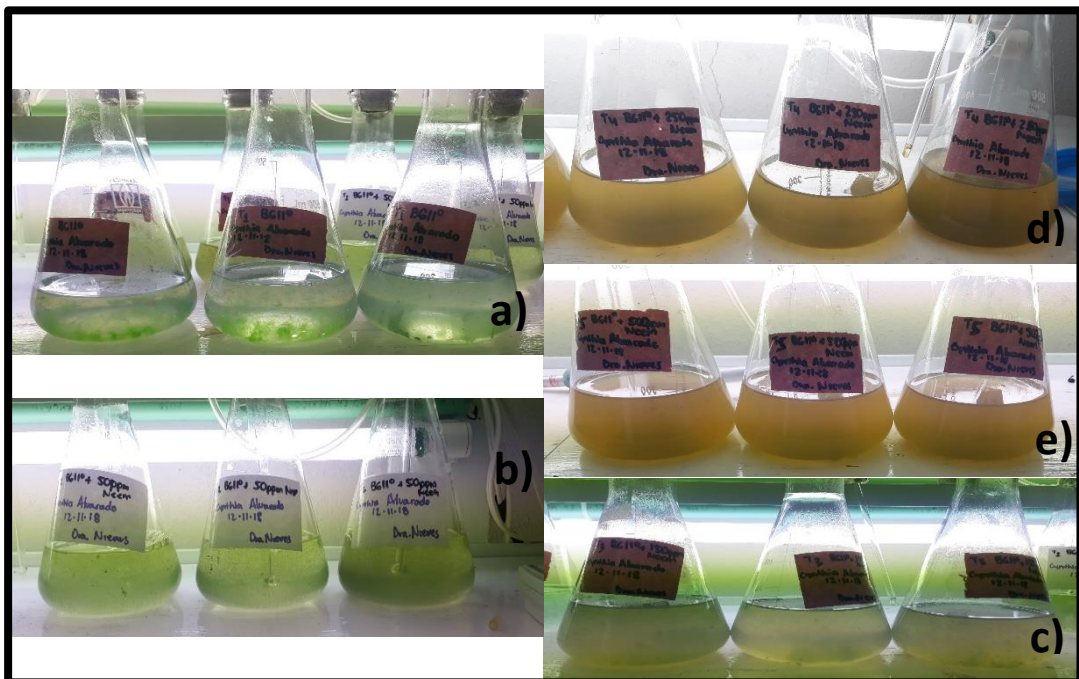


Figura 7. Adición de extracto de neem con las concentraciones; a) C1: 0 mg/L, b) C2: 50 mg/L, c) C3: 150 mg/L, d) C4: 250 mg/L y e) C5: 500 mg/L en 0.15L de BG11° día 9 de crecimiento.

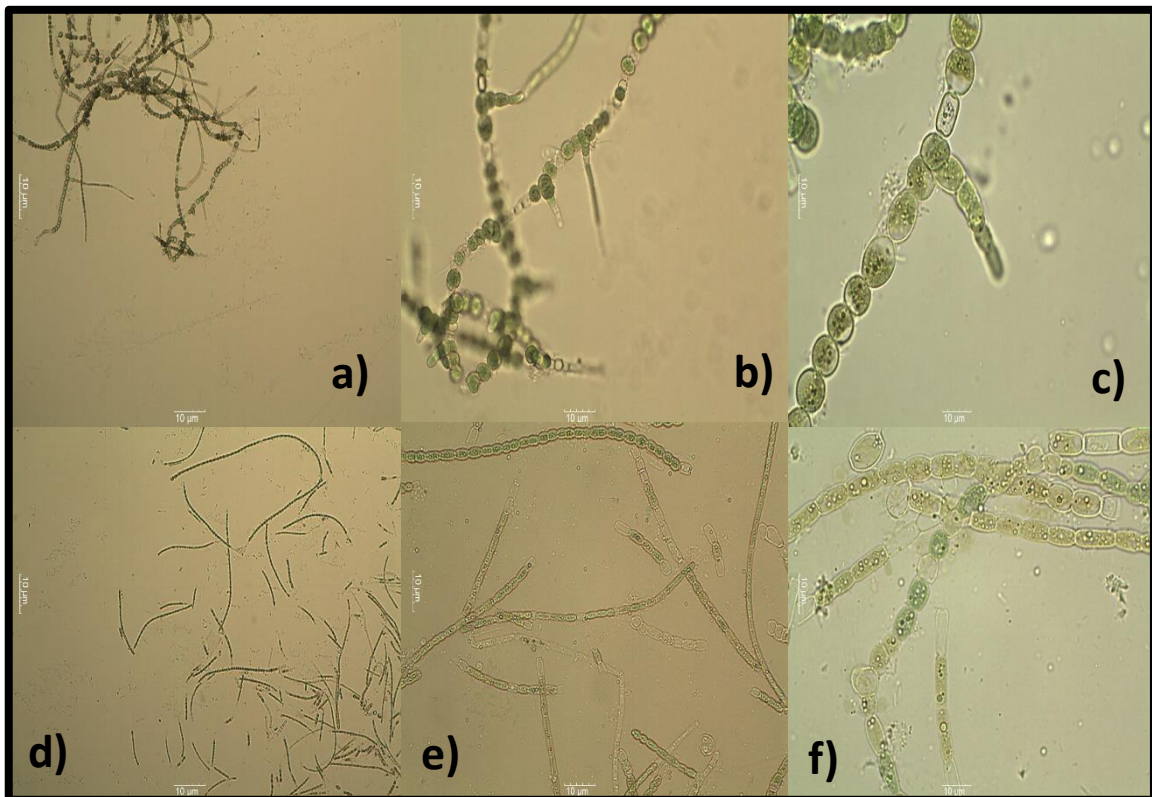


Figura 8. Diferencias fisiológicas de los filamentos de *Fischerella sp* TB22 crecido a 0 mg/L (C1), y 500 mg/L (C5) de extracto acetónico a una escala de 10 µm en el día 9 de crecimiento. La C1 mostró ramificaciones normales vistas a a) 10 X, b) 40 X y c) 100 X. En la C5 no se observaron ramificaciones y aglomeraciones vistas a d) 10 X, e) 40 X y f) 100 X.

El extracto de neem al tener presentes compuestos como antioxidantes, terpenos, alcaloides y ácidos grasos promueve en *Fischerella sp* TB22 un tipo de estrés vegetal cambiando la fisiología en conjunto con el daño sufrido ya que sus cambios fueron de respuesta rápida; puede ser que el estrés generado sea por aclimatación provocando estrés oxidativo debido al exceso de compuestos que integran el extracto de neem que son conocidos como especies reactivas al oxígeno (EROs) (Pandey, Verma and Singh, 2014; Wong *et al.*, 2015).

En este sentido, Robles-Rengel, (2017) menciona que cuando se altera el balance entre los niveles de agentes oxidantes y agentes antioxidantes dentro de la célula, las cianobacterias se enfrentan a un estrés oxidativo que genera daños a distintos niveles con forme al crecimiento o decrecimiento de los metabolitos primarios y secundarios, llegando a provocar la muerte celular. Dicho lo anterior, Solano-Jiménez, (2018) evaluó el efecto del extracto etanólico crudo de *Oryza sativa* L. var. A-98 a una concentración de 1000 mg/mL sobre el crecimiento de *M. aeruginosa*, *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp* las células observadas, presentaron disminución en la concentración de clorofila en las tres especies de cianobacterias del 81.32% (*M. aeruginosa*), 50% (*Anabaena cylindrica*) y 60% (*Anabaena sp*) clorofila/FSC- W, lo anterior hizo suponer que, alguna de las especies reactivas al oxígeno (EROS) de tipo polifenoles como el ácido gálico y el trolox presentes en la cascarilla de *Oryza sativa* L. var. A-98 es causante del daño en la membrana celular y en la actividad fotosintética causando la liberación del contenido intracelular de las cianobacterias.

8.6.2 Crecimiento por densidad óptica.

El análisis ANOVA de medias repetidas seguido del test de tukey para grupos homogéneos de la relación densidad óptica* mg/L de extracto acetónico de neem, no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento de *Fischerella sp* TB22 utilizando la concentración de extracto más baja 50 mg/L (C2), con respecto al control; sin embargo, con las concentraciones de 150 mg/L (C3), 250 mg/L (C4) y 500 mg/L (C5), las diferencias fueron significativas.

En cada una de las cinéticas de crecimiento con extracto acetónico de neem se observó un mejor crecimiento exponencial en *Fischerella sp* TB22 a una dispersión celular de 0.86 ± 0.01 ABS a 4 L/min y 6200 Lux durante el día 18 (fase exponencial) de la cinética de crecimiento con la adición de 500 mg/L (C5) de extracto acetónico de neem (**Fig. 9**).

Estos valores difieren a los mostrados por, Chen et al., (2016) donde evaluaron el crecimiento de *Synechocystis sp* PCC 6803 WT adicionando al medio de crecimiento (BG11) 10 mM de glucosa-6-fosfato durante 8 días, el cual reflejo un mejor crecimiento exponencial con una dispersión celular de 0.8 ± 0.03 ABS durante el día 8 de la cinética de crecimiento de *Synechocystis sp* PCC 6803 WT.

Por otra parte, Alonso-Santos, (2015) evaluó el crecimiento de *Fischerella sp* durante 20 semanas en dos medios de cultivos BG11° (medio sin nitrógeno), BG11 (medio con nitrógeno), y modificados con carbonato de sodio (CO_2Na_2) y nitrato de sodio (NaNO_3); el mejor crecimiento de *Fischerella sp* fue empleando el medio de cultivo BG11 con una dispersión celular de 0.36 ± 0.02 ABS al día 28 de la cinética de crecimiento siendo estadísticamente significativo a los demás tratamientos LSD (T1- T4 $p = 0.0068$, T1– T2 $p = 0.0074$), el cual difiere al valor obtenido que fue 0.86 ± 0.01 ABS durante el día 18 (fase exponencial).

Así mismo, Martínez- Rosales et al., (2020) evaluó el crecimiento de *Fischerella sp* TB22 durante 12 semanas en medio de cultivo BG11° (medio sin nitrógeno) en donde el mejor crecimiento de *Fischerella sp* TB22 se obtuvo al día 9 de la cinética de crecimiento con una dispersión celular de 0.4 ± 0.09 ABS, el cual es mayor al valor obtenido el cual fue 0.39 ± 0.09 ABS durante el día 9 de la cinética de crecimiento con 150 mg/L extracto acetónico de neem, sin embargo, no hay duda que la sonicación aplicada homogenizó el inóculo y facilitó la estabilidad en las mediciones como lo comenta el autor.

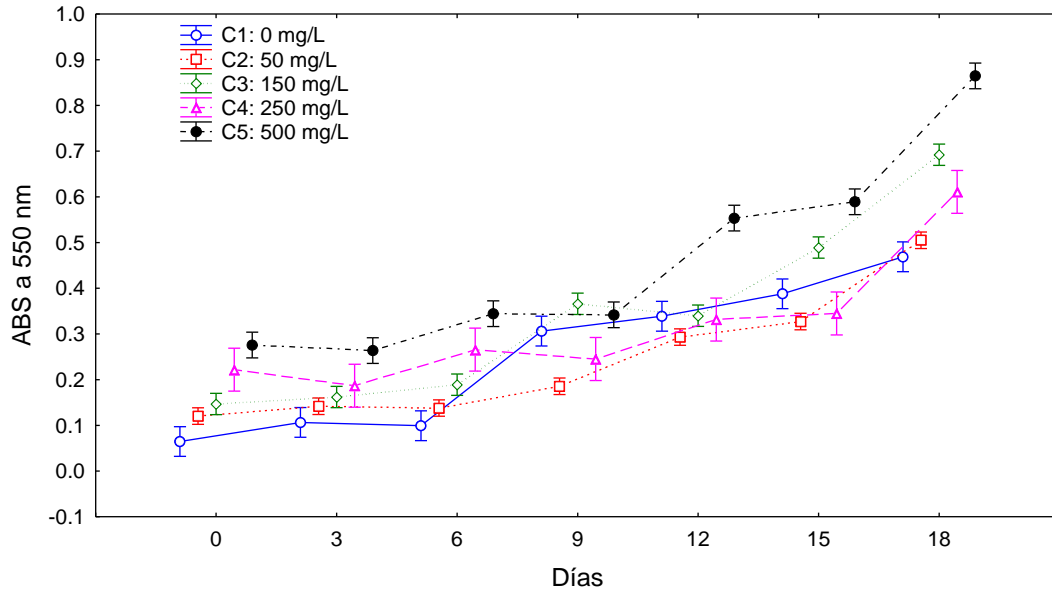


Figura 9. Cinética de crecimiento por densidad óptica de *Fischerella sp* TB22 durante un periodo de 18 días con extracto de neem, C1(-○-), C2(-□-), C3(-◇-), C4(-△-) y C5(-●-).

8.6.3 Crecimiento en biomasa peso seco (BPS)

El análisis ANOVA de medias repetidas seguido del test de tukey para grupos homogéneos de la relación BPS* mg/L de extracto acetónico de neem, solo mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento de *Fischerella sp* TB22 utilizando concentraciones de 50 mg/L (C2) y 500 mg/L (C5) de extracto acetónico de neem.

La concentración de 500 mg/L (C5) tuvo la mayor concentración de BPS y la concentración C1 fue la de menor concentración en BPS al día 6 de la cinética de crecimiento en comparación con la concentración de 250 mg/L (C4) la mayor cantidad de biomasa peso seco fue al día 3 de la cinética de crecimiento con 1.10 ± 0.20 mg/mL. Las concentraciones de 50 mg/L (C2) y 150 mg/L (C3) obtuvieron un incremento de 1.1 ± 0.10 y 1.13 ± 0.28 mg/mL respectivamente cada una en el día 9 (1 semana y media) de la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22 (**Fig. 10**). Sin embargo, Alonso-Santos (2015) obtuvo un crecimiento de *Fischerella sp* empleando el medio de cultivo BG11° con un

peso en BPS de 4.1 ± 0.8 mg/mL a la semana 8 (día 56) de la cinética de crecimiento siendo 3 veces mayor a lo obtenido con extracto de neem (1.6 mg/mL) en la semana 1 (día 6) del crecimiento de *Fischerella sp* TB22 (Alonso-Santos, 2015). De manera semejante, Ramírez-López (2009) obtuvo un crecimiento 7 veces mayor (8.12 ± 0.05 mg/mL) de biomasa de cianobacterias en peso seco durante la fase estacionaria (día 11) de la cinética de crecimiento con medio de cultivo BG11⁰. Así mismo Martínez-Rosales (2020), en la fase estacionaria (día 9) de la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22 obtuvo un crecimiento menor (6.95 ± 0.61 mg/mL) al reportado por Ramirez-López (2009), pero 6 veces mayor a lo obtenido en el día 6 de la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22 con 500 mg/L extracto de neem (1.6 mg/mL).

En este sentido Solano-Jiménez, (2018) indica que al suministrar extractos crudos y puros de plantas se presenta una disminución visible del desarrollo de células vegetativas en cianobacterias sin afectar las ya existentes o en su caso la muerte del microorganismo. Con base a lo anterior, se puede suponer que el extracto crudo de neem ejerce un efecto alguistático sobre *Fischerella sp* TB22, disminuyendo drásticamente el proceso de desarrollo de las células sin afectar las ya existentes, proceso reflejado en la cantidad de biomasa peso seco producido.

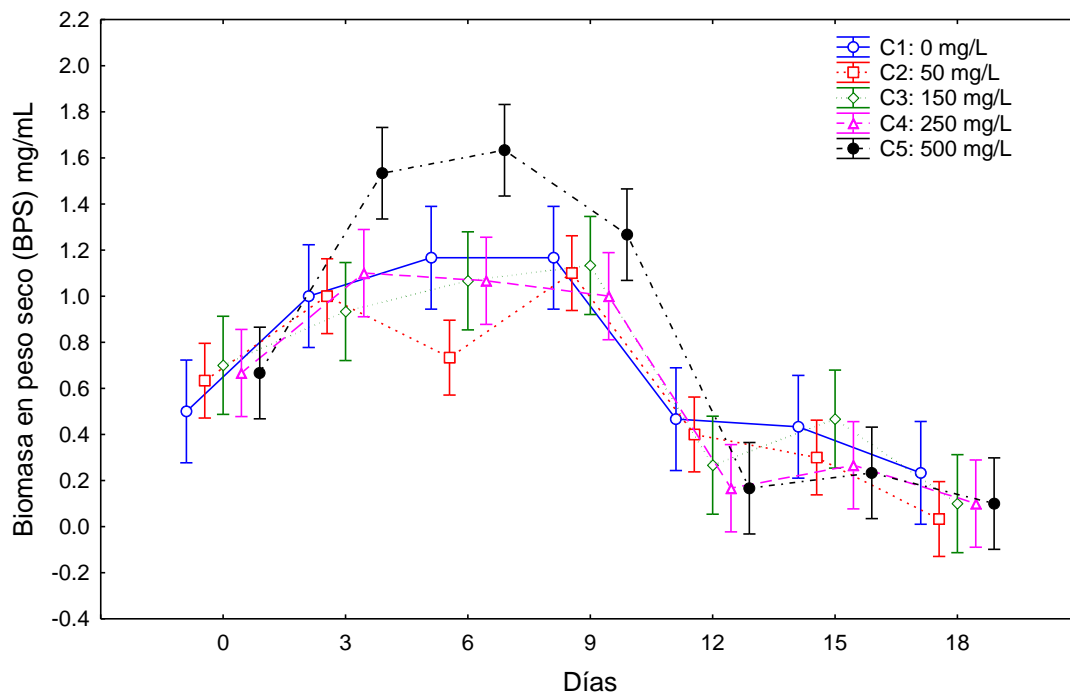


Figura 10. Cinética de crecimiento en biomasa peso seco de *Fischerella sp* TB22 durante un periodo de 18 días con extracto de neem, C1(-○-), C2(-□-), C3(-◇-), C4(-△-) y C5 (-●-).

8.6.4 Cuantificación de amonio

8.6.4.1 Curva de calibración

La curva de calibración obtuvo una ecuación de la recta $y=0.1162+0.2031*x$ y una R^2 igual a 0.9965 con un intervalo de confianza del 95% (ANEXO D).

8.6.4.2 Producción de amonio

El análisis ANOVA de medias repetidas seguido del test de tukey para grupos homogéneos de la relación $\mu\text{g/mL}$ de amonio * mg/L de extracto acetónico de neem, no mostró diferencias significativas ($p<0.05$) en la producción de amonio en *Fischerella sp* TB22. La concentración de 500 mg/L (C5) produjo 141.37 $\mu\text{g/mL}$ de amonio (100%), 6.2% más que la concentración 250 mg/L (C4) (133.9 $\mu\text{g/mL}$), 6.7% más que 150 mg/L (C3) (132.52 $\mu\text{g/mL}$), 8.2% más que 50 mg/L (C2) ($129.76 \pm \mu\text{g/mL}$) y 8.8% más que la concentración de 0 mg/L (C1) (128.85 $\mu\text{g/mL}$) resultando ser la mejor concentración de extracto de

neem para la producción de amonio en el día 6 de la cinética de crecimiento (Fig.11).

Por otra parte, Ramírez-López (2009) obtuvo una producción de amonio de 34.50 ± 4.6 $\mu\text{g/mL}$ con una irradiación a 6200 lux y un flujo de aire de 4 L/min al día 9 de su cinética de crecimiento. Sin embargo, Alonso-Santos (2015), con las mismas condiciones de trabajo reportó una producción de amonio de (16.93 $\mu\text{g/mL}$) en medio BG11° y el efecto inducido por la adición de carbonato de sodio redujo la producción en un 51.6 % (8.19 $\mu\text{g/mL}$) para el medio BG11° y 20.46% (10.46 $\mu\text{g/mL}$) con el medio BG11 mostrando diferencias significativas entre tratamientos. Así mismo Martínez-Rosales (2020) obtuvo una producción de 30.7 ± 2.08 $\mu\text{g/mL}$ de amonio, mayor a lo reportado por Alonso-Santos con medio BG11°, este aumento se debió al ajuste del pH y volumen durante la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22.

Dicho lo anterior la producción obtenida de 141.37 $\mu\text{g/mL}$ (C5 = 500 mg/L) de amonio (100% en medio BG11°) fue 88% y 94.2% mayor a lo reportado por Alonso-Santos con medio BG11° y BG11 con Na_2CO_3 respectivamente, y 99.63% mayor a lo reportado por Ramírez-López en medio BG11°. De manera similar, la producción obtenida de 128.85 $\mu\text{g/mL}$ (C1 = 0 mg/L) fue 86.85% y 93.64% mayor a lo reportado por Alonso-Santos con medio BG11° y BG11 con Na_2CO_3 respectivamente, y 99.59% mayor a lo reportado por Ramírez-López y Martínez-Rosales en medio BG11°. En base a lo anterior y teniendo en cuenta que al modificar químicamente el medio de cultivo de *Fischerella sp* TB22 su metabolismo también se ve alterado (Robles Robles, 2017), se considera que al colocar el extracto crudo de neem compuesto por Especies Reactivas al Oxígeno (EROs) (antioxidantes, terpenos, alcaloides y ácidos grasos) (Wong *et al.*, 2015) al mismo medio de cultivo (BG11°) junto a *Fischerella sp* TB22 esté reaccionen con los polisacáridos exudados por *Fischerella sp* TB22 provocando estrés oxidativo lo cual amenaza a la cianobacteria y aumenta su producción de amonio (NH_4^+).

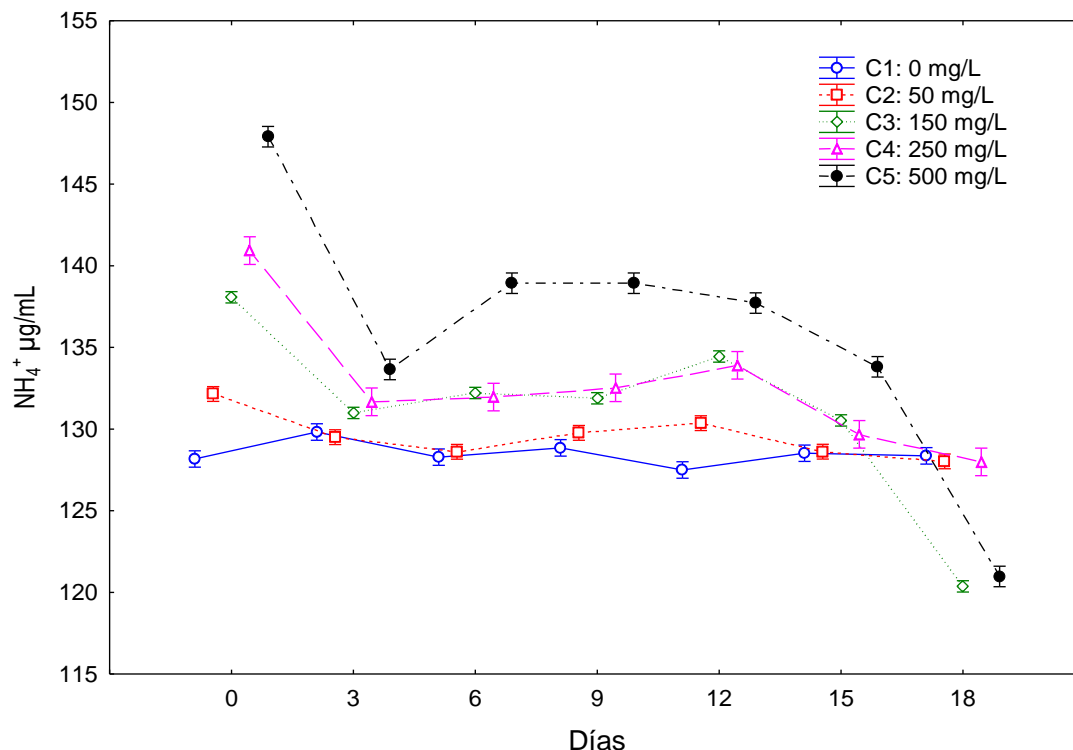


Figura 11. Cinética de la producción de amonio en *Fischerella sp* TB22 durante un periodo de 18 días con extracto de neem, C1(-○-), C2(-□-), C3(-◇-), C4(-△-) y C5 (-●-).

8.7 Presencia de alcaloides en *Fischerella sp* TB22.

El análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba de tukey de grupos homogéneos no demostró diferencias significativas entre los primeros 3 de los tratamientos; 1) con biomasa liofilizada y metanol al 99% (EBL-M99) (A), 2) con biomasa fresca y metanol al 99% (EBF-M99) (A) y 3) con biomasa fresca y metanol al 60% (EBF-M60) (A), pero si fueron significativas ($p < 0.05$) entre el ultimo tratamiento 4) el extracto realizado con biomasa liofilizada y metanol al 60% (EBL-M60) (B). El peso seco (mg) de los extractos EBL-M99 (12.2 mg), EBF-M99 (125.1 mg) y EBF-M60 (194.2 mg) fueron menores al 100% y el extracto EBL-M60 (1058.0 mg) obtuvo un peso mayor al 100%.

Mediante la cromatografía de capa fina (TLC) y de acuerdo con cada una de las fases móviles utilizadas; se obtuvo un total de 14 fracciones; 4 fracciones con metanol: etanol agua (45:45:10), 2 fracciones con acetato de etilo: metanol

(2:1), 2 fracciones con hexano: acetato de etilo (1:1), 3 fracciones con diclorometano: metanol (19:1) y 3 fracciones con acetona: agua (5:2). El análisis ANOVA Kruskal-Wallis seguido del test de Media para grupos independientes, no mostró diferencias estadísticas significativas respecto al número de fracciones observadas entre cada uno de los extractos realizados ($p < 0.05$) (**Tabla 8**).

Tabla 8. Factor de retención (Rf) de fracciones totales de extractos crudos de neem presentes en placa cromatográfica de 15 cm².

Extracto	Metanol: Etanol: Agua (45:45:10)	Acetato de etilo: Metanol(2:1)	Hexano: Acetato de etilo (1:1)	Diclorometano: Metanol (19:1)	Acetona: Agua (5:2)
EBF-M99	0.26, 0.66, 0.73 y 0.83	0.96	0.83	0.26 y 0.93	
EBF-M60					0.93 y 0.96
EBL-M99		0.86(UV) y 0.96	0.76 y 0.86	0.2, 0.66 y 0.83	0.83, 0.93 y 0.96
EBL-M60					

EBF: Extracto de biomasa fresca.

M99: Metanol al 99%.

EBL: Extracto de biomasa liofilizada.

M60: Metanol al 60%.

La fracción alcaloide activa al revelador de *Dragendorff's* fue de Rf 0.66 con la fase móvil de metanol: etanol: agua (45:45:10) la cual estuvo presente en cada uno de los 4 extractos realizados; 1) con biomasa liofilizada y metanol al 99% (EBL-M99), 2) con biomasa fresca y metanol al 99% (EBF-M99), 3) con biomasa liofilizada y metanol al 60% (EBL-M60) y 4) con biomasa fresca y metanol al 60% (EBL-M60) (**Fig.12**); por otra parte, la fracción de Rf 0.66 también se observó con la fase móvil de diclorometano: metanol (19:1) pero no fue activa al revelador de *Dragendorff's*.

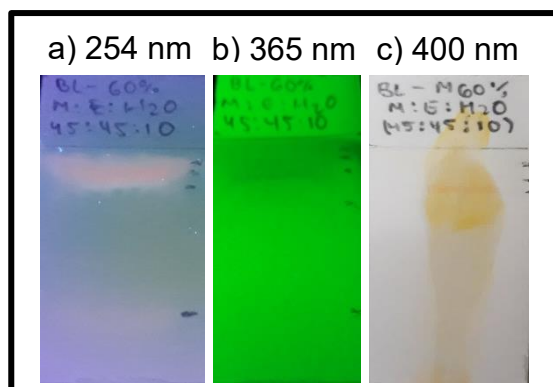


Figura 12. Fracciones alcaloide de Rf 0.66 con la fase móvil de metanol: etanol: agua (45:45:10) presente en el extracto realizado con metanol al 60% y biomasa liofilizada de *Fischerella sp* TB22. A) 254 nm (luz corta UV), B) 365 nm (luz alta UV) y C) 400 nm (luz blanca y revelado con *Dragendorff's*).

Sin embargo, los resultados obtenidos por Ravi, Srivastava, Singh, et al., (2006b) son diferentes a los encontrados en este trabajo ya que reportaron la presencia de un alcaloide de tipo Hapalosiphon T en *Fischerella sp.* en una fracción activa de Rf 0.8 en un extracto realizado con biomasa liofilizada y metanólico al 99.8% dicha fracción tuvo aplicación in vitro para el control de enfermedades humanas como tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), gastro intestinales (*Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*), síndrome de la piel escaldada (*Staphylococcus aureus*), otitis (*Pseudomonas aeruginosa*), Salmonelosis (*Salmonella typhi*). Pero conforme a lo mencionado por Juárez-Chávez, (2012) el extracto crudo realizado con metanol: cloroformo (2:1) de *Fischerella sp* TB22 inhibió el 100% del crecimiento de *Colletotrichum sp.* resultando ser una alternativa para el control de enfermedades agrícolas provocadas por este hongo.

Es importante mencionar que los extractos realizados presentaron 12.16 mg/mL de precipitaciones cristalinas cúbicas y triangulares solubles en agua por cada un mililitro de extracto crudo, también se presentaron en las placas cromatográficas después de la aplicación del revelador; sin embargo, la precipitación no reaccionó al revelador en la cromatoplaca (Fotografía en el ANEXO

C). De manera similar Corrales & Ciro, (2010), reportaron la presencia de 0.0107 mg/mL de precipitaciones naranjas de compuestos nitrogenados al suministrar el reactivo *Dragendorff's* en el extracto crudo de la actinobacteria *Streptomyces sp* siendo este valor 13.01% menor a los generados por la cianobacteria *Fischerella sp* TB22 (12.16 mg/mL).

Los solventes dipolares como el acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo y la acetona tienen polaridades intermedias y solubilizan solutos con una polaridad similar. En cambio, el agua, metanol y diclorometano son solventes polares los cuales tienen la capacidad de solubilizar solutos polares e iónicos, como proteínas, carbohidratos y sales minerales. Sin embargo, los solventes no polares como el hexano y el tetracloruro de carbono solo disuelven compuestos apolares, como los lípidos. Dicho lo anterior, las fases móviles para la observación e identificación por cromatografía en capa fina (TLC), de los alcaloides intracelulares en *Fischerella sp* TB22 con reactivo *Dragendorff's* fue acetona: agua (5:2) (Rf: 0.93), metanol: etanol: agua (45: 45: 10) (Rf's: 0.66). Por lo tanto, se puede suponer que los compuestos alcaloides presentes en *Fischerella sp* TB22 son de naturaleza polar.

8.8 Determinación de la concentración de extracto crudo de neem que induzca la producción alcaloides de *Fischerella sp* TB22.

Mediante cromatografía en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography) se observó y monitoreo cada tercer día la producción de alcaloides durante la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22.

El inicio de la producción de alcaloides fue a partir del día 3 de la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22 con la concentración de 0 mg/mL (C1), en cambio para la concentración de 150 mg/mL (C3) fue a partir del día 6 y para las concentraciones de 50 mg/mL (C2), 250 mg/mL (C4) y 500 mg/mL (C5) de extracto acetónico de neem fue el día 9 de la cinética de crecimiento.

El análisis ANOVA de medias repetidas seguido del test de tukey para grupos homogéneos de la relación R.P.S (p/p) de alcaloides * mg/mL de extracto acetónico de neem, no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con las concentraciones de 50 mg/mL (C2), 150 mg/mL (C3), 250 mg/mL (C4), pero si mostro diferencias significativas entre las concentraciones de 0 mg/mL (C1) y 500 mg/mL (C5).

La concentración de 500 mg/L (C5) produjo una producción de alcaloides de 0.087%, 1.16 veces más con respecto a las concentraciones de: 250 mg/L (C4) (0.075%), 1.19 veces más que 150 mg/L (C3) (0.073%), y 1.24 veces más que la concentración de 50 mg/L (C2) (0.070%) y 0 mg/L (C1) (0.070%); resultando ser la mejor concentración de extracto de neem para la producción de alcaloides en el día 18 de la cinética de crecimiento (**Fig.13**).

La concentración de 500 mg/L (C5) produjo 141.37 $\mu\text{g/mL}$ de amonio (100%), 6.2% más que la concentración 250 mg/L (C4) (133.9 $\mu\text{g/mL}$), 6.7% más que 150 mg/L (C3) (132.52 $\mu\text{g/mL}$), 8.2% más que 50 mg/L (C2) (129.76 \pm $\mu\text{g/mL}$) y 8.8% más que la concentración de 0 mg/L (C1) (128.85 $\mu\text{g/mL}$) resultando ser la mejor concentración de extracto de neem para la producción de amonio en el día 6 de la cinética de crecimiento (**Fig.11**).

Por otro lado Huber et al., (1998) obtuvo 2.6 g de extracto crudo producido de *Hapalosiphon delicatulus* un 0.07% de alcaloides totales durante la semana 5 (día 38) de la cinética de crecimiento, donde identificaron; cinco alcaloides de tipo Hapalindol [D (0.75×10^{-3} %), F (0.25×10^{-3} %), H (0.008%), G (0.015%), y U (0.005%)] y dos alcaloides de tipo Ambiguina [G nitrilo (0.9×10^{-3} %) y E isonitrilo (0.037%)], comparando resultados *Fischerella sp* TB22 produjo por cada 0.1 mg de extracto crudo producido 0.017% más alcaloides con la concentración 5 (con 500 mg/L de extracto de neem + BG11°) y 0.070% con la concentración 1 (con 0 mg/L de extracto de neem + BG11°) durante la semana 3 (18 días) de la cinética de crecimiento, siendo esta última una producción similar a la de *Hapalosiphon delicatulus*, lo que quiere decir que *Fischerella sp* TB22 obtuvo 26 veces más alcaloides que Huber y colaboradores en 1988.

Así mismo Koodkaew et al., (2012) obtuvieron por cada 3.38 g de extracto reducido de *Hapalosiphon sp.* 0.112% del alcaloide Ambiguina D isonitrilo siendo una producción mayor a la obtenida por *Fischerella sp* TB22 con la concentración de 500 mg/mL (0.080%) y 0 mg/mL (0.070%), sin embargo tomando en cuenta que esta producción es por 0.1 mg de extracto producido de *Fischerella sp* TB22, se tiene 33.8 veces más cantidad de alcaloides producidos durante la semana 3 (18 días) de la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22 en comparación a lo producido durante la semana 3 (día 21) de la cinética de crecimiento de *Hapalosiphon sp* (3.38 g).

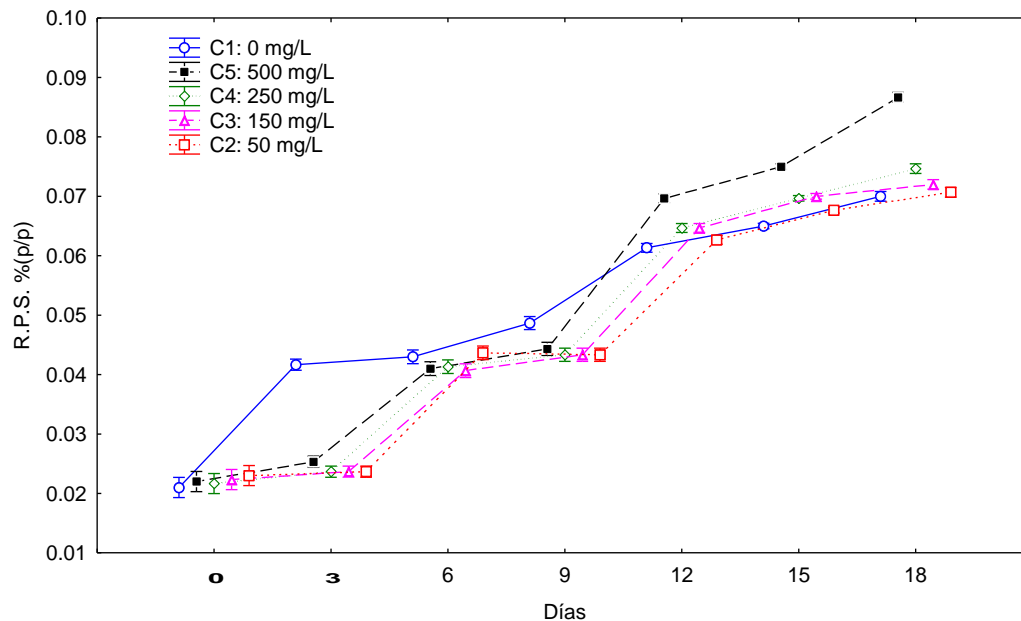


Figura 13. Cinética de la producción de alcaloides en *Fischerella sp* TB22 durante un periodo de 18 días con extracto de neem, C1(-○-), C2(-□-), C3(-◇-), C4(-△-) y C5(-●-).

8.9 Aplicación *in vitro* de extracto de neem y *Fischerella sp* TB22 para el control de cuatro hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de Fresa de la variedad “Rociera” FNM (Fresas Nuevos Materiales).

El efecto de la adición del extracto de neem al medio de cultivo agar patata (PDA) – agua, sobre el crecimiento de los patógenos (Fig.14).

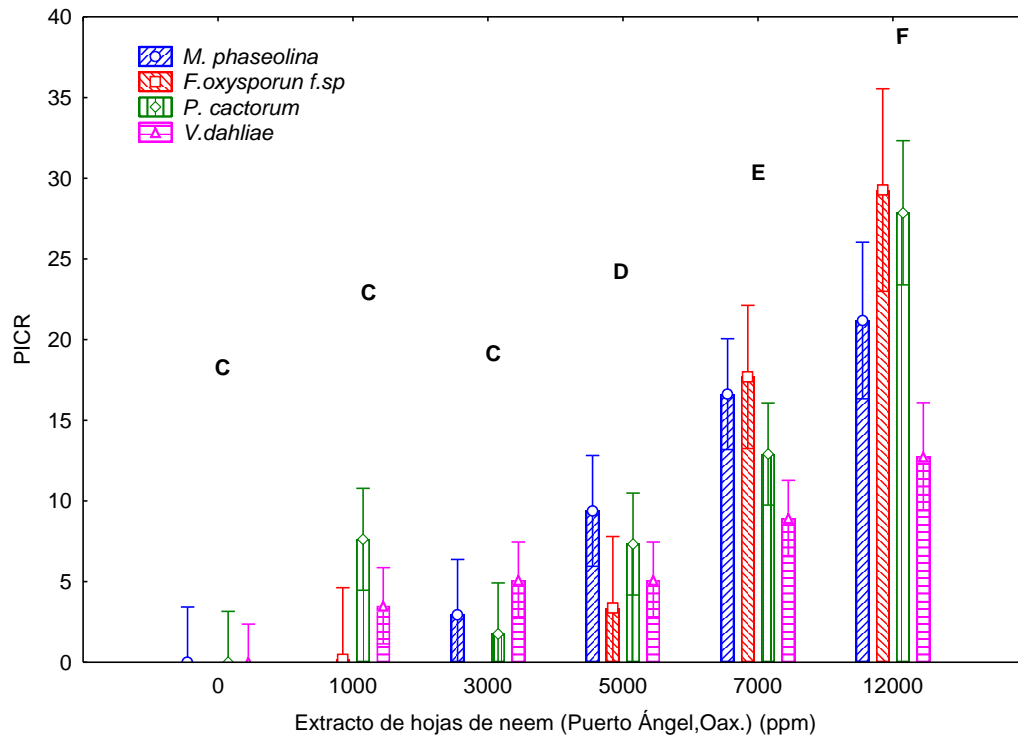


Figura 14. Efecto *in vitro* de la adición de extracto de neem sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *M. phaseolina*, *F. oxysporum f. sp. fragariae*, *P. cactorum* y *V. dahliae*.

El análisis de la varianza seguido del test de Tukey demuestra que los valores entre ppm de extracto*patógeno de *M. phaseolina* y *F. oxysporum f. sp. fragariae* no difieren significativamente ($p < 0.05$) pero *P. cactorum* y *V. dahliae* difieren estadísticamente.

Sin embargo, el análisis de los grupos homogéneos de la relación PICR*ppm de extracto, muestra que hay diferencias significativas de inhibición utilizando concentraciones a partir de 5000 a 12000 ppm de extracto de neem (D a F).

Por lo tanto, se observó una inhibición del 29% de *F. oxysporum f. sp. fragariae*, 21% de *M. phaseolina*, 27.8% de *P. cactorum* y 12.7% de *V. dahliae*, en el medio con 12000 ppm de extracto de neem (**Fig.14**).

Utkhede, Sholberg, & Smirle, (2001) obtuvieron que una concentración de 40 ppm de extracto aceitoso de neem inhibe el 29% de *P. cactorum* a partir del día 28 de incubación del patógeno. De manera similar, Rezende, Lüdke, Salviano, Helena, & Silvano, (2007) observaron que el extracto de hojas de neem a una concentración del 35% (350 ppm) inhibió el 35% del crecimiento del micelio de *Phytophthora ssp.*

Así mismo, el porcentaje de inhibición registrado por Rezende et al., (2007) y Utkhede et al., (2001) fue 1.2 y 6 veces mayor respectivamente a lo obtenido con la concentración de 12000 ppm de extracto acetónico de neem (27.8%).

Por otra parte, Aguila, Almarales, & Lorenzo, (2015) comprobaron *in vitro* que con extracto de hojas de neem (*Azadirachta indica*) se logró un 80% de inhibición en el crecimiento de *M. phaseolina* causante de la pudrición carbonosa de la raíz de plantas, principalmente de fresas a partir del día 3 de incubación del patógeno con una concentración de 800 ppm de extracto acuoso de neem, lo que resulta un porcentaje mayor al 52.2% a lo obtenido con la concentración de 12000 ppm de extracto acetónico de neem (27.8%). De manera semejante, Garcia et al., (2016) evaluaron *in vitro* el control del crecimiento de *M. phaseolina* (Tassi) Goid y *Fusarium spp* con extractos acuosos de hojas de neem, obtuvieron que con una concentración del 75% (750 ppm) se inhibió el 98% de *M. phaseolina* (Tassi) Goid y el 100% de *Fusarium spp* a partir del séptimo y tercer día de incubación del patógeno más el extracto de neem, respectivamente.

Varo et al., (2017) evaluaron el efecto del aceite de neem (Neem® Trabe S.A.) en el control de *V. dahliae* donde obtuvieron el 29% de inhibición del patógeno con una concentración de 5000 ppm de aceite de neem, sin embargo en este

ensayo con la concentración de 12000 ppm el extracto de hojas de neem se obtuvo el 12.7% de inhibición.

El análisis ANOVA de medias repetidas seguido del test de Tukey de los extractos de *Fischerella sp* TB22 demuestra que los valores entre ppm de extracto*patógeno de *M. phaseolina* difieren significativamente ($p < 0.05$) pero con los patógenos *P. cactorum*, *F. oxysporum f sp fragariae* y *V. dahliae* no difieren estadísticamente. Sin embargo, se observó una inhibición del 6.25% de *F. oxysporum f sp fragariae*, 7.75% de *P. cactorum* y 5.42% de *V. dahliae* incluso un aumento en el crecimiento de *M. phaseolina* del 1.3% en el medio con 6000 ppm de extracto de *Fischerella sp* TB22 (**Fig.15**).

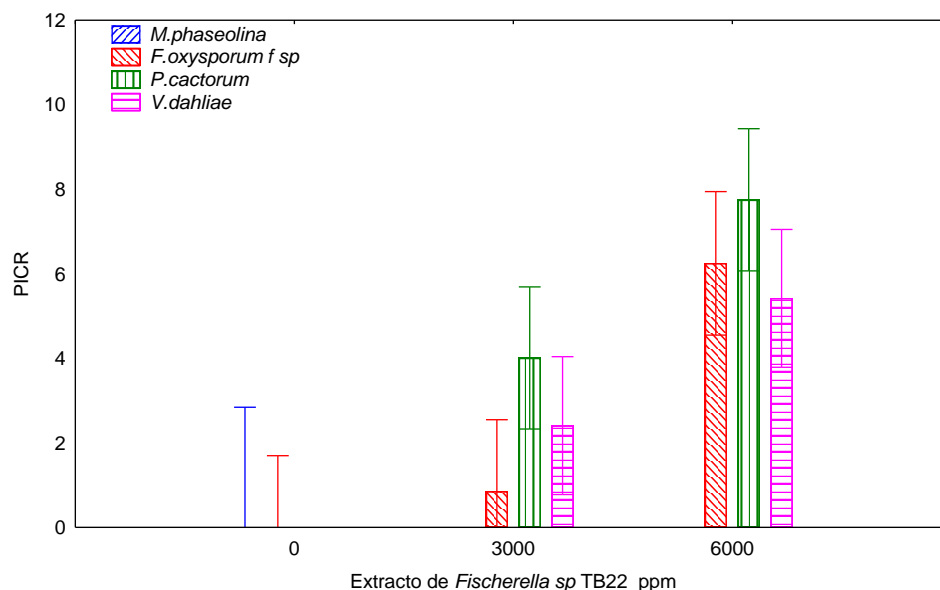


Figura 15. Efecto *in vitro* de la adición de extracto de *Fischerella sp* TB22 sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *M. phaseolina*, *F. oxysporun f. sp fragariae*, *P. cactorum* y *V. dahliae*.

9 CONCLUSIONES

Con base a los resultados y los objetivos planteados, se puede concluir que:

El tratamiento que mostró una mejor eficiencia de extracción de compuestos bioactivos de neem es el tratamiento con acetona (18%).

- La fase móvil que presentó la mejor polaridad para la separación de las diferentes fracciones presentes en los tratamientos de extracción es diclorometano: metanol (19:1) (44 fracciones).
- Se identificaron por GC/MS un total de 15 compuestos de las fracciones acetonicas (0.43, 0.53 y 0.73) purificadas entre ellos los principales son el estigmastan-3,5-dieno, Fitol, C-sitosterol, estigmasterol y el 1- mono-linoleilglicerol trimetil éter.

La extracción de alcaloides en *Fischerella sp* TB22 presentó un total de 4 fracciones (Rf's:0.26, 0.66, 0.76 y 0.8) separadas con la fase móvil de metanol: etanol: agua (45:45:10) y la fracción identificada a un Rf de 0.66 fue positiva al reactivo *Dragendorff's* lo cual indica ser un alcaloide indolico.

La adición del extracto de neem a una concentración de 500 mg/L fue un buen inductor para la producción de amonio a $138.03 \pm 0.90 \mu\text{g/mL}$ y aumento de $0.041 \pm 0.001 \%$ a $0.087 \pm 0.002 \%$ el rendimiento % (p/p) en peso seco la producción de alcaloides indolicos en el crecimiento de *Fischerella sp* TB22.

En la aplicación *in vitro* el extracto de neem inhibió el crecimiento de *P. cactorum* un 27.8% y 29% a *F. oxysporum f. sp fragariae* resultando ser una alternativa para el control de patógenos que afectan el cultivo de fresa.

10 RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación pueden ser mejorados y complementados si se toman en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Probar otras opciones de extracción para los extractos crudos y fracciones de neem utilizando soluciones ácidas o ácidas básicas con ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH).
- Evaluar la adición constante del extracto crudo y la fracción tipo terpeno de neem en su forma libre y encapsulada con alginato de sodio durante todo el periodo de la cinética de crecimiento de *Fischerella sp* TB22.
- Identificar por cromatografía de gases/masas (GC/MS) las moléculas de los alcaloides producidos por *Fischerella sp* TB22.
- Evaluar otros solventes como; acetona (C₃H₆O), agua (H₂O), diclorometano (CH₂Cl₂), éter [butílico (C₈H₁₈O), etílico [(C₂H₅)₂O] y de petróleo], alcohol isopropílico (C₃H₈O) y hexano (C₆H₁₄), para mejorar la extracción de alcaloides.
- Establecer un método de estimación para la cuantificación de los alcaloides de *Fischerella sp* TB22 por espectrofotometría UV/Vis.

LITERATURA CITADA

Aguila, A. R., Almarales, A. M. and Lorenzo, N. M. E. (2015) 'Efectividad biologica in vitro de extractos naturales de plantas en el control de hongo MAcrophomina phaseolina (Tassi) Goid', *Agroecosistemas*, 3(1), p. 161.

Al-Hashemi, Z. S. and Hossain, M. A. (2016) 'Biological activities of different neem leaf crude extracts used locally in Ayurvedic medicine', *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(2), pp. 128–131.

Alcals, L. A. (2008) *CHARACTERIZATION AND EFFICACY OF BACTERIAL STRAINS FOR BIOLOGICAL CONTROL OF SOIL-BORNE DISEASES CAUSED BY Phytophthora cactorum AND Meloidogyne javanica ON ROSACEOUS PLANTS*. Instituto de Tecnologia Agroalimentaria.

Alonso-Santos, E. (2015) *Crecimiento y metabolismo de Fischerella sp (Stigonematales: Cyanobacteria) encapsulada con alginato de Macrocystis pyrifera (linnaeus) C. Agardh 1820*. Universidad del Mar campus Puerto Ángel.

APHA-AWA-WPCF (1992) 'Nitrógeno (amoniaco): Método de fenato.', in *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18 th edit. American Public Health Association. Washington. D. C., U S.A., pp. 4–120.

Arredondo, B. O. *et al.* (2017) 'Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal', in *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. Segunda ed, p. 150. Available at: <https://www.cibnor.gob.mx/libro-de-microalgas>.

Arroyo, P. U. *et al.* (2018) *Frutas y Hortalizas: Nutrición y salud en la España del S. XXI*, FEN, Fundación Española de la Nutrición.

Avilés, M. *et al.* (2008) 'First report of Macrophomina phaseolina causing crown and root rot of strawberry in Spain', *Plant Pathology*, 57(2), p. 382.

Azmir, J. *et al.* (2013) 'Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review', *Journal of Food Engineering*, 117, pp. 426–436.

Baracaldo, P. S., Hayes, P. K. and Blank, C. E. (2005) 'Morphological and habitat evolution in the cyanobacteria using a compartmentalization approach', *Geobiology*, 3(3), pp. 145–165. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1472-4669.2005.00050.x>.

Baran, P. S., Maimone, T. J. and Richter, J. M. (2007) 'Total synthesis of marine natural products without using protecting groups', *Nature*, 446(7134), pp. 404–408. doi: 10.1038/nature05569.

Bauersachs, T. *et al.* (2014) 'Distribution of long chain heterocyst glycolipids in N₂-fixing cyanobacteria of the order Stigonematales', *Phytochemistry*, 98, pp. 145–150. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.11.007.

Becher, G. P. *et al.* (2007) 'Insecticidal activity of 12-epi-hapalindole J isonitrile', *Phytochemistry*, 68(19), pp. 2493–2497. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.06.024.

Benge M D (1989) 'El árbol y sus características, cultivo y propagación del árbol de neem.', in *El árbol de neem. Foco en pesticidas fitoquímico vol.1*. M Jacobson. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–18.

Bernhoft, A. (2010) 'In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters.', in *A brief review on bioactive compounds in plants*. The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway, pp. 11–14.

Bhat, V. *et al.* (2014) 'The Chemistry of hapalindolesm Fischerindoles, Ambiguines, and Weleitindolinones.', in *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, p. 44.

Bolda, M. *et al.* (2015) *Manual de Producción de Fresa para los Agricultores de la Costa Central*. 2da edición. Edited by M. S. y K. P. UCCE: Surendra K. Dara, Ben Faber y Mark Bolda; CRC Staff: Julie Fallon. California, U.S.A: Coordinación por el Distrito de Conservación de Recursos de Cachuma.

Bolda, M. and Koike, S. (2020) *Actualidades de Marchitez de Verticillium en California en, Agriculture and Natural Resources, University of California.*

Borrero, C. *et al.* (2017) 'New foci of strawberry Fusarium wilt in Huelva (Spain) and susceptibility of the most commonly used cultivars', *Scientia Horticulturae*, 226(June), pp. 85–90. doi: 10.1016/j.scienta.2017.08.034.

Calderon, D. I., Trujillo, T. M. N. and Ramírez, F. E. (2016) '¿Cianobacterias que comen petróleo?', *Ciencia y Mar. Universidad del Mar Campus Puerto Ángel Oax.*, pp. 46–52.

Celis, Á. *et al.* (2008) 'Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión', *Agronomía Colombiana*, 26(1), pp. 97–106.

Cerón, R. L. E. and Aristizábal, G. F. A. (2012) 'Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos.', *Rev. Colomb. Biotecnol. Julio*, XIV(1), pp. 285–295.

Chamorro-Rodriguez, D. M. (2014) *Evaluación de la eficacia de tratamientos de desinfección de suelo en el control de hongos patógenos en el cultivo de la fresa, en las condiciones de cultivo de la provincia de Huelva.* Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.

Chamorro, M. *et al.* (2015) 'Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry', *Crop Protection*, 67, pp. 279–286. doi: 10.1016/j.cropro.2014.10.021.

Chatterjee, R. *et al.* (2010) 'Identification of a sulfonoquinovosyldiacylglyceride from *Azadirachta indica* and studies on its cytotoxic activity and DNA binding properties', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd, 20(22), pp. 6699–6702. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.09.007.

Chen, X. *et al.* (2016) 'The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(19), pp. 5441–

5446. doi: 10.1073/pnas.1521916113.

Corrales and Ciro, G. (2010) 'Péptidos con actividad antimicrobiana producidos por microorganismos nativos.', *Vitae*, 17(2), pp. 181–190.

D'Agostino, G. *et al.* (2006) 'A multicenter phase II study of the cryptophycin analog LY355703 in patients with platinum-resistant ovarian cancer', *International Journal of Gynecological Cancer*, 16(1), pp. 71–76.

Doan, N. T. *et al.* (2000) 'Allelopathic actions of the alkaloid 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A from cyanobacteria of the genera *Fischerella* and *Calothrix*', *Journal of applied phycology*, 12(3–5), pp. 409–416. doi: 10.1023/A:1008170007044.

Drabu, S., Khatri, S. and Babu, S. (2012) 'Neem: Healer of all ailments', *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3(09758585), pp. 120–126. Available at: https://www.researchgate.net/publication/282617904_Neem_Healer_of_All_Ailments.

Esparza-Díaz, G. *et al.* (2010) 'Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss.', *Agrociencia*, 44(7), pp. 821–833.

Fiore, M. F. *et al.* (2009) 'Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*', *Toxicon*, 53(7), pp. 754–761. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.02.010.

Gahukar, R. T. (2014) 'Factors affecting content and bioefficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) phytochemicals used in agricultural pest control: A review', *Crop Protection*, 62, pp. 93–99. doi: 10.1016/j.cropro.2014.04.014.

Gambacorta, A. *et al.* (1998) 'Heterocyst glycolipids from nitrogen-fixing cyanobacteria other than nostocaceae', *Phytochemistry*, 48(5), pp. 801–805. Available at:

file:///C:/Users/alani/Zotero/storage/3E9QD6QN/S0031942297009540.html.

Garcia, G. V. *et al.* (2016) 'Efectividad técnica in vitro de cuatro extractos vegetales contra hongos patógenos de habichuela', *Agroecosistemas*, 4(2), pp. 23–29.

Ghasemi *et al.* (2007) 'Antifungal and Antibacterial Activity of the Microalgae Collected from Paddy Fields of Iran: Characterization of Antimicrobial Activity of *Chroococcus dispersus*.pdf'. Iran: *Journal of biological Sciences*, 7(6), pp. 904–910.

Ghasemi, Y. *et al.* (2004) 'Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*', *Pharmaceutical Biology*, 42(4–5), pp. 318–322. doi: 10.1080/13880200490511918.

González, A. R. (2005) 'Las bahías de Hutulco, Oaxaca, México: ensayo geografico-ecológico.', *Ciencia y Mar. Universidad del Mar Campus Puerto Ángel Oax.*

Gordon, T. R. and Subbarao, K. V. (2007) 'Guías de Producción: Marchites Causada por el *Verticillium* en la Fresa.', *California Strawberry Commission*, p. 4.

Gupta, S. C. *et al.* (2017) 'Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis', *Phytomedicine*. Elsevier, 34(5), pp. 14–20. doi: 10.1016/j.phymed.2017.07.001.

Hagmann, L. and Jüttner, F. (1996) 'Fischerellin A, a novel photosystem-II-inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity', *Tetrahedron Letters*, 37(36), pp. 6539–6542. doi: 10.1016/0040-4039(96)01445-1.

Harborne, J. . (1993) 'The plant and its Biochemical Adaptation to the Environment', in *Introduction to Ecological Biochemistry*. 4th edn. London: Academic Press, Elsevier, pp. 2-33 (384). Available at:

<https://www.elsevier.com/books/introduction-to-ecological-biochemistry/harborne/978-0-08-091858-7>.

Hashtroudi, M. S. *et al.* (2013) 'Endogenous auxins in plant growth-promoting Cyanobacteria-Anabaena vaginicola and Nostoc calcicola', *Journal of Applied Phycology*, 25(2), pp. 379–386. doi: 10.1007/s10811-012-9872-7.

Henry, P. M. *et al.* (2016) 'The population of Fusarium oxysporum f. sp. fragariae, cause of Fusarium wilt of strawberry, in California.', *Plant Disease*, 1((2)), p. 28.

Hillwig, M. L. *et al.* (2014) 'Identification and characterization of a welwitindolinone alkaloid biosynthetic gene cluster in the stigonematalean cyanobacterium Hapalosiphon welwitschii', *ChemBioChem*, 15(5), pp. 665–669. doi: 10.1002/cbic.201300794.

Hossain, M. A. *et al.* (2018) 'Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem', *Journal of Taibah University for Science*, 7(4), pp. 181–188. doi: 10.1016/j.jtusci.2013.05.003.

Huber, U., Moore, R. E. and Patterson, G. M. L. (1998) 'Isolation of a nitrile-containing indole alkaloid from the terrestrial blue-green alga Hapalosiphon delicatulus', *Journal of Natural Products*, 61(10), pp. 1304–1306. doi: 10.1021/np9801561.

INDAP, I. de D. A. and INIA, I. de I. A. (2017) *Manual de manejo agronómico de la frutilla*. Santiago, Chile.

Jahandideh, A. *et al.* (2017) 'Life cycle analysis of a large-scale limonene production facility utilizing filamentous N₂-fixing cyanobacteria', 23, pp. 1–11.

James, E. K. (2017) 'Nitrogen Fixation', in *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 2 Academic. Elsevier, pp. 271–277.

Juárez-Chávez, L. V. (2012) *Actividad antifúngica de metabolitos bioactivos de cianobacterias*. División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Oaxaca.

Komárek, J. and Johansen, J. R. (2015) 'Filamentous Cyanobacteria', in Press, A. (ed.) *Freshwater Algae of North America*. Second Edi. Aquatic Ecology, pp. 135–235. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00004-9>.

Koodkaew, I. *et al.* (2012) 'Isolation of ambiguine D isonitrile from Hapalosiphon sp. and characterization of its phytotoxic activity', *Plant Growth Regulation*, 68(2), pp. 141–150. doi: 10.1007/s10725-012-9700-8.

Kurimoto, S. I. *et al.* (2014) 'Triterpenoids from the fruits of *Azadirachta indica* (Meliaceae)', *Fitoterapia*. Elsevier B.V., 92, pp. 200–205. doi: 10.1016/j.fitote.2013.11.004.

Lang, A. L. A. (2003) *Ecología química*. Primera ed. Edited by P. y Valdes. México, D.F. Available at: https://books.google.es/books/about/Ecología_Química.html?id=H6j8zaDYSYEC&printsec=frontcover&source=kp_read_button&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.

Levitsky, D. O. *et al.* (2016) 'Mathews Journal of Pharmaceutical Science Naturally Occurring Isocyanato / Isothiocyanato Compounds: Their Pharmacological and SAR Activities', *MATHEWS, Open Access Journals*, 1(1), pp. 1–15.

Leyva-Mir, S. G. *et al.* (2015) 'Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México', *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), pp. 143–147. doi: 10.1016/j.ram.2015.03.003.

Llopiz, A. (2016) 'Compuestos bioactivos aislados de cianobacterias y microalgas: propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina Active compounds from cyanobacteria and microalgae: properties and potential

applications in biomedicine', *Bionatura*, 1((2)), pp. 75–84. doi: 10.21931/RB/2016.01.02.8.

Lokanadhan, S., Muthukrishnan, P. and Jeyaraman, S. (2012) 'Neem products and their agricultural applications', *Journal of Biopesticides*, 5((Supplementary)), pp. 72–76.

Loyola-vargas, V. M. *et al.* (2004) 'Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica', *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(001), pp. 67–94.

Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K. and Georgiev, M. I. (2016) 'Terpenoides', in *Pharmacognosy, Fundamentals, Applications and Strategies*. 1st edn. Academic Press, Elsevier, pp. 235–266.

Mariscal-Amaro, L. A. *et al.* (2017) 'Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.) en Guanajuato, México', *Agrociencia*, 51(6), pp. 673–681.

Martínez Aguilar, K. (2010) *Establecimiento de las condiciones de cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, aisladas de suelos cultivados de papaya*. Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel Oax.

Martínez-Rosales, A., Trujillo-Tapia, M. N., Ramírez-Fuentes, E. (2020). Crecimiento y metabolismo de *Fischerella* TB22 en medio de cultivo BG110. *Boletín Micológico*. 35(1):26-34. DOI:10.22370/bolmicol.2020.35.1.2425. ISSN: 0719 3114.

Mayz, J. (2004) 'Fijación biológica de nitrógeno', *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), pp. 1–20. doi: 10.1016/j.compositesb.2015.03.045.

Muffler, K. *et al.* (2011) 'Biotransformation of triterpenes', *Process Biochemistry*, 46(1), pp. 1–15. doi: 10.1016/j.procbio.2010.07.015.

Murry, M. . and Wolk, C. P. (1989) 'Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope', *Archives of Microbiology*, 151(6), pp. 469–474. doi: 10.1007/BF00454860.

Pandey, G., Verma, K. and Singh, M. (2014) 'Evaluation of phytochemical, antibacterial and free radical scavenging properties of *Azadirachta indica* (neem) leaves', *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), pp. 444–447.

Pastrana, A. (2014) *Incidencia y epidemiología de nuevos hongos patógenos de fresa en la provincia de Huelva. Desarrollo de herramientas biotecnológicas y aplicación de otras estrategias de control*. Universidad de Sevilla. Available at: <http://fondosdigitales.us.es/tesis/tesis/2641/incidencia-y-epidemiologia-de-nuevos-hongos-patogenos-de-fresa-en-la-provincia-de-huelva-desarrollo-de-herramientas-biotecnologicas-y-aplicacion-de-otras-estrategias-de-control/>.

Patel, S. M. *et al.* (2016) 'Seminars in Cancer Biology Potential of neem (*Azadirachta indica* L .) for prevention and treatment of oncologic diseases', *Seminars in Cancer Biology*, 40–41, pp. 100–115. doi: 10.1016/j.semcan.2016.03.002.

De Paula, J. A. M. *et al.* (2016) 'Ultrasound-assisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) and its determination by a validated HPLC-PDA method', *Talanta*. Elsevier, 149, pp. 77–84. doi: 10.1016/j.talanta.2015.11.005.

Pineda, R. M. *et al.* (2011) 'Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas se florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de México.', *Polibotánica*, 31(ISSN 1405-2768), pp. 31–50.

Puri, H. (1999) 'Chemical Constituents', in *Neem The Divine Tree Azadirachta Indica*. Harwood Academic Publishers, pp. 23–33.

Quesada, A. and Vicent, W. F. (2011) 'Strategies of adaptation by Antarctic

cyanobacteria to ultraviolet radiation Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to', *European Journal of Phycology*, 32(4), pp. 335–342.

Ramírez-López, C. (2009) *Efecto de la aireación y la irradiación sobre un consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno*. Universidad del Mar campus Puerto Ángel.

Rashid, M. I. *et al.* (2016) 'Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils', *Microbiological Research*, 183, pp. 26–41. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.007.

Rastogi, R. P. and Sinha, R. P. (2009) 'Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites', *Biotechnology Advances*, 27(4), pp. 521–539.

Ravi, A. K., Srivastava, A., Kayastha, A. M., *et al.* (2006) 'Antibacterial potential of γ -linolenic acid from *Fischerella* sp. colonizing Neem tree bark', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), pp. 443–448. doi: 10.1007/s11274-005-9054-8.

Ravi, A. K., Srivastava, A., Singh, A. P., *et al.* (2006) 'Identification of an antimicrobial entity from the cyanobacterium *Fischerella* sp. isolated from bark of *Azadirachta indica* (Neem) tree', *Journal of Applied Phycology*, 18(1), pp. 33–39. doi: 10.1007/s10811-005-9011-9.

Revathi, T. and Thambidurai, S. (2017) 'Synthesis of chitosan incorporated neem seed extract (*Azadirachta indica*) for medical textiles', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 104, pp. 1890–1896. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.081.

Rezende, R. A. *et al.* (2007) 'Neem (*Azadirachta indica* a. Juss) components: Candidates for the control of *Crinipellis pernicioso* and *Phytophthora* ssp.', *Microbiological Research*, 162(3), pp. 238–243. doi: 10.1016/j.micres.2006.06.004.

Riahi, H. *et al.* (2013) 'Effect of *Anabaena vaginicola* Inoculum on Growth of Pot Plants', *Acta Horticulturae*, 1013, pp. 507–514.

Rippka, R. *et al.* (1979) 'Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria', *Microbiology*, 111(1), pp. 1–61. doi: 10.1099/00221287-111-1-1.

Robles Robles, R. (2017) *Interacción entre el estado redox celular y el metabolismo del nitrógeno en cianobacterias*. Universidad de Sevilla, Andalucía, España.

Rubin, P. M., Zetooney, E. and McGowan, R. E. (1977) 'Uptake and Utilization of Sugar Phosphates by *Anabaena flos-aquae*', *Plant Physiology*, 60(3), pp. 407–411. doi: 10.1104/pp.60.3.407.

SAGARPA (2014) 'Componente de Agricultura Familiar Periurbana y de Traspatio Cultivo de Rábano', *Tecnológica, Carta*, pp. 14–15.

SAGARPA, S. de A. G. D. R. P. y A. (2017) *PLANEACIÓN AGRICOLA NACIONAL: FRESA MEXICANA*.

Salazar, D. I. O. *et al.* (2015) 'Antifungal activity of neem (*Azadirachta indica*: Meliaceae) extracts against dermatophytes | Actividad antifúngica de extractos de neem (*Azadirachta indica*: Meliaceae) sobre hongos dermatofitos', *Acta Biologica Colombiana*, 20(3), pp. 201–207. doi: 10.15446/abc.v20n3.45225.

Sergeev, V. N., Gerasimenko, L. M. and Zavarzin, G. A. (2002) 'The Proterozoic History and Present State of Cyanobacteria', *Microbiology*, 71(6), pp. 623–637. doi: 10.1023/A:1021415503436.

Shabana, Y. M. *et al.* (2017) 'Efficacy of plant extracts in controlling wheat leaf rust disease caused by *Puccinia triticina*', *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(1), pp. 67–73. doi: 10.1016/j.ejbas.2016.09.002.

Shariatmadari, Z. *et al.* (2013) 'Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran', *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(4),

pp. 535–547. doi: 10.1080/00380768.2013.782253.

Smitka, T. A. *et al.* (1992) 'Ambiguine Isonitriles, Fungicidal Hapalindole-Type Alkaloids from Three Genera of Blue-Green Algae Belonging to the Stigonemataceae', *Journal of Organic Chemistry*, 57(3), pp. 857–861. doi: 10.1021/jo00029a014.

Solano-Jiménez, R. (2018) *Determinación del efecto alelopático del extracto de Oryza sativa L. sobre el crecimiento de cianobacterias productoras de toxinas*. Instituto Mexicano de Tecnología del agua, Coordinación de desarrollo profesional e institucional.

Taiz, L. and Zeiger, E. (2006) *Fisiología vegetal*. Tercera ed, *Universitat Jaume I*. Tercera ed. Edited by C. de la Plana. Los Ángeles California: Universitat Jaume I. Available at: https://books.google.es/books?id=7QIbYg-OC5AC&printsec=frontcover&dq=Fisiologia+vegetal&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjVqqa_qY3jAhX1WhUIHRRbDgUQ6AEIODAD#v=onepage&q=Fisiologia+vegetal&f=false.

Tredici, M. *et al.* (1991) 'A vertical Alveolar Panel (VAP) for Outdoor Mass Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria', *Biores. Technol.*, 38, pp. 153–159.

Utkhede, R. S., Sholberg, P. L. and Smirle, M. J. (2001) 'Effects of chemical and biological treatments on growth and yield of apple trees planted in *Phytophthora cactorum* infested soil', *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23(2), pp. 163–167. doi: 10.1080/07060660109506925.

Varo, A. *et al.* (2017) 'Screening water extracts and essential oils from Mediterranean plants against *Verticillium dahliae* in olive', *Crop Protection*, 92, pp. 168–175. doi: 10.1016/j.cropro.2016.10.018.

Vega-jarquín, C. (2014) 'Identificación de metabolitos bioactivos de Neem (*Azadirachta indica* Adr. Juss.)', 14(23), pp. 60–66.

Verde-star, M. J. and García-gonzález, S. (2016) 'María Julia Verde-Star, Sergio García-González, Catalina Rivas-Morales', pp. 1–39.

Villamil, M. D. A., Naranjo, N. and Van, S. M. A. (2012) 'Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Collaria scenica* Stall (hemiptera:Miridae)', *EntomoBrasilis*, 5, pp. 0–4.

Volk, R. B. (2005) 'Screening of microalgal culture media for the presence of algicidal compounds and isolation and identification of two bioactive metabolites, excreted by the cyanobacteria *Nostoc insulare* and *Nodularia harveyana*', *Journal of Applied Phycology*, 17(4), pp. 339–347. doi: 10.1007/s10811-005-7292-7.

Volk, R. B. and Furkert, F. H. (2006) 'Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth', *Microbiological Research*, 161(2), pp. 180–186. doi: 10.1016/j.micres.2005.08.005.

Walton, K. and Berry, J. P. (2016) 'Indole alkaloids of the stigonematales (cyanophyta): Chemical diversity, biosynthesis and biological activity', *Marine Drugs*, 14(4). doi: 10.3390/md14040073.

Wong, J. E. J. *et al.* (2015) 'Total phenolic content , in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region', *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 14(6), pp. 104–111.

Wright, A. D. *et al.* (2006) 'Effects of cyanobacterium *Fischerella ambigua* isolates and cell free culture media on zebrafish (*Danio rerio*) embryo development', *Chemosphere*, 65(4), pp. 604–608. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.02.004.

Xuan, T. D. *et al.* (2004) 'Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) to crops and weeds', *Crop Protection*, 23(4), pp. 335–345.

ANEXOS

ANEXO A: Contenido de medio de cultivo BG11°.

Tabla 9. Contenido en 100 mL de Stock para el medio de cultivo BG11°.

Compuesto	Cantidad (g)
<i>Stock 1</i>	
Cloruro de sodio (NaCl)	2.3
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ •7H ₂ O)	0.75
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ •2H ₂ O)	0.36
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	0.06
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	0.01
<i>Stock 2</i>	
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	2.0
<i>Stock 3</i>	
Fosfato de potasio dibásico trihidratado (K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O)	4.0
<i>Stock 4</i>	
Citrato férrico (Fe(C ₆ H ₅ O ₇) • xH ₂ O)	0.6
NOTA: Disolver en agitación a 150 °C hasta obtener un naranja tenue.	
<i>Stock 5</i>	
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	0.286
Cloruro de manganeso (MnCl ₂ •4H ₂ O)	0.181
Sulfato de zinc hepta hidratado (ZnSO ₄ •7H ₂ O)	0.022
Molibdato de sodio dihidratado (Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O)	0.0039
Cloruro de cobalto (CoCl ₂)	0.005
Sulfato de cobre penta hidratado (CuSO ₄ •5H ₂ O)	0.008

ANEXO B: Preparación de soluciones empleadas.

Solución de sulfato de magnesio ($MgSO_4$)

Se disuelve en 20 mL de agua destilada 10 mg de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) con agitación magnética constante, el cual se coloca en un frasco ámbar y se mantiene en oscuridad.

Solución de hipoclorito de Sodio ($NaClO$)

Se coloca 5 mL de blanqueador comercial del 5% en 20 mL de agua destilada, la combinación se lleva a un pH de 7 a 6.5 con ácido clorhídrico (HCl) (NOTA: Esta solución caduca en 24 horas).

Solución fenato

Disuelve en 20 mL de agua destilada 2 g de fenol (C_6H_5OH) y 0.5 g de hidróxido de sodio (NaOH) con agitación magnética constante. Para esta solución es necesario utilizar una campana de extracción ya que se produce una reacción exotérmica y por lo tanto libera gases.

Solución Dragendorff's (modificado)

Mezcla al mismo tiempo 5 mL de la solución a y 5 mL de la solución b en 20 mL ácido acético (CH_3COOH) el cual se afora a 100mL con agua destilada.

Solución A. Se disuelve 0.85 g de nitrato de bismuto ($Bi(NO_3)_3$) en una mezcla de 10 mL de ácido acético (CH_3COOH) y 40 mL de agua destilada.

Solución B. Se pesa 8 g de yoduro de potasio (KI) el cual se disuelve en 20 mL de agua destilada.

Solución de vainillina-ácido sulfúrico (H_2SO_4)

Realiza dos soluciones: La primera se disuelven 30 mg de vainillina en 3 mL de etanol (CH_3CH_2OH) y se agita manualmente hasta disolver la totalidad del reactivo.

La segunda solución se prepara con 3 mL de agua destilada en 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado el cual se deja enfriar por completo. Por último, se procede a mezclar en su totalidad las dos soluciones al mismo tiempo (Verde-star and García-gonzález, 2016).

ANEXO C: Precipitaciones de alcaloides en *Fischerella sp* TB22.

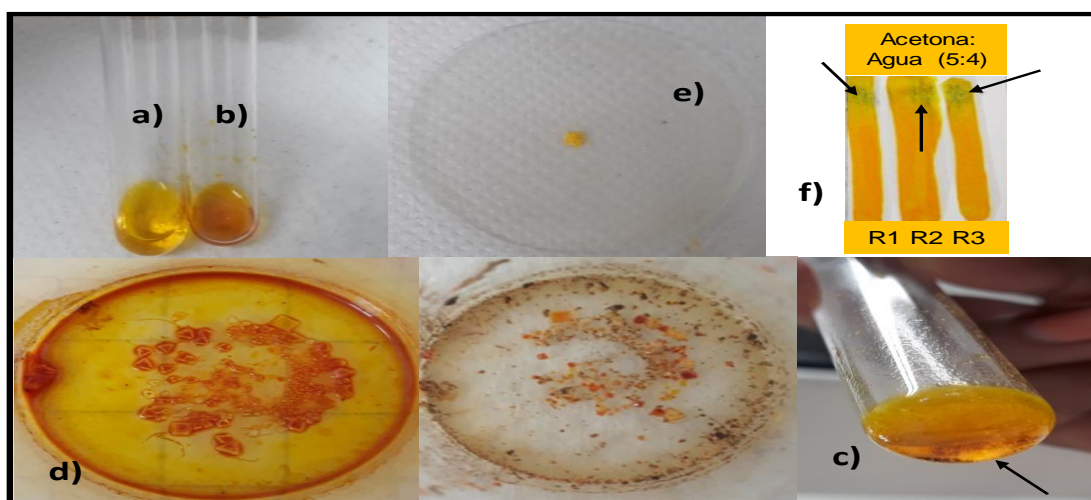


Figura 16. Formación de precipitaciones cristalinas después de la adición de Reactivo Dragendorff's a los extractos de *Fischerella sp* TB22.

- a) Blanco (100 µl de agua destilada y 100 µl de reactivo *Dragendorff's*).
- b) Extracto positivo (100 µl de extracto de *Fischerella sp* TB22 y 100 µl de reactivo *Dragendorff's*).
- c) Formación de cristales por 100 µl de extracto de *Fischerella sp* TB22.
- d) Secado de los cristales a temperatura ambiente por tres días.
- e) Polvo de las precipitaciones cristalinas cubicas y triangulares (73 mg/mL de extracto de *Fischerella sp* TB22).
- f) Presencia de precipitaciones en las placas cromatográficas después de agregar el reactivo *Dragendorff's*.

ANEXO D: Curva de calibración de amonio

Concentración de NH ₄ Cl (µg/mL)	Absorbancia (\bar{X})(630 nm)
0	6.66667E-05
0.2	0.1578
0.4	0.1966
0.6	0.2346
0.8	0.2844
1	0.3169

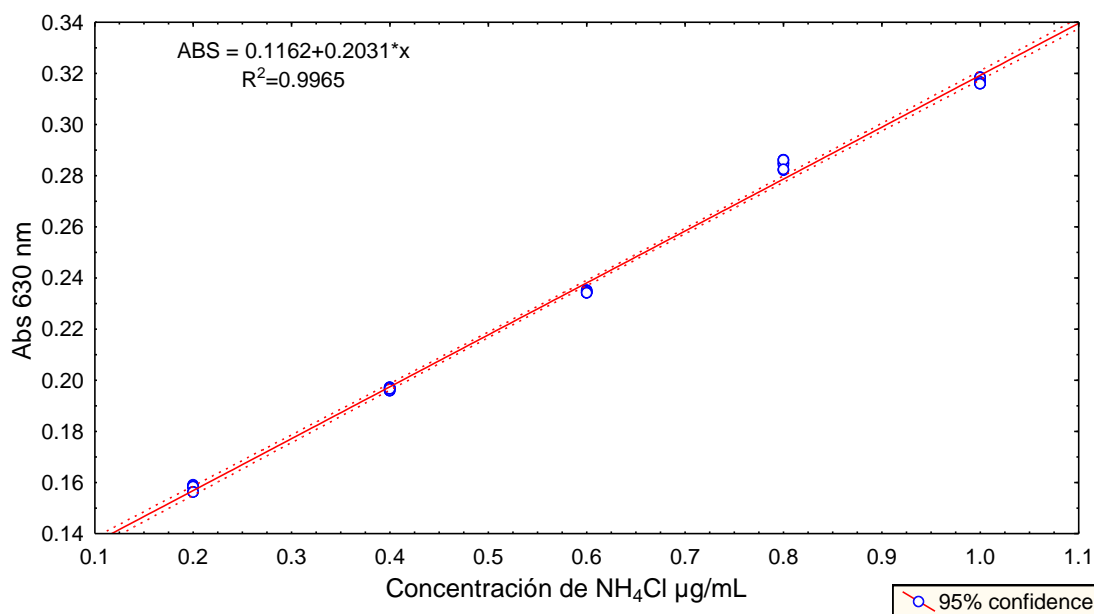


Figura 17. Curva de calibración para la determinación de nitrógeno amoniacal (NH₄⁺).

NOTA: Limpia el material volumétrico con agua, jabón y etanol. Coloca boca abajo el material volumétrico apoyándote con una gradilla y deja evaporar el residuo de etanol a temperatura ambiente (No introducir papel o tela absorbente ni colocar en la estufa) y procura que la parte inferior del menisco este exactamente sobre la línea de aforo para obtener una $R^2 \leq 1$.

ANEXO E: Preparación de medios de cultivos solidos empleados.

Medio dextrosa-agar-patata (PDA)

En un frasco Duran® con capacidad de 1L, disuelve 39 g de medio dextrosa-agar-patata (PDA) en 1000 mL de agua destilada en un agitador magnético a una temperatura de 70°C, se coloca un tapón de algodón desengrasado en la boquilla del frasco y se esteriliza en autoclave por 30 minutos a 120°C.

Medio de ocho vegetales (V8)

Toma con una probeta graduada 100 mL de zumo de vegetales (V8) (Splash® Kiwifresón V8 o Campbell's V8 jugo de verduras el original) y con una centrífuga separa la pulpa del jugo a 4000 RPM hasta tener un total de 180 mL de jugo centrifugado.

En un frasco Duran® con capacidad de 1L, vierte 720 mL de agua destilada, 180 mL de jugo V8 centrifugado y disuelve en la mezcla antes mencionada 2.7 g de carbonato de calcio (CaCO_3) y 13.5 g de agar bacteriológico con un agitador magnético a una temperatura de 70°C, se coloca un tapón de algodón desengrasado en la boca del frasco y se esteriliza en autoclave por 30 minutos a 120°C.

Medio Agar-Malta-Asparagina-Peters (AMAP)

Disuelve en 900 mL de agua destilada 0.45 g de Peters (SCOTT'S® Fertilizante Peters 20:15:20), 1.8g de L-asparagina, 9 g de extracto de malta bacteriológico y 9 g de agar bacteriológico con un agitador magnético a una temperatura de 70°C, se coloca un tapón de algodón desengrasado en la boca del frasco y se esteriliza en autoclave por 30 minutos a 120°C.

NOTA: Respeta el orden de los elementos de los medios AMAP y V8 como también el tiempo de disolución de uno entre otro elemento para evitar que se precipiten (No colocar todos juntos en una sola exhibición).