

Actividad antifúngica *In vitro* de nanoemulsión preparada a base de aceite de neem (*Azadirachta indica*)

Antifungal activity *In vitro* of nanoemulsion prepared from neem oil (*Azadirachta indica*)

Josafat Alberto Hernández-Becerra¹ ,
Ana Lidia Sánchez-Cerino² ,
Hugo Sergio García-Galindo³ ,
Cristóbal Torres-Palacios³ ,
Angélica Alejandra Ochoa-Flores^{2*} 

¹Universidad Tecnológica de Tabasco, División de Procesos Industriales. Carretera Villahermosa-Teapa, Km 14.6 s/n, Fraccionamiento Parrilla II, CP. 86280. Centro, Tabasco, México.

²Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Agropecuarias. Carretera Villahermosa-Teapa Km 25, CP. 86298. Centro, Tabasco, México.

³Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz, Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos. Av. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, CP. 91897. Veracruz, Veracruz, México.

* Autor de correspondencia:
angelica.ochoa@ujat.mx

Artículo científico

Recibido: 01 de febrero 2023

Aceptado: 09 de noviembre 2023

Como citar: Hernández-Becerra JA, Sánchez-Cerino AL, García-Galindo HS, Torres-Palacios C, Ochoa-Flores AA (2023) Actividad antifúngica *In vitro* de nanoemulsión preparada a base de aceite de neem (*Azadirachta indica*). Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Núm. Esp. III: e3637. DOI: 10.19136/era.a10nIII.3637

RESUMEN. Las nanoemulsiones son una alternativa efectiva en la protección, acarreo y liberación de compuestos bioactivos al favorecer una mayor solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad y eficacia. El aceite de neem contiene compuestos con actividades biológicas, entre ellas capacidad antifúngica y, dado que los mohos son responsables del deterioro de muchos frutos, las nanoemulsiones de aceite de neem podrían representar una alternativa de manejo postcosecha. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar nanoemulsiones estables a base de aceite de neem, así como evaluar su actividad antifúngica frente a una cepa de *Aspergillus niger* aislada de frutos de papaya. Nanoemulsiones con diferentes valores de HLB (Balance Hidrófilo Lipófilo) fueron preparadas empleando aceite de neem, agua y emulsificantes. Las preparaciones fueron analizadas en su tamaño de glóbulo, índice de polidispersidad (PDI) y carga superficial. La actividad antifúngica fue evaluada a través de la técnica de alimento envenenado. La metodología de superficie de respuesta fue empleada para identificar una formulación óptima, con 8.21% de aceite de neem, una relación aceite-emulsificante 1:3.28 y a un HLB de 16.2, con la cual se prepararon nanoemulsiones que alcanzaron un tamaño de glóbulo de 60 nm, estables por 365 días. Las nanoemulsiones, preparadas con aceite de neem comercial o recién extraído, fueron efectivas para inhibir *In vitro* el crecimiento de *Aspergillus niger*. Esto contrasta con ensayos en donde se empleó aceite no nanoemulsionado. El empleo de nanoemulsiones a base de aceite de neem representa una alternativa prometedora en el control del deterioro postcosecha ocasionado por *Aspergillus niger*.

Palabras clave: Inhibición, fitopatógeno, *Aspergillus niger*, emulsión nanométrica, optimización.

ABSTRACT. Nanoemulsions are an effective alternative in the protection, transport, and release of bioactive compounds, favoring greater solubility, stability, bioavailability, and efficacy. Neem oil contains compounds with a broad spectrum of biological activity, including antifungal capacity. Molds are responsible for the deterioration of many fruits, so extracts from plants represent ecologically viable postharvest handling alternatives. The aim of this work was to develop stable nanoemulsions with neem oil, evaluating its antifungal activity against *Aspergillus niger* isolated from papaya fruits. Nanoemulsions with different Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB) values were prepared using neem oil, deionized water, and non-ionic emulsifiers. The globule size, polydispersity index (PDI), and surface charge was analyzed. The antifungal activity was evaluated through the poisoned food technique. Response surface methodology was used to identify an optimal formulation which consisted of 8.21% of neem oil, 1:3.28 oil:emulsifier ratio, and 16.2 of HLB. This nanoemulsion reached a globule size of 60 nm and was stable for 365 days. Nanoemulsions prepared with commercial or freshly extracted neem oil were effective in inhibiting *In vitro* the growth of *Aspergillus niger*. This contrasted with trials where non-nano-emulsified oil was used. The use of nanoemulsions with neem oil represents a promising alternative in the control of postharvest deterioration caused by *Aspergillus niger* in fruits.

Key words: Inhibition, phytopathogen, *Aspergillus niger*, nanometric emulsion, optimization.

INTRODUCCIÓN

Azadirachta indica, comúnmente reconocido como neem, es un árbol de gran relevancia en diferentes países debido a que se le atribuyen propiedades biológicas, tales como insecticida, antifúngico y anticonceptivo, entre otras. Los compuestos bioactivos relacionados con estas propiedades pueden encontrarse en la corteza, ramas, hojas, tronco y semillas; destacando éstas últimas debido a que es en ellas donde se albergan la mayor proporción de estos compuestos bioactivos (Ospina-Salazar *et al.* 2015). La fracción oleosa de las semillas de neem es la más relevante debido a que constituye alrededor del 40% de su peso y por qué en ella se han identificado metabolitos como los limonoides (tetranotriterpenoides), los cuales poseen actividad bactericida, antifúngica y antialimentaria en insectos (Gahucar 2014, Hatti *et al.* 2014, Djibiril *et al.* 2015, Muñoz-Reyes *et al.* 2016, Teuntor y Aleman 2016). De entre los compuestos bioactivos, la azadiractina es el más reconocido debido a sus propiedades insecticidas, encontrándose principalmente en las semillas y en menor concentración en las hojas.

La presencia de azadiractina en el aceite de neem ha hecho de éste un producto de gran interés comercial enfocado al control de diferentes tipos de insectos en diversos cultivos. No obstante, la presencia de otros compuestos como la nimbina y la salanina, adquieren relevancia ya que la sinergia entre ellos, o con otros componentes han demostrado destacadas propiedades antifúngicas contra algunas especies tales como *M. canis*, *C. albicans* y *Aspergillus* sp. (Mahmoud *et al.* 2011), así como contra *Drechslera*, *Alternaria* y *Fusarium* (Ospina-Salazar *et al.* 2015).

Diferentes hogos fitopatógenos son responsables del deterioro de una gran variedad de productos agrícolas, generando éstos importantes pérdidas (5 al 25% en países desarrollados y 20 al 50% en países en desarrollo) (Herrera-Cebreros *et al.* 2022). Considerando lo anterior, resulta atractivo el evaluar la actividad antifúngica de extractos oleosos de la semilla del neem contra hogos fitopatógenos

relacionados con daños pre y postcosecha de algunas frutas y hortalizas.

Si bien, la fracción oleosa de los frutos del árbol de neem contiene compuestos con un amplio espectro de actividad biológica, su naturaleza lipofílica limita su aplicación en entornos hidrofílicos reduciendo significativamente el efecto esperado. La nanotecnología a través del desarrollo de nanoemulsiones ha demostrado ser una alternativa efectiva en la protección, acarreo y liberación de compuestos bioactivos de interés tecnológico, ofreciendo una mayor solubilidad, estabilidad, bioaccesibilidad, biodisponibilidad y eficacia (Zambrano-Zaragoza *et al.* 2013, Ohashi *et al.* 2015). En este sentido, investigaciones recientes han reportado mejoras en la actividad antifúngica de diversos aceites esenciales cuando éstos fueron integrados en nanoemulsiones como sistemas de acarreo y liberación (Wan *et al.* 2019). Este efecto observado se sugiere que es debido al reducido tamaño de la nanoestructura conformada lo cual incrementa la absorción celular pasiva, disminuyendo la resistencia a la transferencia de masa hacia los compartimentos intercelulares del hongo. Por otro lado, se incrementa la estabilidad fisicoquímica de la fracción oleosa o aceite esencial durante el almacenamiento de la nanoemulsión (Bedoya-Serna *et al.* 2018, Ribes *et al.* 2017).

Las nanoemulsiones han sido definidas como finas dispersiones de agua en aceite o de aceite en agua, que presentan una distribución de tamaño de glóbulo de entre 20 y 500 nm, estabilizadas por pequeñas cantidades de emulsificantes, que a diferencia de las emulsiones, ofrecen diversas ventajas entre las que destacan una mayor estabilidad de las gotas ante la agregación y separación gravitacional, alta solubilidad y estabilidad, además de mejorar la biodisponibilidad y eficacia biológica a los compuestos bioactivos en ellas dispersos (Cardoso-Ugarte y Jimenez-Munguia 2015). Para mantener la estabilidad fisicoquímica de las nanoemulsiones, en su formulación pueden emplearse diversos métodos de preparación, diversas condiciones de operación características del método de preparación, diferentes tipos y proporciones de las fases que las conforman, así como diferentes tipos

y proporciones de los emulsificantes empleados (Mushtaq *et al.* 2023). Considerando que la estabilidad de las nanoemulsiones a desarrollar es una característica determinante en el logro de la función de acarreo de compuestos activos, las formulaciones planeadas, así como lo principales parámetros de proceso deben ser evaluados y monitoreados durante su preparación, así como a través del tiempo de almacenamiento. En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar nanoemulsiones estables a base de aceite de neem, así como evaluar su actividad antifúngica frente a una cepa de *Aspergillus niger* aislada de frutos de papaya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de aceite a partir de semillas de neem

Frutos maduros de árboles de neem (*Azadirachta indica*) fueron recolectados en los alrededores de la Universidad Tecnológica de Tabasco. Los frutos fueron trasladados al laboratorio, lavados y retirada la pulpa de sus semillas. Las semillas fueron secadas a temperatura ambiente bajo sombra y posteriormente se retiró la cascarilla del kernel. El kernel obtenido fue molido hasta convertirlo en una masa homogénea la cual se pesó dentro de matraces Erlenmeyer, adicionando posteriormente acetona como solvente de extracción. La relación kernel:Acetona empleada fue de 1:10 (p:v). La mezcla kernel-acetona fue colocada en un baño sonicador (Cole-Parmer Modelo 8895-39) con potencia de salida de 110W, 40KHz. Las condiciones de sonicación fueron de 20 min a una temperatura de 40 °C. Al finalizar el tiempo de extracción, la mezcla fue filtrada a vacío y el filtrado evaporado bajo vacío empleando un rota evaporador a 50 °C. La fracción oleosa extraída fue pesada y estimado el porcentaje de extracción mediante la relación de los pesos del aceite extraído y del kernel inicialmente empleado.

Diseño, preparación y evaluación de nanoemulsiones

Nanoemulsiones aceite en agua fueron planteadas considerando un diseño experimental

central compuesto, con tres factores a tres niveles y dos puntos axiales, empleando como ingredientes: aceite de neem, agua desionizada y mezcla de emulsificantes no iónicos (Tween 20 y Span 20, ambos de la marca Cedrosa®). Los factores considerados fueron: concentración de aceite en la nanoemulsión, proporción aceite-emulsificante y valor de HLB. Los valores de HLB considerados se obtuvieron a través de la mezcla de diferentes proporciones de los emulsificantes. En la Tabla 1 se muestran las formulaciones planteadas dentro del diseño experimental. Para la elaboración de las nanoemulsiones, se preparó la fase oleosa mezclando las proporciones adecuadas de los emulsificantes con el aceite de neem. A continuación, una emulsión gruesa fue preparada mediante la adición de agua destilada a la fase oleosa, homogeneizándola por 3 min a 20,000 rpm con ayuda de un homogeneizador Ultra-Turrax T25 digital (IKA Works, Inc. Staufen, Alemania). Cada emulsión gruesa fue sometida a ultra sonicación empleando un Sonicador Branson Digital S-450D (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT). Las condiciones de proceso fueron: 20% de amplitud, 50% de ciclo de trabajo, 6 minutos de tratamiento en ciclos de 1 minuto de sonicación, 1 minuto de reposo.

Las nanoemulsiones preparadas fueron analizadas en su tamaño de glóbulo, índice de polidispersidad y carga superficial del glóbulo, para lo cual se empleó un equipo de dispersión de luz dinámica Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments Inc.) con ángulo fijo de 90° y 25 °C de temperatura. A partir de los resultados del tamaño de glóbulo alcanzado en las nanoemulsiones preparadas y, derivado de un análisis estadístico de superficie de respuesta, se identificó una formulación óptima a partir de la cual se obtuviera una nanoemulsión cuyo tamaño de glóbulo estuviera entre 30 y 60 nm. La estabilidad de las nanoemulsiones con tamaño de glóbulo menor a 100 nm fue evaluada durante su almacenamiento a 4 °C. Análisis del tamaño de glóbulo, distribución y carga superficial fueron realizados cada siete días, durante los primeros 28 días y finalmente después de 365 días.

Tabla 1. Formulación de nanoemulsiones planteadas por diseño experimental central compuesto con tres factores a tres niveles y dos puntos axiales.

Formulación	Aceite (%)	Relación aceite:mezcla emulsificantes (p:p)	HLB	Composición porcentual (%) de emulsificantes en mezcla	
				Tween 20	Span 20
1	3	1:2	10.625	25	75
2	7	1:2	10.625	25	75
3	3	1:4	10.625	25	75
4	7	1:4	10.625	25	75
5	3	1:2	14.675	75	25
6	7	1:2	14.675	75	25
7	3	1:4	14.675	75	25
8	7	1:4	14.675	75	25
9	1	1:3	12.65	50	50
10	9	1:3	12.65	50	50
11	5	1:1	12.65	50	50
12	5	1:5	12.65	50	50
13	5	1:3	12.65	50	50
14	5	1:3	8.6	0	100
15	5	1:3	16.7	100	0

Aislamiento e identificación del hongo filamentos

A partir de un fruto de papaya (*Carica papaya* L.) con síntomas visibles de daño por hongo filamentos, se realizó un aislamiento mediante la siembra directa en medio Agar Dextrosa y Papa (PDA) (MCD LAB[®]) acidificado. El cultivo fue incubado a 25 ± 1 °C por 5 días y posteriormente se realizaron una serie de reaislamientos en medio PDA hasta obtener un cultivo monospórico. El hongo filamentos aislado fue identificado molecularmente, para lo cual se extrajo su ADN según Raeder y Broda (1985) y se utilizó para la amplificación de la región espaciadora interna (ITS) transcrita del ADN ribosomal por la técnica de PCR, según White *et al.* (1990). El ADN amplificado fue secuenciado en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuernavaca, Morelos, México), y las secuencias fueron alineadas con secuencias depositadas en el GenBank del NCBI mediante el programa BLASTn, para verificar el porcentaje identidad correspondiente a la especie analizada.

Evaluación de actividad antifúngica *In vitro*

La técnica de alimento envenenado fue empleada para evaluar la actividad antifúngica de las nanoemulsiones preparadas, considerando la formulación óptima previamente identificada. Para la pre-

paración de estas nanoemulsiones se consideró, por un lado, aceite recién extraído a partir de las semillas de neem y por otro, aceite de neem comercial (NowFoods[®]). Aunado a lo anterior, se evaluó también la actividad antifúngica de los aceites, tanto el extraído como el comercial, sin nano emulsionar. Las concentraciones evaluadas del aceite de neem (nanoemulsionado o solo) en el medio de cultivo fueron de 7.7, 15.4, 23.1, 30.8 y 38.5 mg mL⁻¹. Durante la preparación de las pruebas, las nanoemulsiones a evaluar, así como los aceites de neem fueron mezclados con medio PDA a 40 °C y vertidos en cajas de Petri de 90 mm de diámetro. Cajas de prueba con medio PDA sin nano emulsión o sin aceite de neem integrado fueron empleadas como tratamiento testigo. Una vez solidificado el medio, se inoculó al centro de cada caja de Petri un disco de 5 mm de diámetro conteniendo crecimiento del hongo filamentos aislado previamente, sembrado en medio PDA e incubado por 8 días. Todas las Cajas de Petri inoculadas al centro fueron incubadas a 25 ± 1 °C hasta que el crecimiento del hongo filamentos en el tratamiento testigo ocupara el 100% de la superficie de la caja de Petri. El crecimiento radial del micelio alrededor de los discos en cada caja de prueba fue medido diariamente empleando un vernier. El porcentaje de inhibición fue estimado considerando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición(\%)} = \left(\frac{D1 - D2}{D1} \right) * 100$$

Donde: D1 = Diámetro colonial testigo, y D2 = Diámetro colonial tratamiento

Análisis estadístico

La identificación de una formulación óptima para preparar nanoemulsiones con tamaño de glóbulo de entre 30 y 60 nm fue realizada mediante un análisis de superficie de respuesta empleando el Optimizador de Respuesta del Software Minitab (© 2022 Minitab, LLC. All Rights Reserved). Análisis de varianza (ANOVA) con posterior comparación de medias empleando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) fueron realizadas para estimar diferencia entre los tratamientos.

RESULTADOS

Preparación de nanoemulsiones, caracterización y definición de formulación óptima

Aceite extraído de las semillas de frutos del árbol de neem fue empleado como fase oleosa en la preparación de las nanoemulsiones, considerando las formulaciones planeadas bajo el diseño experimental indicado en la Tabla 1. Cada una de las preparaciones fue analizada en su tamaño de glóbulo, índice de polidispersidad (PDI) y carga superficial (potencial Z). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2; en ésta se observa que la concentración de aceite de neem empleada (A), así como la relación aceite:emulsificante (RAE) y los valores de HLB alcanzados por las diferentes mezclas de los emulsificantes usados (Tween 20 y Span 20) tienen efecto significativo en el tamaño de glóbulo obtenido en las nanoemulsiones generadas a partir de estos componentes. Así mismo, las interacciones A*RAE, A*HLB, RAE*HLB y RAE*RAE también mostraron tener efectos significativos sobre el tamaño de glóbulo. Por otro lado, en el caso del PDI, únicamente las interacciones A*HLB y RAE*HLB mostraron efectos significativos sobre este

parámetro. En el caso del potencial Z, éste fue solo influenciado por el HLB y su término cuadrático (HLB*HLB) (Tabla 2).

Considerando que el tamaño de glóbulo alcanzado es una característica relevante, el conocer el efecto que ejercen los diferentes factores involucrados en su preparación es muy importante. En este sentido, al analizar en forma general los efectos principales ejercidos por cada uno de los factores estudiados se encontró que al incrementar la concentración del aceite, o aumentando la RAE, los tamaños de glóbulo obtenidos tienden a ser mayores (Figura 1a, región derecha). Situación contraria se observó en el caso del HLB, siendo que valores de HLB mayores favorecen la formación de glóbulos de menor tamaño (Figura 1b y c, región izquierda). El efecto de las interacciones observadas entre los diferentes factores también fue significativo. En este sentido es de hacer notar la influencia que la RAE ejerce sobre el tamaño de glóbulo en las nanoemulsiones obtenidas, de manera que grandes incrementos en el tamaño de glóbulo son observados al incrementar tanto los niveles de este factor como el de la concentración de aceite en las formulaciones (Figura 1a). Por lo anterior, si se desea obtener nanoemulsiones con tamaños de glóbulo en escala nanométrica (< 100 nm) es necesario considerar esta importante interacción (Figura 1a). En este mismo sentido, en las Figuras 1b y 1c se observa el efecto de las interacciones HLB* A y HLB*RAE sobre el tamaño de glóbulo. Como puede apreciarse, cambios en los niveles de HLB influyen marcadamente sobre el tamaño de glóbulo, siendo valores de HLB altos los que generan tamaños de glóbulo pequeños.

A partir de los resultados obtenidos se estimaron los coeficientes para cada uno de los términos que conforman modelos matemáticos que mejor se ajustan y describen los tamaños de glóbulo, PDI y potencial Z en función de los factores considerados en dichos modelos. Los coeficientes estimados, así como el grado de ajuste (R^2) para cada uno de los modelos generados se muestra en la Tabla 3, siendo éstos empleados para el desarrollo de los gráficos de superficie presentados en las figuras 1a, 1b y 1c. Una característica fundamental en la funcionalidad

Tabla 2. Valores de p derivados del Análisis de Varianza de los efectos de los diferentes factores y términos del modelo sobre las diferentes variables de respuesta consideradas en la caracterización de las nanoemulsiones preparadas.

	Valores de p		
	Tamaño de glóbulo	Índice de polidispersidad (PDI)	Carga superficial del glóbulo (Z)
Aceite (A)	0.000	0.294	0.398
Relación Aceite:Emulsificante (RAE)	0.000	0.851	0.503
HLB	0.000	0.202	0.000
A*A	0.120	0.129	0.078
RAE*RAE	0.026	0.439	0.095
HLB*HLB	0.374	0.065	0.020
A*RAE	0.000	0.160	0.965
A*HLB	0.002	0.007	0.420
RAE*HLB	0.017	0.001	0.097

esperada en las nanoemulsiones es que los tamaños de glóbulo alcanzados sean menores a 100 nm. Por ello al contar con un modelo matemático que predijera el tamaño de glóbulo de una nanoemulsión en función de la composición de sus ingredientes (factores estudiados) fue posible identificar una formulación (formulación óptima) con la cual se alcanzarían tamaños de glóbulo entre 30 y 60 nm. En este sentido, la formulación óptima identificada considera una concentración de aceite de neem del 8.21%, una RAE de 1:3.28 (p:p) y un HLB de 16.222. Lo anterior, descrito en términos porcentuales para cada uno de los ingredientes de la formulación corresponde al 8.21% de aceite de neem, 25.340% del emulsificante Tween 20, 1.589% del emulsificante Span 20 y 64.861% de agua destilada desionizada.

En nanoemulsiones, el mantener los tamaños de glóbulo en escala nanométrica a lo largo del tiempo es un requerimiento necesario para asegurar la funcionalidad de dichas nanoemulsiones durante su uso. En este contexto, en la Tabla 4 se muestran los tamaños de glóbulo observados en nanoemulsiones conteniendo aceite de neem durante su almacenamiento a 4 °C. Las nanoemulsiones consideradas en esta parte del estudio comprendieron aquellas cuyos tamaños de glóbulo inicial se encontraba por debajo de los 100 nm. Estas nanoemulsiones correspondían a las formulaciones 5 (F5), 6 (F6), 7 (F7), 11 (F11) y 14 (F14) indicadas en la Tabla 1. Así mismo, se consideró también la formulación identificada previamente como óptima (F Opt). Como puede apreciarse, las nanoemulsiones preparadas a

partir de las formulaciones F Opt y F14 fueron las únicas que mantuvieron sus tamaños de glóbulo sin cambios significativos a lo largo del almacenamiento de 365 días (Tabla 4).

Identificación del hongo filamentoso aislado

La funcionalidad esperada para las nanoemulsiones conteniendo aceite de neem fue su capacidad antifúngica frente a uno de los hongos responsables del deterioro postcosecha de frutos de papaya. En este sentido, derivado de la serie de reaislamientos en medio PDA, se obtuvo un hongo monospórico cuyas colonias después de 5 días de crecimiento presentaban características filamentosas, de color blanco grisáceas que tornaron a amarillo (Figura 2). Estas colonias posteriormente se cubrían de puntos oscuros apreciándose finalmente de color negro y granulosas. Características microscópicas indicaban la presencia de cabezas conoidales globosas de color café oscuro, conidióforos lisos de color marrón claro y conidios globosos. La posterior identificación molecular realizada mediante búsqueda por homología indicó como resultado un 99% de similitud con *Aspergillus niger* AY373852 y AF138904. Considerando todo lo anterior, el hongo aislado en este estudio fue identificado como *Aspergillus niger*.

Evaluación de la actividad antifúngica

Considerando la formulación identificada previamente como óptima, nanoemulsiones conteniendo aceite de neem recién extraído a partir de las semillas de neem (NeE), así como aceite de neem comercial

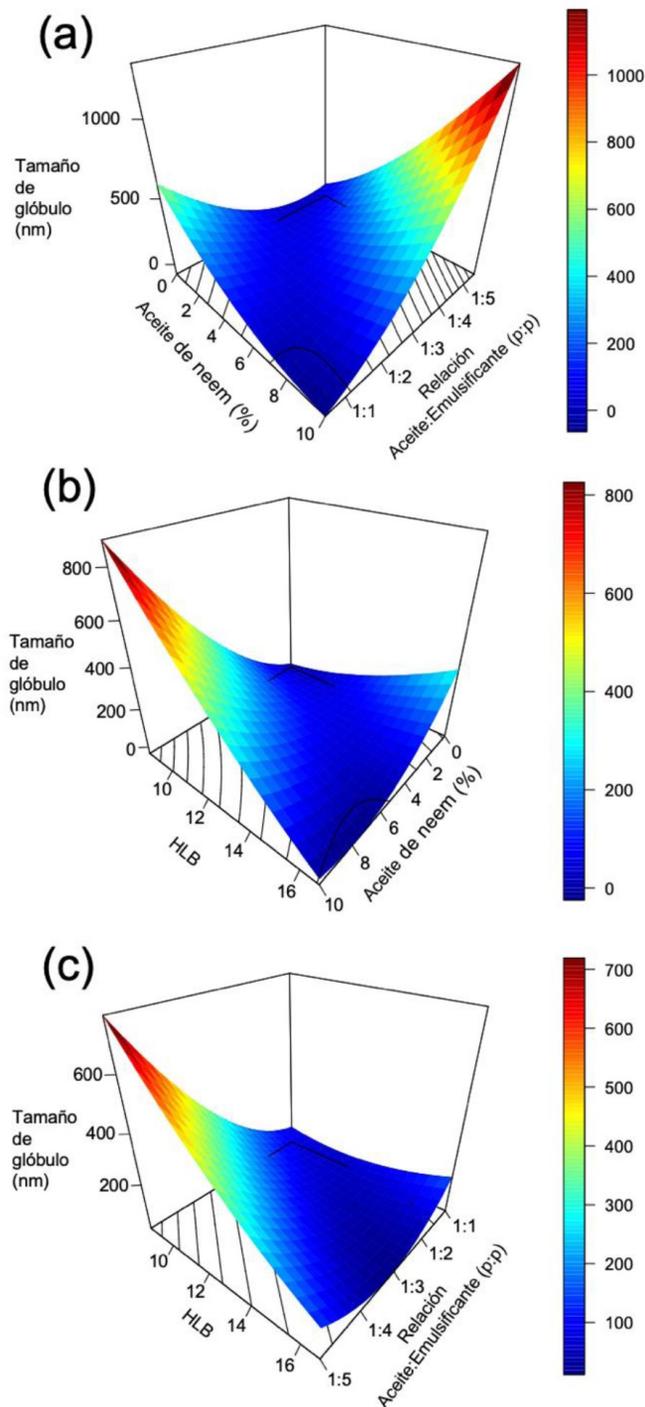


Figura 1. Efecto de las diferentes interacciones conformadas por las variables concentración de aceite, relación aceite:emulsificante y valores de HLB en el tamaño de glóbulo obtenido en las nanoemulsiones.

Tabla 3. Coeficientes estimados para cada uno de los diferentes términos considerados en los modelos generados para cada una de las variables de respuesta consideradas en la caracterización de las nanoemulsiones preparadas.

Coefficientes del modelo	Tamaño de glóbulo	Índice de polidispersidad (PDI)	Carga superficial del glóbulo (Z)
Constante	-81.90	-1.00	127.70
Aceite (A)	45.70	0.121	9.54
Relación Aceite:Emulsificante (RAE)	-46.10	0.581	1.90
HLB	25.40	-0.006	-16.70
A*A	5.90	0.012	-0.56
RAE*RAE	35.10	0.023	2.10
HLB*HLB	3.20	0.014	0.74
A*RAE	38.90	0.025	0.03
A*HLB	-15.20	-0.026	-0.29
RAE*HLB	-21.90	-0.067	-1.22
R ²	88.16	63.40	78.90

Tabla 4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el tamaño de glóbulo (nm) de las nanoemulsiones generadas, considerando las formulaciones que menor tamaño de glóbulo producen.

Días	Formulación					
	F5	F6	F7	F11	F14	F Opt
0	49.36 ± 10.71 ^{cAB}	30.54 ± 0.04 ^{bB}	59.16 ± 10.72 ^{bA}	65.49 ± 7.32 ^{dA}	62.52 ± 3.12 ^{aA}	59.99 ± 2.16 ^{aA}
7	52.08 ± 2.41 ^{cB}	32.60 ± 2.46 ^{bB}	44.64 ± 6.79 ^{bB}	99.10 ± 6.47 ^{cA}	59.73 ± 16.00 ^{aB}	66.68 ± 10.00 ^{aAB}
14	55.79 ± 7.29 ^{cB}	36.78 ± 5.77 ^{bB}	44.55 ± 10.94 ^{bB}	127.34 ± 10.43 ^{bcA}	51.31 ± 10.59 ^{aB}	64.19 ± 7.09 ^{aB}
21	90.76 ± 4.32 ^{bB}	46.44 ± 7.97 ^{bC}	43.56 ± 10.66 ^{bC}	130.59 ± 10.09 ^{bcA}	64.41 ± 1.54 ^{aBC}	65.50 ± 6.24 ^{aBC}
28	99.13 ± 0.69 ^{bB}	48.82 ± 2.64 ^{bC}	57.16 ± 10.19 ^{bC}	142.37 ± 10.37 ^{bA}	62.32 ± 2.97 ^{aC}	66.47 ± 10.32 ^{aC}
365	269.10 ± 0.68 ^{aB}	322.60 ± 7.29 ^{aA}	218.60 ± 0.30 ^{aC}	208.80 ± 3.50 ^{aC}	64.79 ± 1.61 ^{aD}	67.17 ± 5.39 ^{aD}

Valores medios dentro de la misma columna que no comparten alguna letra minúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$).
 Valores medios dentro de la misma fila que no comparten alguna letra mayúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

(NeC) fueron evaluadas en su actividad antifúngica frente a la cepa de *Aspergillus niger*. En la figura 2b y 2c se muestra ejemplo de la inhibición del desarrollo radial del hongo en cajas de Petri con medio PDA conteniendo NeE y NeC. Lo anterior contrasta con el desarrollo normal del hongo en cajas de Petri con medio PDA sin nanoemulsiones adicionadas (Testigo) (Figura 2a). El grado de inhibición (%) estimado en cada caso deriva de la relación porcentual observada entre el desarrollo radial de la caja testigo contra la caja conteniendo las nanoemulsiones. En este sentido, aceite de neem extraído (AE), así como el aceite de neem adquirido comercialmente (AC), ambos sin nanoemulsificar, fueron también evaluados en su actividad antifúngica. En la Figura 3 se muestran los grados de inhibición alcanzados por cada una de las nanoemulsiones y de los aceites de neem sin nanoemulsificar bajo diferentes concentraciones de éstos en el medio PDA. Como puede apreciarse, el mayor grado de inhibición alcanzado ($93.33 \pm 5.77\%$) correspondió a nanoemulsiones

preparadas con aceite de neem extraído (NeE) y que se encontraba presente en el medio a una concentración de 38.5 mg mL^{-1} (Figura 3). Aunque no se encontró diferencia estadísticamente significativa, menores concentraciones de NeE en el medio PDA tiende a provocar un menor grado de inhibición en el desarrollo radial de *A. niger* en el medio. En este sentido los grados de inhibición provocados por la presencia de Ne E en concentraciones de 7.7, 15.4, 23.1 y 30.5 mg mL^{-1} de medio PDA variaron desde $68.52 \pm 11.56\%$ a $76.67 \pm 7.28\%$ (Figura 3). Para el caso de nanoemulsiones conteniendo aceite de neem comercial (NeC), los niveles de inhibición alcanzados cuando éstas se encontraban en concentraciones de 15.4, 23.1, 30.5 y 38.5 mg mL^{-1} variaron de $68.40 \pm 3.01\%$ a $76.71 \pm 3.93\%$. Los anteriores niveles de inhibición fueron significativamente superiores a los alcanzados cuando dichas Ne C se encontraban en el medio a una concentración de 7.7 mg mL^{-1} (Figura 3).

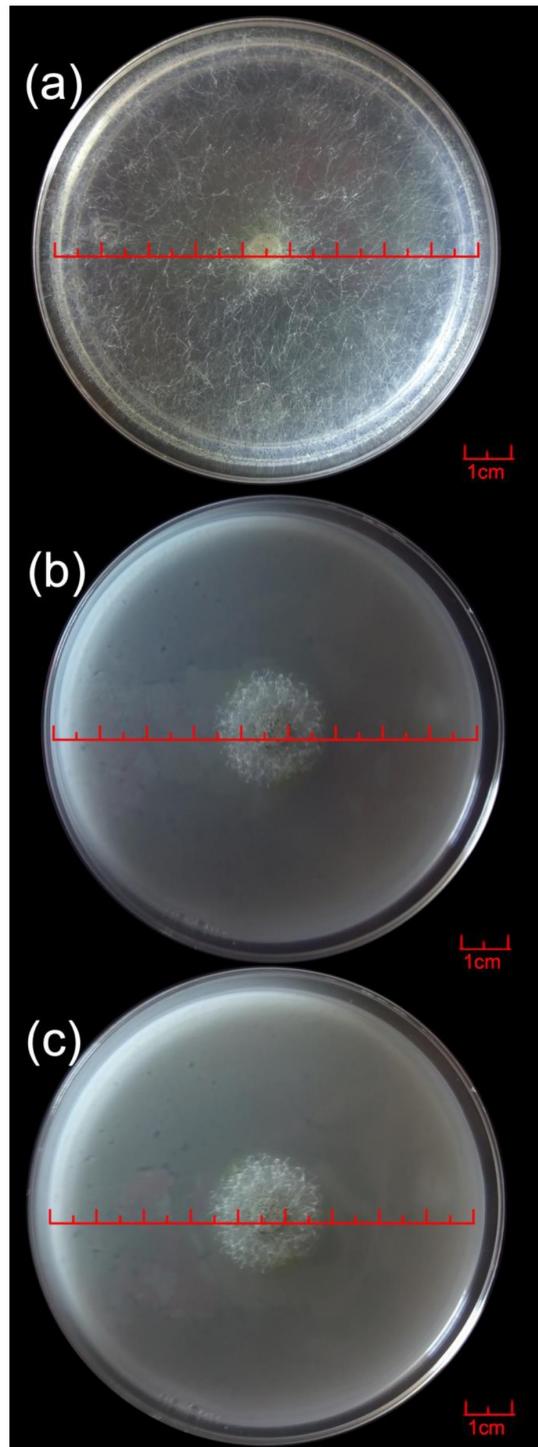


Figura 2. Crecimiento de *Aspergillus niger* en medio PDA después de 72 horas de incubación a 25 °C. (a) Tratamiento testigo; (b) Tratamiento con incorporación de NeC (23.1 mg mL⁻¹); (c) Tratamiento con incorporación de NeC (38.5 mg mL⁻¹)

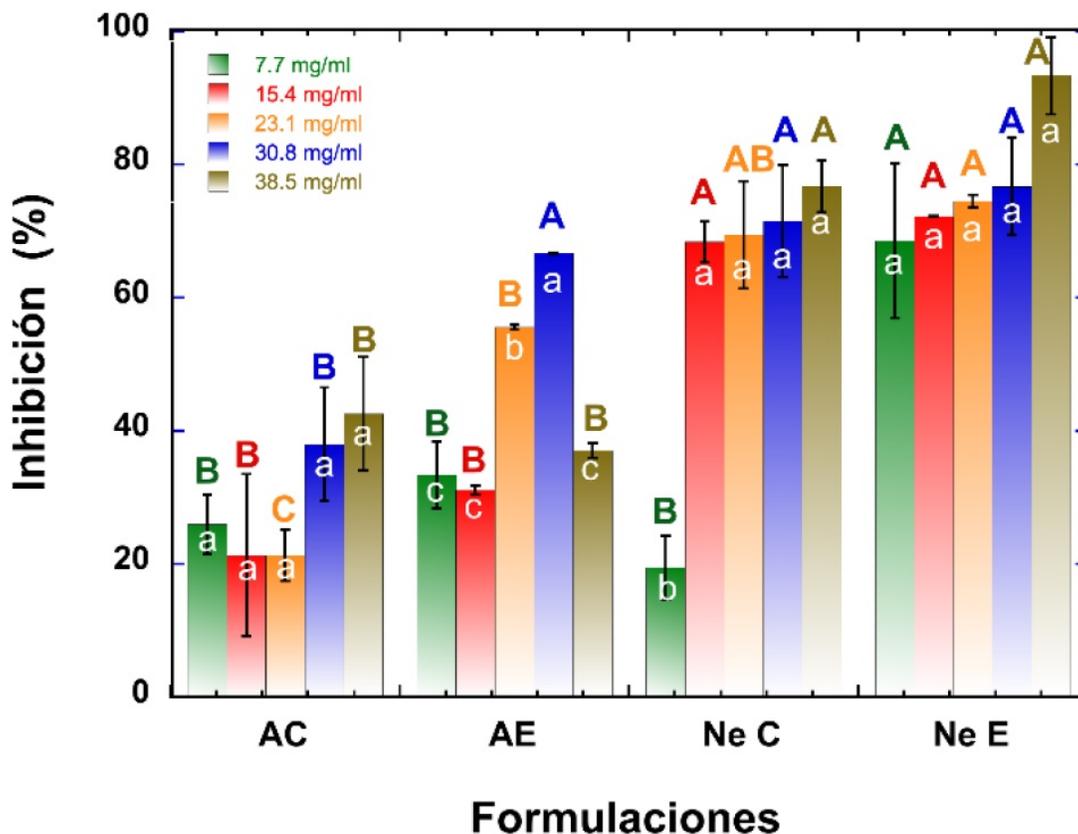


Figura 3. Nivel de inhibición alcanzado por nanoemulsiones preparadas con aceite de neem comercial (NeC), aceite de neem extraído (NeE), así como de los aceites de neem comercial (AC) y extraído (AE) sin nanoemulsificar. Comparación entre valores medios derivados de diferentes concentraciones evaluadas dentro del mismo tipo de aceite o nanoemulsión y que no compartan alguna letra minúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Comparación entre valores medios derivados del empleo de diferente tipo de aceite o nanoemulsión considerando la misma concentración y que no compartan alguna letra mayúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Al considerar el grado de inhibición generado por los aceites de neem sin nanoemulsionar (AC y AE) se encontró que los mayores niveles alcanzados correspondían al AE en concentraciones de 23.1 y 30.8 mg ml⁻¹ (55.56 ± 0.04% y 66.67 ± 0.10%, respectivamente) (Figura 3). Los valores anteriores son significativamente superiores a los encontrados cuando el AE se encontraba en el medio a 7.7, 15.4 y 38.5 mg mL⁻¹ o bien, cuando se empleó a AC en todas las concentraciones evaluadas (Figura 3).

Al comparar los niveles de inhibición generados por los aceites de neem sin nanoemulsionar (AC y AE) en comparación con su correspondiente contraparte nanoemulsionada (NeC y NeE) se observa un incremento significativo en el grado de inhibición en

el desarrollo de *A. niger* en el medio PDA por efecto de la nanoemulsificación de los aceites (Figura 3).

DISCUSIÓN

Muchos frutos durante su almacenamiento y comercialización son generalmente afectados por una gran variedad de microorganismos que ocasionan daño irreversible en ellos. En el caso de los frutos de la papaya se han identificado como responsables de daño a una serie de complejos fúngicos en los que destacan algunas especies como *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer* (Bautista-Baños et al.

2013, Lucas-Bautista *et al.* 2019). En el presente estudio, el microorganismo aislado e identificado en un fruto de papaya con daño correspondió a *Aspergillus niger*, concordando con lo reportado en las investigaciones previamente citadas. En este contexto, extractos derivados de diferentes partes del árbol de neem (hojas, frutos y semillas) han demostrado actividad antifúngica frente a diferentes hongos fitopatógenos, incluyendo *Aspergillus niger*. Extractos de hojas de neem han demostrado una efectividad variable y dependiente de la concentración del extracto empleada (Razzaghi-Abyaneh *et al.* 2005, Raja *et al.* 2013, Hussain *et al.* 2015, Keta *et al.* 2019). Por otro lado, en el caso del aceite de neem se ha reportado una reducción del crecimiento micelar del 84% para *Aspergillus parasiticus* cuando se empleó aceite al 0.5% y reducciones del 52 y 36% cuando se usó al 0.2 y 0.1% respectivamente (Gowda *et al.* 2004). Lo anterior, contrasta con lo reportado por Rodrigues *et al.* (2019), quienes reportan una inhibición del crecimiento micelar de *Aspergillus carbonarius* del 82.5% cuando empleó aceite de neem al 0.1%, incrementando la actividad antifúngica al 97.6% al usar aceite al 0.3%. No obstante, concentraciones de aceite del 0.5 y 1.0% generaron solo el 40.2 y 64.7% de inhibición. Los investigadores atribuyen lo anterior a que posiblemente, concentraciones de aceite de neem por arriba del 0.5% exceden los límites de solubilidad de éste en el medio, lo que limita su actividad antifúngica. En el presente estudio, un fenómeno similar se aprecia para el caso del aceite de neem extraído (AE, Figura 3). Sin embargo, el aceite de neem extraído y preparado en forma de nanoemulsión (NeE), usando formulación óptima, mostró un incremento significativo en el grado de inhibición frente a *A. Niger* (Figura 3). Lo anterior, podría deberse al mayor grado de dispersión y bio-accesibilidad que el aceite de neem alcanza al encontrarse en forma de nanoemulsión. Lo encontrado en el presente estudio es de importancia ya que plantea una mejora sustancial en la actividad antifúngica del aceite de neem al emplearla en forma de nanoemulsión. En el aceite de neem coexisten diversos compuestos los cuales podrían ser responsables de la actividad antifúngica antes indicada. Sin embargo, su presencia puede

variar dependiendo de diferentes factores de procesamiento o almacenamiento que pueden favorecer la disminución de su presencia en el aceite. Lo anterior explicaría la menor actividad inhibitoria del aceite de neem adquirido comercialmente (AC) en comparación con el aceite recién extraído de las semillas de neem (AE) (Figura 3). En este contexto Zeringue *et al.* (2001) reportaron que los compuestos volátiles emitidos a 30 °C desde aceite de neem clarificado, mostraban una mayor inhibición en el desarrollo de *Aspergillus* spp. en comparación con la generada por la sola adición del aceite al medio de cultivo.

La preparación de nanoemulsiones estables involucra el control de la composición y proporción de los ingredientes que las conforman, así como de las condiciones de operación consideradas durante su preparación (Mushtaq *et al.* 2023). En este sentido, el efecto de los componentes de una formulación sobre las principales propiedades de las nanoemulsiones (tamaño de glóbulo, DPI y potencial Z) tiene gran influencia (Qian y McClements 2011). En el presente estudio, la concentración de aceite y la RAE mostraron importante efecto sobre el tamaño de glóbulo, lo cual concuerda con lo reportado por diferentes investigaciones en donde se plantea que el tamaño de glóbulo alcanzado es directamente proporcional a la concentración de aceite en la emulsión (Ullah *et al.* 2022). Lo anterior, se observa de forma clara cuando la RAE es de 1:5 o 1:4 (Figura 1a). Esto último se atribuye a que durante el proceso de emulsificación las partículas de aceite compiten entre ellas por el agente emulsificante, el cual generalmente se encuentra en cantidad limitada. De esta manera, los glóbulos pequeños que son formados, al no contar con suficiente agente emulsificante coalescen favoreciendo la formación de glóbulos más grandes e incrementando el tamaño de glóbulo promedio en la emulsión (Cinar 2017, Pavoni *et al.* 2020). No obstante, lo anterior, cuando las RAE evaluadas fueron del orden de 1:1 o 1:2, concentraciones de aceite en el medio menores al 3% generaron tamaños de glóbulo mayores que concentraciones de aceite mayores al 6%. Lo anterior puede ser debido a que la mayor cantidad de emulsificante, en comparación con la de aceite, provoca la formación de multicapas de emulsi-

ficante alrededor de los glóbulos, promueve la floculación de los glóbulos o bien la formación de agregados de emulsificante (Qian y McClements 2011, Ochoa *et al.* 2016).

El empleo del adecuado surfactante influye directamente en la estabilidad de la emulsión, siendo atractivo el uso de mezclas de algunos de ellos debido a los diferentes mecanismos y sus interacciones, lo que favorece la estabilidad de las emulsiones (Hong *et al.* 2018). En general los surfactantes no iónicos contienen grupos hidrofílicos y lipofílicos cuyo balance es expresado en valores de HLB (Balance hidrofílico lipofílico). Los valores de HLB están relacionados con su solubilidad en agua, de esta manera, valores bajos (4 a 9) indican emulsificantes lipofílicos y valores altos (11 a 18) emulsificantes hidrofílicos (Chiang *et al.* 2023). En general, para formar emulsiones del tipo aceite en agua se emplean emulsificantes con valores de HLB altos, mientras que para emulsiones agua en aceite valores bajos (Chiang *et al.* 2023). En el presente estudio, el aumento en los valores de HLB de la mezcla de emulsificantes empleadas favoreció la formación de tamaños de glóbulo más pequeños (Figura 1b y 1c). Lo anterior coincide con lo reportado por Hong *et al.* (2018), quienes empleando mezclas de los emulsificantes Span 80 y Tween 80 (con diferentes valores de HLB) observaron la formación de emulsiones monodispersas, con menor tamaño de glóbulo, cuando los valores de HLB fueron de 12.6; en contraste con la formación de emulsiones multidispersas, con mayores tamaños de glóbulo, cuando la mezcla de emulsificantes tenía un HLB de 8.9.

La metodología de superficie de respuesta, desde su introducción, ha sido empleada como una técnica estadística multivariada en diversos estudios de optimización, en donde el efecto de diferentes variables independientes (y sus interacciones) sobre diferentes variables de respuesta se desea conocer. Esta técnica estadística permite generar modelos matemáticos a partir de los cuales es posible identificar condiciones que generen valores óptimos en alguna de las variables de respuesta (Samiun *et al.* 2020). En la Tabla 3, se muestran los coeficientes de regresión estimados para el modelo poli-

nomial de segundo orden generado para cada una de las variables de respuesta consideradas (Tamaño de glóbulo, PDI y Potencial Z). Con el modelo generado para el tamaño de glóbulo, se procedió a identificar los valores de las variables independientes que definen el modelo (A, RAE y HLB) con los que se obtuvieran tamaños de glóbulo entre 30 y 60 nm. En este sentido, las condiciones encontradas correspondieron a valores de 8.21% para A, 1:3.28 para RAE y 16.22 para HLB, con lo cual el modelo predecía un tamaño de glóbulo de 32 nm. Al preparar nanoemulsiones bajo dichas condiciones, los valores de tamaño de glóbulo alcanzados fueron de 59.99 ± 2.16 nm. Como puede apreciarse el valor alcanzado se encontraba dentro del rango deseado, por lo que se decidió continuar con el estudio considerando dichas condiciones y definiéndolas como formulación óptima (F Opt).

Una nanoemulsión estable debe mantener su tamaño de glóbulo durante largos periodos de tiempo. En el presente estudio la formulación identificada como óptima (F Opt) se mantuvo estable a lo largo de 365 días de almacenamientos a 4 °C, conservando su tamaño de glóbulo sin cambio significativo (Tabla 4). Así mismo, no se apreció visualmente indicios de floculación, cremado o sedimentación. Esta estabilidad puede explicarse en función de los valores de PDI y potencial Z alcanzados, 0.12 ± 0.001 y -16.80 ± 1.7 , respectivamente. El PDI en una nanoemulsión se relaciona con la calidad del proceso de emulsificación, considerando la homogeneidad de la emulsión. En este sentido, su resistencia al cremado, dependerán de la homogeneidad del tamaño de glóbulo (PDI). En este contexto, se ha planteado que nanoemulsiones con valores de PDI menores o cercanos a 0.1 se consideran altamente monodispersas, adecuadas y con una suspensión coloidal de buena calidad; nanoemulsiones con valores de PDI entre 0.10 y 0.40 se consideran moderadamente dispersas; aquellas con valores mayores a 0.40 son consideradas altamente dispersas. Mientras que valores cercanos a 1 indicarían emulsiones de muy pobre calidad (Ochoa *et al.* 2016, Ullah *et al.* 2022). Por otro lado, la intensidad del potencial Z es otra característica que se relaciona con la estabilidad de

las nanoemulsiones. Se ha reportado que valores de potencial Z menores a -30 mV corresponden a nanoemulsiones estables debido a que las fuerzas de repulsión eléctrica generada entre los glóbulos son predominantes. Mientras tanto, valores de entre -5 mV y -15 mV representarían una zona de floculación limitada (Heurtault *et al.* 2003). Los valores de intensidad de potencial Z alcanzados en la F Opt fueron de -16.80 ± 1.7 mV. Este valor de potencial Z ubica a la F Opt muy cerca de la región de floculación limitada. Sin embargo, mecanismos de estabilización estérica ocasionado por el agente surfactante empleado podrían estar colaborando en la estabilidad observada en la nanoemulsión. En este sentido se ha planteado que para que una nanoemulsión alcance estabilidad se requiere un potencial Z menor a -9 mV en combinación con la estabilidad estérica generada por el surfactante empleado (Heurtault *et al.* 2003).

CONCLUSIONES

Nanoemulsiones estables, constituidas por aceite de neem extraído de frutos, los emulsificantes Tween 20/Span 20 y agua fueron altamente efectivas en inhibir *In vitro* el crecimiento de *Aspergillus niger*, en contraste con el empleo de aceite de neem no nanoemulsionado. De esta manera, el uso de nanoemulsiones a base de aceite de neem representa una alternativa prometedora en el control del deterioro poscosecha en frutos ocasionada por *Aspergillus niger*.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de Tabasco y a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por el apoyo brindado con los equipos e infraestructura requerida para el desarrollo del presente estudio.

LITERATURA CITADA

- Bautista-Baños S, Bello-Perez ASS, Villanueva-Arce R, Hernández-López M (2013) A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection* 49: 8-20.
- Bedoya-Serna CM, Dacanal GC, Fernandes AM, Pinho SC (2018) Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: *in vitro* study and application in Minas Padrão cheese. *Brazilian Journal of Microbiology* 49: 929-935.
- Cardoso-Ugarte G, Jimenez-Munguia M (2015) Nanoemulsiones en alimentos: preparación y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 9: 15-24.
- Chiang TC, Chang JY, Chou TH (2023) Formulation and characteristics of edible oil nanoemulsions modified with polymeric surfactant for encapsulating curcumin. *Polymers* 15: 2864. DOI: 10.3390/polym15132864
- Cinar K (2017) A review on nanoemulsions: preparation methods and stability. *Trakya University Journal of Engineering Sciences* 18: 73-83.
- Djibril D, Mamadou F, Gérard V, Geuye MC, Oumar S, Luc R (2015) Physical characteristics, chemical composition and distribution of constituents of the neem seeds (*Azadirachta indica* a. juss) collected in senegal. *Research Journal of Chemical Sciences* 5: 52-58.
- Gahucar R (2014) Factors affecting content and bioeacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) phytochemicals used in agricultural pest control. *Crop Protection* 62: 93-99.
- Gowda N, Malathi V, Suganthi R (2004) Effect of some chemical and herbal compounds on growth of aspergillus parasiticus and aflatoxin production. *Animal Feed Science and Technology* 116: 281-291.

- Hatti K, Muralitharan R, Hegde R, Kush R (2014) Neemdb: convenient database for neem secondary metabolites. *Bioinformation* 3: 314-315.
- Herrera-Gebreros JM, Preciado-Rodríguez JM, Robles-Parra JM (2022) Impacto económico de las pérdidas postcosecha en los sistemas agrícolas: El sistema de uva de mesa. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 2: 2-17
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP (2003) Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24: 4283-4300.
- Hong IK, Kim SI, Lee SB (2018) Effects of hlb value on oil-in-water emulsions: droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 67: 123-131.
- Hussain F, Abid M, Shaukat S, Farzana S, Akbar M (2015) Anti-fungal activity of some medicinal plants on different pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Botany* 5: 2009-2013.
- Keta JN, Suberu HA, Shehu K, Yahayya U, Mohammad NK, Gudu GB (2019) Effect of neem (*Azadirachta indica* a. Juss) leaf extract on the growth of aspergillus species isolated from foliar diseases of rice (*Oryza sativa*). *Science World Journal* 14: 98-102.
- Lucas-Bautista J, Bautista-Baños S (2019) Determinación de quitina en hongos postcosecha y de quitinasas en frutos de papaya "maradol". *Revista Mexicana de Fitopatología* 37: 1-7.
- Mahmoud D, Hassanein N, Youssef K, Zeid M A (2011) Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology* 42 : 1007-1016.
- Muñiz-Reyes E, Ramos-Barreto C, Rodriguez-Hernandez C, Ortega-Arenas L (2016) Actividad biológica de nim en adultos de mosca blanca trialeurodes vaporariorum (aleyrodidae) west. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 1283-1295.
- Mushtaq A, SM Wani, AR Malik, A Gull, S Ramniwas, GA Nayik, S Ercisli, RA Marc, R Ullah, A Bari (2023) Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. *Food Chemistry* 18: 100684. DOI: 10.1016/j.fochx.2023.100684.
- Ochoa AA, Hernández-Becerra J, Cavazos-Garduño A, Vernon-Carter E, García-Galindo HS (2016) Preparation and characterization of curcumin nanoemulsions obtained by thin-film hydration emulsification and ultrasonication methods. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15: 79-90.
- Ohashi T, Pilon L, Spricigo P, Miranda M, Souza C, Ferreira M (2015) Postharvest quality of 'golden' papayas (*Carica papaya*.) coated with carnauba wax nanoemulsions. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 16: 199-209.
- Ospina-Salazar D, Hoyos-Sanchez R, Orozco-Sanchez F, Arango-Arteaga M, Gómez-Londoño I (2015) Anti-fungal activity of neem (*Azadirachta indica*: meliaceae) extracts against dermatophytes. *Acta Biológica Colombiana* 20: 201-207.
- Pavoni L, Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GP (2020) An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials* 10(1): 135. DOI: 10.3390/nano10010135.
- Qian C, McClements D (2011) Formation of nanoemulsions stabilized by model food grade emulsifiers using high pressure homogenization: Factors effecting particle size. *Food Hydrocolloids* 43: 540-546.
- Raeder J, Broda P (1985) Rapid preparation of dna from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17-20.

- Raja RY, Krishna KC, Lokanatha O, Mamatha S, Damodar-Reddy C (2013) Antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Neem) leaf, bark and seed extracts. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology* 3: 1-4.
- Razzaghi-Abyaneh M, Allameh A, Tiraihi T, Shams-Ghahfarokhi M, Ghorbanian M (2005) Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. *Mycopathologia* 159: 565-570.
- Ribes S, Fuentes A, Talens P, Barat JM, Ferrari G, Donsi F (2017) Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. *Food Control* 73: 784-795.
- Rodrigues M, Astoreca A, Oliveira A, Salvato L, Biscoto G, Keller L, Rocha RCA, Cavaglieri LR, Azevedo MI de, Keller AM (2019) *In vitro* activity of neem (*Azadirachta indica*) oil on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* isolates. *Toxins* 11: 579. DOI: 10.3390/toxins11100579.
- Samiun WS, Ashari SE, Salim N, Ahmad S (2020) Optimization of processing parameters of nanoemulsion containing aripiprazole using response surface methodology. *International Journal of Nanomedicine* 15: 1585-1594.
- Teuntor S, Aleman T (2016) La resonancia magnética nuclear: una herramienta para la producción agrícola. *Revista Científica Interdisciplinaria Investigación y Saberes* 5: 39-63.
- Ullah N, Amin A, Alamoudi R, Rasheed S, Alamoudi R, Nawaz A, Raza M, Nawaz T, Ishtiaq S, Abbas S (2022) Fabrication and optimization of essential-oil-loaded nanoemulsion using box-behnken design against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from oral cavity. *Pharmaceutics* 14: 1640. DOI: 10.3390/pharmaceutics14081640.
- Wan J, Zhong S, Schwarz P, Chen B, Rao J (2019) Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five T essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. *Food Chemistry* 291: 199-206
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White, T, editors, *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press pp 315-322.
- Zambrano-Zaragoza M, Mercado-Silva P, Ramirez-Zamorano M, Cornejo-Villegas E, Gutierrez-Corteza D, Quintanar-Guerrero D (2013) Use of solid lipid nanoparticles (slns) in edible coatings to increase guava (*Psidium guajava* L.) shelflife. *Food Research International* 51: 946-953.
- Zeringue HJ, Shih B, Bhatnagar D (2001) Effects of clarified neem oil on growth and aflatoxin B formation in submerged and plate cultures of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. *Phytoparasitica* 29: 1-4.