

DOI:10.22144/ctu.jvn.2023.004

PHỐI CHẾ VÀ PHÂN TÍCH TÍNH CHẤT CỦA NHỮ TƯƠNG NANO CHỨA HOẠT CHẤT TRỪ NẤM DIFENOCONAZOLE

Phạm Quốc Yên^{1*} và Trần Quốc Tuấn²

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Phạm Quốc Yên (email: phqyen@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/09/2022

Ngày nhận bài sửa: 27/09/2022

Ngày duyệt đăng: 10/10/2022

Title:

Fabrication and characterization of nanoemulsion of difenoconazole fungicide

Từ khóa:

Dầu thực vật, difenoconazole thải, nhũ tương nano, phối chế, thuốc trừ nấm

Keywords:

Fabrication, fungicide nanodifenoconazole, nanoemulsion, waste vegetable oil

ABSTRACT

In this study, nanodispersion of difenoconazole (NDifen) was prepared by low energy emulsification method using methyl ester synthesized from waste vegetable oil as the dispersed phase throughout the aqueous medium. The average droplet size of NDifen is less than 100 nm which was characterized by modern physicochemical methods including dynamic light scattering (DLS) and transmission electron spectroscopy (TEM). The long-term stability property of NDifen was evaluated within 3 months with the active ingredient remaining more than 95%, determined by gas chromatography – flame ionization detector technique (GC-FID). The in vitro antifungal efficacy results on plant pathogenic fungal strains showed that NDifen could be 2 – 3 times superior to commercially available difenoconazole. The inhibitory effectiveness of NDifen is approximately 80% against *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium ambrosium* at a concentration of 500 ppm meanwhile the commercial form is only about 60%. Therefore, Nanodifenoconazole could be a promising candidate for modern agrochemical science in the future.

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, nanodifenoconazole (NDifen) được tổng hợp bằng phương pháp nhũ hóa năng lượng thấp sử dụng hỗn hợp methyl ester tổng hợp từ dầu thực vật thải làm pha phân tán trong môi trường nước. NDifen tổng hợp có kích thước hạt trung bình nhỏ hơn 100 nm, được xác định bằng các phương pháp phân tích hiện đại bao gồm: tán xạ ánh sáng động (DLS) và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Độ bền nhũ được đánh giá trong 3 tháng, với hàm lượng hoạt chất duy trì trên 95%, được xác định bằng kỹ thuật sắc ký khí đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID). Các thử nghiệm in vitro trên các chủng nấm gây bệnh hại cây trồng cho thấy hiệu quả ức chế sự phát triển của nấm rất tốt vượt trội hơn từ 2 – 3 lần so với dạng thương mại. Hiệu quả ức chế khoảng 80% đối với *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium ambrosium* tại nồng độ 500 ppm trong khi dạng thương mại chỉ khoảng 60%. Do đó, NDifen sẽ là một ứng cử viên tiềm năng trong ngành nông dược hiện đại trong tương lai.

1. GIỚI THIỆU

Khoa học và công nghệ nano được đặt vào nhóm những ngành công nghệ cao, đặc biệt trong giai đoạn phát triển công nghệ 4.0 và trong tương lai (Satyanarayana et al., 2011). Hiện nay, nhiều ngành công nghiệp cũng đã bắt đầu áp dụng công nghệ nano như một công cụ để cải tiến và nâng cao chất lượng sản phẩm như điện tử (Korkin et al., 2010), dược phẩm (Saini et al., 2010), nông dược (Grillo et al., 2016), các sản phẩm chăm sóc cá nhân và mỹ phẩm (Mu et al., 2010). Trong lĩnh vực thuốc bảo vệ thực vật, các chế phẩm nhũ tương nano (NTN) có nhiều ưu điểm vượt trội hơn so với các dạng nhũ đậm đặc truyền thống: (i) giảm độc tính đối với cây trồng do sử dụng ít dung môi hữu cơ; (ii) kiểm soát quá trình phóng thích thuốc, cải thiện hoạt tính sinh học của chế phẩm; (iii) giảm thiểu ô nhiễm môi trường và an toàn hơn đối với người sử dụng (Setyowati & Suresh, 2019). Hệ nhũ tương nano dầu trong nước (O/W) là hệ keo phân tán kém bền về mặt nhiệt động học, đặc điểm này tương đồng với dạng nhũ tương truyền thống (EC). Tuy nhiên, NTN thường được chế tạo với tỷ lệ chất hoạt động bề mặt và hàm lượng dầu xác định và có kiểm soát, kết hợp với các phụ gia làm bền như các polymer giúp duy trì hệ nhũ có kích thước giọt nhỏ hơn 200 nm. Điều này gia tăng độ bền của sản phẩm chống lại các yếu tố kết tụ, kết tủa hay tạo kem (McClements, 2012). Difenconazole là hoạt chất kháng nấm thuộc nhóm triazole. Đặc tính chung của nhóm triazole là tác động ức chế enzyme sterol-1-4-a-demethylase trên các chủng nấm *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* và *Deuteromycetes* dẫn đến ức chế sinh tổng hợp ergosterol và ngăn cản quá trình phát triển của sợi nấm và sự nảy mầm của bào tử nấm (Reuveni et al., 2002). Các hoạt chất triazole đều kém tan trong nước, do đó, các sản phẩm chứa hai hoạt chất trên chủ yếu ở dạng nhũ dầu đậm đặc (EC) hoặc huyền phù đậm đặc (SC) chứa lượng lớn phụ gia độc hại. Trong nghiên cứu này, nanodifenconazole (NDifen) được chế tạo bằng phương pháp nhũ hóa năng lượng thấp, pha dầu (OP) được sử dụng là hỗn hợp các methyl ester tổng hợp từ dầu thực vật đã qua sử dụng thay thế cho dung môi công nghiệp (xylene, dimethyl sulfoxide, dimethylformamide), pha nước sử dụng chất làm bền là xanthan gum (XG) là một polymer có nguồn gốc sinh học. Tổng thể công thức phối chế thay thế các hóa chất công nghiệp kém thân thiện môi trường và sức khỏe con người đáp ứng xu thế hóa học xanh

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và thiết bị

Difenconazole tiêu chuẩn kỹ thuật, polyethylene glycol (PEG), xanthan gum, polysorbate 80 (TW80), potassium hydroxide (KOH), methanol (MeOH) xuất xứ Xilong, Trung Quốc. Dầu thực vật đã qua sử dụng thu thập từ các quán ăn trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh.

Thiết bị tán xạ ánh sáng động (DLS-Horiba SZ-100 Nanoparticle Analyzer, Horiba, Nhật Bản) dùng để xác định kích thước hạt và thế zeta, thiết bị vận hành dưới góc 90°, nhiệt độ 25°C, và thế áp điện cực 3,4V. Thiết bị quang phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) 1700 Shimadzu dùng để phân tích tính chất quang học của hệ nhũ tương bằng phổ truyền qua. Đèn xenon và wonfram, cuvet 1 cm. Máy khuấy cơ (IKA-Eurostar 40 digital, Đức) tốc độ khuấy 30 – 2000 rpm. Máy khuấy từ gia nhiệt (IKA RCT, Đức). Kính hiển vi điện tử truyền qua (JEOL, Nhật Bản) được dùng để xác định hình thái vật liệu. Phương pháp sắc ký khí đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID) dùng để xác định hàm lượng hoạt chất của hệ nhũ tương, thiết bị sử dụng cột mao quản HP-5MS, (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), nhiệt độ đầu dò 350°C, tốc độ dòng khí hydrogen 35 mL/phút, tốc độ khí mang helium 1,5 mL/phút tốc độ dòng khí duy trì ngọn lửa 425 mL/phút.

2.2. Điều chế nhũ tương nano chứa difenconazole

Chuẩn bị methyl ester (ME) cho pha dầu (OP)

ME được tổng hợp bằng phương pháp chuyển đổi ester nhóm glycerol của dầu thực vật và methyl của methanol có sự điều chỉnh theo quy trình đã được công bố bởi Wang et al. (2007). Dầu thực vật đã qua sử dụng (WSBO) được thu thập và kiểm tra hàm lượng acid béo tự do nhỏ hơn 75,9 mg KOH/g (Wang et al., 2007). Hỗn hợp gồm 262,2 g WSBO, 86,4 g MeOH và 4,18 g KOH được khuấy trộn trong 3 giờ ở 60°C bằng máy khuấy cơ với tốc độ 1000 rpm. Sản phẩm sau đó được phân tách bằng bình lỏng để loại bỏ glycerol bên dưới, lớp ME bên trên được rửa với hỗn hợp CH₃COOH và NaCl sau cùng làm khô bằng Na₂SO₄.

Phối chế NDifen

Xác định độ tan của Difenconazole trong ME tại nhiệt độ 25 °C nhằm xác định hàm lượng hoạt chất có thể tải được trong pha dầu mà không bị kết tủa hay tạo kem ở điều kiện khí hậu Việt Nam. Phương pháp xây dựng công thức phối chế được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp xây dựng công thức phối chế

Pha	Thành phần	Tỷ lệ
Dầu (OP)	Difenoconazole TW80 ME	24,8% khối lượng so với ME Tỷ lệ Tỷ lệ ME:TW80 (OSR) được khảo sát (1:9; 2:8; 3:7 và 4:6)
Nước (WP)	Xanthan gum (XG) Nước RO	0,1 % theo lượng nước sử dụng Tỷ lệ Tỷ lệ pha dầu và pha nước (OWR) 1:5 (Moghaddasi et al., 2018)

Công thức 1 (CT1): 1 g ME và 9 g TW80 được khuấy 15 phút ở tốc độ 1000 rpm để hình thành OP, sau đó 0,33 g hoạt chất difenoconazole được thêm vào OP và khuấy ở 500 rpm trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Các công thức 2 (CT2), 3 (CT3) và 4 (CT4) thực hiện tương tự với khối lượng các thành phần như Bảng 2.

WP được điều chế bằng cách cân 0,05 g xanthan gum vào cốc 100 mL, hòa tan xanthan gum bằng 50 mL nước lọc thẩm thấu ngược (RO) ở 70°C khuấy đều bằng máy khuấy từ trong 30 phút với tốc độ 1000 rpm, sau đó để nguội ở nhiệt độ phòng.

Tiếp theo, WP được thêm từ từ vào OP với tốc độ thêm 1 – 1,5 mL/phút, và duy trì sự khuấy trộn ở 1000 rpm trong 30 phút thu được sản phẩm có màu từ gần như trong suốt đến trắng đục tùy thuộc vào tỷ lệ pha dầu và chất hoạt động bề mặt (OSR). OSR được khảo sát theo các công thức phối chế được trình bày tại Bảng 2.

2.3. Phân tích đặc trưng tính chất của nhũ tương nano

Các công thức nhũ được đánh giá qua các chỉ tiêu hóa lý bao gồm: độ ổn định, đặc tính quang học bằng phổ truyền qua, xác định phân bố kích thước hạt bằng thiết bị DLS, điện tích hạt bằng phép đo thế Zeta, hình thái và kích thước hạt được xác định bằng kỹ thuật TEM.

Hoạt tính sinh học của NDifen được thực hiện để kiểm tra sự cải thiện hoạt tính kháng nấm so với

Bảng 2. Các công thức nhũ tương khảo sát

CT	ME (g)	TW80 (g)	OSR	Difenoconazole (g)	XG (g)	Nước RO (g)
CT1	1	9	1:9	0,33	0,05	50
CT2	2	8	2:8	0,66	0,05	50
CT3	3	7	3:7	0,99	0,05	50
CT4	4	6	4:6	1,32	0,05	50

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tính chất hóa lý của NDifen

Hình ảnh thực tế 4 công thức nhũ được trình bày ở Hình 1. Đặc tính quang học là một tính chất quan trọng của các hệ nhũ góp phần vào chỉ tiêu chất lượng sản phẩm. Tính chất này được đánh giá bằng phổ truyền qua thể hiện ở Hình 2. Màu của dung

dạng hạt kỹ thuật, phương pháp được thực hiện dựa trên các công bố khoa học trước đó. Hoạt tính được đánh giá dựa trên khả năng ức chế sự phát triển của sợi nấm của các mẫu thử nghiệm.

Mỗi loại mẫu thử nghiệm được pha loãng với môi trường thạch dextrose khoai tây (PDA) cho nồng độ 100, 200, 500 và 1000 ppm với nước vô trùng (Masibonge et al., 2020). Môi trường PDA được hấp tiệt trùng và để nguội đến khoảng 50°C trước khi được thêm với mẫu thử. Sau đó, PDA với chất thử nghiệm được đổ vào đĩa petri có đường kính 9 cm. Ba đĩa petri lặp lại được sử dụng cho mỗi nồng độ. Các đĩa PDA không có chất thử nghiệm sử dụng làm đối chứng âm (mẫu kiểm soát). Mỗi đĩa petri được cấy với một khoanh thạch chứa sợi nấm có đường kính 6 mm được lấy từ các mẫu cấy các chủng nấm khảo sát (sau khi ủ 5 ngày). Tất cả các đĩa petri tiếp theo được ủ ở 28 °C trong 5 ngày. Sau đó, đường kính của khuẩn lạc sợi nấm trên đĩa PDA được đo vuông góc hai lần và sau đó lấy giá trị trung bình. Tỷ lệ phần trăm sự ức chế tăng trưởng sợi nấm được tính theo công thức:

Ức chế tăng trưởng sợi nấm:

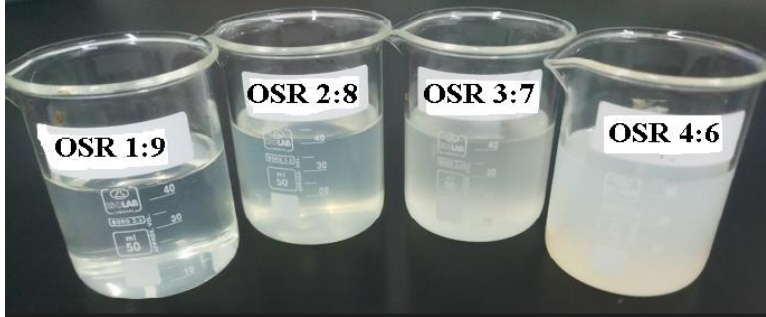
$$I(\%) = (D_c - D_t) / D_c \times 100$$

Trong đó, D_c: đường kính của khuẩn lạc mẫu đối chứng D_t: đường kính của khuẩn lạc trong mẫu chứa chất thử nghiệm.

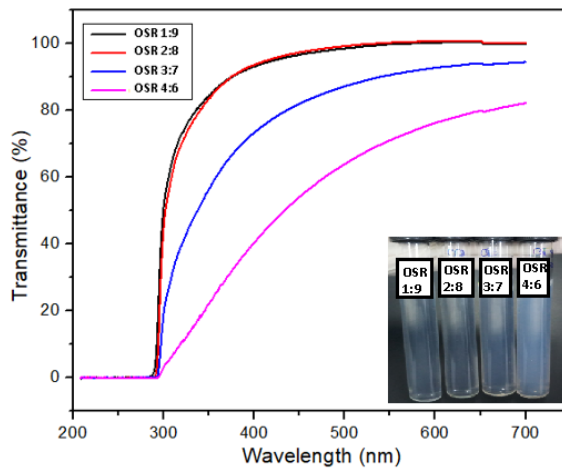
dịch nhũ nano thay đổi theo OSR. Quan sát bằng mắt thường có thể thấy tỷ lệ dầu càng cao mẫu có khuynh hướng đục dần do kích thước hạt cũng như nồng độ hạt tăng. Nhằm khẳng định kết luận này, phổ truyền qua được sử dụng trong khoảng bước sóng 200 – 700 nm, kết quả cho thấy các công thức nhũ có OSR 1:9 và 2:8 trên 80% ánh sáng vùng khả kiến (340 – 700 nm) truyền qua dung dịch mẫu. Trong khi ở tỷ

lệ 3:7 và 4:6 vùng ánh sáng khả kiến truyền qua thấp hơn nhiều do kích thước cũng như nồng độ hạt lớn làm tăng sự tán xạ ánh sáng làm dung dịch trở nên chuyển đục hơn. Về mặt đặc tính quang học, các công thức nhũ có OSR 1:9 và OSR 2:8 có độ truyền quang gần như tương đương nhau, tuy nhiên, công

thức OSR 2:8 có hàm lượng dầu cao hơn, nên có khả năng tải được nhiều hoạt chất hơn so với công thức OSR 1:9. Do đó, công thức OSR 2:8 được xem như tỷ lệ tối ưu trong nghiên cứu này về mặt tính chất quang học và khả năng tải hoạt chất.



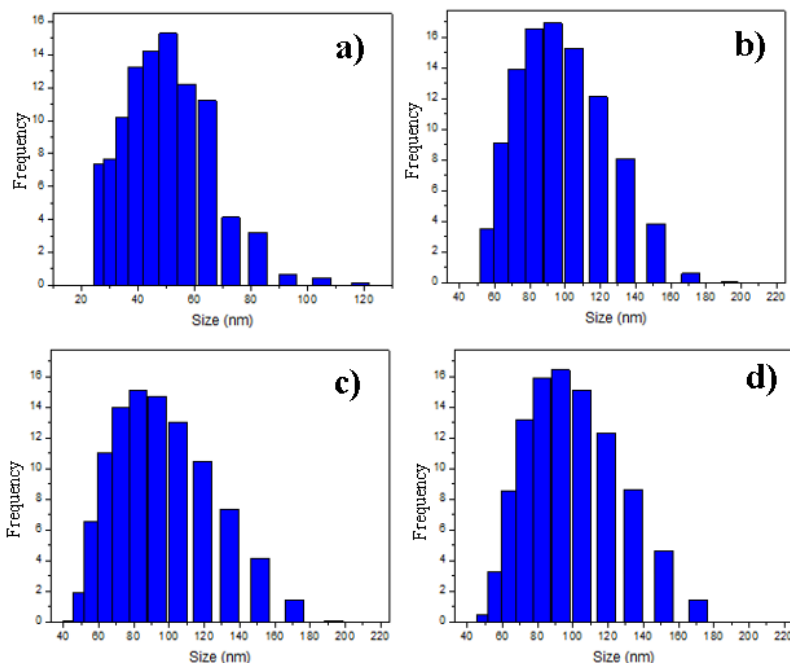
Hình 1. Màu sắc NDifen tổng hợp của các công thức nhũ có OSR (1:9; 2:8; 3:7 và 4:6)



Hình 2. Phổ truyền qua của mẫu NDifen pha loãng 20 lần của các công thức nhũ

Kết quả đo phân bố kích thước hạt bằng kỹ thuật DLS cho thấy các công thức nhũ tương nano trong nghiên cứu này có kích thước giọt trung bình nhỏ hơn 100 nm được trình bày tại Hình 3 và Bảng 3. Xu hướng tạo thành giọt nhũ có kích thước nhỏ khi tăng tỷ lệ chất hoạt động bề mặt so với lượng dầu trong hệ nhũ. Lượng dầu càng lớn, dẫn đến nồng độ hạt nhũ càng cao làm cho hạt nhũ có khuynh hướng kết tụ lại với nhau. Công thức có OSR 1:9 cho hệ nhũ có kích thước nhỏ nhất 48,3 nm do hàm lượng dầu sử dụng thấp phù hợp với kết quả phân tích độ truyền quang, các tỷ lệ còn lại thay đổi không đáng

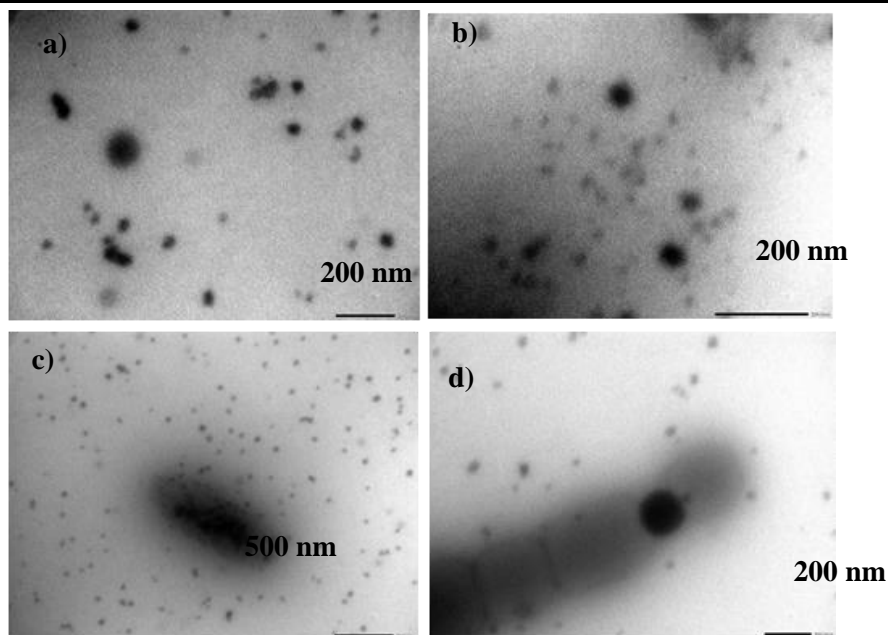
kể với phân bố kích thước hạt trung bình nhỏ hơn 90 nm. Bên cạnh đó, các công thức nhũ được đo chỉ số đa phân tán (PDI) và thế zeta (Bảng 3), kết quả cũng cho thấy cả 4 hệ nhũ đều đáp ứng tốt yêu cầu của một hệ nhũ tương ổn định với PDI nhỏ hơn 0,3 và thế zeta khác không (McClements, 2012). Tổng hợp các chỉ tiêu đánh giá phân tích hóa lý, công thức nhũ có OSR 2:8 là tỷ lệ tối ưu nhất. Do đó, công thức nhũ 2 (OSR 2:8) được chọn làm đại diện quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) để xác nhận lại kích thước hạt nhũ.



Hình 3. Phân bố kích thước hạt của các công thức nhũ NDifen (a) CT1, (b) CT2, (c) CT3 và (d) CT4

Bảng 3. Giá trị kích thước hạt, chỉ số đa phân tán (PDI), thế zeta và màu sắc của các công thức nhũ đại diện NDifen

CT	OSR	d (nm)	PDI	Thế zeta (mV)	Màu sắc
CT1	1:9	48,3	0,123	- 30,2	Gà trong suốt
CT2	2:8	78,9	0,226	- 28,7	Trắng đục
CT3	3:7	82,6	0,137	- 48,3	Trắng đục
CT4	4:6	84,4	0,216	- 10,1	Trắng đục



Hình 4. Ảnh TEM của NDifen đại diện công thức OSR 2:8 ở các mức phóng đại khác nhau (a, b và d x200k, c x100k)

NDifen phối chế theo công thức có OSR 2:8 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua ở các mức độ phóng đại khác nhau và được thể hiện qua Hình 4. Một cách tổng quan, các giọt nhũ có kích thước tương đối đồng đều (Hình 4c), tại một số điểm chụp kích thước giọt dao động từ 50 nm đến 100 nm (Hình 4a, 4b) và gần như không có giọt nhũ nào có kích thước lớn hơn 200 nm trong phạm vi các ảnh chụp. Kết quả này phù hợp với kết quả phân tích DLS với phân bố kích thước giọt từ 50 nm đến 180 nm và kích thước giọt nhũ trung bình 78,9 nm. NDifen trong nghiên cứu này cũng được so sánh với

NDifen trong các nghiên cứu trước đây về phương pháp điều chế, kích thước giọt nhũ trung bình tạo thành và kỹ thuật đo thể hiện qua Bảng 4. Trong đó, phương pháp nhũ đảo pha sử dụng methyl ester tổng hợp từ dầu thực vật thái và TW80 cho kích thước giọt nhỏ hơn so với phương pháp pha loãng nhũ macro và phương pháp tải hoạt chất trên nền polymer. Thêm vào đó, phương pháp này sử dụng các thành phần có nguồn gốc từ tự nhiên, an toàn với người sử dụng và môi trường, giá thành chấp nhận được nên khả thi hơn về mặt kinh tế cho sản phẩm khi được thương mại hóa.

Bảng 4. Kích cỡ giọt nhũ tương NDifen của một số phương pháp điều chế khác nhau

Phương pháp	Thành phần OP	Kích cỡ giọt	Kỹ thuật đo	Tài liệu tham khảo
Tải trên nền polymer	Difen/PBS/PLA	7,2 µm	TEM	Wang et al., 2018
Pha loãng nhũ macro	Difen/AOT/Alox4913	141,1 – 156,3 nm	DLS/TEM	Lu et al., 2021
Nhũ hóa đảo pha	Difen/ME/TW80	78,9 nm	DLS/TEM	Nghiên cứu này

PBS = poly(butylene succinate), PLA = poly lactic acid, AOT = Bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium, Alox4913 chất hoạt diện thương mại.

Độ bền bảo quản dài hạn là yếu tố cần thiết đối với hệ nhũ mang tính thương mại, các công thức nhũ trong nghiên cứu này cũng được khảo sát mô phỏng điều kiện bảo quản dài hạn trong 3 tháng và đánh giá cảm quan thông qua hai yếu tố kết tủa và tạo kem, hàm lượng hoạt chất sau điều kiện bảo quản cũng được kiểm tra bằng kỹ thuật GC-FID. Bảng 5 cho thấy các công thức OSR 1:9, 2:8 và 3:7 cho độ bền bảo quản cao, không xuất hiện các hiện tượng kết tủa hay tạo kem, hàm lượng hoạt chất cũng được duy trì trong giới hạn cho phép sai lệch 10% so với ban đầu. Công thức OSR 4:6 cho kết tủa nhẹ sau 24 giờ, tuy nhiên lượng kết tủa khá nhỏ (nhỏ hơn 2 mL), nhưng có thể thấy với lượng dầu lớn, hệ nhũ mất ổn định hơn và bên cạnh đó phải lưu ý đến hàm lượng hoạt chất difenoconazole tải trong pha

dầu, lượng hoạt chất tải lớn, tăng khối lượng riêng của hạt nhũ dẫn đến tách pha và tạo tủa. Kết quả đó phù hợp với sự thất thoát hàm lượng hoạt chất của CT4 sau 3 tháng chỉ còn 87% so với ban đầu.

3.2. Hoạt tính sinh học của NDifen

Trong nghiên cứu này, mẫu NDifen được thử nghiệm hoạt tính ức chế sự hình thành sợi nấm trên các chủng như: *Sclerotium rolfisii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium ambrosium*, và *Phytophthora capsici*. Các chủng nấm kể trên là những tác nhân gây bệnh hại phổ biến như bệnh bạc lá, thối quả, bệnh héo rũ trên nhiều loại cây trồng (Mehan, 1994; Charline, 2016; Palaksha, 2010). Kết quả được thể hiện qua Bảng 6. Đồng thời nghiên cứu cũng tiến hành kiểm tra hoạt tính của Difen thương mại và được trình bày tại Bảng 7.

Bảng 5. Độ ổn định nhũ qua các thời gian bảo quản

CT	Thể tích lớp kem (↑) hay kết tủa (↓) nhỏ hơn 2 mL				Hàm lượng hoạt chất (±10%)*
	2 h	24h	15 ngày	30 ngày	
CT1	-	-	-	-	95%
CT2	-	-	-	-	97%
CT3	-	-	-	-	96%
CT4	-	↓0,5	↓0,5	↓1,0	87%

* Chênh lệch hàm lượng cho phép của hoạt chất chính sau thời gian bảo quản (theo TCCS)

Một cách tổng quát, NDifen điều chế trong nghiên cứu này cho hiệu quả ức chế sự hình thành sợi nấm tốt hơn so với dạng difenoconazole thương mại (Difen) ở tất cả các chủng nấm và khoảng nồng độ hoạt chất khảo sát. Cụ thể trên chủng *Sclerotium rolfisii*, NDifen cho hiệu quả ức chế gấp 2 lần so với

Difen ở nồng độ từ 200 ppm. Trên chủng *Fusarium oxysporum*, hiệu suất ức chế của NDifen là 20% cao gấp ba lần so với Difen chỉ 7% tại nồng độ khảo sát 200 ppm. Đặc biệt trên chủng *Phytophthora capsica*, Difen cho hiệu quả ức chế chỉ 78,14% tại nồng độ 1000 ppm, trong khi NDifen ức chế gần như

hoàn toàn lên đến 96,91%. Các kết quả trên cho thấy nhũ tương nanodifenconazole (NDifen) với kích thước hạt rất nhỏ, khả năng khuếch tán của các hạt thuốc tốt hơn so với dạng thương mại (Difen), dẫn đến hiệu quả ức chế sự phát triển của nấm cũng tốt hơn. Điều này đặc biệt có ý nghĩa trong việc sử dụng NDifen làm thuốc phòng ngừa và ngăn chặn sự lây lan của các bệnh hại do nấm gây ra trên cây trồng. Bảng 6 cho thấy ở nồng độ 500 ppm, NDifen

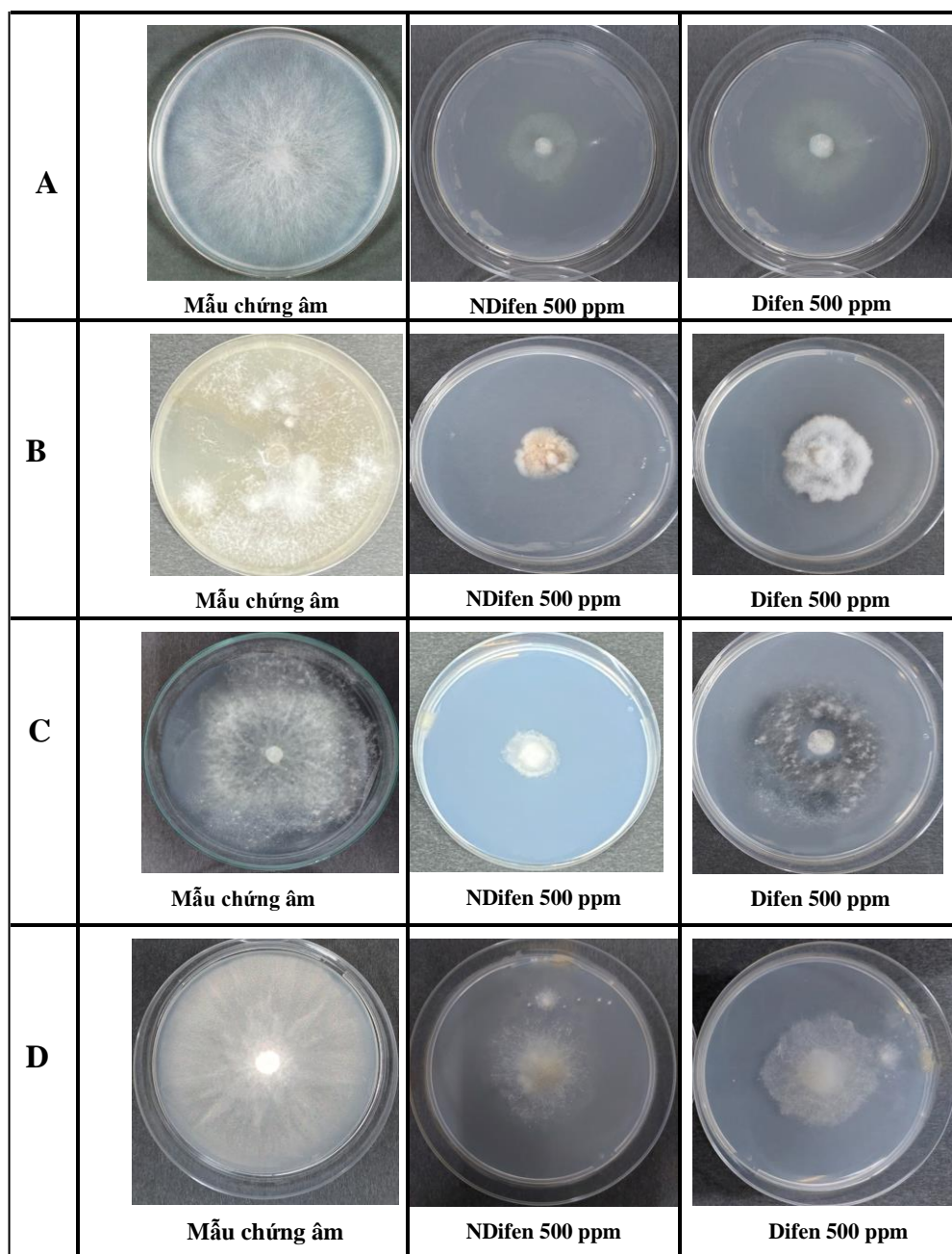
cho hiệu quả ức chế sự sinh trưởng của nấm rất tốt khoảng 80% đối với các chủng *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium ambrosium* và cho thấy khả năng vượt trội hơn do với dạng thương mại, do đó ở nồng độ này, NDifen có thể được ứng dụng trong thực nghiệm. Một số hình ảnh kết quả ức chế các chủng nấm của NDifen và Difen tại nồng độ 500 ppm được trình bày tại Hình 5.

Bảng 6. Kết quả khảo sát hiệu quả ức chế hình thành sợi nấm trên các chủng nấm khác nhau của NDifen so với mẫu đối chứng âm

Chủng nấm	Mẫu thử	Nồng độ (ppm)	Đường kính tản nấm (mm)	Hiệu quả ức chế (%)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Chứng âm	-	86,8 ± 1,6	-
	NDifen	100	80,0 ± 6,2	8,45
	NDifen	200	49,3 ± 2,5	46,39
	NDifen	500	23,3 ± 1,5	78,56
	NDifen	1000	6,0 ± 1,0	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	Chứng âm	-	86,8 ± 1,6	-
	NDifen	100	81,7 ± 3,1	6,39
	NDifen	200	70,7 ± 1,5	20,00
	NDifen	500	21,3 ± 2,5	81,03
	NDifen	1000	8,0 ± 1,0	97,53
<i>Fusarium ambrosium</i>	Chứng âm	-	88,0 ± 1,0	-
	NDifen	100	78,0 ± 3,0	10,93
	NDifen	200	57,3 ± 2,1	36,49
	NDifen	500	22,0 ± 1,0	80,21
	NDifen	1000	6,0 ± 1,0	100
<i>Phytophthora capsici</i>	Chứng âm	-	86,8 ± 1,6	-
	NDifen	100	83,3 ± 1,3	4,33
	NDifen	200	49,0 ± 2,0	46,80
	NDifen	500	39,0 ± 1,0	59,18
	NDifen	1000	8,50 ± 0,5	96,91

Bảng 7. Kết quả khảo sát hiệu quả ức chế hình thành sợi nấm trên các chủng nấm khác nhau của Difen

Chủng nấm	Mẫu thử	Nồng độ (ppm)	Đường kính tản nấm (mm)	Hiệu quả ức chế (%)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Difen	100	80,0 ± 6,2	8,45
	Difen	200	69,0 ± 3,0	22,06
	Difen	500	40,3 ± 1,5	57,53
	Difen	1000	6,0 ± 1,0	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	Difen	100	84,7 ± 2,5	2,68
	Difen	200	80,7 ± 1,5	7,63
	Difen	500	32,7 ± 2,1	67,01
	Difen	1000	14,0 ± 2,0	90,10
<i>Fusarium ambrosium</i>	Difen	100	83,0 ± 2,5	4,74
	Difen	200	66,3 ± 1,5	25,36
	Difen	500	49,7 ± 1,5	45,98
	Difen	1000	6,0 ± 1,0	100
<i>Phytophthora capsici</i>	Difen	100	82,7 ± 2,1	5,15
	Difen	200	57,0 ± 2,0	36,91
	Difen	500	49,3 ± 1,5	46,39
	Difen	1000	23,6 ± 1,5	78,14



Hình 5. Các đĩa thạch thử nghiệm các mẫu thử và mẫu kiểm soát

A. Sclerotium rolfsii, *B. Fusarium oxysporum*, *C. Fusarium ambrosium*, và *D. Phytophthora capsici*

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này thực hiện thành công phối chế nanodifenconazole bằng phương pháp nhũ hóa năng lượng thấp, các thành phần sử dụng trong hệ nhũ là những chất có nguồn gốc tự nhiên, không sử dụng các dung môi hữu cơ độc hại. Hệ nhũ nano có

kích thước hạt trung bình nhỏ hơn 100 nm được xác định bằng kỹ thuật DLS và TEM. Hệ nhũ tối ưu (OSR 2:8) có độ truyền quang tốt, màu sắc sáng bèn ở điều kiện bảo quản dài hạn. Hoạt tính sinh học của nhũ tương nanodifenconazole được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán môi trường thạch, cho hiệu quả ức chế sự phát triển của sợi nấm rất tốt vượt trội

hơn từ 2 – 3 lần dạng thương mại trên nhiều chủng nấm khác nhau bao gồm *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium ambrosium*, và *Phytophthora capsica*. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa lớn trong bối cảnh sự lạm dụng hóa chất bảo vệ thực vật hiện nay, các chế phẩm nano tổng hợp bằng phương pháp hóa học xanh góp phần làm giảm liều lượng sử dụng nhưng vẫn giữ được hiệu lực tác

dụng, hạn chế ô nhiễm môi trường và giảm thiểu sự ảnh hưởng đến sức khỏe con người.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata) thuộc tập đoàn Vingroup, mã số 2021.ThS151.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Charline, L., Claude, A., Veronique, E. H., Fabien, R., & Christian, S. (2016). 1 Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control*, 101, 17-30. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.004>
- Grillo, R., Abhilash, P. C., & Fraceto, L. F. (2016). Nanotechnology applied to bio-encapsulation of pesticides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(1), 1231-1234. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12332>
- Korkin, A., Krstić, P. S., & Wells, J. C. (2010). *Nanotechnology for electronics, photonics, and renewable energy*. Springer New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7454-9>.
- Lu, Z., Zhang, C., Gao, Y., Wang, W., Lin, J., & Du, F. (2021). Simple, Effective, and Energy-Efficient Strategy to Construct a Stable Pesticide Nanodispersion. *ACS Agricultural Science & Technology*, 1(4), 329-337. <https://doi.org/10.1021/acscagtech.1c00018>
- Masibonge, G., Jung, W., Busisiwe, G., Vusi, M., Thobela, L. T., Phešheya, D., & Jie, G. (2020). In vitro effect of some commercial fungicides on mycelial growth of *Fusarium* species causing maize ear rot disease in China. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(11-12), 557-569. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1844531>
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, 8, 1719-1729. DOI <https://doi.org/10.1039/C2SM06903B>
- Mehan, V. K., Mayee, C. D., & McDonald, D. (1994). Management of *Sclerotium rolfsii*-caused stem and pod rots of groundnut—a critical review. *International Journal of Pest Management*, 40(4), 313-320. <https://doi.org/10.1080/09670879409371906>
- Moghaddasi, F., Housaindokht, M. R., Darroudi, M., Bozorgmehr, M. R., & Sadeghi, A. (2018). Synthesis of nano curcumin using black pepper oil by O/W Nanoemulsion Technique and investigation of their biological activities. *Lwt*, 92, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.023>
- Mu, L., & Sprando, R. L. (2010). Application of nanotechnology in cosmetics. *Pharmaceutical research*, 27, 1746-1749.
- Palaksha, M., Ahmed, M., & Das, S. (2010). Antibacterial activity of garlic extract on streptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* solely and in synergism with streptomycin. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 1(1), 12-15. Doi: 10.4103/0976-9668.71666
- Reuveni, M., & Sheglov, D. (2002). Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. *Crop Protection*, 21(20), 951-955. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00073-X)
- Saini, R., Saini, S., & Sharma, S. (2010). Nanotechnology: the future medicine. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, 3(1), 32-33. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.63301>
- Satyanarayana, T., & Rai, R. (2011). Nanotechnology: the future. *Journal of interdisciplinary dentistry*, 1(2), 93-100. DOI: 10.4103/2229-5194.85026
- Setyowati, R. D., & Suresh, K. (2019). Nanopesticide: Future Application of Nanomaterials in Plant Protection. *Plant conversion and management*, 48 (1), 184-188.
- Wang, Y., Ou, S., Liu, P., & Zhang, Z. (2007). Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process. *Energy Conversion and Management*, 48(1), 184-188. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2006.04.016>
- Wang, Y., Li, Y., Wang, Y., Zhang, Y., & Li, X. (2018). Compound pesticide controlled release system based on the mixture of poly(butylene succinate) and PLA. *Journal of microencapsulation*, 35(5), 494-503. <https://doi.org/10.1080/02652048.2018.153826>