

TỔNG HỢP NANO NHŨ TƯƠNG TRÊN NỀN TINH DẦU BƯỞI KẾT HỢP NANO BẠC ỨNG DỤNG LÀM VẬT LIỆU KHÁNG KHUẨN

NGUYỄN THỊ LAN HƯƠNG

Viện Công nghệ Sinh học & Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

nguyenthilanhuong@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Nano nhũ tương (nanoemulsion) trên nền tinh dầu trích ly từ vỏ bưởi Năm Roi đã được tích hợp thành công với nano bạc bằng phương pháp rung siêu âm. Các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt nano nhũ tương cũng được khảo sát, như tỷ lệ hỗn hợp các chất hoạt động bề mặt (Tween 80 và Span 80), thể tích tinh dầu bưởi và thể tích nước. Phân bố kích thước hạt nano nhũ tương được khảo sát bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động học (DLS). Các mẫu nano nhũ tương cũng được khảo sát khả năng kháng 04 chủng vi khuẩn gồm *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella enterica* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, các mẫu nano nhũ tương kết hợp với nano bạc có kích thước trong khoảng từ 10 - 115 nm và có khả năng kháng 04 chủng vi khuẩn kể trên vượt trội hơn so với nano nhũ tương từ tinh dầu bưởi tinh khiết.

Từ khóa: tinh dầu bưởi, phương pháp tán xạ ánh sáng động học, nano nhũ tương, chất nhũ hóa, ứng dụng kháng khuẩn.

SYNTHESIS OF NAMROI POMELO PEEL ESSENTIAL OIL INWATER NANOEMULSION FOR ANTIBACTERIAL APPLICATION

Abstract. Nanoemulsion based on Pomelo essential oil extracted from Pomelo peels was successfully combined with nanosilver by ultrasonic vibration method. The most important factors affecting the nanoemulsion particle size such as ratio of two types of emulsifiers including Tween 80 and Span 80, the volume of Pomelo essential oil and water volume were also investigated in detail. Particle size distribution of nanoemulsion was investigated by Dynamic Light Scattering (DLS) method. Nanoemulsion samples were also tested for the resistance to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* by disc diffusion method. The study results showed that the nanoemulsions based on Pomelo essential oil combined with nanosilver were nanosized in the range from 10 to 115 nm and capable of resisting to mentioned above four types of bacteria superior to nanoemulsion based only on pure Pomelo essential oil.

Keywords: Pomelo peel essential oil, dynamic light scattering, nanoemulsion, antibacterial application.

1 GIỚI THIỆU

Hiện nay các loại tinh dầu chiết xuất tự nhiên từ thực vật rất được ưa chuộng và được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp mỹ phẩm, nước hoa, thực phẩm và y dược [1-4]. Tinh dầu là hỗn hợp của hơn 200 hợp chất thơm khác nhau, thành phần chính của chúng có thể kể đến như terpene, sesquiterpene và các dẫn xuất oxy hoá của chúng như este, rượu, aldehyde aliphatic và xeton [5].

Bưởi Năm Roi có tên khoa học là *Citrus maxima* (Burm) Merr. thuộc họ Rutaceae, là giống bưởi được trồng nhiều ở miền Tây Nam bộ. Tinh dầu bưởi Năm Roi có hương thơm dịu nhẹ, mang lại cảm giác sáng khoái, dễ chịu. Tinh dầu Bưởi được dùng để chữa viêm họng, viêm đường hô hấp, trị ho, cảm cúm, giúp giảm mệt mỏi, đau nhức cơ bắp, giúp loại bỏ bã nhờn trên da, điều trị mụn, nám và điều trị mái tóc bị hư tổn. Ngoài ra, tinh dầu bưởi còn được sử dụng để xông phòng do có khả năng xua đuổi côn trùng, khả năng kháng khuẩn và thanh lọc loại bỏ mùi hôi trong không khí [6, 7].

Nano nhũ tương có đường kính hạt trong khoảng 20-500 nm, thành phần chính bao gồm dầu, nước và các chất hoạt động bề mặt đóng vai trò nhũ hóa [8-11]. Từ năm 2016 đến nay đã có nhiều báo cáo khoa học của các nhóm tác giả được công bố về việc chuyển hóa tinh dầu trích ly từ thực vật sang dạng nano như

tinh dầu nano định hương có kích thước hạt nhỏ hơn 50 nm bằng phương pháp tối ưu dùng sóng siêu âm [12], tinh dầu quế dạng nano với kích thước hạt 8,69 nm có khả năng kháng các chủng vi khuẩn Gram (-) và Gram (+) [13], nano tinh dầu oliu với kích thước hạt 151,68 nm [14], nano tinh dầu từ cây thì là và cây hồ tiêu sử dụng sóng siêu âm có khả năng kháng 2 chủng vi khuẩn Gram (-) *Escherichia coli* và *Salmonella enteria* [15]. Bằng phương pháp nhũ tương ion gel, Yuan Li và cộng sự đã tạo ra microcapsules sử dụng nhiều chất hoạt động bề mặt khác nhau cho ra hạt có kích thước lớn hơn 289,3 nm từ tinh dầu bưởi chanh kết hợp với chitosan [16]. Tuy nhiên, các báo cáo khoa học này mới chỉ đề cập đến các phương pháp tối ưu hóa quá trình trích ly tinh dầu, đặc tính sinh hóa của các loại tinh dầu tự nhiên, phương pháp chế tạo nano tinh dầu dạng nanoemulsion, còn nanoemulsion được hỗ trợ bởi các hạt nano kim loại chưa được công bố rộng rãi. Trong các vật liệu nano kim loại, nano bạc được đặc trưng bởi khả năng phân tán ổn định trong các loại dung môi khác nhau và có độ bền hóa học cao, không bị biến đổi dưới tác dụng của ánh sáng và các tác nhân oxy hóa khử thông thường. Ngoài ra, nano bạc còn có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, khử mùi và an toàn cho sức khỏe con người với liều lượng tương đối cao [17].

Tổng hợp nanoemulsion bằng phương pháp siêu âm có nhiều ưu điểm hơn so với các phương pháp khác như phương pháp đồng nhất áp lực cao, khuếch tán vi lỏng bởi mức tiêu thụ năng lượng và chất ổn định ít hơn, cho kích thước hạt nhỏ hơn nên có độ phân tán cao hơn [18, 19]. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là tổng hợp nanoemulsion từ tinh dầu bưởi trích ly từ vỏ quả bưởi Năm Roi, sau đó kết hợp với nano bạc bằng phương pháp rung siêu âm và khảo sát hoạt tính sinh học của nó trong ứng dụng làm vật liệu kháng khuẩn.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Vỏ bưởi tươi được thu thập là của giống bưởi Năm Roi trồng ở xã Vĩnh Xuân, huyện Trà Ôn, tỉnh Vĩnh Long. Hóa chất được dùng cho quá trình tổng hợp gồm trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$), tween 80 ($\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$, $\geq 99\%$), span 80 ($\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_6$, $\geq 99\%$), sodium sulphate (Na_2SO_4 , $\geq 99\%$) và sodium chloride (NaCl , $\geq 99,1\%$) được đặt từ công ty hóa chất Shanghai Shenglong Chemical Co. Nước cất hai lần được sử dụng làm dung môi.

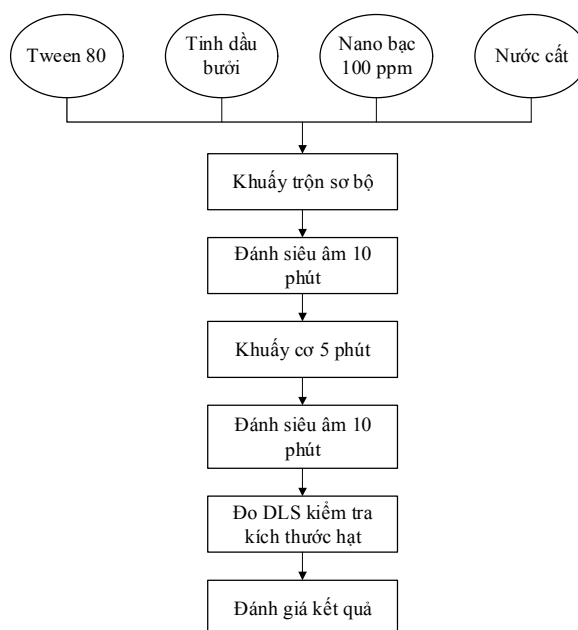
2.2 Tổng hợp nano bạc

Trong các phương pháp tổng hợp nano bạc, dựa vào điều kiện của phòng thí nghiệm chúng tôi chọn phương pháp khử hóa học với chất khử là Trinatri citrat, vì ưu điểm dễ tìm, giá thành rẻ, phương pháp tổng hợp đơn giản dễ thực hiện và cho kích thước nano bạc dưới 100 nm [20-22].

2.3 Tổng hợp nano nhũ tương từ tinh dầu bưởi kết hợp nano bạc

Tinh dầu bưởi được trích ly từ vỏ quả bưởi bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước trực tiếp. Nano nhũ tương từ tinh dầu bưởi kết hợp nano bạc được tổng hợp theo quy trình được biểu diễn trên hình 1. Tinh dầu bưởi được nhũ hóa bằng hỗn hợp Tween 80 và Span 80 với tỉ lệ thích hợp, sử dụng dung dịch nano bạc như một môi trường phân tán. Sau đó, hỗn hợp được rung siêu âm 10 phút với biên độ 30 microns và độ lặp lại đánh 10 giây nghỉ 5 giây, rồi khuấy cơ 5 phút với tốc độ 1200 vòng/phút, tiếp tục cho hỗn hợp rung siêu âm trong 10 phút nữa sẽ thu được hệ nano nhũ tương của tinh dầu trong dung dịch nano bạc.

**TỔNG HỢP NANO NHŨ TƯƠNG TRÊN NỀN TINH DẦU BƯỞI
KẾT HỢP NANO BẠC ỨNG DỤNG LÀM VẬT LIỆU KHÁNG KHUẨN**



Hình 1: Quy trình tổng hợp nano nhũ tương tinh dầu bưởi kết hợp với nano bạc

Mẫu nano nhũ tương tinh dầu bưởi không được tích hợp nano bạc như mẫu trắng cho mục đích so sánh cũng được tổng hợp tương tự theo qui trình trên, bằng cách thay thế dung dịch nano bạc bằng nước cất.

2.4 Phương pháp phân tích

Phương pháp GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry) đã được sử dụng để phân tích định tính và định lượng các thành phần chứa trong tinh dầu bưởi. Phương pháp tán xạ ánh sáng động học (DLS - Dynamic Light Scattering) đã được sử dụng để xác định phân bố kích thước hạt. Phân bố kích thước được thực hiện trên thiết bị đo Horiba SZ-100 tại viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng – Viện Hàn Lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam tại TP. Hồ Chí Minh.

2.5 Phương pháp nghiên cứu kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của mẫu nanoemulsion được thử nghiệm bằng phương pháp khoan giấy kháng sinh khuếch tán đĩa thạch [23]. Mỗi mẫu vi khuẩn được cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường thạch LB (Luria Bertani). Đĩa giấy 6mm vô trùng đặt lên bề mặt thạch và thấm mẫu thử nghiệm nanoemulsion. Đối chứng dương sử dụng các đĩa giấy tẩm kháng sinh gentamycin do Công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Nam Khoa cung cấp. Đĩa Petri được bọc kín bằng giấy vô trùng và đem ủ trong điều kiện 37°C trong vòng 24 giờ. Quan sát các vòng kháng khuẩn xung quang đĩa giấy và đánh giá kết quả.

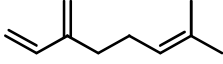
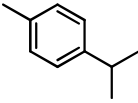
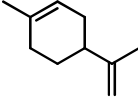
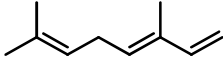
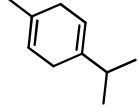
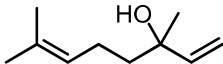
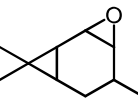
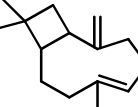
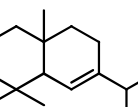
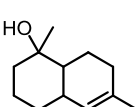
Mẫu nano tinh dầu, nano tinh dầu kết hợp với nano Bạc được xác định khả năng kháng khuẩn tại phòng thí nghiệm vi sinh vật của viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm – Trường Đại học Công nghiệp TP.HCM.

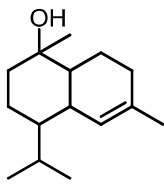
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần hóa học chính của tinh dầu bưởi

Thành phần hóa học chính trong tinh dầu bưởi được phân tích bằng phương pháp sắc ký ghép khối phổ, nhiệt độ làm bay hơi tinh dầu trước khi đi vào phân tích là 320°C.

Bảng 1. Thành phần tinh dầu bưởi bay hơi nhiệt độ 320 oC.

| STT | Thời gian lưu | danh pháp | Công thức phân tử | Công thức cấu tạo | % |
|-----|---------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 | 7,36 | β -Myrcene | $C_{10}H_{16}$ |  | 1,6 |
| 2 | 7,95 | p-Cymene | $C_{10}H_{14}$ |  | 2,4 |
| 3 | 8,06 | D-limonene | $C_{10}H_{16}$ |  | 76,2 |
| 5 | 8,38 | β -ocimene | $C_{10}H_{16}$ |  | 2,8 |
| 6 | 8,59 | γ -terpinene | $C_{10}H_{16}$ |  | 9,8 |
| 7 | 9,50 | 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl | $C_{10}H_{18}O$ |  | 0,3 |
| 8 | 11,87 | Carane | $C_{10}H_{16}O$ |  | 1,9 |
| 9 | 23,77 | Caryophyllene | $C_{15}H_{24}$ |  | 2,17 |
| 10 | 30,33 | Selina-6-en-4-ol | $C_{15}H_{26}O$ |  | 0,27 |
| 11 | 30,84 | τ -Muurolol | $C_{15}H_{26}O$ |  | 0,45 |

| STT | Thời gian lưu | đanh pháp | Công thức phân tử | Công thức cấu tạo | % |
|-------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 12 | 31,22 | α -cadinol | $C_{15}H_{26}O$ |  | 0,13 |
| Tổng | | | | | 98,02 |

Tất cả bảng tổng hợp ở trên ta thấy thành phần D – Limonene và γ -terpinene chiếm phần trăm cao nhất, tương ứng 76,2 và 9,8%. Từ đó rút ra kết luận là D – Limonene là thành phần chính trong tinh dầu bưởi. D – Limonene là chất có khả năng chống lại oxy hóa mạnh mẽ, hoạt tính của nó có khả năng ức chế phòng chống ung thư [24].

3.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt nano nhũ tương tinh dầu bưởi

3.2.1 Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ chất ổn định trong hỗn hợp

Để tìm ra tỉ lệ chất tạo nhũ thích hợp cho tổng hợp nano nhũ tương trên nền tinh dầu bưởi, thí nghiệm được tiến hành bố trí như sau: Một lượng tinh dầu từ 0,5 đến 1,5 mL được khuấy trộn với các tỉ lệ chất ổn định Tween 80:Span 80 khác nhau (Bảng 2) và thêm một lượng nước cất nhất định để phân tán các hạt tinh dầu trong dung dịch. Các mẫu sau khi thực hiện quá trình tổng hợp nano tinh dầu theo phương pháp ở mục 2.3 được xác định kích thước hạt bằng phương pháp DLS và quan sát khả năng ổn định của mẫu trong thời gian 60 ngày.

Bảng 2. Kết quả đo DLS các mẫu nano tinh dầu bưởi

| Tinh dầu V = 0,5 mL. | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|------------------------|--------|
| Tỉ lệ Tween/Span | 25mL H ₂ O | | 50mL H ₂ O | | 75mL H ₂ O | | 100mL H ₂ O | |
| 0,00 – 1,00 | A1 | 147,1 | A6 | 367,1 | A11 | ! | A16 | 305,2 |
| 0,25 – 0,75 | A2 | 207,2 | A7 | 210,5 | A12 | 275 | A17 | 255,4 |
| 0,50 – 0,50 | A3 | 15,6 | A8 | ! | A13 | 3750,0 | A18 | ! |
| 0,75 – 0,25 | A4 | 2106,4 | A9 | 3245,7 | A14 | ! | A19 | ! |
| 1,00 – 0,00 | A5 | 78,7 | A10 | 788,8 | A15 | 22,8 | A20 | 1646,0 |
| Tinh dầu V = 1 mL. | | | | | | | | |
| Tỉ lệ Tween/Span | 25mL H ₂ O | | 50mL H ₂ O | | 75mL H ₂ O | | 100mL H ₂ O | |
| 0,00 – 1,00 | B1 | 155,8 | B6 | 245,1 | B11 | 475,4 | B16 | 347 |
| 0,25 – 0,75 | B2 | 218,7 | B7 | 225,4 | B12 | 216,8 | B17 | 234 |
| 0,50 – 0,50 | B3 | 1891 | B8 | 147,9 | B13 | - | B18 | 192,5 |
| 0,75 – 0,25 | B4 | - | B9 | - | B14 | - | B19 | 1681,6 |
| 1,00 – 0,00 | B5 | 4007,0 | B10 | 71,1 | B15 | 40,0 | B20 | 1209,9 |
| Tinh dầu V = 1,5 mL. | | | | | | | | |
| Tỉ lệ Tween/Span | 25mL H ₂ O | | 50mL H ₂ O | | 75mL H ₂ O | | 100mL H ₂ O | |
| 0,00 – 1,00 | C1 | 396,6 | C6 | 254,0 | C11 | 576 | C16 | 605 |
| 0,25 – 0,75 | C2 | 714,3 | C7 | 274,8 | C12 | 476,9 | C17 | 549,1 |
| 0,50 – 0,50 | C3 | 521,3 | C8 | 392,4 | C13 | 672 | C18 | 587,3 |
| 0,75 – 0,25 | C4 | 473,1 | C9 | 374,2 | C14 | 539 | C19 | 425,8 |
| 1,00 – 0,00 | C5 | 251 | C10 | 171,1 | C15 | 367 | C20 | 392,7 |

Ghi chú: “-”: kích thước hạt quá lớn; “!”: kích thước hạt quá bé, vượt quá ngưỡng đo của máy.

Bảng 2 cho thấy kích thước trung bình hạt nhũ tương trong cùng điều kiện thể tích tinh dầu là 0,5 mL tương ứng tỉ lệ giữa Tween:tinh dầu là 1:0,5 và thể tích nước thay đổi lần lượt là 25 mL; 50 mL; 75 mL; 100 mL tương ứng với tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt Tween/Span (mL/mL) thay đổi từ 0 – 1; 0,25 – 0,75; 0,5 – 0,5; 0,75 – 0,25; 1 – 0.



Hình 2. Ảnh chụp thực tế các mẫu sau 60 ngày. Trong đó, Các mẫu A1 đến A20: Thể tích tinh dầu 0,5 mL, thể tích nước thay đổi từ 25 mL đến 100 mL, tỉ lệ Tween/Span thay đổi từ 0 đến 1 mL; Các mẫu B1 đến B20: Thể tích tinh dầu 1,0 mL, thể tích nước thay đổi từ 25 mL đến 100 mL, tỉ lệ Tween/Span thay đổi từ 0 đến 1 mL; Các mẫu C1 đến C20: Thể tích tinh dầu 1,5 mL, thể tích nước thay đổi từ 25 mL đến 100 mL, tỉ lệ Tween/Span thay đổi từ 0 đến 1 mL.

Đối với khảo sát thể tích tinh dầu là 0,50 mL trong quá trình tổng hợp cho ra kết quả ở tốt nhất khi thể tích nước là 25 mL và 75 mL đối với mẫu A3 và A15 với kích thước tối ưu lần lượt là 15,6 và 22,8 nm. Mẫu A8, A11, A14, A18, A18 có kích thước trung bình của hạt quá nhỏ, nằm ngoài giới hạn đo của máy. Với thí nghiệm 2, các thể tích nước cũng thay đổi lần lượt là 25 mL; 50 mL; 75 mL; 100 mL tương ứng với tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt Tween/Span (mL/mL) thay đổi từ 0 – 1; 0,25 – 0,75; 0,5 – 0,5; 0,75 – 0,25; 1 – 0 nhưng lượng tinh dầu sử dụng là 1 mL tương ứng tỉ lệ giữa Tween:tinh dầu là 1:1. Kết quả tốt nhất khi thể tích nước là 50 mL và 75 mL đối với mẫu B10 và B15 với kích thước tối ưu lần lượt là 71,1 và 40 nm. Các mẫu B4, B9, B13 và B14 có kích thước trung bình của hạt quá nhỏ, nằm ngoài giới hạn đo của máy.

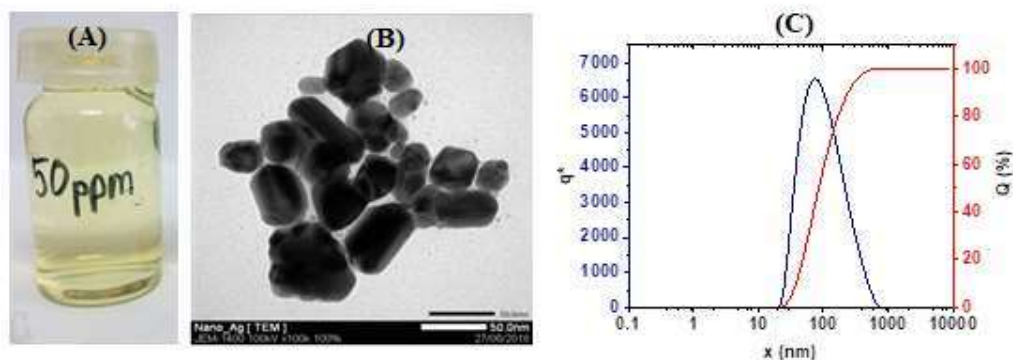
Với thí nghiệm 3, các thể tích nước cũng thay đổi lần lượt là 25 mL; 50 mL tương ứng với tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt Tween/Span (mL/mL) thay đổi từ 0 – 1; 0,25 – 0,75; 0,5 – 0,5; 0,75 – 0,25; 1 – 0 nhưng lượng tinh dầu sử dụng là 1,5 mL tương ứng tỉ lệ giữa Tween:tinh dầu là 1:1,5. Kết quả tốt nhất khi thể tích nước là 50 mL và 75 mL đối với mẫu C5 và C10 với kích thước tối ưu lần lượt là 251 và 171,1 nm, mặt dù kích thước đã tối ưu ở thí nghiệm này nhưng vẫn lớn hơn so với thí nghiệm 1 và 2. Điều này chứng tỏ tỉ lệ giữa chất ổn định:tinh dầu là 1:1,5 chưa tối ưu, lượng Tween không đủ để ổn định lượng tinh dầu phân tán trong nước.

Hình 2 cho ta thấy, sau 60 ngày thì có nhiều mẫu bị lắng ta có thể nhìn thấy rõ ràng như A1, A6, A12, A13, A16, B1, B6, B11, B14, B16, B17, B18, C1, C6, C8 và C9, hai mẫu B1 và B11 đã có hiện tượng lắng dầu tách ra và nổi lên trên bề mặt của chất lỏng, còn những mẫu khác ta có thể thấy độ đục của phần trên và phần dưới của dung dịch khác nhau, phần trên đục hơn phần dưới. Điều này chứng tỏ các hệ nhũ này không bền và đang có hiện tượng lắng, phân tách với các hạt có kích thước khác nhau. Còn các mẫu sử dụng chất nhũ hoá là Tween 80 có độ trong suốt hơn các mẫu còn lại và sau 60 ngày vẫn chưa có hiện tượng lắng, tách pha.

Các kết quả này cho thấy việc chỉ sử dụng Tween làm chất nhũ hoá ổn định cho hệ với tỉ lệ lượng tinh dầu nhỏ hơn hoặc bằng với lượng Tween 80 là tối ưu nhất. Hệ nhũ tổng hợp được có hương thơm của tinh dầu bưởi khi trong hệ chứa trên 2% thể tích tinh dầu. Như vậy để đảm bảo quá trình tổng hợp nano tinh dầu bưởi vừa đảm bảo về kích thước hạt, mùi hương của hệ và độ trong suốt cho sản phẩm đã lựa chọn tỉ lệ các chất trong hệ là 1 mL tinh dầu bưởi, 1 mL Tween trong 50 mL nước để tổng hợp nanoemulsion tinh dầu bưởi. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong công trình của Susana Ribes và cộng sự năm 2017, rằng chất ổn định bề mặt Tween 80 là lựa chọn tối ưu để tổng hợp nano nhũ tương trên nền tinh dầu trích ly từ các cây thuộc chi cam chanh [25].

3.2.2 Phân tích dung dịch nano bạc

Kết quả phân tích từ ảnh TEM (Hình 3) cho thấy các hạt nano bạc trong dung dịch có hình lục giác với kích thước trung bình khoảng từ 50 - 70 nm.



Hình 0: (A) Dung dịch nano bạc nồng độ 50 ppm, (B) Ảnh TEM nano bạc và (C) phân bố kích thước hạt của dung dịch nano bạc

Kết quả DLS của dung dịch nano bạc cho thấy kích thước tập trung của nano bạc trong dung dịch là từ 50 – 80 nm và kết quả trung bình của các hạt nano bạc là 67 nm, khá tương đồng so với kết quả TEM.

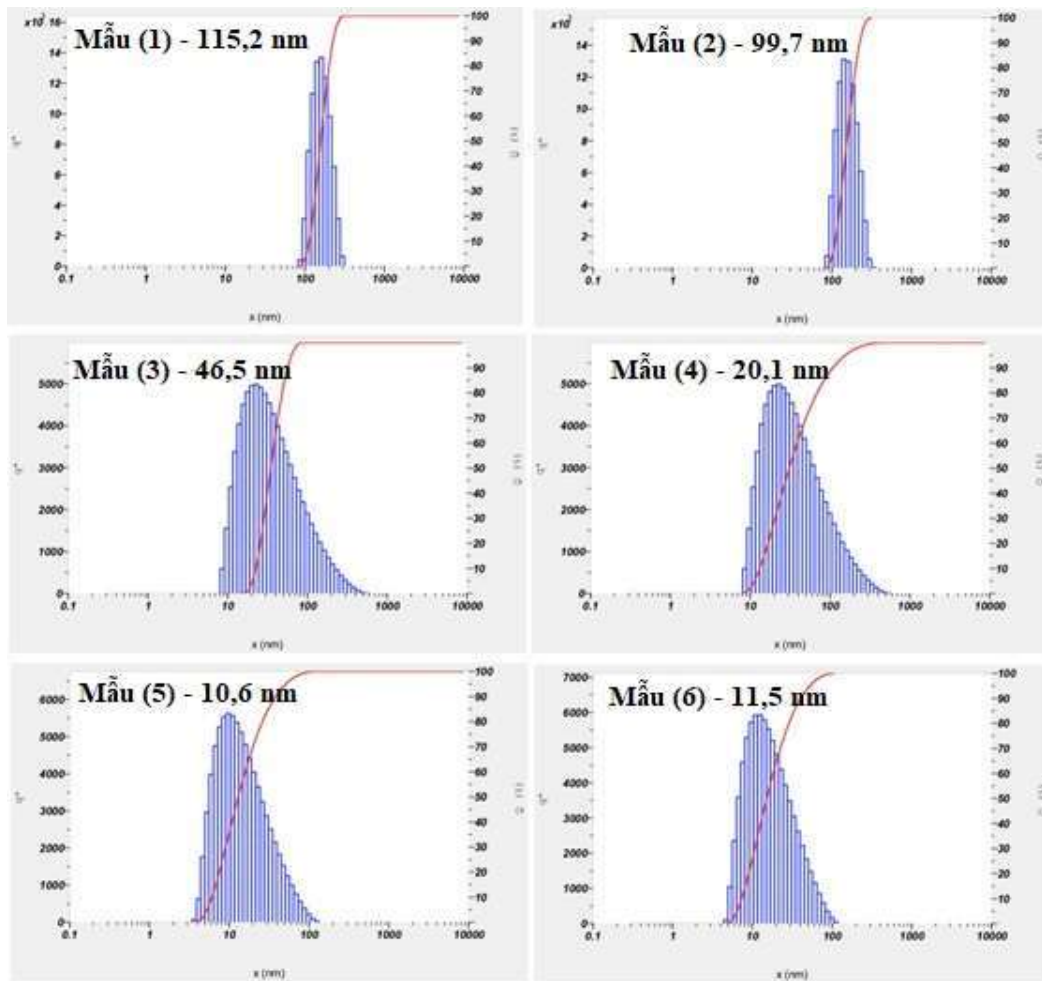
3.3. Tổng hợp nano nhũ tương trên nền tinh dầu bưởi kết hợp nano bạc

Thí nghiệm này thực hiện khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng thể tích tinh dầu trong dung dịch nano bạc 50ppm bằng phương pháp tổng hợp nano tinh dầu kết hợp với nano bạc đã trình bày ở mục 2.3. Nhằm mục đích là đánh giá kích thước hạt nano khi thay đổi hàm lượng thể tích của tinh dầu trong 50 mL hỗn hợp dung dịch nano bạc 50ppm.

Dựa vào kết quả thu được ở Bảng 2, tiến hành lựa chọn tinh dầu bưởi được nhũ hóa bằng Tween 80 với tỉ lệ tinh dầu:Tween 80 là 2:3, tăng hàm lượng thể tích tinh dầu lên 0,5 mL đối với các mẫu từ (1) đến (6), thể tích dung dịch nano bạc 100ppm được cố định sử dụng là 25 mL, sau đó tính toán cho thêm thể tích nước cất thêm vào sao cho nồng độ nano bạc là 50ppm, tổng thể tích của hỗn hợp là 50 mL (Bảng 3).

Bảng 0. Kết quả DLS của các mẫu nano tinh dầu bưởi kết hợp nano Bạc

| Mẫu | Tinh dầu bưởi (mL) | Tween 80 (mL) | Dung dịch nano bạc 100ppm (mL) | H ₂ O (mL) | Kích thước hạt trung bình (nm) |
|-----|--------------------|---------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 1 | 0,5 | 0,75 | 25 | 23,75 | 115,2 |
| 2 | 1,0 | 1,5 | 25 | 22,5 | 99,7 |
| 3 | 1,5 | 2,25 | 25 | 21,25 | 46,5 |
| 4 | 2,0 | 3 | 25 | 20 | 20,1 |
| 5 | 2,5 | 3,75 | 25 | 18,75 | 10,6 |
| 6 | 3,0 | 4,5 | 25 | 17,5 | 11,5 |
| 7 | - | - | 25 | 25 | 67 |



Hình 4: Kết quả đo DLS của các mẫu nano tinh dầu bưởi kết hợp nano bạc. Trong đó, mẫu (1): 0,5 mL tinh dầu + 0,75 mL Tween 80 + 25 mL dung dịch nano bạc + 23,75 mL nước; mẫu (2): 1,0 mL tinh dầu + 1,5 mL Tween 80 + 25 mL dung dịch nano bạc + 22,75 mL nước; mẫu (3): 1,5 mL tinh dầu + 2,25 mL Tween 80 + 25 mL dung dịch nano bạc + 21,25 mL nước; mẫu (4): 2,0 mL tinh dầu + 3,0 mL Tween 80 + 25 mL dung dịch nano bạc + 20 mL nước; mẫu (5): 2,5 mL tinh dầu + 3,75 mL Tween 80 + 25 mL dung dịch nano bạc + 18,75 mL nước; mẫu (6): 3,0 mL tinh dầu + 4,5 mL Tween 80 + 25 mL dung dịch nano bạc + 25 mL nước.

Ở Hình 4 ta thấy khi tăng lượng thể tích tinh dầu Bưởi và chất ổn định bề mặt thì dung dịch có màu đục dần, do mật độ của các hạt tinh dầu phân tán trong dung dịch nano bạc cao và kích thước hạt lớn làm tăng khả năng tán xạ ánh sáng, làm cho dung dịch bị đục.

Kết quả DLS cho thấy phương pháp tổng hợp nano tinh dầu kết hợp với nano Bạc có thể tổng hợp được hệ nhũ tương nano có kích thước hạt nhỏ nhất là 10,6 nm. Trong Hình 4 các cột màu xanh dương thể hiện tỉ lệ phân bố kích thước hạt có trong mẫu, cột màu xanh dương này càng rộng trải về hai bên thì độ đồng hình thấp. Ở Hình 4 mẫu (1) và (2) ta có thể thấy các cột màu xanh có độ rộng hẹp nên tỉ lệ phân bố kích thước hạt của các mẫu có độ đồng hình tương đối cao. Còn các mẫu (3), (4), (5) và (6) các cột màu xanh có độ rộng lớn về hai bên nên tỉ lệ phân bố kích thước hạt của các mẫu có độ đồng hình không cao.

Từ kết quả đo DLS ta thấy kích thước hạt của các mẫu từ (1) đến (5) giảm dần, (5) là mẫu có kích thước hạt nhỏ nhất và tới (6) thì kích thước hạt lại tăng, như vậy có thể kết luận là mẫu (5) có hàm lượng thể tích tinh dầu 2,5 mL và chất ổn định bề mặt Tween 80 với thể tích 3,75 mL là tốt nhất trong 50 mL hỗn hợp để tổng hợp dung dịch nano tinh dầu kết hợp nano Bạc.

3.4. Phân tích khả năng kháng khuẩn của nanoemulsion tinh dầu bưởi kết hợp với nano bạc

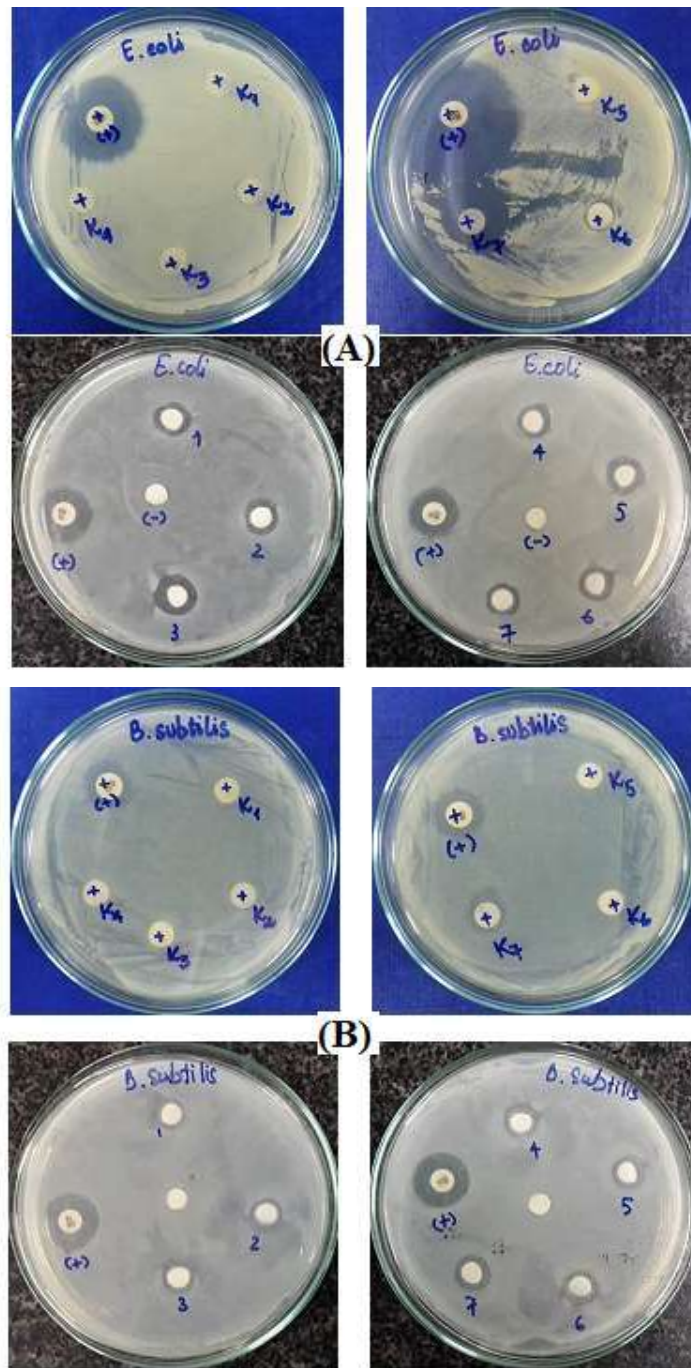
Tất cả các mẫu nano tinh dầu bưởi kết hợp với nano bạc được gửi cho Viện Sinh học & Thực phẩm - Trường Đại học Công nghiệp Tp.HCM để làm thử nghiệm khả năng kháng khuẩn.

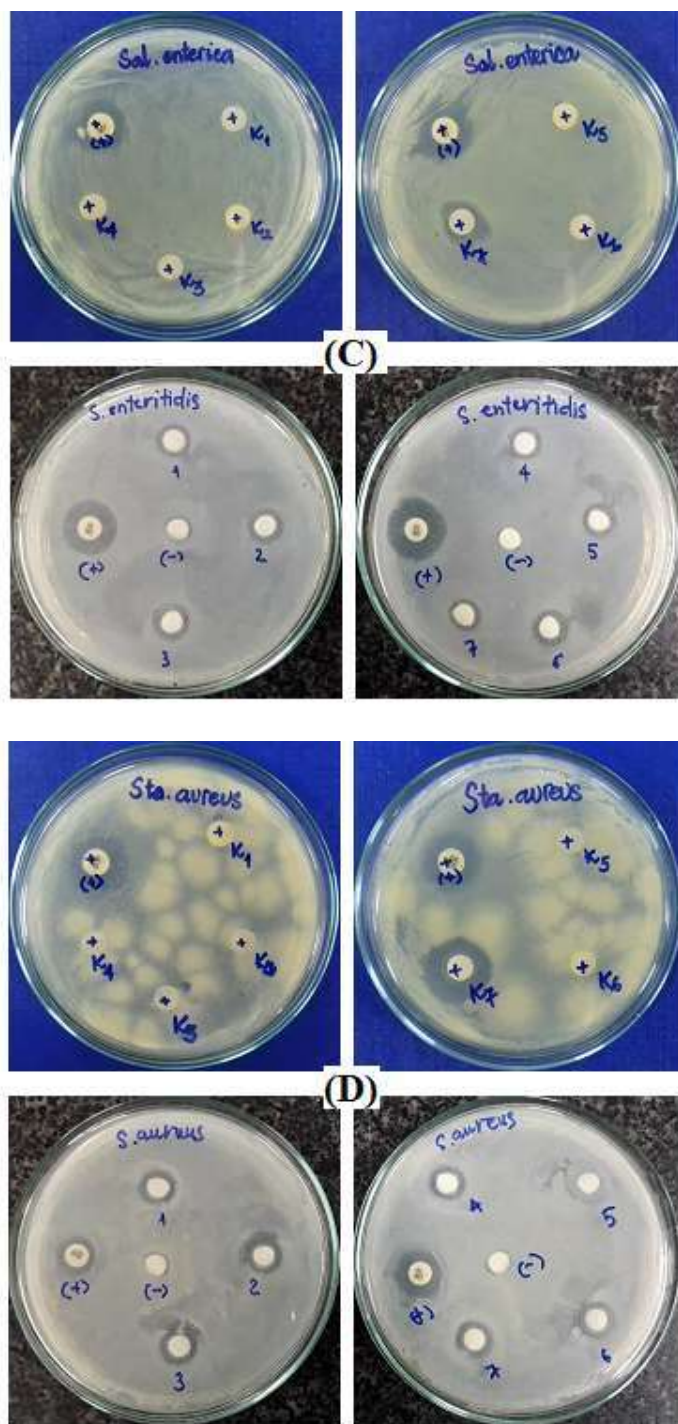
Mỗi mẫu thử nghiệm được lấy 10 μ l nhỏ lên đĩa giấy và đặt lên bề mặt thạch LB đã dàn đều vi khuẩn. Ở thí nghiệm này, sử dụng bốn loại vi khuẩn là *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* để phân tích khả năng kháng khuẩn của các mẫu.

Để đánh giá chính xác khả năng kháng khuẩn của các mẫu nano tinh dầu bưởi kết hợp với nano bạc 50 ppm (từ mẫu 1 đến 6). Chuẩn bị các mẫu đối chứng không chứa nano bạc (từ K1 đến K6), mẫu tinh dầu bưởi nguyên chất (K7) và mẫu chỉ chứa nano bạc 50 ppm (mẫu 7). Thí nghiệm được chuẩn bị theo Bảng 4. Kết quả kháng khuẩn của các mẫu nano nhũ tương được thể hiện ở Hình 5.

Bảng 4. Mẫu thử nghiệm kháng khuẩn

| Mẫu | Tinh dầu bưởi (%) | nano bạc |
|-----|-------------------|------------------|
| K1 | 1 | - |
| K2 | 2 | - |
| K3 | 3 | - |
| K4 | 4 | - |
| K5 | 5 | - |
| K6 | 6 | - |
| K7 | 100 | - |
| (1) | 1 | dung dịch 50 ppm |
| (2) | 2 | dung dịch 50 ppm |
| (3) | 3 | dung dịch 50 ppm |
| (4) | 4 | dung dịch 50 ppm |
| (5) | 5 | dung dịch 50 ppm |
| (6) | 6 | dung dịch 50 ppm |
| (7) | 0 | dung dịch 50 ppm |

TỔNG HỢP NANO NHŨ TƯƠNG TRÊN NỀN TINH DẦU BƯỚI
KẾT HỢP NANO BẠC ỨNG DỤNG LÀM VẬT LIỆU KHÁNG KHUẨN



Hình 5. Kết quả kháng khuẩn của các mẫu nano nhũ tương không chứa nano bạc (mẫu K1 đến K7) và có chứa nano bạc (mẫu 1 đến mẫu 7) có thành phần các mẫu được chuẩn bị theo Bảng 4. (A): Kết quả kháng vi khuẩn *E. coli*; (B): Kết quả kháng vi khuẩn *B. subtilis*; (C): Kết quả kháng vi khuẩn *Sal. enterica*; (D): Kết quả kháng vi khuẩn *S. enteritidis*.

Từ các kết quả thử nghiệm cho thấy tinh dầu bưởi nguyên chất (mẫu K7) và dung dịch nano bạc 50 ppm đều có khả năng kháng 4 loại vi khuẩn kể trên. Các mẫu nanoemulsion có lượng tinh dầu bưởi nhỏ hơn 5% và không chứa nano bạc (K1, K2, K3, K4 và K5) không có khả năng kháng khuẩn. Đối với mẫu K6, có thể quan sát được một vòng kháng khuẩn nhỏ xung quanh đĩa giấy. Như vậy, với nano tinh dầu bưởi không có nano bạc thì nồng độ tinh dầu bưởi là 6% trở lên và kích thước của hệ nhũ phải đạt gần 11,5nm thì chúng bắt đầu có khả năng kháng khuẩn.

Đối với các mẫu nanoemulsion tinh dầu bưởi kết hợp với nano bạc đều có khả năng kháng *Escherichia coli*. Khả năng kháng khuẩn của chúng tăng rất ít từ mẫu (1) đến mẫu (5) và (6). Điều này có thể giải thích, khi các hạt ở kích thước nano càng nhỏ thì diện tích bề mặt tiếp xúc với vi khuẩn tăng dần dẫn đến khả năng kháng vi sinh tăng.

Ở mẫu (5) và (6) có diện tích vòng kháng khuẩn tương đương nhau. Để giải thích cho kết quả này ta đi từ kích thước và nồng độ của tinh dầu trong mẫu, ta có thể thấy kích thước của mẫu (5) lớn hơn một chút so với (6) nhưng (6) lại có nồng độ tinh dầu là 6% là nồng độ tại đó mẫu nano tinh dầu không có nano bạc bắt đầu có khả năng kháng *Escherichia coli* còn (5) nồng độ tinh dầu là 5% tại đó nồng độ này vẫn chưa có khả năng kháng khuẩn. Vì thế khả năng kháng khuẩn giữa hai mẫu này được bù trừ giữa kích thước và nồng độ tinh dầu trong mẫu nên kết quả kháng khuẩn giữa hai mẫu này tương đương nhau.

Các mẫu nano tinh dầu chưa có nano bạc không có khả năng kháng khuẩn với ba loài vi khuẩn còn lại đó là *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella enterica* nhưng tinh dầu bưởi nguyên chất thì có khả năng kháng khuẩn. Như vậy, với nồng độ tinh dầu đã khảo sát ở các mẫu K1 đến K6 vẫn chưa đủ để thể hiện khả năng kháng ba chủng vi khuẩn kể trên. Khi nano tinh dầu kết hợp với nano bạc thì chúng đều có khả năng kháng khuẩn và khả năng kháng khuẩn của chúng cũng được tăng dần từ mẫu (1) đến mẫu (6). Điều này cũng được giải thích dựa vào kích thước hạt của hệ nhũ, khi các hạt ở kích thước nano càng nhỏ thì diện tích bề mặt tiếp xúc với vi khuẩn tăng dần đến khả năng kháng vi sinh tăng. Kết quả tương tự cũng được tìm thấy trong công trình nghiên cứu của nhóm tác giả Donsi và cộng sự năm 2016 [26], và của nhóm tác giả Hatice Yazgan và cộng sự năm 2019 [27], khẳng định rằng kích thước hạt là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn của nano nhũ tương.

Các kết quả này cho thấy nano tinh dầu bưởi không làm ảnh hưởng tới khả năng kháng khuẩn của nano bạc. Vậy, tinh dầu bưởi dạng nano có khả năng kháng vi sinh với nồng độ nhất định đối với mỗi loại vi sinh khác nhau và tính kháng vi sinh được tăng lên khi có thêm sự hỗ trợ của dung dịch nano bạc.

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp rung siêu âm các hạt nano nhũ tương từ tinh dầu vỏ bưởi kết hợp với nano bạc đã được tổng hợp thành công khi sử dụng Tween 80 và Span 80 như một chất nhũ hóa hiệu quả. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các mẫu nhũ tương từ tinh dầu khi được kết hợp với nano bạc hầu hết có kích thước nano với đường kính động học dao động trong khoảng 10 – 115 nm phụ thuộc vào tỉ lệ dầu/nước và tỉ lệ chất nhũ hóa. Mẫu nano nhũ tương kết hợp với nano bạc thể hiện khả năng kháng các chủng vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*) và vi khuẩn Gram dương (*Staphylococcus aureus*) mạnh hơn so với các mẫu nhũ tương từ tinh dầu vỏ bưởi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Amaral and K. Bhargava, Essential oil nanoemulsions and food applications, Adv. Food Technol. Nutr. Sci. Open J., vol. 1, pp. 84-87, 2015.
- [2] P. Anand, V. Vellingiri, R. Durairajan and N. Paramasivam, Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against *Salmonella Typhimurium*, Food Bioscience, vol. 28, pp. 57-65, 2019.
- [3] D. S. Hélder, P. Joana, A. C. Pinheiro, F. Donsi, A. T. Serra, C. M. M. Duarte, G. Ferrari, M. A. Cerqueira and A.A. Vicente, Evaluating the behaviour of curcumin nanoemulsions and multilayer nanoemulsions during dynamic in vitro digestion, Journal of Functional Foods, vol. 48, pp. 605-613, 2018.

- [4] H. B. Eral Gupta, T. A. Hatton and P. Doyle, Nanoemulsions: Formation, Properties And Applications, *Soft Matter*, vol. 11, pp. 1-17, 2016.
- [5] M.M. Ahmad, Salim - ur - Rehman, F.M. Anjum and E.E. Bajwa, Comparative Physical Examination Of Various Citrus Peel Essential Oils, *International Journal of Agriculture and Biology*, vol. 8, pp. 186-190, 2006.
- [6] Ezejiofor et al, “Waste to wealth: Industrial raw materials potential of peels of Nigerian sweet orange (*Citrus sinensis*)”, *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 33, 6257 – 6264, 2011.
- [7] Nisha Pauline et al, “Extraction of Orange Oil by Improved Steam Distillation and its Characterization Studies”, *International Journal of Engineering Technology Management and Applied Sciences*, vol. 3, no. 2, 2349 – 4476, 2015.
- [8] H. V. Mojdeh, R. Hassan, A. Aliahmadi and A. Ardalan, Chapter 13 – Nanoemulsions: A Novel Antimicrobial Delivery System, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*. Elsevier, 2017.
- [9] O. C. Aneta and S. H. Beata, Chapter 7 - The Use of Nanotechnology in Modern Pharmacotherapy, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing*. Elsevier, 2017.
- [10] D. S. Bernardi, T. A. Pereira, N. R. Maciel, J. Bortoloto, G. S. Viera, G. C. Oliveira and P. A. Rocha-Filho, Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments, *J. Nanobiotechnology* vol. 9, pp. 1-9, 2011.
- [11] S. A. Chime, F. C. Kenechukwu and A.A. Attama, *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. IntechOpen, 2014.
- [12] H. S. Mohammad, M. Hosseini, M. Jahanshahi, R. L. Meyer and G. N. Darzi, Clove oil nanoemulsion as an effective antibacterial agent: Taguchi optimization method, *Desalination and Water Treatment*, vol. 57, pp. 18379-18390, 2016.
- [13] S. Zhang, M. Zhang, Z. Fang and Y. Liu, Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 75, pp. 1-7, 2016.
- [14] T. Mehmood, A. Ahmad, A. Ahmed, and Z. Ahmed, Optimization of olive oil-based O/W nanoemulsions prepared through ultrasonic homogenization: A response surface methodology approach, *Food Chemistry*, vol. 229, pp. 790-796, 2017.
- [15] B. Amrutha, K. Sundar, and P. H. Shetty, Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables, *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, vol. 79, pp. 152-159, 2017.
- [16] Y. Li, C. Wu, T. Wu, L. Wang, S. Chen, T. Ding and Y. Hu, Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers, *Journal of Food Engineering*, vol. 217, pp. 108-114, 2018.
- [17] S.P. Deshmukh, S.M. Patil, S.B. Mullani and S.D. Delekar, Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 97, pp. 954-965, 2019.
- [18] P. H. Li and B. H. Chiang, Process optimization and stability of D-limonene-inwater nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 19, pp. 192-197, 2012.

- [19] S. Kentish, T. J. Wooster, M. Ashokkumar, S. Balachandran, R. Mawson and L. Simons, The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 9, pp. 170-175, 2008.
- [20] Sudhir Kapoor et al, Reduction and aggregation of silver ions in aqueous citrate solutions, *Materials Science and Engineering C*, vol. 38, pp. 192 – 196, 2014.
- [21] Andrzej Kudelski et al, Light-induced transformation of citrate-stabilized silvernanoparticles: Photochemical method of increase of SERS activity of silver colloids, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 456, pp. 41 – 48, 2014.
- [22] Arunas Ramanavicius et al., Antibacterial and antifungal activity of silver nanospheres synthesized by tri-sodium citrate assisted chemical approach, *Vacuum*, vol. 146, pp. 259 – 265, 2017.
- [23] A. W. Bauer et al., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 4, pp. 493-436, 1966.
- [24] J. A. Miller et al., D-Limonene: A bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment, *Oncology Reviews*, vol. 5, issue 1, pp. 31-42, 2011.
- [25] Susana Ribes et al., Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*, *Food Control*, vol. 73, Part B, pp. 784-795, 2017.
- [26] F. Donsi et al., Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food, *J. Biotech*, vol. 233, pp. 106–120, 2016.
- [27] Hatice Yazgan, Yesim Ozogul, and Esmeray Kuley, Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, vol.306, No. 108266, 2019.

Ngày nhận bài: 18/09/2019

Ngày chấp nhận đăng: 05/12/2019