

PHÁT TRIỂN HỆ NHũ TƯƠNG NANO CHỨA TINH DẦU TRẦU VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM *Malassezia furfur*

Đến tòa soạn 23-09-2024

Nguyễn Kim Minh Tâm^{1,2}, Phạm Thị Thanh Ngân^{1,2}, Lê Thị Phương Liên^{1,2}, Hồ Thị Huỳnh Như^{1,2} và Lê Xuân Tiến^{1,2,*}

¹Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa, Thành phố Hồ Chí Minh

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*E-mail: tien.le@hcmut.edu.vn

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A NANOEMULSION CONTAINING BETEL ESSENTIAL OIL AND EVALUATION OF ITS ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Malassezia furfur*

In this study was evaluated the antifungal activity against *Malassezia furfur* of Piper betle L. essential oil by agar diffusion assay. The inhibition zone diameter of P. betle essential oil was 21.7 ± 1.31 mm (50 mg/mL), 14.1 ± 0.63 mm (25 mg/mL) and 10.2 ± 0.35 mm (12.5 mg/mL). However, essential oils had low solubility in water and were unstable by environmental factors. The self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) containing P. betle essential oil to enhance its stability and solubility was thus developed. The composition of the nanoemulsion included P. betle essential oil (1 % v/v) and capric triglyceride (1 % v/v) as the dispersion phase, distilled water (92 % v/v) as the continuous phase, non-ionic surfactant Tween 80 (4.8 % v/v) along with 1,3-propanediol (1.2 % v/v) as the emulsifying agents. Dynamic light scattering (DLS) measurements showed that the P. betle nanoemulsion had a mean droplet size that meets the size requirements of the SNEDDS and remained relatively stable for 42 days of storage. In comparison, the minimum inhibitory concentration (MIC) of P. betle essential oil in the nanoemulsion against *M. furfur* was 0.625 mg/mL, twice as high as the MIC of P. betle essential oil dissolved in DMSO. In conclusion, the nanoemulsion containing P. betle essential oil had potential applications in antifungal activity against *M. furfur*. However, the stability in antifungal ability of nanoemulsion needed to be determined more clearly in future studies.

Keywords: Piper betle, essential oil, nanoemulsion, *Malassezia furfur*, antifungi.

1. MỞ ĐẦU

Malassezia furfur thuộc chi *Malassezia*, là một loại nấm men ưa lipid và ký sinh phổ biến nhất trên da người. Tuy nhiên, loài nấm men này có thể trở thành tác nhân gây bệnh trong những điều kiện nhất định như độ ẩm cao, hoạt động của tuyến bã nhờn, mồ hôi, di truyền và tình trạng ức chế miễn dịch. *M. furfur* có liên quan đến một loạt bệnh khác bao gồm lang ben, vẩy nến, gàu, viêm nang lông, ... [1].

Các cơ chế kháng nấm đối với loài này chủ yếu ngăn chặn sự phát triển bằng cách

ức chế quá trình sinh tổng hợp ergosterol, phá vỡ hoạt động của màng tế bào và ức chế sự phân chia tế bào [1]. Nhiều loại tinh dầu đã được nghiên cứu về khả năng kháng nấm và cho thấy tiềm năng thay thế các chất kháng nấm hóa học. Trong đó, tinh dầu trầu (*Piper betle* L.) nổi bật với hiệu quả kháng lại nấm *M. furfur*. Khả năng kháng nấm mạnh mẽ của tinh dầu trầu chủ yếu đến từ các thành phần hoạt tính: eugenol, eugenol acetate, chavicol, chavicol acetate [2]. Tuy nhiên, việc ứng dụng tinh dầu trên thực tiễn thường gặp nhiều hạn chế bởi một số yếu tố, đặc biệt

là khả năng hòa tan trong nước tương đối thấp do đặc tính kỵ nước của chúng. Do đó, việc sử dụng nhũ tương nano có thể làm tăng tính ứng dụng của tinh dầu trong các sản phẩm. Ngoài ra, việc bao bọc tinh dầu bằng nhũ tương nano có thể cải thiện hoạt tính kháng nấm do bề mặt tiếp xúc với vi sinh vật tăng [3].

Trong nghiên cứu này, tinh dầu trầu được đánh giá khả năng kháng nấm *M. furfur* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Đồng thời, công thức nhũ tương nano tinh dầu trầu được xây dựng và đánh giá độ bền vật lý trong thời gian 42 ngày. Cuối cùng, đề tài so sánh khả năng kháng nấm giữa tinh dầu trầu và nhũ tương nano để chứng minh tiềm năng ứng dụng nhũ tương nano trong việc kháng nấm *M. furfur*.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Xác định đường kính vòng ức chế nấm của tinh dầu trầu và nhũ tương nano

Đường kính vòng ức chế nấm được xác định bằng phương pháp khuếch tán thạch đã được điều chỉnh cho phù hợp với điều kiện của nghiên cứu [4].

Tinh dầu trầu và nhũ tương nano được pha loãng liên tiếp trong dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO) sao cho nồng độ tinh dầu trong mẫu lần lượt: 50 – 25 – 12,5 mg/mL. Mẫu đối chứng dương climbazole được pha loãng trong DMSO ở nồng độ: 0,8 – 0,4 – 0,2 mg/mL. Đồng thời, nghiên cứu cũng thử nghiệm kháng nấm với đối chứng âm là dung môi DMSO.

Môi trường Dixon's Agar (25 mL) được đổ vào đĩa petri có đường kính 90 mm. Sau khi môi trường đông lại, dịch nấm (300 μ L) được trải lên trên bề mặt thạch bằng que bông vô trùng. Dịch nấm trước khi trải lên thạch được pha loãng trong

môi trường lỏng Dixon's và được điều chỉnh sao cho độ đục tương đương McFarland 0,5 hoặc đo độ hấp thụ quang (OD) ở bước sóng 600 nm với giá trị OD trong khoảng 0,42 - 0,45 để có huyền phù nấm với mật độ tế bào 10^7 CFU/mL. Thạch được đục 4 lỗ bằng que sắt rồng vô trùng có đường kính lỗ 8 mm, sao cho các lỗ không quá gần nhau và không gần mép đĩa. Sau đó, dung dịch mẫu tinh dầu và mẫu đối chứng (40 μ L) được cho lần lượt vào các lỗ trên đĩa. Các đĩa được ủ ở 30 °C và đo kích thước vòng ức chế sau 48 giờ (các giá trị được đo bằng thước chia vạch có độ chia nhỏ nhất là 0,1 mm). Mỗi mẫu thử nghiệm được lặp lại ba lần và xác định giá trị trung bình của ba lần thử nghiệm.

2.2. Xây dựng công thức nhũ tương nano của tinh dầu trầu

Hệ nhũ tương nano được xây dựng theo quy trình sau: tỉ lệ pha dầu được giữ cố định ở 2% (v/v) sau đó được trộn với Tween 80 với tỉ lệ chất hoạt động bề mặt (HĐBM) và dầu xác định. Hỗn hợp sau khi trộn đồng nhất sẽ được thêm từ từ từng giọt vào pha nước dưới tốc độ của máy khuấy cơ là 300 ± 10 vòng/phút trong 30 phút.

Đầu tiên, tỉ lệ HĐBM/dầu được khảo sát với các tỷ lệ: 1,0 (mẫu M1); 2,0 (Mẫu M2); 2,5 (Mẫu M3); 3,0 (mẫu M4). Sau đó, chọn ra tỉ lệ HĐBM/dầu phù hợp và khảo sát tiếp tỉ lệ giữa các chất hoạt động bề mặt với chỉ số cân bằng ưa nước – ưa dầu (Hydrophilic – lipophilic balance - HLB) trong khoảng 13 – 17 (Bảng 1).

2.3. Xác định kích thước và phân bố kích thước nhũ nano tinh dầu trầu

Phương pháp tán xạ ánh sáng động (Dynamic light scattering – DLS) được lựa chọn để xác định kích thước hạt và phân bố kích thước của nhũ tương nano tinh dầu trầu.

Mẫu nhũ tương nano được ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, mẫu thử nghiệm được pha loãng với nước cất để thu được nồng độ thích hợp. Mẫu pha loãng được cho vào cuvet và đặt vào thiết bị LB550 – Horiba. Thiết bị đo kích thước được cài đặt thông tin mẫu như sau: môi trường phân tán là nước, chỉ số khúc xạ trung bình là 1,33, độ nhớt trung bình của mẫu là 7,975E-04 Pa.s, ở nhiệt độ 30 °C, thời gian trễ 50 giây và góc của bộ thu ánh sáng tán xạ là 90°.

2.4. Đánh giá độ bền hóa lý của nhũ tương nano tinh dầu trầu

Độ ổn định của nhũ tương dầu trong nước thường chịu ảnh hưởng bởi nhiều quá trình xử lý và các yếu tố môi trường chẳng hạn như độ pH, cường độ ion cao, nhiệt độ, sự pha loãng,... điều này ảnh hưởng không tốt đến việc ứng dụng chúng trong một số các sản phẩm. Để đánh giá mức độ ổn định của công thức nhũ tương nano tinh dầu đã xây dựng, nghiên cứu đã thực hiện các thí nghiệm ở điều kiện khác nhau. Phương pháp thí nghiệm trong nghiên cứu này được điều chỉnh từ các nghiên cứu trước đây [3, 5].

Đánh giá độ ổn định của hệ nhũ tương nano bằng phương pháp ly tâm: Các mẫu nhũ tương được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 30 phút để đánh giá độ bền. Mẫu đạt khi hệ đồng nhất, không xảy ra hiện tượng tách lớp sau ly tâm [5].

Đánh giá độ ổn định của hệ nhũ tương nano theo nhiệt độ bảo quản: Các mẫu nhũ tương được lưu trữ ở nhiệt độ ổn định 45 °C, 30 °C và 10 °C trong thời gian 42 ngày. Sau đó, các mẫu được đánh giá định kỳ 7 ngày/lần dựa trên các chỉ tiêu gồm: kích thước giọt và chỉ số đa phân tán.

2.5. So sánh hoạt tính kháng nấm *M. furfur* của tinh dầu trầu và nhũ tương nano tinh dầu trầu

Hoạt tính kháng nấm của tinh dầu trầu và nhũ tương nano được so sánh dựa trên nồng độ ức chế nấm tối thiểu (Minimum inhibitory concentration - MIC). Nồng độ MIC được xác định bằng phương pháp pha loãng liên tục đã điều chỉnh cho phù hợp điều kiện của nghiên cứu [3].

Thí nghiệm tiến hành trên đĩa 96 giếng. Thành phần trong mỗi giếng bao gồm: 50 µL dịch nấm có nồng độ 10^6 CFU/mL, mẫu nhũ tương nano hoặc mẫu tinh dầu được pha loãng liên tiếp với môi trường thành một dãy dung dịch có nồng độ tinh dầu trầu tương ứng: 2,50 – 1,25 – 0,625 – 0,313 – 0,156 (mg/mL). Hai cột giếng cuối được sử dụng làm mẫu đối chứng. Một cột giếng chỉ có môi trường Dixon's và dịch nấm để kiểm tra sự tăng sinh của nấm, một cột giếng chỉ có môi trường Dixon's để kiểm tra độ vô trùng của thí nghiệm. Hàng giếng cuối cùng chứa mẫu nền của nhũ tương (chất hoạt động bề mặt, nước) có nồng độ tương đương với nồng độ trong mẫu thử nghiệm để kiểm tra khả năng ức chế vi khuẩn thử nghiệm của nền mẫu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xây dựng công thức nhũ tương nano của tinh dầu trầu

3.1.1. Tỷ lệ chất hoạt động bề mặt và pha dầu (HDBM/dầu)

Công thức của nhũ tương nano bao gồm tinh dầu trầu và capric triglyceride đóng vai trò là pha dầu, Tween 80 đóng vai trò là chất hoạt động bề mặt và nước cất đóng vai trò là pha nước. Tỷ lệ chất nhũ hoá – tinh dầu (HDBM/dầu) 1,0 (M1) – 2,0 (M2) – 2,5 (M3) – 3,0 (M4) đã được áp dụng trong nghiên cứu này.

Tỷ lệ chất hoạt động bề mặt – pha dầu (HDBM/dầu) ảnh hưởng đáng kể đến sự

hình thành nhũ tương nano thông qua phương pháp tự nhũ hóa. Kết quả cho thấy, các mẫu nhũ tương M1, M2 và M3 (HĐBM/dầu = 1,0 – 2,0 – 2,5) đều bị tách lớp sau 7 ngày lưu trữ. Trong khi đó, mẫu nhũ tương M4 (HĐBM/dầu = 3,0) có trạng thái mờ đục, đồng nhất được và bền sau 7 ngày lưu trữ ở nhiệt độ 30 °C.

Với sự gia tăng nồng độ chất hoạt động bề mặt (Tween 80), khả năng hình thành nhũ tương tăng và kích thước giảm đáng kể. Kết quả này tương tự như trong nghiên cứu của Ghosh và cộng sự (2014) như sau: Kích thước giọt nhũ nano lớn nhất là 95 nm thu được với tỷ lệ HĐBM/dầu là 1,0. Khi tăng tỷ lệ HĐBM/dầu lên 2,0 và 3,0, kích thước giọt giảm xuống lần lượt là 47 nm và 20 nm với thời gian nhũ hóa là 30 phút. Tỷ lệ HĐBM/dầu = 3,0 là hệ nhũ bền và ổn định [6]. Vì vậy, tỷ lệ chất hoạt động bề mặt – pha dầu (3:1) là phù hợp để tiếp tục sử dụng khảo sát trong các công thức tiếp theo.

3.1.2. Tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt

Công thức của nhũ tương nano được giữ cố định tỷ lệ HĐBM/dầu là 3,0 và được khảo sát tiếp tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt. Các loại chất hoạt động bề mặt được lựa chọn và trộn lẫn với tỷ lệ được thể hiện trong *Bảng 1*. Các mẫu nhũ N1 và N2 không hình thành hệ nhũ tương. Việc sử dụng các chất hoạt động bề mặt không ion có giá trị HLB cao như Tween 20 (HLB = 16,7) hay kết hợp giữa Tween 20 và Tween 80 (HLB = 15,0) có giá trị HLB > 15,0 để tạo hệ nhũ tương nano là không phù hợp.

Với mục đích giảm hàm lượng Tween 80, các chất đồng hoạt động bề mặt như Span 80 (HLB = 4,3) và 1,3 – propanediol được bổ sung vào công thức. Các mẫu N4 – N9 có giá trị HLB trong khoảng 14 – 15 tạo hệ nhũ tương màu vàng đục đến trắng đục và ổn định vật lý sau 7 ngày lưu trữ ở 30 °C. Tuy nhiên, mẫu nhũ có độ đục cao

phản ánh kích thước hạt lớn. Khi ánh sáng gặp phải các hạt lớn, nó không thể truyền qua hoàn toàn, mà bị phản xạ hoặc phân tán, dẫn đến độ đục cao [7]. Vì vậy, việc phối hợp các chất hoạt động bề mặt theo tỷ lệ như các mẫu N4 – N9 cho thấy hiệu quả kém trong việc hình thành hệ nhũ tương nano.

Bảng 1. Trạng thái các mẫu sau 7 ngày lưu trữ ở 30 °C.

Mẫu	Loại chất hoạt động bề mặt	Tỷ lệ (% v/v)	HLB	Trạng thái
N1	Tw 20	100	16,7	Tách 2 lớp
N2	Tw 20:Tw 80	60:40	16,0	Tách 2 lớp
N3	Tw 80	100	15,0	Tách 2 lớp
N4	Tw 80:Sp 80	95:5	14,5	Nhũ vàng đục
N5	Tw 80:Sp 80	90:10	13,9	Nhũ vàng đục
N6	Tw 80:Sp 80	85:15	13,4	Nhũ vàng đục
N7	Tw 80:1,3 - Pr	95:5	14,7	Nhũ trắng đục
N8	Tw 80:1,3 - Pr	90:10	14,4	Nhũ trắng đục
N9	Tw 80:1,3 - Pr	85:15	14,2	Nhũ trắng đục
N10	Tw 80:1,3 - Pr	80:20	13,9	Nhũ trong mờ
N11	Tw 80:1,3 - Pr	75:25	13,6	Nhũ trong mờ
N12	Tw 80:1,3 - Pr	70:30	13,3	Nhũ trong mờ

Tw: Tween; Sp: Span; 1,3-Pr: 1,3- Propanediol

Hai mẫu N10, N11 và N12 tạo thành hệ nhũ trong mờ và ổn định vật lý sau 7 ngày lưu trữ ở 30 °C. Việc sử dụng 1,3 – propanediol như chất đồng hoạt động bề mặt là lựa chọn phù hợp. Vì chúng là các phân tử nhỏ, giúp phân bố nhanh chóng vào bề mặt phân pha, xen vào giữa các phân tử chất HĐBM để hỗ trợ hiệp đồng [3]. Trong nghiên cứu này, Tween 80 được kết hợp với 1,3 – propanediol để làm chất hoạt động bề mặt trong công thức tạo nhũ tương nano tinh dầu nhằm tăng tính ổn định của hệ. Ba mẫu từ N10 – N12 được lựa chọn để tiến hành các đánh giá độ bền và đo kích thước giọt nhũ.

Nghiên cứu của Li và cộng sự (2018) đã khảo sát các chất đồng hoạt động bề mặt là ethanol, 1,2-propanediol và glycerol với tỷ lệ hoạt động bề mặt/đồng hoạt động bề mặt (K_m) lần lượt là 1:1, 3:1 và 3:2. Kết quả của nghiên cứu đưa ra rằng 1,2-

propanediol là chất đồng hoạt động bề mặt hiệu quả trong việc tăng sự ổn định và ngăn ngừa sự kết tụ của hệ nhũ tương nano. So với các chất đồng hoạt động bề mặt khác, 1,2-propanediol cũng dễ dàng xen vào giữa các phân tử chất HDBM hơn do sự hòa tan pha dầu tối đa của chúng. Đồng thời theo nghiên cứu, ở tỷ lệ K_m lớn hơn 1, vùng nhũ tương nano bên trên giảm độ pha lớn và kích thước hạt nhũ càng nhỏ khi K_m tăng dần. Kết quả và bàn luận của Li có sự tương đồng với kết quả xây dựng công thức nhũ tương nano trong bài báo này [3].

3.2. Xác định kích thước và phân bố kích thước nhũ nano tinh dầu trầu

Trong nghiên cứu này, phương pháp đo DLS (Dynamic light scattering) được sử dụng để xác định kích thước và phân bố kích thước nhũ tương nano. Kết quả đo kích thước và phân bố kích thước của ba mẫu N10, N11 và N12 được thể hiện ở *Bảng 2*.

Bảng 2. Kích thước và phân bố kích thước của các mẫu

Các chỉ tiêu đánh giá	Mẫu N10	Mẫu N11	Mẫu N12
D10 (nm) ^a	86,30	22,02	28,45
D50 (nm) ^b	154,43	42,56	57,33
D90 (nm) ^c	275,60	82,01	115,50
Dav Diameter (nm) ^d	220,30	66,36	94,01
PDI ^e	0,2270	0,3017	0,3461

a – kích thước hạt mịn, cho biết 10% các hạt có kích thước nhỏ hơn giá trị này

b – kích thước hạt trung bình, cho biết 50% các hạt có kích thước nhỏ hơn giá trị này

c – kích thước hạt thô, cho biết 90% các hạt có kích thước nhỏ hơn giá trị này

d – kích thước hạt trung bình của nhóm hạt.

e – chỉ số đa phân tán.

Kết quả đo kích thước cho thấy mẫu N10 có kích thước trung bình là 220,03 nm, thành phần giọt chiếm tỉ lệ cao nhất có kích thước khoảng 275,60 nm (*Hình 1A*).

Kết quả này đáp ứng yêu cầu kích thước của hệ SNEDDS (khoảng 100 – 300 nm) [8]. Trong khi đó, mẫu N11 và N12 có 90% hạt có kích thước 66,36 nm và 94,01 nm, kích thước hạt của hai mẫu này nhỏ hơn so với kích thước hạt cần thiết của hệ SNEDDS. Ngoài ra, chỉ có mẫu N10 có giá trị PDI nhỏ hơn 0,3 (PDI=0,2270). Hệ nhũ tương có giá trị PDI nhỏ hơn 0,3 là hệ có sự đồng nhất và độ ổn định cao [9]. Từ kết quả trên, tỉ lệ các chất hoạt động bề mặt trong công thức mẫu N10 cho thấy sự phù hợp trong việc xây dựng công thức tạo nhũ tương nano tinh dầu trầu.

3.3. Đánh giá độ bền hóa lý của nhũ tương nano tinh dầu trầu

Để ứng dụng hệ nhũ tương nano vào việc cải thiện tính chất của tinh dầu, điều quan trọng là giữ cho hệ được ổn định trong quá trình bảo quản và sử dụng. Do đó, nghiên cứu đã đánh giá độ ổn định vật lý của mẫu nhũ tương nano theo thời gian. Công thức nhũ tương nano N10 tối ưu nhất và được chọn đánh giá độ bền hóa lý.

3.3.1. Độ ổn định khi ly tâm của nhũ tương nano

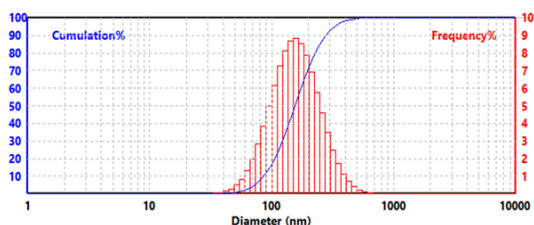
Mẫu nhũ tương nano được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 30 phút để đánh giá độ bền [5].

Sau khi ly tâm, mẫu nhũ tương nano cho trạng thái đồng nhất, không xảy ra hiện tượng tách lớp. Như vậy, hệ nhũ tương được tạo thành với các điều kiện và thành phần phù hợp. Điều này tạo ra một hệ ổn định, giúp ngăn chặn sự tách lớp sau quá trình ly tâm.

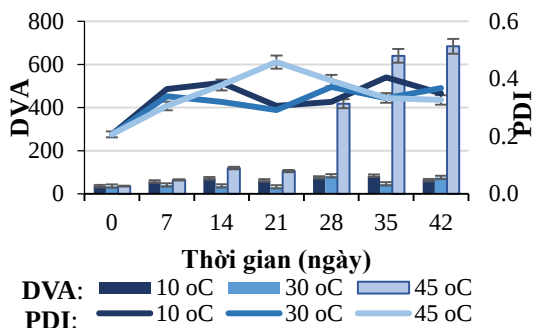
3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lưu mẫu đến hệ nhũ tương nano

Mẫu nhũ tương nano được pha loãng với nước cất xuống nồng độ thích hợp, sau đó đem đo kích thước bằng máy phân tích kích thước hạt Nano Winner802. Với cùng một mẫu ở các nhiệt độ khác nhau, đường kính tiểu phân trung bình (DVA)

và chỉ số đa phân tán (PDI) theo thời gian thu được được thể hiện ở đồ thị Hình 1B.



(A)



(B)

Hình 1. Phân bố kích thước và đánh giá độ bền hóa lý của mẫu nhũ tương nano

(A): Kích thước và phân bố kích thước của mẫu N10.

(B): Đường kính trung bình (DVA) và chỉ số đa phân tán (PDI) của nhũ tương nano theo thời gian và nhiệt độ

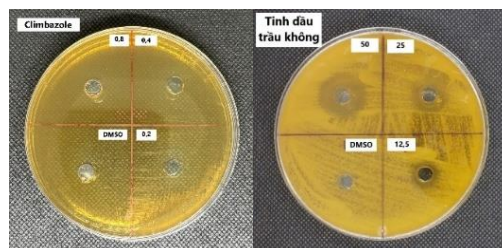
Trong suốt thời gian lưu giữ, mẫu nhũ tương nano lưu trữ ở các nhiệt độ khác nhau đều có xu hướng tăng kích thước nhưng mức độ tăng khác nhau. Mẫu lưu trữ ở nhiệt độ thường (30 °C) sau 7 ngày có đường kính hạt trung bình là $41,01 \pm 2,05$ nm, đến ngày thứ 42 kích thước tăng lên đến $76,22 \pm 3,81$ nm. Mẫu được lưu trữ ở nhiệt độ cao (45 °C) có sự tăng kích thước rõ rệt, kích thước trung bình tăng từ $64,55 \pm 3,22$ nm (sau 7 ngày) lên đến $683,91 \pm 3,41$ nm (sau 42 ngày). Khi thời gian bảo quản kéo dài, các giọt nhũ tương nano có diện tích bề mặt lớn sẽ có xu hướng kết tụ [10]. Khi nhiệt độ tăng, các phân tử trong hệ có xu hướng di chuyển nhanh hơn, tương tác nhiều hơn với nhau nên tốc độ kết tụ và tăng kích thước giọt

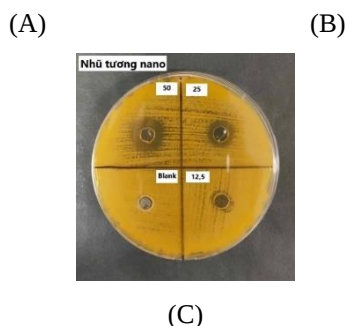
nhũ cũng diễn ra mạnh mẽ hơn. Đối với mẫu lưu trữ ở nhiệt độ lạnh, sự thay đổi kích thước không đáng kể, kích thước trung bình của giọt nhũ là $57,28 \pm 2,86$ nm (sau 7 ngày) và $63,46 \pm 3,17$ nm (sau 42 ngày). Khi hệ nhũ tương nano được bảo quản ở nhiệt độ thấp, độ nhớt của pha liên tục tăng dần. Điều này có thể ngăn chặn sự di chuyển và sự tương tác giữa các hạt nano, làm giảm khả năng hình thành các hạt lớn hơn.

Giá trị PDI phản ánh sự phân bố kích thước hạt. Giá trị PDI nằm trong khoảng 0,1 đến 0,3 chứng tỏ sự phân bố kích thước hẹp của các tiểu phân, trong khi PDI lớn hơn 0,5 sẽ thể hiện sự phân bố kích thước rộng của các tiểu phân [9]. Trong thời gian 7 ngày đầu, giá trị PDI ở cả ba điều kiện bảo quản đều tăng nhẹ. Ở những tuần tiếp theo, hai mẫu ở 10 °C và 30 °C có giá trị PDI giao động trong khoảng 0,3 – 0,4. Tuy nhiên, đối với mẫu bảo quản ở 45 °C, giá trị PDI có sự tăng mạnh rõ rệt trong những tuần tiếp theo. Điều này có thể giải thích rằng khi nhiệt độ tăng, các tiểu phân có xu hướng di chuyển nhanh và tương tác nhiều hơn với nhau, dẫn đến sự không đồng nhất của hệ. Sau 6 tuần lưu trữ, PDI của cả ba mẫu đều giảm về mức $0,348 \pm 0,021$.

3.4. Đánh giá hoạt tính kháng nấm *M. furfur* của tinh dầu trầu và nhũ tương nano tinh dầu trầu

Tinh dầu trầu và nhũ tương nano sử dụng trong nghiên cứu được xác định hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán thạch và pha loãng liên tục.





Hình 2. Kết quả khuếch tán thạch của (A) climbazole, (B) tinh dầu trầu và (C) nhũ tương nano

Bảng 3. Đường kính vòng ức chế và MIC của climbazole, tinh dầu trầu và nhũ tương nano

Mẫu	Đường kính của vòng ức chế (mm)				MIC (mg/mL)
	0,8 mg/mL	0,4 mg/mL	0,2 mg/mL	Bl	
Clim	> 40	> 36	32 ± 1,54	8	0,015
Trầu	50 mg/mL	25 mg/mL	12,5 mg/mL	Bl	MIC (mg/mL)
	21,7 ± 1,31	14,1 ± 0,63	10,2 ± 0,35	8	0,323
Nhũ tương nano	17,5 ± 0,38	13,6 ± 0,51	9,3 ± 0,23	8	0,625

Clim: Climbazole, Bl: mẫu trắng

Theo kết quả ở Bảng 3, tinh dầu trầu có hoạt tính kháng nấm *M. furfur* đáng kể. Cụ thể, đường kính vòng kháng nấm ở nồng độ 50 mg/mL là $21,7 \pm 1,31$ (mm), ở 25 mg/mL là $14,1 \pm 0,63$ (mm) và ở 12,5 mg/mL là $10,2 \pm 0,35$ (mm). Đối chứng dương được sử dụng là climbazole, đây là chất kháng nấm *M. furfur* được ứng dụng phổ biến trong các sản phẩm kem bôi hỗ trợ điều trị nấm da và dầu gội chống gàu. Đường kính kháng nấm của climbazole ở nồng độ 0,8 mg/mL và 0,4 mg/mL lớn hơn 40 (mm), ở nồng độ 0,2 mg/mL là $32 \pm 1,54$ (mm).

Nghiên cứu của He và cộng sự (2024) đã chứng minh tinh dầu đinh hương (*Syzygium aromaticum*) và tinh dầu cỏ xạ hương (*Thymus vulgaris*) có khả năng kháng nấm *M. furfur*. Ở nồng độ 10% (v/v), đường kính vòng ức chế của tinh dầu đinh hương là $30,41 \pm 0,14$ mm và của tinh dầu cỏ xạ hương là $20,00 \pm 1,00$

mm [4]. Vòng ức chế của các tinh dầu trên có sự khác biệt so với vòng ức chế của tinh dầu trầu trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, kết quả còn này phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện thí nghiệm như nồng độ mẫu, thể tích môi trường, đường kính lỗ và mật độ tế bào nấm ban đầu.

Theo kết quả Bảng 3, nhũ tương nano trầu thể hiện vòng ức chế nấm ở nồng độ 50 mg/mL là $17,5 \pm 0,38$ (mm), ở 25 mg/mL là $13,6 \pm 0,51$ (mm) và ở 12,5 mg/mL là $9,3 \pm 0,23$ (mm). Đường kính vòng ức chế nấm gần như tương tự với tinh dầu trầu ở cùng nồng độ tinh dầu. Tuy nhiên, đường kính này còn phụ thuộc vào khả năng khuếch tán của mẫu vào môi trường thạch. Do đó, việc xác định nồng độ MIC bằng phương pháp pha loãng liên tục có ý nghĩa hơn trong việc so sánh khả năng kháng nấm của nhũ tương nano và tinh dầu trầu.

Sau 48 giờ dịch nấm được ủ với nhũ tương nano tinh dầu trầu, các giếng được đo độ đục bằng thiết bị Elisa (Multiskan FC) ở bước sóng 600 nm để xác định giá trị MIC. Kết quả MIC của các mẫu được trình bày ở Bảng 3. Mẫu tinh dầu trầu có giá trị MIC là 0,313 mg/mL. Khi so sánh với nghiên cứu của He và cộng sự (2024), tinh dầu đinh hương và xạ hương có giá trị MIC đối với *M. furfur* lần lượt là 0,422 mg/mL và 1,474 mg/mL. Mặc dù có sự tương đồng về cấu trúc hóa học của thành phần chính (đều là nhóm phenolic), khả năng kháng nấm của tinh dầu trầu tốt hơn so với các loại tinh dầu trong nghiên cứu của He [4].

Bên cạnh đó nhũ tương nano có nồng độ MIC là 0,625 mg/mL, cao hơn so với MIC của tinh dầu trầu. Điều này có thể giải thích do nhũ tương nano là một hệ thống phân tán khá bền của các hạt nano nhỏ trong một pha lỏng. Vì vậy khi tinh dầu được bao bọc trong cấu trúc giọt nhũ tương nano sẽ khó khăn hơn trong việc

phóng thích các hoạt chất để tương tác với tế bào nấm.

Trong nghiên cứu của Li và cộng sự (2018), ở dạng nhũ tương nano, khả năng kháng nấm của tinh dầu phật thủ giảm đối với *Aspergillus niger* và không đổi đối với *Penicillium citrinum*. So với kết quả của Li, kết quả trong bài báo này có phần tương đồng. Điều này được lý giải là do các thành phần trong nhũ tương có thể cung cấp dinh dưỡng cho nấm, thành tế bào phức tạp của nấm có thể ngăn chặn sự xâm nhập của nhũ tương nano và chất hoạt động bề mặt có cấu trúc phân tử lớn có thể ngăn chặn khả năng ức chế vi khuẩn hoặc vi nấm [3].

4. KẾT LUẬN

Những kết quả trên cho thấy, hệ nhũ tương nano chứa tinh dầu trầu có khả năng kháng nấm *M. furfur*. Việc sử dụng hệ nhũ tương nano để khắc phục nhược điểm kỵ nước và tăng cường sự ổn định về tính chất hóa – lý cho tinh dầu là rất tiềm năng. Tuy nhiên, để xác định rõ ràng hơn về việc duy trì tính ổn định và hoạt tính của tinh dầu, việc đánh giá khả năng kháng nấm của hệ nhũ tương nano theo thời gian là rất cần thiết cho các nghiên cứu trong tương lai.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM trong khuôn khổ đề tài mã số SVKSTN-2024-KTHH- 17. Chúng tôi xin cảm ơn Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

Cam kết: Tôi xin cam đoan đây là công trình của Thạc sĩ Nguyễn Kim Minh Tâm và các đồng tác giả, và nội dung này chưa được công bố trên bất kỳ tạp chí nào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Billamboz, M. and S. Jawhara, (2023). Anti-Malassezia Drug candidates based on virulence factors of *Malassezia*-Associated diseases. *Microorganisms*, **11**(10): p. 2599.
2. Vu, T., et al., (2021). Chemical compositions and anti-malassezia properties of Vietnamese *Mentha arvensis* and *Piper betle* essential oils. *International Journal of Agricultural Technology*, **17**(4), 1619-1630.
3. Li, Z.-h., et al., (2018). Development of finger citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) essential oil loaded nanoemulsion and its antimicrobial activity. *Food Control*, **94**: p. 317-323.
4. He, D., et al., (2024). Synergistic activity of clove essential oil and thyme essential oil and their interaction against *Malassezia furfur*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. *LWT*, **204**: p. 116431.
5. Anwer, M.K., et al., (2014). Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. *Journal of oleo science*, **63**(4): p. 347-354.
6. Ghosh, V., A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran, (2014). Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **114**: p. 392-397.
7. Kharat, M., G. Zhang, and D.J. McClements, (2018). Stability of curcumin in oil-in-water emulsions: Impact of emulsifier type and concentration on chemical degradation. *Food Research International*, **111**: p. 178-186.
8. Pouton, C.W., (2000). Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *European journal of pharmaceutical sciences*, **11**: p. S93-S98.
9. Pongsumpun, P., S. Iwamoto, and U. Siripatrawan, (2020). Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. *Ultrasonics sonochemistry*, **60**: p. 104604.
10. Nie, Y., et al., (2023). Stability and bioactivity evaluation of black pepper essential oil nanoemulsion. *Heliyon*, **9**(4).