

CHẾ TẠO VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM *IN VITRO* CỦA NANO NHũ TƯƠNG THẢO MỘC ỨC CHẾ *SCLEROTIUM ROLFSII* VÀ *RHIZOCTONIA SOLANI* GÂY BỆNH TRÊN CÂY TRỒNG

Đến tòa soạn 29-08-2024

Phạm Quang Dương^{1,2}, Phan Thị Hiệp^{2,3}, Vũ Đình Hoàng³, Trần Đại Lâm¹,
Nguyễn Vũ Sơn³, Lê Huy Bình², Võ Thị Kiều Anh¹, Phí Huy Bách⁴, Lê Thế Tâm⁵,
Lê Đăng Quang^{1*}

^{1.} Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

^{2.} Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và
Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

^{3.} Trường Hóa học và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội,
1 Đại Cồ Việt, Hà Nội, Việt Nam

^{4.} Trường THCS và THPT Tạ Quang Bửu, Số 94A, Đường Lê Thanh Nghị,
Phường Bách Khoa, Quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

^{5.} Đại học Vinh, 182 Lê Duẩn, Vinh, Nghệ An, Việt Nam

*E-mail: ledangquang2011@gmail.com

SUMMARY

PREPARATION AND EVALUATION OF *IN VITRO* ANTIFUNGAL BIOASSAY OF BOTANICAL NANOEMULSIONS AGAINST *SCLEROTIUM ROLFSII* AND *RHIZOCTONIA SOLANI* PHYTOPATHOGENIC FUNGI

In this study, the nanoemulsion containing ethyl acetate extract of Polygonum cuspidatum root was successfully prepared. The emulsified extract was dispersed in an aqueous medium at a dilution ratio of 400-800 times to form nanoemulsions. The resulting nanoemulsions had an average particle size of 219 to 227.9 nm based on dynamic light scattering (DLS) measurement. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was also used to evaluate the composition and quality of the extract in the product. In vitro antifungal bioassay of the obtained nanoemulsions on fungal strains Sclerotium rolfsii and Rhizoctonia solani, showed excellent inhibitory effects. The inhibitory effects ranged from 84.88% to 100% for S. rolfsii and R. solani in vitro. Therefore, the nanoemulsions containing the plant extract promised to bring outstanding effects in developing plant protection products in the future.

Keywords: Polygonum cuspidatum, botanical nanoemulsion, antifungal.

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, *Sclerotium rolfsii* (SR) và *Rhizoctonia solani* (RS) là những mầm bệnh phá hoại nhiều loại thực vật trên thế giới [1]. *S. rolfsii* là một loại nấm gây bệnh hoại tử trong đất, tạo ra nhiều sợi nấm màu trắng trên cây bị nhiễm bệnh. Các quả nằm gần bề mặt đất thường dễ bị nhiễm nấm hơn. Các vết bệnh mềm, sưng nước, trũng, hơi vàng phát triển trên vỏ sau đó lan ra hầu hết hoặc toàn bộ quả, cuối cùng quả sẽ mềm và bị mục nát trong vòng 3 đến 4 ngày sau khi bị nhiễm bệnh. *R. solani* là một loại nấm hoại tử phát triển hạch nấm với kết cấu đồng nhất và đường kính đa dạng. Trên các loại cây trồng khác nhau, khi bị nhiễm nấm sẽ xuất hiện các triệu chứng như cháy bẹ, cháy lá, thối gốc và đốm nâu [2]. Nhóm nghiên cứu của M. Salaril đã chỉ ra rằng *R. solani* có thể ra các bệnh ở cây trồng như thối rễ, thối quả và làm úng thân [3].

Trong lĩnh vực bảo vệ thực vật, các chế phẩm nhũ tương nano có nguồn gốc từ cao chiết thực vật, tinh dầu cho thấy hiệu quả vượt trội hơn nhũ tương thông thường và thân thiện với môi trường [4]. Đặc biệt, việc chế tạo nhũ tương nano từ nhũ tương đậm đặc là một phương pháp phổ biến và dễ thực hiện. Các sản phẩm nhũ tương đậm đặc thường chứa hàm lượng chất có hoạt tính sinh học cao, sau đó được phân tán vào nước theo tỉ lệ thích hợp. Nhũ tương nano tạo thành với các hạt kích thước nanomet có thể cải thiện hiệu quả kháng nấm, tăng khả năng thấm ướt và thẩm thấu vào bề mặt cây trồng [5].

Cốt khí củ (*Polygonum cuspidatum*) là một loài thực vật thân thảo, sống lâu năm thuộc họ Rau răm – Polygonaceae. Có 4 anthraquinone chính đã được phân lập từ rễ cốt khí củ là: physcion, emodin, citreorosein và anthraglycoside B [6]. Anthraquinone có trong cao cốt khí củ được biết đến là hợp chất thiên nhiên nổi

tiếng có khả năng ức chế một số tác nhân gây bệnh cho thực vật [7]. Các anthraquinone có tác dụng diệt nấm mạnh, có thể kể đến một số nấm quan trọng như: *Botrytis cinerea*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita*, và *Rhizoctonia solani* [8].

Nghiên cứu này nhằm mục đích chế tạo nhũ tương nano có thành phần cao chiết cốt khí củ (*P. cuspidatum*) chứa anthraquinone và đánh giá hoạt tính kháng nấm của nó đối với *S. rolfsii* và *R. solani* gây bệnh trên cây trồng. Từ đó phát triển tạo thành chế phẩm bảo vệ thực vật có nguồn gốc từ thiên nhiên, mang lại hiệu quả tối ưu, an toàn với sức khỏe con người và thân thiện với môi trường.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Vật liệu và thiết bị

Rễ cốt khí củ (*P. cuspidatum*) được thu mua tại chợ cây thuốc Ninh Hiệp bởi Thạc sĩ Phạm Quang Dương, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao. Rễ được thu gom, hong khô ở nơi thoáng mát, phơi khô dưới ánh nắng mặt trời và sấy tới khi có độ ẩm từ 5-10 %. Tiến hành nghiền nhỏ rễ với kích thước 0,2-1 cm trước khi tiến hành ngâm chiết.

Tween 20, Tween 60, propylen glycol (PG), methanol, ethyl acetate, *n*-hexane là các hóa chất công nghiệp có nguồn gốc từ Trung Quốc. Các dung môi được cất lại trước khi sử dụng.

Thiết bị tán xạ ánh sáng động phân tích cỡ hạt nano Horiba SZ-100Z2, Nhật Bản, dùng để đo kích thước hạt và thế zeta. Máy cô quay chân không RV 10 Digital V của hãng IKA, Đức. Máy đồng hóa T 18 Ultra-Turrax (IKA, Đức) với tốc độ từ 3000-25000 vòng/ phút. Tủ cấy vi sinh Human Lab, Hàn Quốc đạt tiêu chuẩn ISO 9001:2008. Máy đo quang phổ hồng ngoại Nicolet iS10 FT-IR, Thermo scientific, Mỹ.

2.2. Tạo cao chiết chứa anthraquinone từ cốt khí củ

Rễ cốt khí củ (*P. cuspidatum*) phơi khô, nghiền nhỏ, sau đó đem ngâm chiết với methanol (MeOH) ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Quá trình ngâm chiết được thực hiện 3 lần. Phần dịch MeOH thu được đem cô quay chân không thu được dịch đặc MeOH. Phần dịch đặc này sau đó được hòa vào nước và được chiết phân bố với dung môi ethyl acetate (EtOAc). Dịch chiết EtOAc được cô quay chân không thu được 250 g cao chiết EtOAc (Hiệu suất thu hồi 10%).

2.3. Tạo nhũ tương nano chứa cao chiết cốt khí củ

Tạo nhũ tương đậm đặc từ cao chiết cốt khí củ

Cân 30,2 mg cao chiết ethyl acetate cốt khí củ cho vào lọ penicilin. Cân 0,5 g PG và 0,5 g cặn đáy của tinh dầu quế (quá trình chưng cất tinh chế tinh dầu quế sinh ra cặn ở đáy) vào bình thủy tinh 50 mL có sẵn cao chiết cốt khí củ. Cặn đáy tinh dầu quế kết hợp với chất hoạt động bề mặt dùng để phân tán hệ nhũ tương. Ngoài ra theo nghiên cứu còn cho thấy tinh dầu quế có khả năng kháng nấm hiệu quả [9]. Khuấy đều trên máy đồng hóa ở 500 rpm trong 30 phút, tạo hệ đồng nhất (pha dầu). Đồng thời, cân 0,5 g Tween 20 và 0,5 g Tween 60, khuấy đều trên máy đồng hóa ở 500 rpm trong 30 phút. Tiến hành trộn pha dầu và chất hoạt động bề mặt, đem khuấy đều trên máy đồng hóa trong 15 phút ở tốc độ 1000 rpm cho đến khi thu được hệ nhũ tương đậm đặc đồng nhất (hàm lượng cao chiết cốt khí củ chiếm 1,49 %) [10].

Tạo các hệ nhũ tương nano chứa cao chiết cốt khí củ

Sau khi chế tạo được nhũ tương nano đậm đặc, tiến hành chế tạo hai hệ nhũ tương nano chứa cao chiết cốt khí củ (hệ

1, hệ 2) bằng cách cho thêm pha nước theo tỉ lệ thích hợp. Hóa chất được sử dụng như pha nước trong thí nghiệm này là nước cất. Các hệ 1, hệ 2, có tỉ lệ nhũ tương đậm đặc/ pha nước lần lượt là 1/400 và 1/800 ứng với hàm lượng cao chiết cốt khí củ lần lượt là 37 ppm và 18.5 ppm. Tiến hành lấy cùng một thể tích dung dịch nhũ tương đậm đặc cho lần lượt vào 2 lọ penicillin với kích cỡ như nhau. Sau đó cho thêm nước cất với tỷ lệ như trên, tiến hành khuấy đều trên máy đồng hóa trong 15 phút ở tốc độ 1000 rpm đến khi thu được hệ đồng nhất, dung dịch có màu vàng nhạt hơn so với hệ nhũ tương đậm đặc [11]. Các hệ nhũ tương nano được theo dõi và bảo quản ở nhiệt độ thường trong khoảng thời gian 1 tháng. Tiếp tục nghiên cứu các đặc điểm của các hệ nhũ tương nano: hệ 1, hệ 2 và đánh giá hoạt tính kháng nấm *in vitro*.

2.4. Các phương pháp đánh giá đặc điểm của nhũ tương nano

Phương pháp đo kích thước hạt trung bình, chỉ số đa phân tán (PI) và giá trị thế zeta

Để xác định kích thước hạt trung bình, chỉ số đa phân tán và giá trị thế zeta của nhũ tương nano, đã sử dụng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động. Phép đo được thực hiện trên thiết bị phân tích kích thước hạt (DLS), thế zeta và trọng lượng phân tử Horiba SZ-100Z2, Nhật Bản. Phép đo được thực hiện lần lượt với 2 hệ nhũ tương nano (hệ 1, hệ 2) đã chế tạo. Cho lần lượt dung dịch trong 2 hệ vào cuvet polystyrene. Cài đặt các thông số với tất cả các phép đo như: nhiệt độ 25 °C, độ nhớt: 0,8872 cP, chỉ số khúc xạ của nước là 1,330. Mỗi phép đo của từng hệ được lặp lại 3 lần. Các kết quả thu được hiển thị trên máy tính được kết nối với thiết bị.

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier

Xác định phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR trên máy đo quang phổ hồng ngoại

Nicolet iS10 FTIR để phân tích mẫu cao chiết ethyl acetate từ rễ cốt khí củ ban đầu và các hệ nhũ tương nano tạo thành (hệ 1, hệ 2). Từ đó có thể đánh giá được sự thay đổi của thành phần các chất trong cao chiết ban đầu và ở sản phẩm tạo thành [12].

2.5. Phương pháp thử nghiệm *in vitro* trên nấm *S. rolfii* và *R. solani* gây bệnh ở cây trồng

Các hệ nhũ tương nano tạo thành gồm: hệ 1, hệ 2 được thử nghiệm với nấm cây trong môi trường chứa Potato dextro Agar (PDA), theo dõi sự ức chế của nấm và so sánh với đối chứng âm sau 2-5 ngày. Môi trường PDA được hấp tiệt trùng và làm nguội đến khoảng 50 °C, sau đó cho thêm mẫu thử. PDA thu được đem đổ vào đĩa petri có đường kính 9 cm. Ba đĩa petri lặp lại được sử dụng cho mỗi hệ nhũ tương nano. Dùng 3 đĩa PDA không chứa chế phẩm để làm đối chứng âm (mẫu kiểm soát). Đối chứng dương được thực nghiệm với Score 250EC tại nồng độ pha loãng 500 lần. Theo dõi và đo đường kính nấm bằng thước kẹp điện tử. Hiệu quả ức chế nấm được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu quả ức chế} = \frac{D_c - D_t}{D_c - 5} \times 100\%$$

Trong đó : D_c : Đường kính nấm trên đĩa petri đối chứng, mm; D_t : đường kính nấm trên đĩa có chứa nhũ tương nano, mm.

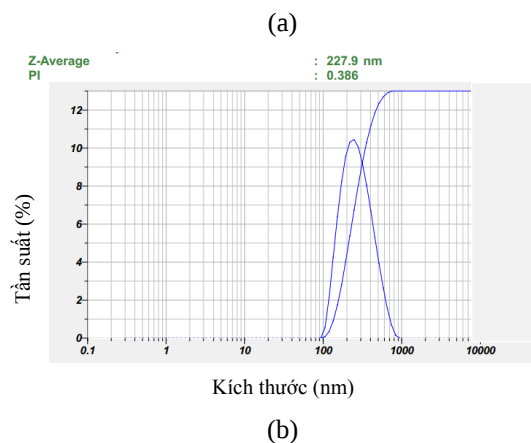
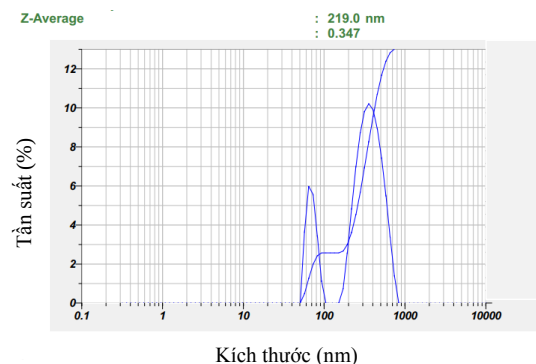
Nấm *S. rolfii* và *R. solani* được cung cấp từ nguồn thuần chủng của Viện Bảo vệ Thực vật, bảo quản ở nhiệt độ 4 °C và đậy kín để tránh lây nhiễm chéo.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

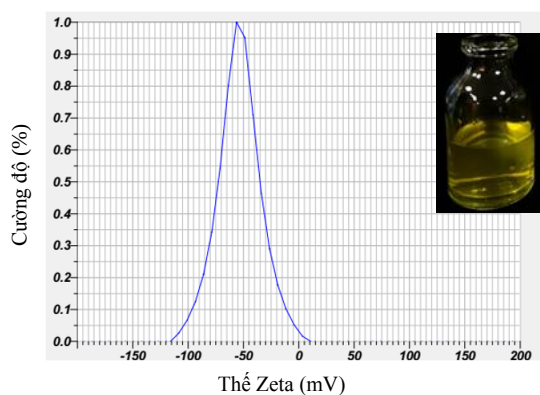
3.1. Tính chất hóa lý của hệ nhũ tương nano

Kích thước hạt trung bình, chỉ số đa phân tán và giá trị thế zeta

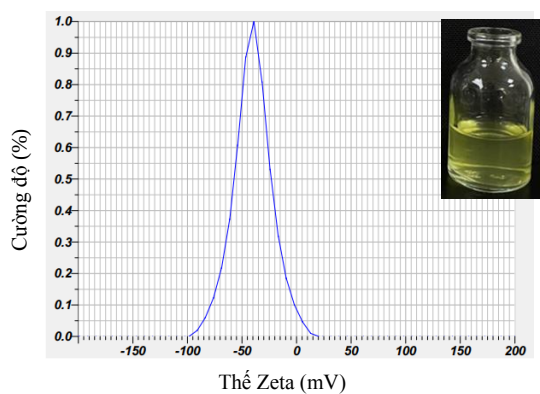
Kết quả đo bằng kỹ thuật DLS cho thấy hệ 1, hệ 2 có kích thước hạt trung bình gần như bằng nhau và đều nhỏ hơn 300 nm, chỉ số đa phân tán (PI) nhỏ hơn 0,5 (Hình 1). Hệ 1 có kích thước hạt trung bình (219,0 nm) nhỏ hơn so với hệ 2 (227,9 nm). Điều này cho thấy các hệ nhũ tương nano tạo thành đáp ứng tốt yêu cầu của hệ nhũ tương ổn định [13]. Thế zeta có giá trị tuyệt đối > 25 cho thấy tạo hệ vi nhũ tương bền, tránh được hiện tượng tách lớp, kết tủa xảy ra do hiệu ứng tương tác tĩnh điện (Hình 2) [14]. Điều này cũng phù hợp với kết quả theo dõi 2 hệ nhũ tương nano sau 1 tháng ở nhiệt độ phòng thấy không xuất hiện cặn lắng, hệ đồng nhất. Công thức hệ 1 với tỉ lệ nhũ tương đậm đặc/ nước cất là 1/400 với giá trị của thế zeta là -53,8 mV cho thấy độ ổn định của hệ 1 tốt hơn so với hệ 2 (-40,2 mV).



Hình 1. Giản đồ kích thước hạt trung bình và chỉ số đa phân tán của a) hệ 1 và b) hệ 2



(a)

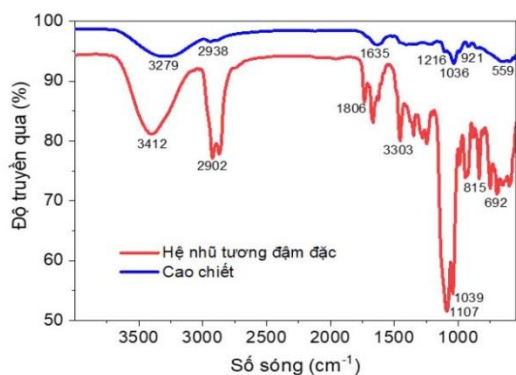


(b)

Hình 2. Giản đồ thế zeta của a) hệ 1 và b) hệ 2

Phổ FTIR

Kết quả phân tích phổ hồng ngoại FTIR của các mẫu cao chiết cốt khí củ và của hệ nhũ tương đậm đặc được thể hiện trên Hình 3.



Hình 3. Phổ FTIR của cao chiết cốt khí củ và của hệ nhũ tương đậm đặc

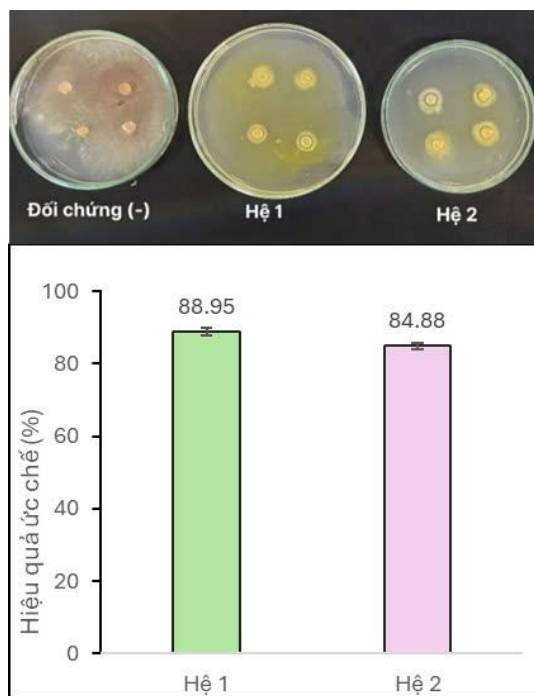
Các dải phổ IR ở khoảng $3500-3000\text{ cm}^{-1}$, đặc trưng cho liên kết của các nhóm

hydroxyl (O-H) trong cấu trúc các hợp chất anthraquinone. Các dải phổ IR quan sát được ở $1675-1625\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho các nhóm carbonyl (C=O).

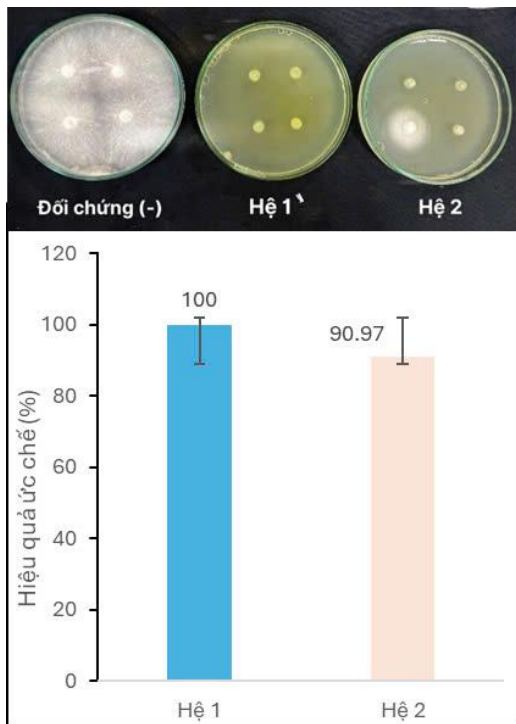
So sánh phổ FTIR của mẫu cao chiết EtOAc cốt khí củ và hệ nhũ tương đậm đặc (Hình 3) cho thấy không có quá nhiều sự thay đổi về các thành phần hoá học đặc trưng trong hệ. Như vậy có thể giữ được thành phần chất có hoạt tính trong chế phẩm tạo thành.

3.2. Hoạt tính sinh học của các hệ nhũ tương nano

Trong nghiên cứu này, các hệ nhũ tương nano hệ 1 và hệ 2 tạo thành được thử nghiệm hoạt tính ức chế sự hình thành sợi nấm trên 2 chủng *S. rolfsii* và *R. solani* sau 2 ngày nuôi cấy. Đây là những tác nhân chính gây bệnh hại phổ biến như bệnh bạc lá, thối quả, héo rũ trên cây trồng [15]. Kết quả được thể hiện trên Hình 4 và Hình 5.



Hình 4. Hiệu quả ức chế nấm *R. solani* của 2 hệ nhũ tương nano sau 2 ngày nuôi cấy



Hình 5. Hiệu quả ức chế nấm *S. rolfssii* của 2 hệ nhũ tương nano sau 2 ngày nuôi cấy

Các hệ nhũ tương nano được tạo thành cho hiệu quả ức chế mạnh trên 2 chủng nấm *S. rolfssii* và *R. solani*. Hệ 1 (tỷ lệ nhũ tương đậm đặc/ pha nước là 1/400) có khả năng ức chế tốt hơn so với hệ 2 (tỷ lệ nhũ tương đậm đặc/ pha nước là 1/800). So sánh với đối chứng âm, hiệu quả ức chế nấm giảm dần khi phần trăm khối lượng nhũ tương nano đậm đặc giảm. Bên cạnh đó đối chứng dương Score 250EC ức chế hoàn toàn đối với cả 2 nấm khi thử nghiệm. Chủng nấm *S. rolfssii*, sau 2 ngày, tiến hành đo đường kính nấm cho thấy đối chứng âm có đường kính trung bình là 68,7 mm, hệ 1 nấm không phát triển, còn hệ 2 có đường kính nấm trung bình là 10,75 mm. Như vậy, hệ 1 cho hiệu quả ức chế hoàn toàn 100% còn hệ 2 cũng đạt hiệu quả cao lên tới 90,97% (Hình 5). Trên chủng nấm *R. solani* hai hệ nhũ tương nano hệ 1, hệ 2 tạo thành cũng gần như cho hiệu quả rất tốt. Sau 2 ngày, đường kính nấm đo được của đối chứng âm là 63,2 mm, hệ 1 có đường kính trung bình 11,4 mm và hệ 2 là 13,8 mm. Hiệu

quả ức chế của hệ 1, hệ 2 lần lượt là 88,95% và 84,88% (Hình 4). Điều này chứng tỏ hàm lượng cao chiết cốt khí củ có trong mẫu chế phẩm ảnh hưởng đến khả năng ức chế các chủng nấm. Các kết quả này cho thấy khả năng vượt trội hơn của chế phẩm nano tạo thành so với những nghiên cứu trước.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chế tạo thành công nhũ tương nano hệ 1 và hệ 2 có chứa thành phần cao chiết cốt khí củ. Các hệ nhũ tương nano tạo thành có kích thước hạt trung bình trong khoảng 219 tới 227,9 nm được xác định bằng kỹ thuật DLS. Giá trị tuyệt đối của thế zeta của các hệ tạo thành >40 mV, hệ phân tán đều, bền và không bị lắng hay nổi dầu theo thời gian. Hệ 1 (tỷ lệ nhũ tương đậm đặc/pha nước là 1/400) có kích thước hạt trung bình nhỏ hơn và giá trị tuyệt đối thế zeta cao hơn. Kết quả đo phổ hồng ngoại FTIR cũng cho thấy thành phần các chất trong cao chiết được đảm bảo sau khi tạo thành hệ nhũ tương đậm đặc. Các hệ nano nhũ tương thể hiện hoạt tính kháng nấm *in vitro* cho hiệu quả ức chế mạnh đối với nấm *S. rolfssii* và *R. solani*. Kết quả nghiên cứu đã gợi mở ứng dụng tạo chế phẩm nhũ tương nano có thành phần thiên nhiên trong thuốc bảo vệ thực vật. Đây hứa hẹn sẽ là sản phẩm mang lại hiệu quả cao và thân thiện với sức khỏe con người cũng như hạn chế gây ô nhiễm môi trường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Sở KHCN Hải Phòng từ đề tài mã số UDNDP.06/2022-2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Reynaldi Darma, Maria Purnamasari I, Delia Agustina, Theodorus Eko Pramudito, Maria Sugiharti and Antonius Suwanto (2016). A Strong Antifungal-producing Bacteria from Bamboo

- Powder for Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* in Melon (*Cucumis melo* var. *amanta*). *Biotechnology Research and Development*, **7** (2), 1-7.
- [2] M. Senapati, A. Tiwari, N. Sharma, P. Chandra, B. M. Bashyal, R. K. Ellur, P. K. Bhowmick, H. Bollinedi, K. K. Vinod, A. K. Singh and S. G. Krishnan (2022). *Rhizoctonia solani* Kühn Pathophysiology: Status and Prospects of Sheath Blight Disease Management in Rice. *Frontiers in Plant Science*, (13).
- [3] Mohammad Salari, Naser Panjekeh, Zahrah Nasirpoor and Javad Abkhoo (2012). Changes in total phenol, total protein and peroxidase activities in melon (*Cucumis melo* L.) cultivars inoculated with *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Microbiology Research*, **6** (37), 6629-6634.
- [4] Orlando Campolo, Giulia Giunti, Maryne Laigle, Thomas Michel and Vincenzo Palmeri (2020). Essential oil-based nano-emulsions: Effect of different surfactants, sonication and plant species on physicochemical characteristics. *Industrial Crops and Products*, (157), 112935.
- [5] K. Bouchemal et al. (2004). Nano emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, (280), 241-251.
- [6] Yann-Lii Leu, Tsong-Long Hwang, Juan-Wen Hu, Jia-You Fang (2008). Anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* as tyrosinase inhibitors for dermal use. *Phytotherapy Research*, **22** (4), 552-556.
- [7] Antoine H. L. Nkuété, Ludovico Migliolo, Hippolyte K. Wabo, Piere Tane and Octávio L. Franco (2015). Evaluation of Multiple Functions of *Polygonum* Genus Compounds. *European Journal of Medicinal Plants*, **6** (1), 1-16.
- [8] Young Mi Kim, Chi Hoon Lee, Hyo Guyng Kim and Hoi Seon Lee (2004). Anthraquinones Isolated from *Cassipourea* (Leguminosae) seed show antifungal property against phytopathogenic fungi. *Journal of Food Chemistry*, **52** (20), 6096-6100.
- [9] S. Manso, F. Cahon, R. Becerril and C. Nerin (2013). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, **30** (2), 370-378.
- [10] Jincheng Li, Yanbin Shi, Yuan Ren, Zhaotong Cong, Guotai Wu, Nana Chen, Xiaoning Zhao, Li Li (2017). Development and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery system of rhubarb anthraquinones. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2017.
- [11] B. K. Nanjwade, P. J. Varia, V. T. Kadam, T. Scichana and M. S. Kamble (2013). Development and Evaluation of Nanoemulsion of Repaglinide. *JSM Nanotechnology & Nanomedicine*, **1** (2), 1016.
- [12] Thilak Mudalige & et al. (2019). Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. *Nanomaterials for Food Applications*, United States, 313-353.
- [13] Nguyễn Mạnh Huy, Trần Thị Bích Hiền và Nguyễn Đăng Thoại (2021). Nghiên cứu bào chế hệ vi tự nhũ hóa chứa diclofenac. *Tạp chí Y- Dược học Quân sự*, (5).
- [14] Ismail Erper, Melike Cebi Kilicoglu, Muharrem Turkkan and Hasan Onder (2016). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from winter squash in the Black Sea region of Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, (146), 683-697.
- [15] Phạm Quốc Yên và Trần Quốc Tuấn (2022). Phối chế và phân tích tính chất của nhũ tương nano chứa hoạt chất trừ nấm Difenoconazole. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **1A**(59), 30.