



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0036653

(51)^{2020.01} A01N 59/00

(13) B

(21) 1-2020-06319

(22) 30/10/2020

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/05/2022 410

(73) Trường Đại học Vinh (VN)

182 Lê Duẩn, thành phố Vinh, tỉnh Nghệ An

(72) Lê Thế Tâm (VN); Trần Đại Lâm (VN); Lê Đăng Quang (VN); Nguyễn Hoa Du (VN); Hồ Đình Quang (VN); Phan Thị Hồng Tuyết (VN); Lê Thị Thu Hiệp (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NANO ĐỒNG HỮU CƠ KHÁNG NẤM

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) chuẩn bị hỗn dịch chứa dung dịch muối đồng vô cơ phân tán trong dung dịch chitosan; và b) phối trộn hỗn dịch thu được ở bước a) với dung dịch muối natri hữu cơ để thu được chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tạo ra phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nấm bảo vệ cây trồng, và thân thiện với môi trường, cụ thể là sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm trên cơ sở muối đồng hữu cơ với kích thước bé (kích thước nanomet) được bao bọc bằng polyme phân hủy sinh học và có hoạt tính sinh học để tăng khả năng kháng nấm gây bệnh hại cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trên thế giới, cùng với sự phát triển của ngành nông nghiệp, tình hình sâu, bệnh phá hoại mùa màng và các côn trùng gây bệnh cho người, gia súc ngày càng trở lên trầm trọng, gây tổn thất lớn về người và vật chất. Sử dụng các hóa chất phòng trừ dịch hại nhằm hạn chế các tổn thất trên là biện pháp không thể thiếu, đặc biệt vào những thời điểm dịch hại xảy ra. Nhu cầu các thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) trên thế giới hàng năm không ngừng tăng lên. Nếu như chỉ số tiêu thụ các sản phẩm BVTV năm 2012 là 49,9 tỷ USD thì năm 2017 đã tăng lên khoảng 67,5 tỷ USD và đến năm 2019 ước tính lên 81,13 tỷ USD. Thống kê cho thấy, trong những năm gần đây xu hướng sử dụng thuốc BVTV nguồn gốc hóa học của thế giới có xu hướng tăng chậm và dự đoán giảm nhanh trong các năm tới. Trong đó, Châu Mỹ có nhu cầu sử dụng thuốc BVTV hóa học giảm mạnh hơn hẳn so với các châu lục khác. Theo Gifap, trong 10 năm gần đây ở các nước châu Á như Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Thái Lan nhu cầu sử dụng thuốc BVTV tăng 200 - 300%, trong đó Trung Quốc tiêu thụ hàng năm 1,5-1,7 triệu tấn thuốc BVTV (2010).

Lạm dụng thuốc hóa học BVTV còn tác động xấu đến môi trường, hệ sinh thái và sức khỏe cộng đồng phá vỡ sự bền vững của phát triển nông nghiệp. Lạm dụng hóa chất BVTV làm tăng tính kháng thuốc, suy giảm hệ ký sinh - thiên địch để lại dư lượng độc trên nông sản, đất và nước, ảnh hưởng đến chất lượng môi trường, nhiễm độc người tiêu dùng nông sản. Trong giai đoạn 1996 - 2000, ở các nước phát triển vốn rất nghiêm ngặt về vệ sinh an toàn thực phẩm, vẫn có tình trạng tồn tại dư lượng hóa chất BVTV trên nông sản như: Hoa Kỳ có 4,8% mẫu trên mức cho phép,

cộng đồng châu Âu - EU là 1,4%, Úc là 0,9%. Hàn Quốc và Đài Loan là 0,8 - 1,3%. Do những hệ lụy và tác động xấu của việc lạm dụng thuốc BVTV tổng hợp hóa học cho nên ở các nước đã và đang chuyển hướng sang sử dụng các sản phẩm thuốc BVTV có nguồn gốc sinh học hoặc nano an toàn và hiệu quả.

Ở nước ta cũng như trên thế giới, thuốc trừ bệnh gốc đồng được sử dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp, thuốc có tác dụng tốt trong phòng trừ bệnh hại góp phần nâng cao năng suất cây trồng. Hiện nay, thuốc trừ bệnh gốc đồng gồm 4 nhóm chính: đồng oxyclorua (Copper Oxychloride), đồng hydroxit (Copper Hydroxide), đồng sulfat (Copper sulfate) và đồng xitrat (Copper citrate). Đây là các nhóm thuốc bảo vệ thực vật được đăng ký sử dụng trên nhiều loại cây trồng. Theo danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng ở Việt Nam năm 2015, thuốc trừ bệnh gốc đồng hiện có 27 công ty đăng ký 44 loại thuốc thương phẩm để phòng trừ sâu hại trên các loại cây trồng như lúa, cà phê, hồ tiêu, cà chua, khoai tây, bắp cải ... trong đó có 27 thuốc thương phẩm đơn chất (Champion 770 WP, Map – Jaho 77 WP, COC 85 WP, Heroga 6.4SL Vidoc 30 WP, Cuproxat 345 SC, Super cook 85WP...) và 18 thuốc thương phẩm của 16 dạng hỗn hợp giữa với các hoạt chất khác (Kasuran 47 WP, Vroxyl 58 WP, Zincopper 50 WP, Cuprimicin 500 81 WP...). Sau khi hấp thụ vào nấm hoặc vi khuẩn, các ion đồng sẽ liên kết với những nhóm hóa học khác nhau (imidazol, phosphat, sulfhydryls, hydroxyl) được xảy ra trong nhiều protein và phá vỡ chức năng của các protein và enzym này, dẫn đến tổn thương tế bào và rò rỉ màng. Do đó, phương thức hoạt động của đồng hydroxit (hoặc bất kỳ loại thuốc diệt nấm đồng nào khác) là sự biến tính không đặc hiệu (phá vỡ) của protein tế bào.

Tuy nhiên, các thuốc bảo vệ thực vật hoạt chất gốc đồng hiện nay hầu hết là các loại hợp chất vô cơ, thuộc nhóm độc II, một số thuốc nhóm này chậm phân huỷ trong môi trường; tương đối độc, và đặc biệt dễ bị rửa trôi sau khi phun nên liều lượng dùng thực tế rất lớn. Trong tương lai gần tiến tới nền nông nghiệp cao, nông nghiệp bền vững, Châu Âu và một số nước phát triển sẽ cấm các thuốc vô cơ gốc đồng và thay thế bằng các thuốc gốc đồng dạng hữu cơ. Ở Việt nam các chế phẩm BVTV dạng đồng hữu cơ trong việc phòng trừ một số bệnh trên cây ăn quả có múi như cam, vải, bưởi... là chưa có.

Hiện nay các nghiên cứu về dạng đồng hữu cơ chủ yếu là tìm các phương pháp tổng hợp được các phức chất của đồng với các phối tử axit hữu cơ, với dạng cấu trúc này sẽ có hoạt lực sinh học lớn hơn các ion đồng trong muối vô cơ. Các sáng chế đã công bố đều tập trung vào đưa ra phương pháp tạo ra hợp chất đồng hữu cơ với mục đích giảm thiểu tác động đến môi trường. Một số sáng chế có thể kể đến:

Ví dụ, các dạng hợp chất đồng hữu cơ đã được bộc lộ trong sáng chế EP2123161A3 về “Sản phẩm ứng dụng trong nông nghiệp dựa trên phức hợp đồng hữu cơ” và US3323987A về “Các chế phẩm diệt nấm có chứa đồng bis-valerianate” (xem tài liệu sáng chế 1 và 2). Các hợp chất đồng hữu cơ được mô tả trong các sáng chế này đều là phức chất chelat của đồng với các axit hữu cơ, hợp chất thu được theo sáng chế cho phép ngăn ngừa hoặc giảm thiểu sự tấn công của các bệnh nấm hoặc vi khuẩn khác nhau ở thực vật, hoạt động hiệu quả theo cách phòng ngừa và chữa bệnh với nồng độ đồng thấp hơn và do đó, với tác động môi trường thấp hơn. Ngoài ra, nó cũng kích hoạt và củng cố các cơ chế bảo vệ của thực vật, ngoài việc tăng sức sống và sự phát triển của chúng, do đó cung cấp các loại cây trồng lớn hơn với chất lượng cao hơn. Sáng chế US 2005/0159482A1 “Hoạt động sinh học của hợp chất đồng hữu cơ” đã đưa ra chế phẩm diệt nấm và diệt khuẩn trên cơ sở muối đồng hữu cơ dưới dạng phức chelat, các hợp chất này có công thức dạng $\text{Cu}^{2+}\cdot 2\text{R}$ với tỉ lệ 1:2 giữa các đồng và gốc hữu cơ, theo đó gốc này có dạng $\text{O}^{\text{t}}\text{-CO-CH(SH)-CH}_3$ (xem tài liệu sáng chế 3). Tuy nhiên, những sản phẩm thu được này có vấn đề là không làm giảm đáng kể lượng đồng áp dụng trên mỗi hecta so với loại đồng vô cơ đã được sử dụng lâu nay.

Gần đây, khoa học và công nghệ nano đã trở thành một lĩnh vực nghiên cứu hấp dẫn và nhận được sự quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học. Công nghệ nano kết hợp các nguyên lý sinh học với các phép tiếp cận hóa học và lí học đã tạo ra các hạt có kích thước nano có những chức năng nhất định. Việc ứng dụng công nghệ nano trong lĩnh vực nano nông nghiệp có nhiều ưu điểm nổi trội trên cả phương diện lý thuyết và thực tế. Hiệu quả của đồng nano đã được nghiên cứu trên một số loài cây trồng ở những thời kỳ sinh trưởng khác nhau và đã đem lại hiệu quả khác biệt, vượt trội hơn so với các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học truyền thống.

Theo nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Bích Ngọc và cộng sự (2018), khi đánh giá khả năng ức chế của nano bạc và nano đồng trên nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại cam và nấm *Phytophthora* sp. gây rụng quả cam. Nano bạc có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. đạt 100% ở nồng độ 10ppm và ức chế nấm *Phytophthora* sp. đạt hiệu quả 100% ở nồng độ 5ppm trong điều kiện *in vitro*. Nano đồng có khả năng ức chế nấm kém hơn nano bạc. Với nấm *Colletotrichum* sp., khả năng ức chế của nano đồng đạt 77,36% ở nồng độ 200ppm và ức chế nấm *Phytophthora* sp. đạt 100% ở nồng độ 100ppm trong điều kiện *in vitro*. Kết hợp nano bạc 20ppm và nano đồng 200ppm với 0,1 % Tween 20 cho hiệu quả ức chế nấm cao nhất đạt 84,27% với nấm *Colletotrichum* sp. và 64,01% với nấm *Phytophthora* sp. trong điều kiện *in vivo*.

Nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* gây bệnh bạc lá lúa của chế phẩm nano đồng-bạc/chitosan oligosacarit của các tác giả (Nguyễn Thu Thủy và Nguyễn Tiến Long, 2018) cho thấy: trong điều kiện *invitro*, nano đồng-bạc/chitosan oligosacarit ở nồng độ 50, 70 và 100ppm có hiệu lực ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* cao nhất sau nuôi cấy 2 ngày và 3 ngày với hiệu lực đạt 100%. Trong điều kiện nhà lưới, xử lý nano đồng-bạc/chitosan oligosacarit với nồng độ 70ppm và 100ppm ở thời điểm 1 ngày trước khi lây bệnh nhân tạo có tác dụng làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh bạc lá đáng kể. Ở điều kiện ngoài đồng ruộng sử dụng nano đồng-bạc/chitosan oligosacarit ở nồng độ 70ppm có khả năng hạn chế bệnh bạc lá phát triển tương đương với thuốc hoá học Kasumin 2L.

Nhóm tác giả Choudhary và cộng sự (2017) trong một nghiên cứu trên tạp chí *Scientific Reports*, 7, 9754 (2017) đã tổng hợp các hạt nano Cu-chitosan có khả năng tăng cường phản ứng phòng vệ chống lại bệnh đốm lá và sự phát triển của cây trồng ở ngô (*Zea mays* L.). Đây là một bước phát triển quan trọng trong nghiên cứu vật liệu nano nông nghiệp, các hạt nano Cu-chitosan phân hủy sinh học, tương thích tốt hơn với khả năng kiểm soát sinh học vì các hạt nano này “bắt chước” sự kích thích tự nhiên của hệ thống bảo vệ và chống oxy hóa thực vật để bảo vệ cây trồng (xem tài liệu sáng chế 4).

Nhóm tác giả Saharan và cộng sự (2015) trong một nghiên cứu đã tổng hợp và đánh giá hiệu quả kháng nấm gây bệnh cho cà chua (*Solanum lycopersicum* Mill) trên thí nghiệm in vitro của các hạt nano Cu-chitosan. Các hạt nano tổng hợp trong phòng thí nghiệm cho thấy tác dụng thúc đẩy tăng trưởng đáng kể đối với sự nảy mầm của hạt cà chua, chiều dài cây con. Ở nồng độ 0,12%, các hạt nano này có hiệu lực ức chế đến 73,5% sự phát triển của sợi nấm và 61,5 và 83,0% ức chế sự nảy mầm của bào tử ở *Alternaria solani* và *Fusarium oxysporum* (xem tài liệu sáng chế 5).

Như vậy, hiện nay ngoài sản phẩm gốc đồng vô cơ thì một số sản phẩm thuốc BVTV dạng nano cũng đã được sử dụng phổ biến như nano đồng, nano hỗn hợp bạc đồng. Tuy nhiên, dạng chế phẩm này vẫn là dạng vô cơ, với các hạt nano đồng tự do hoặc được bọc bằng polyme như chitosan. Mặc dù hoạt lực tăng lên đáng kể, nhưng nhà sản xuất vẫn đưa ra lời khuyên khi sử dụng cho mục đích phòng và đặc trị bệnh cho cây trồng nên kết hợp 2 loại nano bạc đồng dạng hợp kim nồng độ tổng số 500-1000ppm và nano đồng oxyclorea 10.000ppm. Điều đó cho thấy các sản phẩm nano bạc, nano đồng vô cơ hiện nay vẫn chưa đạt được mục đích như mong muốn. Trong khi đó các nghiên cứu về dạng nano của các hợp chất muối đồng hữu cơ cho các ứng dụng trong nông nghiệp còn rất mới mẻ, và chưa có các thử nghiệm đánh giá tác dụng của chúng đối với cây trồng và nấm gây hại cây trồng. Do đó, có nhu cầu cao về một phương pháp công nghệ tạo ra một chế phẩm mới trên cơ sở nano của các muối đồng hữu cơ để phòng trừ bệnh, nhờ đó giúp người nông dân giảm đi việc sử dụng thuốc BVTV trong quá trình chăm sóc cây.

Tài liệu tình trạng kỹ thuật

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: EP2123161A3 về “Sản phẩm ứng dụng trong nông nghiệp dựa trên phức hợp đồng hữu cơ”

Tài liệu sáng chế 2: US3323987A về “Các chế phẩm diệt nấm có chứa đồng bis-valerianate”

Tài liệu sáng chế 3: US 2005/0159482A1 “Hoạt động sinh học của hợp chất đồng hữu cơ”

Tài liệu số 4: Choudhary và cộng sự về “Hạt nano Cu-chitosan tăng cường phản ứng phòng vệ và tăng trưởng thực vật ở ngô (*Zea mays* L.)” (Sci. Rep. 7, 2017, 9754)

Tài liệu sáng chế 5: Saharan và cộng sự về “Tổng hợp và hiệu quả kháng nấm in vitro của hạt nano Cu-chitosan chống lại nấm gây bệnh trên cà chua” (Int J Biol Macromol. 2015, 75:346-53).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Thông thường, các thành phần hoạt tính trong thuốc trừ sâu hòa tan kém trong nước, khiến việc sử dụng chúng trở nên khó khăn, lượng sử dụng thực tế lớn hơn nhiều so với nhu cầu cần thiết. Vật liệu nano có thể làm tăng khả năng hòa tan trong nước của các hoạt chất như các chất đi kèm. Bằng cách này, việc giải phóng và phân phối có thể được kiểm soát tốt hơn và hoạt chất có thể được bảo vệ tốt hơn chống lại sự phân hủy quá nhanh của thuốc, hiệu quả không được kéo dài. Điều này không chỉ cải thiện sự hấp thu và hiệu quả của tác nhân kiểm soát dịch hại, nó còn làm giảm đáng kể lượng thuốc trừ sâu được sử dụng. Hơn nữa, các hoạt chất và sản phẩm thay thế được tạo ra là ít gây hại cho môi trường và có thể làm giảm sự phát triển của tính kháng sâu bệnh đối với thuốc trừ sâu.

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu tìm ra phương pháp sản xuất chế phẩm dung dịch nano đồng hữu cơ kháng nấm, phân tán trong nước để có thể ứng dụng trong lĩnh vực nông nghiệp. Cụ thể, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp tạo ra một loại chế phẩm mới, bằng cách tổng hợp các muối đồng hữu cơ và sử dụng một số cấu trúc polyme thiên nhiên có khả năng phân hủy sinh học tốt và có hoạt tính sinh học (trong sáng chế này là chitosan) làm chất bao bọc các hoạt chất muối đồng hữu cơ, nhằm mục đích hướng tới sản phẩm ứng dụng trong nông nghiệp công nghệ cao nhưng thân thiện với môi trường.

Một trong những khác biệt lớn của phương pháp này là không cần đòi hỏi các thiết bị đắt tiền và việc chuẩn bị hóa chất quá phức tạp. Cụ thể, trong nội dung của sáng chế này, chúng tôi sử dụng phản ứng trao đổi từ muối của axit hữu cơ béo với muối đồng vô cơ phân tán trong dung dịch chitosan qua quá trình tạo phức với các nhóm $-NH_2$ và $-OH$ của chitosan, kết hợp với quá trình bọc *in-situ* (bọc ngay trong quá trình hình thành hạt ở kích thước nanomet). Chất polyme thiên nhiên chitosan

được sử dụng làm chất ổn định, đồng thời là chất mang, chất để bọc các hạt nano đồng hữu cơ ngay trong quá trình tạo hạt. Đây là điểm mới của phương pháp sản xuất sản phẩm của sáng chế so với các nghiên cứu trước đây về tổng hợp và bọc hạt nano nói chung (phương pháp bọc *ex-situ*). Nhược điểm của phương pháp bọc hạt nano hiện nay (phương pháp bọc *ex-situ*), các hạt nano sau khi được chế tạo, các hạt này sau đó mới được bọc bằng các polyme như chitosan, poly etylenglycol, natri alginat... Theo phương pháp này, do không được vi bọc ngay trong quá trình hình thành tinh thể nano nên các hạt dễ bị kết đám, dẫn đến kích thước lớn do đó các hạt có độ đơn phân tán thấp, độ tan trong nước kém.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm, bao gồm các công đoạn sau:

a) chuẩn bị hỗn dịch chứa dung dịch muối đồng vô cơ phân tán trong dung dịch chitosan bằng cách

(i) định lượng các thành phần: muối đồng vô cơ, chitosan, axit axetic, nước cất,

(ii) hòa tan muối đồng vô cơ trong nước với tỉ lệ 1/200 (khối lượng gam/thể tích ml) (trong đó với phần trăm khối lượng của nguyên tố Cu trong sản phẩm khô ban đầu thu được tính theo lý thuyết là 25,6%), khuấy đều thu được dung dịch A,

(iii) hòa tan chitosan trong dung dịch axit axetic 0,2% theo tỉ lệ 1/250 (khối lượng gam/thể tích ml), khuấy đều thu được dung dịch B,

(iv) nạp dung dịch A vào bình cầu,

(v) nạp từ từ dung dịch B vào bình cầu theo tỉ lệ 2/1 (thể tích dung dịch A/thể tích dung dịch B), khuấy đều trong thời gian 2 giờ quy định thu được hỗn dịch chứa dung dịch muối đồng vô cơ phân tán trong dung dịch chitosan (hỗn dịch C).

Theo một phương án của sáng chế, các muối đồng vô cơ được sử dụng là đồng sulfat (CuSO_4), đồng clorua (CuCl_2), đồng nitrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$).

b) phối trộn hỗn dịch C với dung dịch muối natri hữu cơ để thu được chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm bằng cách

(i) hòa tan muối natri hữu cơ trong nước theo tỉ lệ 1/37 (khối lượng gam/thể tích ml), khuấy đều trong thời gian 1 giờ thu được dung dịch muối natri hữu cơ,

(ii) nạp từ từ dung dịch muối natri hữu cơ vào bình cầu chứa hỗn dịch C thu được ở bước a) ở trên theo tỉ lệ 1/3 về thể tích (thể tích dung dịch muối natri hữu cơ/thể tích hỗn dịch D), khuấy liên tục bình cầu trong 5 giờ và duy trì ở nhiệt độ 40 đến 50°C, sau đó để qua đêm và tiến hành ly tâm để lọc tách thu được chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm .

Theo một phương án của sáng chế, các muối hữu cơ được dùng để tạo muối đồng hữu cơ là natri oleat, natri xitrat, natri tartrat, natri stearat, natri palmitat.

Theo một phương án của sáng chế, thời gian khuấy hỗn hợp hỗn dịch D và dung dịch C với nhau nằm trong khoảng 4 đến 6 giờ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm nano đồng hữu cơ thu được từ phương pháp sản xuất trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu và ưu điểm của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn qua phần mô tả chi tiết các phương án làm ví dụ cùng với hình vẽ kèm theo, trong đó:

Hình 1 là sơ đồ khối phương pháp sản xuất dung dịch nano đồng hữu cơ bằng phương pháp của sáng chế.

Hình 2 là ảnh phổ hồng ngoại (FTIR) của polyme chitosan, đồng hữu cơ và nano đồng hữu cơ bọc chitosan chế tạo bằng phương pháp của sáng chế

Hình 3 là ảnh phổ UV-Vis của dung dịch nano đồng hữu cơ.

Hình 4 là ảnh sự phân bố kích thước (a) và (b) thế zeta của dung dịch nano đồng hữu cơ chế tạo bằng phương pháp của sáng chế.

Hình 5 là ảnh được xác định bằng phương pháp kính hiển vi điện tử truyền qua TEM (Transmission Electron Microscopy) của dung dịch nano đồng hữu cơ chế tạo bằng phương pháp của sáng chế.

Hình 6 là ảnh được xác định bằng phương pháp phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX: Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) của dung dịch nano đồng hữu cơ chế tạo bằng phương pháp của sáng chế.

Hình 7 là ảnh thể hiện khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum gloeosporidises* (C-G) của mẫu chế phẩm đồng hữu cơ (đồng oleat – M1) và chế phẩm dung dịch

nano đồng hữu cơ (nano đồng oleat bọc chitosan – M2) sau 3 ngày (a) và sau 5 ngày (b) chế tạo bằng phương pháp của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết theo từng bước thực hiện và cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó các phương án làm ví dụ của sáng chế được thể hiện.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm, bao gồm các bước mô tả dưới đây.

(i) Trước tiên, tạo các dung dịch muối đồng, dung dịch muối oleat và dung dịch chitosan bằng cách hòa tan muối đồng vô cơ trong nước cất theo tỉ lệ 1/200 (khối lượng gam/thể tích ml) (trong đó với phần trăm khối lượng của nguyên tố Cu trong sản phẩm khô ban đầu thu được tính theo lý thuyết là 25,6%), natri oleat trong nước cất theo tỉ lệ 1/37 (khối lượng gam/thể tích ml), và chitosan trong dung dịch axit axetic 0,2% theo tỉ lệ 1/250 (khối lượng gam/thể tích ml), khuấy đều trong 30 phút, 60 phút và 5 giờ tương ứng đến khi thu được các dung dịch đồng nhất.

(ii) Nạp từ từ dung dịch chitosan vào dung dịch muối đồng vô cơ với tỉ lệ 2/1 về thể tích, khuấy đều trong 2 giờ thu được hỗn dịch A. Sau đó nạp từ từ dung dịch muối natri oleat vào hỗn dịch A theo tỉ lệ 1/3 về thể tích, khuấy đều trong 5 giờ và duy trì ở nhiệt độ 40°C đến 50°C thu được hỗn hợp dạng dung dịch. Dung dịch được để qua đêm, sau đó tiến hành lọc dung dịch để loại bỏ các tạp chất kích thước lớn thu được sản phẩm dạng lỏng, màu xanh ngọc là chế phẩm kháng nấm, trong đó Cu với hàm lượng nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 % trọng lượng, các hạt nano đồng hữu cơ có cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ 50 đến 60nm được bọc bởi một lớp polyme có chiều dày nằm trong khoảng từ 10 đến 12nm.

Chế phẩm nano đồng hữu cơ bọc polyme chitosan thu được từ phương pháp sản xuất theo sáng chế ở dạng lỏng màu xanh ngọc, có Cu với hàm lượng nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0% trọng lượng, trong đó hạt nano có cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ 50nm đến 60nm, được bọc bởi một lớp polyme có chiều dày nằm trong khoảng từ 10 đến 12nm.

Sau đây, tác giả sáng chế sẽ chứng minh sự tạo ra dung dịch nano đồng hữu

cơ dựa trên các kết quả thu được từ các phép phân tích vật lý, hóa học hiện đại. Cũng cần hiểu rằng, các giải thích này chỉ nhằm làm rõ cho bản chất của sáng chế, nó không được dùng để giới hạn phạm vi bảo hộ, và cũng không phải là giải thích đầy đủ cho toàn bộ các quá trình phản ứng diễn ra.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành đo phổ hấp thụ hồng ngoại của sản phẩm nano đồng hữu cơ bọc chitosan được trình bày trong hình 2. Kết quả cho thấy, phổ hồng ngoại có các dải hấp thụ đặc trưng của dao động hóa trị của nhóm $-OH$ ở 3415cm^{-1} , nhóm ete $-O-$ ở 1086cm^{-1} , dao động hóa trị $C=O$ ở 1712cm^{-1} của nhóm axetyl của chitosan, các dải ở 1605 và 1414cm^{-1} được quy gán cho dao động hóa trị bất đối xứng và đối xứng của nhóm carboxylate (COO^-) trong oleat. So với phổ của natri oleat các dải này ở 1559 và 1424cm^{-1} , đã có sự dịch chuyển rõ rệt, giá trị $\Delta\nu_{COO}$ tăng thêm 56cm^{-1} , từ 135cm^{-1} lên 191cm^{-1} , chứng tỏ có tương tác của nhóm oleat với ion Cu^{2+} . Sự xuất hiện của các dải hấp thụ trong vùng $2800-3000\text{cm}^{-1}$ do các dao động hóa trị không đối xứng ν_{as} và đối xứng ν_s của các nhóm methyl (CH_3) và metylen (CH_2) của phần gốc hydro cacbon. Dải hấp thụ của dao động biến dạng nhóm $-NH_2$ của chitosan xuất hiện ở 1599cm^{-1} đã dịch chuyển xuống 1553cm^{-1} trong sản phẩm, chứng tỏ có tương tác của chitosan với đồng oleat.

Những số liệu phổ IR nêu trên chứng tỏ sản phẩm đồng oleat đã được tạo thành và bọc bởi chitosan bằng phương pháp *in-situ*. Điều kết luận này cũng được làm rõ qua phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Từ hình 3 cho thấy đỉnh hấp thụ cực đại đã có sự dịch chuyển từ bước sóng 810nm đối với dung dịch muối đồng vô cơ về 670nm đối với dung dịch nano đồng oleat, tương ứng với sự dịch chuyển màu xanh lam về dung dịch màu xanh ngọc do sự tương tác của nhóm oleat với ion Cu^{2+} .

Kết quả phân tích DLS cho 1 đỉnh duy nhất (tương ứng với kích thước cỡ hạt 130nm) như được thể hiện ở hình 4a, hoàn toàn không có sự kết khối, tạo ra các tập hợp hạt ở vùng kích thước cỡ hạt chủ yếu tập trung trong khoảng 90 đến 200nm . Điều này khẳng định các tiểu phân nano phân tán đồng đều.

Trong hệ sản phẩm dạng lỏng, thế zeta thường được sử dụng như là một ngưỡng để đánh giá cho sự ổn định. Sự phụ thuộc độ ổn định của hệ keo vào giá trị thế zeta được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1: Sự phụ thuộc độ ổn định của hệ keo vào giá trị thế Zeta

Thế zeta (mV)	Độ ổn định của hệ keo
0 - ± 5	Kết tụ hay tập hợp thành từng đám rất nhanh
± 10 - ± 30	Bắt đầu không ổn định
± 30 - ± 40	Độ ổn định trung bình
± 40 - $60\pm$	Độ ổn định rất tốt
≥ 61	Độ ổn định rất cao

Thế zeta thể hiện mức độ đẩy giữa các hạt tích điện cùng dấu gần nhau trong hệ phân tán. Đối với các phân tử và các hạt đủ nhỏ, thế zeta cao (âm hoặc dương) sẽ cho độ ổn định cao, hệ phân tán sẽ chống lại sự keo tụ, kết đám. Thế zeta đo được của mẫu đạt $-61,7\text{mV}$ (hình 4b). Như vậy, với kết quả đo được thì thế zeta đạt được là khá tối ưu và khẳng định tính bền vững và ổn định của hệ dung dịch nano.

Dung dịch nano đồng hữu cơ này được đem đi phân tích để xác định cỡ hạt của các hạt nano. Hình 5 là ảnh hình thái vi cấu trúc TEM của dung dịch nano đồng hữu cơ được chụp trên máy kính hiển vi điện tử truyền qua Jeol 2100 ở các độ phóng đại 10.000 lần, 30.000 lần, 50.000 lần và 200.000 lần tương ứng. Kết quả hình 5 cho thấy rằng các hạt nano đồng hữu cơ được chế tạo bởi phương pháp này có kích thước đồng nhất, dạng hình cầu và có kích thước trung bình nằm trong khoảng từ 50 đến 60nm. Hình 5d là ảnh TEM của mẫu nano đồng hữu cơ với độ phóng đại 200.000 lần ở thang đo 20nm cho thấy mẫu với số ít các hạt riêng rẽ có kích thước bé, tương ứng 10 đến 17nm. Kết quả kích thước thu được từ ảnh TEM nhỏ hơn so với kết quả thu được từ kết quả phân tích DLS là hoàn toàn phù hợp, vì kết quả phân tích DLS (phương pháp tán xạ ánh sáng động) là kích thước động, thu được từ một tập hợp hạt rất lớn, trong khi ảnh TEM chỉ quan sát một vùng nhỏ, số lượng hạt được quan sát bé, kích thước thu được là kích thước tĩnh. Mặt khác kích thước hạt của các mẫu bọc đo trong môi trường chất lỏng (đo DLS) có kích thước lớn hơn khi chụp ảnh TEM, có thể được giải thích do khi đo hạt trong môi trường chất lỏng, các polyme ưu nước sẽ tương tác với nước và làm cho các hạt có kích thước lớn hơn.

Thành phần các nguyên tố được xác định bằng phương pháp phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) (hình 6). Kết quả cho thấy trong chế phẩm kháng nấm nano đồng

hữu cơ có hàm lượng Cu chiếm 5,68% về trọng lượng, C với hàm lượng 70,96%, O với hàm lượng 13,32%, N với hàm lượng 7,69%.

Hệ chế phẩm nano kháng nấm gây bệnh cây trồng theo sáng chế được chế tạo từ những vật liệu thực sự thân thiện với môi trường. Thành phần hữu cơ là các loại polyme thiên nhiên được chiết tách từ các phế phụ phẩm trong nông nghiệp hay công nghiệp thực phẩm như chitosan hay alginat. Các polyme này đều có khả năng phân hủy sinh học, ngoài ra còn có một số hoạt tính sinh học đáng quan tâm như kháng khuẩn, kháng nấm v.v. góp phần giảm thiểu sâu và nấm gây bệnh trên cây trồng.

Chế phẩm nano đồng hữu cơ thu được theo phương pháp sản xuất từ sáng chế có thể mở rộng để sản xuất ra chế phẩm nano đồng hữu cơ dạng bột bằng phương pháp sấy đông khô, qua đó có thể tăng thêm thời gian bảo quản và sử dụng của chế phẩm.

Ngoài ra, chế phẩm nano đồng hữu cơ tạo ra từ sáng chế có thể mở rộng kết hợp với một số hoạt chất kháng nấm, kháng khuẩn gây hại cây trồng khác như nano Ag, hoặc nano chitosan sẽ giúp tăng hiệu quả trị bệnh và tính chống chịu cho cây. Đây là điểm độc đáo trong sản phẩm của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được minh họa rõ hơn qua các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này không dùng làm giới hạn mục đích và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Phương pháp sản xuất chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm quy mô pilot 5 lít/mẻ

Chuẩn bị các nguyên liệu bao gồm: CuSO_4 : 6,25g; natri oleat: 33,6g; chitosan 12,5g; axit axetic 7,5ml.

Hòa tan 6,25g CuSO_4 trong 1,25 lít nước cất, khuấy đều trong 30 phút đến khi thu được dung dịch đồng nhất A.

Hòa tan 25g chitosan trong 2,5 lít nước cất (có bổ sung 7,5ml axit axetic), khuấy đều trong 5 giờ cho đến khi được dung dịch đồng nhất B. Hòa tan 33,6g natri oleat trong 1,25 lít nước cất, khuấy đều trong 1 giờ đến khi thu được dung dịch đồng nhất C.

Tiếp đó, nạp từ từ 2,5 lít dung dịch chitosan vào dung dịch A trên, khuấy đều

trong 2 giờ cho đến khi thu được hỗn dịch đồng nhất D. Sau đó nạp từ từ 1,25 lít dung dịch muối natri oleat vào hỗn dịch D, khuấy đều trong 5 giờ và duy trì ở nhiệt độ 40°C đến 50°C thu được dung dịch E. Dung dịch E được để qua đêm, sau đó tiến hành lọc dung dịch để loại bỏ các tạp chất kích thước lớn thu được sản phẩm dạng lỏng, màu xanh ngọc là chế phẩm kháng nấm, trong đó Cu với hàm lượng nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 % trọng lượng, các hạt nano đồng hữu cơ có cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ 50 đến 60nm được bọc bởi một lớp polyme có chiều dày nằm trong khoảng từ 10 đến 12nm.

Chế phẩm nano đồng oleat bọc chitosan thu được theo sáng chế có Cu với hàm lượng 5,68% về trọng lượng, C với hàm lượng 70,96%, O với hàm lượng 13,32%, N với hàm lượng 7,69%, ở dạng lỏng màu xanh ngọc, trong đó các hạt nano đồng oleat bọc chitosan có cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ 50nm đến 60nm, lớp vỏ bọc có chiều dày từ 10 đến 12nm.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về hoạt tính kháng nấm gây bệnh thán thư trên Cam của chế phẩm nano đồng oleat bọc chitosan

Phương pháp kiểm tra khả năng ức chế mycelia của nấm (food-poisoned technique) được sử dụng trong nghiên cứu với giống nấm *Colletotrichum gloeosporoides* (C-G) được biết tới là tác nhân chính gây bệnh thán thư trên Cam, gây hiện tượng thối khô cuống trái cam và gây rụng trái. Hoạt tính kháng nấm được thử trên các đĩa thạch petri với môi trường khoai tây (PDA- Potato Dextrose Agar) tại pH: 6,8-7,0.

Nấm được phân lập và làm thuần, dùng dụng cụ đục lỗ có đường kính 4mm tiến hành đục vành ngoài đường kính tán nấm sau đó đặt lên môi trường PDA đã trộn với mẫu thử (cao hoặc hợp chất cần thử). Trong nghiên cứu này chúng tôi thử nghiệm trên mẫu muối đồng hữu cơ oleat (với hàm lượng Cu khoảng 15,42% về trọng lượng) và mẫu nano đồng hữu cơ oleat bọc chitosan (với hàm lượng đồng khoảng 5,68% về trọng lượng) tạo ra theo phương pháp từ sáng chế. Mẫu thử đồng oleat (M1) và mẫu thử nano đồng oleat bọc chitosan (M2) được hòa tan bằng Tween 80 với nồng độ 0,05% và Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 2% ở nồng độ 500ppm (tương ứng với hàm lượng Cu là 77ppm đối với mẫu M1 và 28ppm đối với mẫu M2)

và 1000ppm (tương ứng với hàm lượng Cu là 154ppm đối với mẫu M1 và 56ppm đối với mẫu M2), sau đó trộn vào môi trường PDA nóng chảy ở 50°C, đã khử trùng và để nguội. Mỗi nồng độ khác nhau sẽ được thử lặp lại 3 lần trên môi trường PDA. Theo dõi sự phát triển của nấm sau 1, 3 và 5 ngày và tính hiệu lực tương ứng. Đo đường kính tản nấm sau 3, 5 ngày và tính hiệu quả ức chế theo công thức:

$$\text{Hiệu quả ức chế} = \frac{\text{ĐK}_{\text{đối chứng}} - \text{ĐK}_{\text{của cao}}}{(\text{ĐK}_{\text{đối chứng}} - 4)} \cdot 100\%$$

Bảng 2: Hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum gloeosporoides* (C-G) của mẫu M1 và M2 sau 3 và 5 ngày nuôi cấy

Mẫu kiểm tra	Nồng độ (ppm)	3 ngày		5 ngày	
		ĐKTN ^a	HQƯC ^b	ĐKTN	HQƯC
Đồng oleat (M1)	500	15,1	46,1	24,7	43,1
	1000	12,1	70,4	18,0	60,7
Nano đồng bọc chitosan (M2)	500	12,4	59,2	22,4	51,5
	1000	9,0	75,7	15,0	71
ĐC ^c		24,6		41,9	

^aĐKTN: đường kính tản nấm (mm). ^bHQƯC: hiệu quả ức chế (%). ^cĐC: mẫu đối chứng âm

Bảng kết quả trên cho thấy mẫu đồng oleat (M1) và nano đồng bọc chitosan (M2) có hiệu quả ức chế nấm *Colletotrichum orbiculare* (>40%) ở cả hai nồng độ thử nghiệm là 500 và 1000ppm (bảng 2). Trong đó, đồng oleat ở nồng độ 500ppm cho thấy khả năng ức chế 46,1% sự phát triển của nấm *C. orbiculare* sau 3 ngày thí nghiệm và 43,1% sau 5 ngày thí nghiệm (hình 7). Tại nồng độ 1000ppm, đồng oleat có hiệu quả kháng nấm *C. orbiculare* đạt 70,4% và 60,7% tương ứng với ngày thí nghiệm thứ 3 và thứ 5. Mẫu nano đồng bọc chitosan cho thấy hiệu quả kháng nấm *C. orbiculare* tốt hơn đáng kể ở cùng nồng độ với mẫu đồng oleat. Nano đồng ở nồng độ 500ppm cho thấy hiệu quả kháng đến 59,4% nấm *C. orbiculare* ở ngày thí nghiệm thứ 3 và sau 5 ngày thí nghiệm hiệu quả kháng nấm vẫn đạt 51,5%. Với nồng độ 1000ppm, nano đồng bọc chitosan có hiệu quả ức chế đạt 75,7% ở ngày thứ 3 và vẫn đạt trên 70% ở ngày thứ 5 (hình 7). Từ các kết quả thu được, với nồng độ

hoạt chất Cu khoảng 50 ppm đã cho hiệu lực ức chế trên 70%, điều đó cho thấy khả năng kháng nấm tốt của chế phẩm thu được theo phương pháp từ sáng chế.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hiện nay, nhu cầu sử dụng thuốc BVTV tăng cao và đa dạng hoạt chất do nguồn gốc gây bệnh ngày càng phát triển thành nhiều chủng loại. Hầu hết các loại thuốc BVTV đang sử dụng hiện nay có nguồn gốc hoá học, độc hại cho môi trường, thiên nhiên và con người, trong khi, các thuốc BVTV có nguồn gốc sinh học bảo quản phức tạp, hoạt lực không cao trong điều kiện bất lợi về thời tiết. Mặt khác, hiện nay trên thị trường, đa số các thuốc BVTV gốc đồng đều ở dạng vô cơ, dễ tan trong nước và phân ly thành ion đồng, tồn dư rất lớn trong đất và cây trồng. Nông dân trồng cam và chè đang rất mong đợi một sản phẩm thân thiện với môi trường, không độc hại như các sản phẩm có xuất xứ Trung Quốc được bán cho người dân, đồng thời có hiệu quả phòng trị bệnh tương tự. Chế phẩm phức hợp nano đồng hữu cơ là sản phẩm an toàn, không độc hại, thân thiện môi trường và có triển vọng lớn trong sản xuất nông nghiệp sạch, nông nghiệp hữu cơ. Chế phẩm này có khả năng phòng và trị bệnh thán thư trên cây trồng, là bệnh gây thiệt hại lớn cho bà con nông dân. Với giá cả hợp lý và chất lượng phòng trừ bệnh tốt, sản phẩm sẽ được bà con nông dân đón nhận, có sức sống và lan tỏa sang các huyện, tỉnh khác.

Chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm thu được theo phương pháp sản xuất từ sáng chế có thể mở rộng để sản xuất ra chế phẩm kháng nấm dạng bột bằng phương pháp sấy đông khô, qua đó có thể tăng thêm thời gian bảo quản và sử dụng của chế phẩm.

Ngoài ra, chế phẩm nano đồng hữu cơ tạo ra từ sáng chế có thể mở rộng kết hợp với một số hoạt chất khác như nano Ag, hoặc nano chitosan sẽ giúp tăng hiệu quả trị bệnh và tính chống chịu cho cây. Đây là điểm độc đáo trong sản phẩm của sáng chế.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sản phẩm của sáng chế là các phương pháp công nghệ phù hợp với điều kiện tại Việt Nam, sản phẩm dự kiến sẽ được thử nghiệm, ứng dụng và phân phối trực tiếp tới người sử dụng thông qua đơn vị tư vấn và kinh doanh: Trung tâm Ứng dụng

tiền bộ Khoa học và Kỹ thuật Nghệ An.

Sản phẩm của sáng chế sẽ tiếp tục được thử nghiệm và ứng dụng làm thuốc BVTV trừ bệnh thán thư gây hại cây Cam, Chè trên địa bàn các huyện Thanh Chương, Quỳnh Hợp tại Nghệ An. Ngoài ra có thể nhân rộng thử nghiệm ra các tỉnh lân cận hoặc áp dụng cho các vùng chuyên canh rau, cây trồng (có bệnh thán thư) theo tiêu chuẩn Việt GAP, sản xuất rau hữu cơ. Ngoài ra, có thể sử dụng đối với các vùng trồng dược liệu sạch hoặc hoa lan, hoa cây cảnh cao cấp. Sản phẩm của sáng chế dự kiến sẽ được thương mại hóa thông qua Trung tâm Ứng dụng tiến bộ Khoa học và Kỹ thuật Nghệ An.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị hỗn dịch chứa dung dịch muối đồng vô cơ phân tán trong dung dịch chitosan bằng cách

(i) định lượng các thành phần: muối đồng vô cơ, chitosan, axit axetic, nước cất,

(ii) hòa tan muối đồng vô cơ trong nước với tỉ lệ 1/200 (khối lượng gam/thể tích ml) (trong đó với phần trăm khối lượng của nguyên tố Cu trong sản phẩm khô ban đầu thu được tính theo lý thuyết là 25,6%), khuấy đều thu được dung dịch A,

(iii) hòa tan chitosan trong dung dịch axit axetic 0,2% theo tỉ lệ 1/250 (khối lượng gam/thể tích ml), khuấy đều thu được dung dịch B,

(iv) nạp dung dịch A vào bình cầu,

(v) nạp từ từ dung dịch B vào bình cầu theo tỉ lệ 2/1 (thể tích dung dịch A/thể tích dung dịch B), khuấy đều trong thời gian 2 giờ quy định thu được hỗn dịch chứa dung dịch muối đồng vô cơ phân tán trong dung dịch chitosan (hỗn dịch C); và

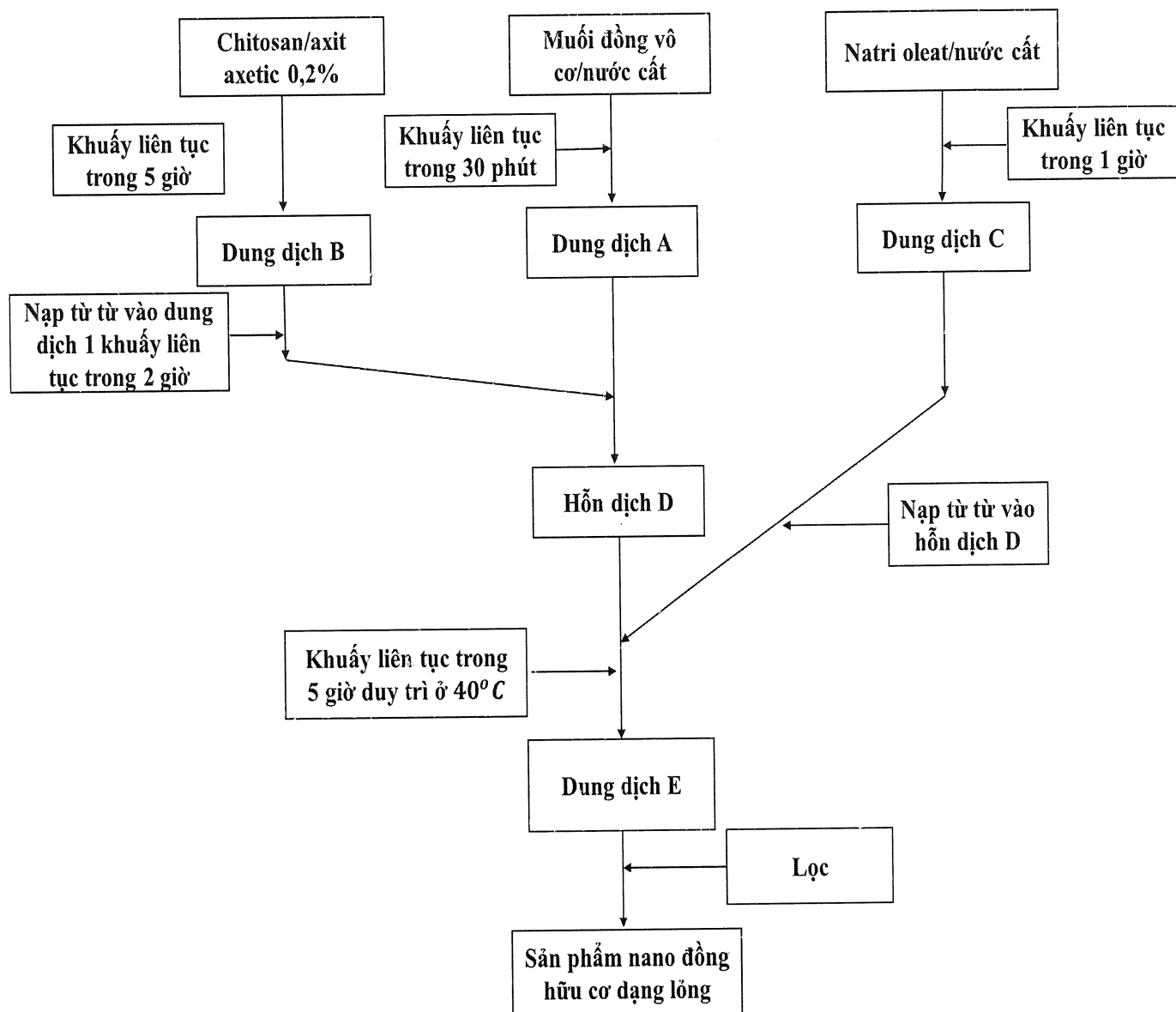
b) phối trộn hỗn dịch C với dung dịch muối natri hữu cơ để thu được chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm bằng cách

(i) hòa tan muối natri hữu cơ trong nước theo tỉ lệ 1/37 (khối lượng gam/thể tích ml), khuấy đều trong thời gian 1 giờ thu được dung dịch muối natri hữu cơ,

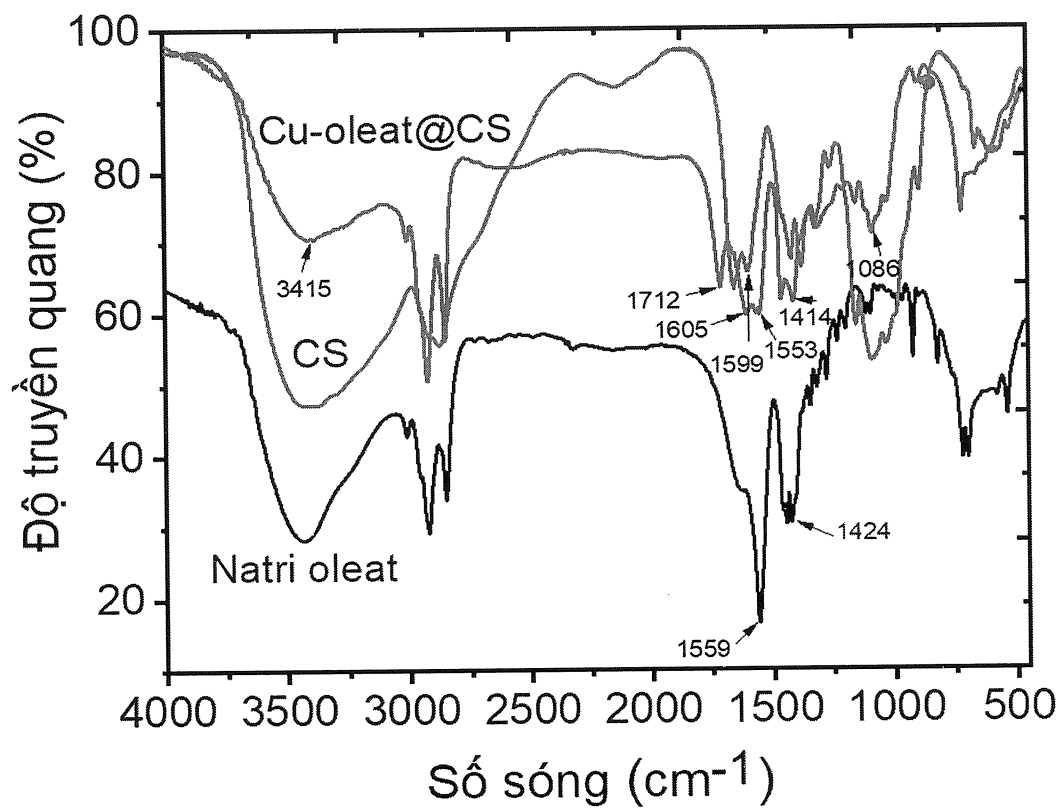
(ii) nạp từ từ dung dịch muối natri hữu cơ vào bình cầu chứa hỗn dịch C thu được ở bước a) ở trên theo tỉ lệ 1/3 về thể tích (thể tích dung dịch muối natri hữu cơ/thể tích hỗn dịch D), khuấy liên tục bình cầu trong 5 giờ và duy trì ở nhiệt độ 40 đến 50°C, sau đó để qua đêm và tiến hành ly tâm để lọc tách thu được chế phẩm nano đồng hữu cơ kháng nấm.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các muối đồng vô cơ được sử dụng là đồng sulfat (CuSO_4), đồng clorua (CuCl_2), đồng nitrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$).

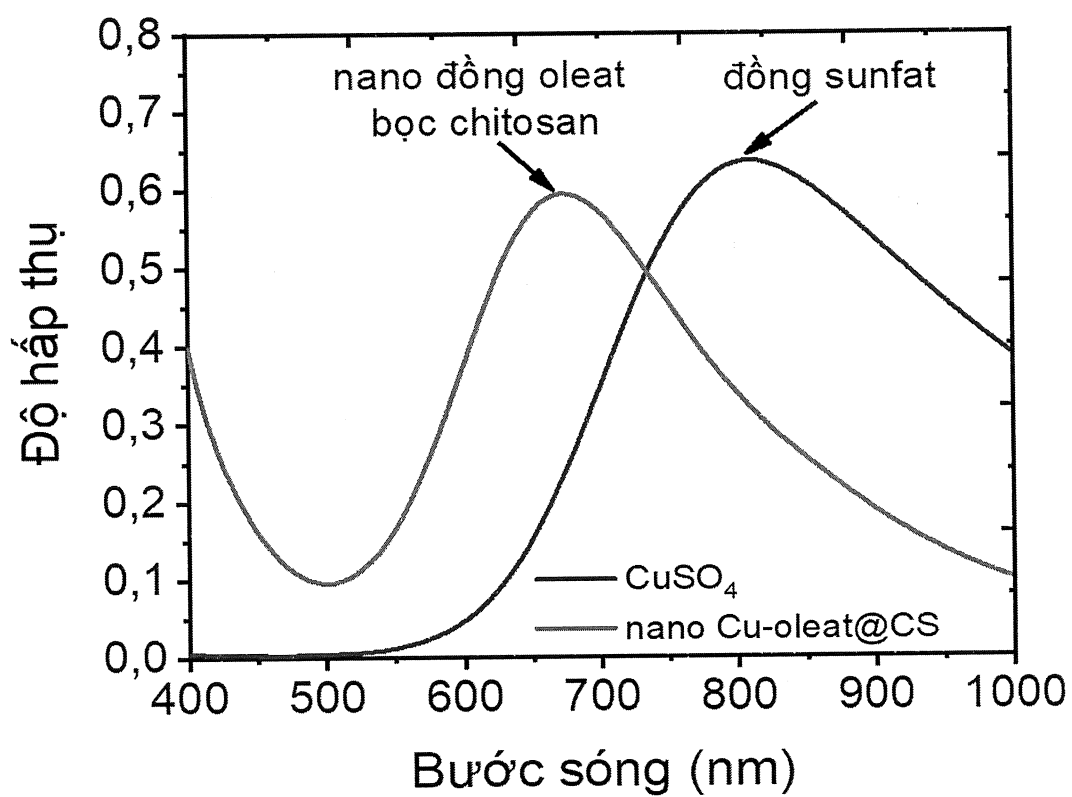
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các muối natri hữu cơ được dùng để tạo muối đồng hữu cơ là natri oleat, natri xitrat, natri tartrat, natri stearat, natri palmitat.



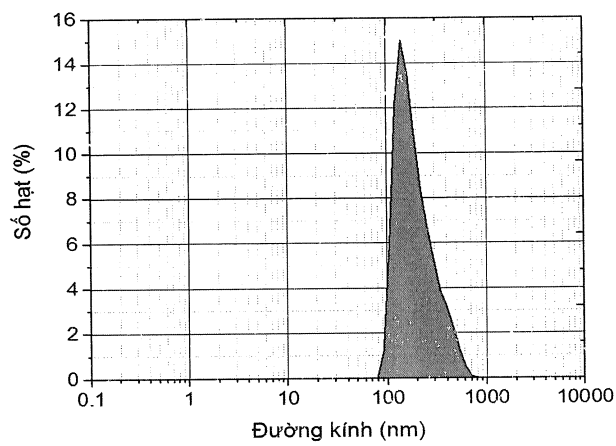
Hình 1



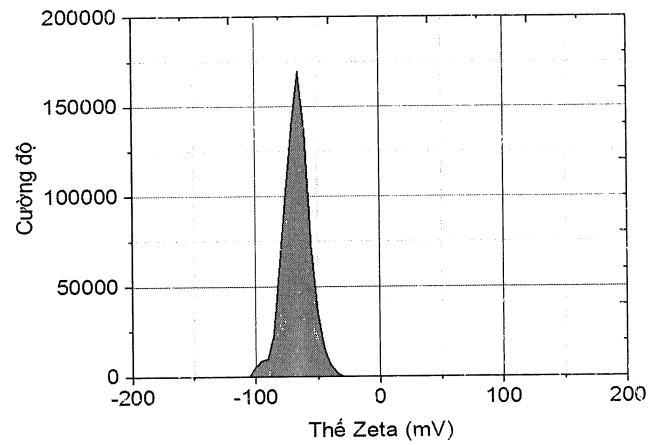
Hình 2



Hình 3

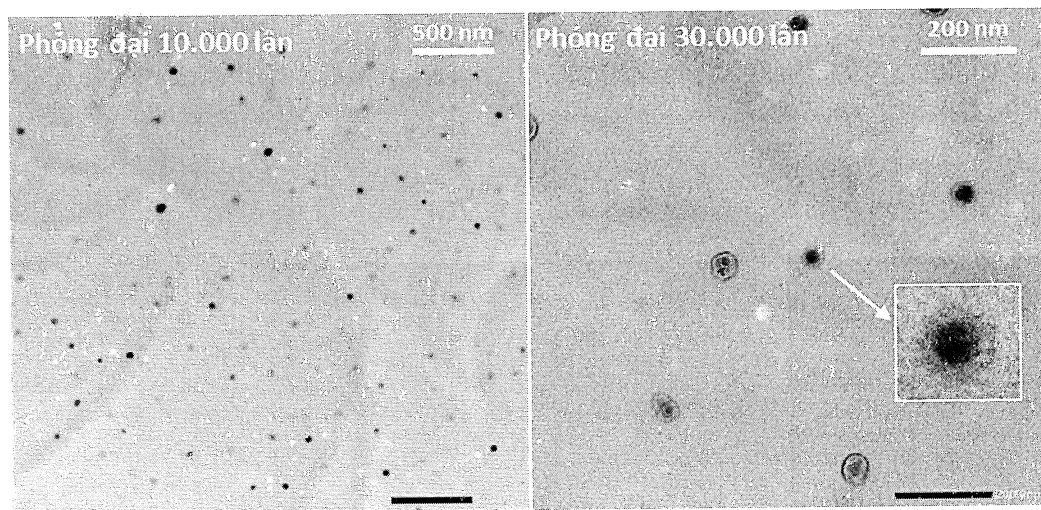


(a)



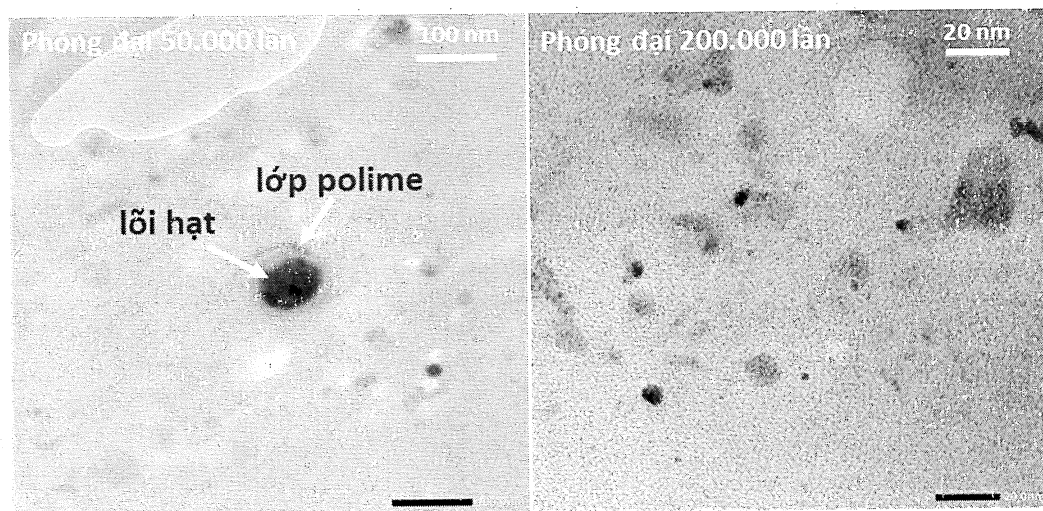
(b)

Hình 4



(a)

(b)

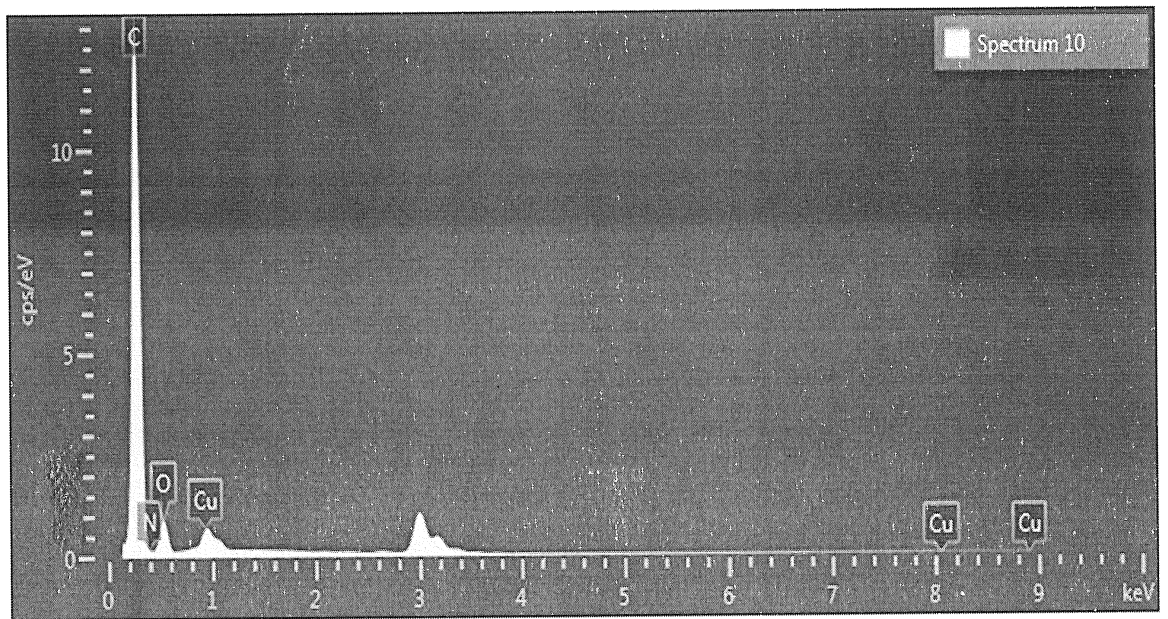


(c)

(d)

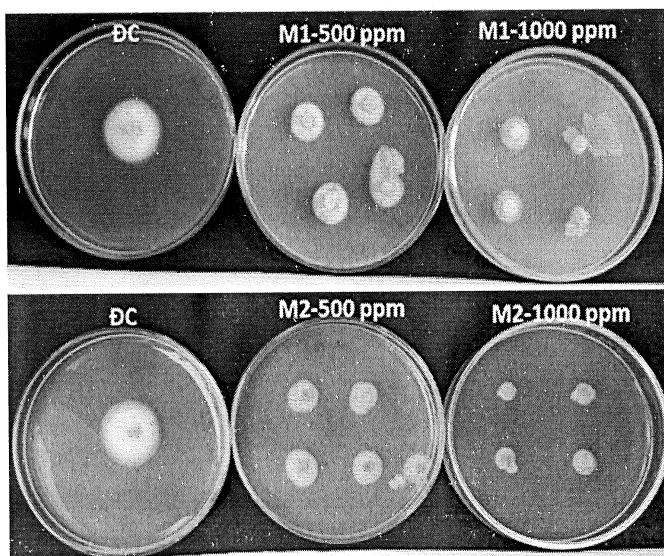
Hình 5

cường độ
tương đối

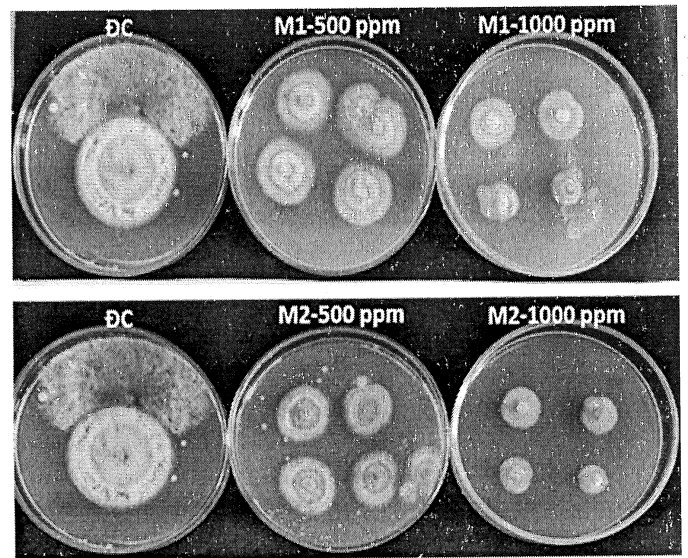


Năng lượng (keV)

Hình 6



(a)



(b)

Hình 7.