

Pickering emulziók gyógyszer technológiai alkalmazása vízben nem oldódó hatóanyagok és illóolajok formulálására

Doktori (Ph.D.) értekezés



Vörös-Horváth Barbara

Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Gyógyszerészi kémia alprogram

Programvezető: Dr. Perjési Pál

Témavezető

Dr. Secenji Aleksandar

tudományos főmunkatárs

Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszer technológiai és Biofarmáciai Intézet

Pécs

2021

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
1.1. Emulziók a gyógyszertechnológiában	6
1.2. Hagyományos- és Pickering emulziók a gyógyszerészetben	10
1.3. Pickering emulziók alkalmazása a gyógyszerészet különböző területén	13
<i>1.3.1. Illóolajok formulálása mikrobiológiai vizsgálatokhoz</i>	<i>13</i>
<i>1.3.2. Fogászati biofilm helyi kezelése</i>	<i>14</i>
<i>1.3.3. Körömgomba helyi kezelése és problémái</i>	<i>15</i>
1.4. Pickering emulziók tulajdonságai – Kolloidkémiai áttekintés	18
<i>1.4.1. Stabilitás</i>	<i>18</i>
<i>1.4.2. Emulzió típusa</i>	<i>21</i>
<i>1.4.3. Cseppméret</i>	<i>21</i>
<i>1.4.4. Stabilizáló részecskék típusai</i>	<i>23</i>
<i>1.4.5. Pickering emulziókat stabilizáló szilika nanorészecskék</i>	<i>25</i>
2. CÉLKITŰZÉS	28
3. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	31
3.1. Szilika nanorészecskék szintézise, felületmódosítása és vizsgálata	31
<i>3.1.1. Szilika nanorészecske szintézis és felületmódosítás során felhasznált vegyszerek és eszközök</i>	<i>31</i>
<i>3.1.2. Szilika nanorészecskék szintézise és felületmódosítása</i>	<i>31</i>
<i>3.1.3. Méret pontos szilika nanorészecske szintézis – Statisztikai módszer</i>	<i>32</i>
<i>3.1.4. Részecskeméret meghatározás - Dinamikus fényszórás mérés és transzmissziós elektronmikroszkópiai vizsgálat</i>	<i>33</i>
<i>3.1.5. Felületmódosítás vizsgálata - Infravörös spektroszkópia</i>	<i>33</i>
3.2. Illóolajok formulálása mikrobiológiai vizsgálatokhoz	34
<i>3.2.1. Kamilla és fehérüröm illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása</i>	<i>34</i>
<i>3.2.2. Pickering emulziók vizsgálata – Cseppméret, emulzió típusa, stabilitás</i>	<i>34</i>
<i>3.2.3. Pickering emulziók és sejtmembránok közötti kölcsönhatás vizsgálata sejtmodellen</i>	<i>35</i>
<i>3.2.4. Mikrobiológiai vizsgálatok</i>	<i>36</i>
3.3. Streptococcus mutans fogászati biofilm kezelése Pickering emulziókkal.....	37
<i>3.3.1. Különböző illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása.....</i>	<i>37</i>
<i>3.3.2. Pickering emulziók vizsgálata – Cseppméret, emulzió típusa, stabilitás</i>	<i>38</i>
<i>3.3.3. Biofilm degradációjának in vitro vizsgálata</i>	<i>38</i>
<i>3.3.4. In vitro diffúziós vizsgálatok modell biofilmen.....</i>	<i>38</i>
3.4. Körömgomba helyi kezelése teafa illóolajat és tiokonazol hatóanyagot tartalmazó Pickering emulzióval.....	40
<i>3.4.1. Teafa illóolaj gázkromatográfiás analízise</i>	<i>40</i>
<i>3.4.1.1. Statikus göztéranalízis szilárd fázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME)</i>	<i>40</i>

3.4.1.2.	Gázkromatográfia és tömegspektrometria (GC-MS)	40
3.4.2.	<i>Tiokonazol oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban</i>	40
3.4.2.1.	Oldhatóság meghatározása a Hansen-féle oldhatósági paraméter segítségével..	40
3.4.2.2.	Tiokonazol kinetikai oldhatóságának meghatározása	41
3.4.2.3.	Teafa illóolaj és tiokonazol tartalmú Pickering emulziók formulálása.....	41
3.4.2.4.	Pickering emulziók tulajdonságainak meghatározása – Cseppméret, emulzió típusa, stabilitás	42
3.4.2.5.	Pickering emulziók in vitro diffúziós vizsgálata körömmodellen	43
3.4.3.	<i>Mikrobiológiai vizsgálatok <i>Trichophyton rubrum</i> és <i>Candida albicans</i> gombafajokon</i>	44
3.4.3.1.	A mikrobiológiai vizsgálatok során használt műszerek	44
3.4.3.2.	Mikrobiológiai kísérletek során használat anyagok	44
3.4.3.3.	Gomba törzsek és tenyésztésük.....	44
3.4.3.4.	Antifungális aktivitás meghatározása.....	45
3.4.3.5.	Minimális gátlási koncentráció [MIC] meghatározása <i>T. rubrum</i> esetén	45
3.4.3.6.	Minimális gátlási koncentráció [MIC] meghatározása <i>C. albicans</i> esetén	46
3.4.3.7.	A minimális fungicid koncentráció [MFC] meghatározása	46
3.4.3.8.	Statisztikai kiértékelés.....	46
4.	EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	47
4.1.	Szilika nanorészecskék szintézise, felületmódosítása és vizsgálata	47
4.1.1.	<i>Szilika nanorészecskék szintézise és vizsgálata</i>	47
4.1.1.1.	Ammónia, mint katalizátor koncentrációjának hatása a SNk szintézisére	47
4.1.1.2.	Hőmérséklet változtatásának hatása a SNk szintézisére	48
4.1.1.3.	Víz koncentráció változtatásának hatása a SNk szintézisére	49
4.1.2.	<i>Szilika nanorészecskék méretpontos szintézise a hőmérséklet befolyásolásával</i>	52
4.1.3.	<i>Szilika nanorészecskék felületmódosítása és vizsgálata</i>	54
4.2.	Illóolajok formulálása mikrobiológiai vizsgálatokhoz	60
4.2.1.	<i>Kamilla és fehérüröm illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása és vizsgálata</i>	60
4.2.2.	<i>Pickering emulziók és sejtmembránok közötti kölcsönhatás vizsgálata sejtmodellen</i>	60
4.2.3.	<i>Kamilla és fehérüröm illóolajok különböző formulációinak mikrobiológiai vizsgálata</i>	62
4.3.	<i>Streptococcus mutans</i> fogászati biofilm kezelése Pickering emulziókkal.....	63
4.3.1.	<i>Különböző illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása és vizsgálata</i>	63
4.3.2.	<i>Biofilm degradációjának in vitro vizsgálata</i>	64
4.3.3.	<i>In vitro diffúziós vizsgálat biofilm modell membránon</i>	65
4.4.	Körömgomba helyi kezelése teafa illóolajat és tiokonazol tartalmú Pickering emulziókkal.....	67
4.4.1.	<i>Teafa illóolaj gázkromatográfias analízisének eredménye</i>	67
4.4.2.	<i>Tiokonazol oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban</i>	67
4.4.3.	<i>Teafaolaj és tiokonazol tartalmú Pickering emulziók formulálása és vizsgálata</i>	68
4.4.4.	<i>In vitro diffúziós vizsgálatok körömmodellen</i>	74

4.4.5. <i>T. rubrum</i> és <i>C. albicans</i> gombafajokon végzett mikrobiológiai vizsgálatok eredményei	76
5. ÖSSZEFOGLALÁS	79
6. HIVATKOZÁSOK	82
7. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	94
7.1. Publikációk	94
7.1.1. A doktori értekezés alapját képező publikációk	94
7.1.2. Egyéb, a disszertációhoz fel nem használt publikációk	95
7.2. Konferencia absztraktok	95
7.2.1. Előadás absztraktok	95
7.2.2. Poszter prezentáció absztraktok	95
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97
9. MELLÉKLETEK	98
9.1. Szilika nanorészecske szintézis kitermelésének számítása	98
9.2. Felületi borítottság számolása szilika nanorészecskék felületi módosításához	99
9.3. Kamilla és fehérüröm illóolajokkal készült Pickering emulziók formulálása és vizsgálata - Előkísérletek	101
9.4. Különböző illóolajokkal készült Pickering emulziók formulálása fogászati biofilm kezelésére – Előkísérletek	103
9.5. PBS puffer oldat készítése	105
9.6. Teafa illóolaj tartalmú Pickering emulziók készítése és jellemzése – Előkísérletek	106
9.7. In vitro diffúziós vizsgálat biofilm modell membránon	108
9.8. Teafa illóolaj gázkromatogramja	110
9.9. Tiokonazol oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban Hansen-féle oldhatósági érték számításával	111
9.10. Tiokonazol kinetikai oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban oldószer addíciós módszer segítségével	112

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

DLS: dinamikus fényszórás mérés (Dynamic Light Scattering)

ETES: etil-trietoxi-szilán

FTES: fenil-trietoxi-szilán

HA: hatóanyag

HCPM: részecskék szoros illeszkedése az olaj-víz határfelületen, azaz a PE csepp felületén (*Hexagonally Closed Pack Monolayer*)

HE: hagyományos emulzió

IR: infravörös spektroszkópia

KM: kumulatív hatóanyag mennyiség vagy kumulatív illóolaj mennyiség (% vagy mg/cm²)

MA: teafa illóolaj rövidítése a latin név alapján (*Melaleuca alternifolia*)

MFC: minimális fungicid koncentráció (Minimal Fungicid Concentration)

MIC: minimális gátlási koncentráció (Minimal Inhibitory Concentration)

MTES: metil-trietoxi-szilán

PBS: PBS puffer vagy foszfátalt só oldat (Phosphated Buffer Saline)

PE: Pickering emulzió

PTES: propil-trietoxi-szilán

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification, azaz egyszerűsített, begépelhető molekula-leíró rendszer

SN: szilika nanorészecske

TEM: transzmissziós elektronmikroszkóp

TEOS: tetra-etoxi-szilán

TIO MA: 20 m/m%: tiokonazol és teafa illóolaj oldata, amely a tiokonazol 20 m/m%-ban tartalmazza

TIO: tiokonazol

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Emulziók a gyógyszer technológiában

Az emulziók jól ismert kolloid rendszerek, melyeket az ipar számos területén alkalmaznak¹. Az emulziók két, egymással nem elegyedő folyadékból álló, kolloid diszperz rendszerek, melyek termodinamikailag instabilak, stabilizálásukhoz felületaktív anyagokat, tenzideket, szilárd anyagokat vagy különböző makromolekulákat (pl. fehérje, poliszacharid, lipid) használnak. A kolloidkémiai ismereteink napról napra egyre bővülnek, ennek köszönhetően ma már megkülönböztetünk makro-, mikro- és nanoemulziókat^{2,3}, melyek tulajdonságait összefoglalva az 1. táblázatban láthatjuk.

Tulajdonság	Makroemulzió	Mikroemulzió	Nanoemulzió
<i>Keletkezés</i>	energia befektetéssel	spontán	energia befektetéssel
<i>Stabilitás</i>	kinetikai állandóság, nem egyensúlyi rendszer	termodinamikai egyensúly	kinetikai állandóság, nem egyensúlyi rendszer
<i>Határfelületi feszültség</i>	$\sigma > 1$ mN/m	$\sigma \approx 0$ mN/m	$\sigma > 1$ mN/m
<i>Stabilizátor</i>	felületaktív anyag (kis koncentrációban)	felületaktív anyag és segéd felületaktív anyag (nagy koncentrációban)	nem feltétlenül szükséges
<i>Cseppméret</i>	$d < 1 \mu\text{m}$	$100 \text{ nm} < d < 1 \mu\text{m}$	$d < 100 \text{ nm}$
<i>Megjelenés</i>	tejszerű, zavaros	áttetsző, átlátszó	a jellegtől függ
<i>Típus</i>	o/v és v/o, összetett emulziók	o/v és v/o	o/v és v/o

1. táblázat. Makro-, mikro- és nanoemulziók tulajdonságainak összehasonlítása.

Az emulziókat számos különböző gyógyszerforma előállításánál használják⁴, úgymint krémek, gélek, transzdermális tapaszok vagy infúziók formulálása során⁵. Az emulziók alkalmazása több beviteli úton is lehetséges, adhatók injekciókként (intravénás és intramuszkuláris módon egyaránt)^{6,7}, orális⁸- vagy topikális alkalmazásban⁹, szemészeti¹⁰- és nazális készítményekben¹¹. Az emulziós gyógyszerformák alkalmazása megoldást nyújthat többek között a vízben nehezen, vagy egyáltalán nem oldódó hatóanyagok [HA] formulálására; a HA biológiai hasznosíthatóságának növelésére; a HA bőrön keresztül történő penetrációjának fokozására; célzott HA leadásra; a gyógyszerforma küllemének, állagának, ízének javítására.

A gyógyszeripari fejlesztések során számos új vegyületet és HAot állítanak elő, azonban ezek csaknem 40%-a lipofil tulajdonsággal rendelkezik, ezért vízben nehezen vagy egyáltalán nem oldódnak, így biohasznosulásuk is csekély¹². Amennyiben a HAot szerves

oldószerben vagy olajos fázisban oldják/diszpergálják, majd abból olaj a vízben típusú emulziót készítenek, a HA oldékonysága és biohasznosíthatósága orális gyógyszerkészítményekben növelhető, a HA adszorpciója a gyomor-bél traktusban fokozható¹³.

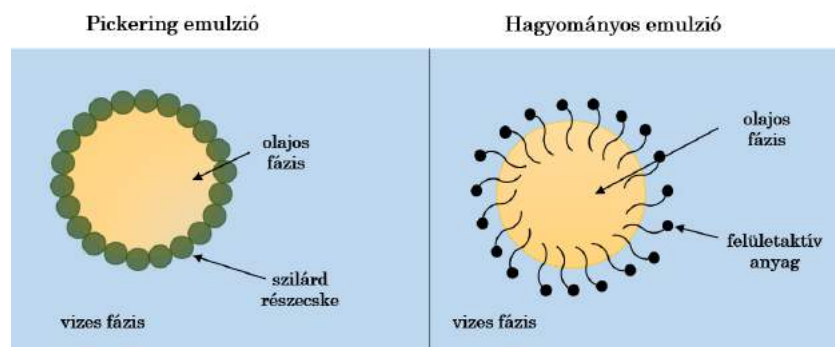
Az emulziós gyógyszerformát injekció, illetve parenterális táplálásra szánt készítmények előállítására is használják. Az első intramuszkuláris injekcióval kapcsolatos kísérletet az 1970-es években végezték, melyben Nakamoto és munkatársai a mitomicin-C, kemoterápiás HA formulálására tettek javaslatot¹⁴. Munkájuk során megállapították, hogy limfóma kezelésre jóval hatékonyabb az emulziós forma, a tumorsejtekben a lipofil tulajdonságú HA nagyobb mértékben felhalmozódik, mint oldatban történő adagolás esetén. Hashida és kollégái radioaktívan jelölt modell vegyületet alkalmazva megállapították, hogy a HA izomzatból történő felszívódása lényegesen megnövelhető víz az olajban típusú emulzió használatával¹⁵. Az utóbbi 30 évben számos kísérlet és publikáció igazolja, hogy a kemoterápiás- és antimikrobás szerek, vakcinák intramuszkuláris adagolása esetén az emulziós gyógyszerforma bizonyul megfelelőnek^{16,17,18}. Az FDA jelenleg több, mint 20 emulziós injekciót tart nyilván, többek között a a H1N1 elleni, Audenz[®] védőoltást¹⁹. Az intravénás vagy intramuszkuláris emulziós gyógyszerforma adagolása sok szempontból előnyösebb, mint a HA oldatos injekciójának alkalmazása. Klinikai vizsgálatokkal igazolták, hogy emulziós forma esetén a helyileg fellépő fájdalom, irritáció, illetve vénagyulladás mértéke jelentősen kisebb, vagy egyáltalán nem is jelentkezik²⁰. Emellett az emulziós készítmények igazoltan alacsonyabb vese- és máj toxicitással rendelkeznek, mint az oldatos készítmények, ezáltal a HA napi tolerálható dózisa is növelhető²¹.

A topikális terápiában az emulziós gyógyszerforma terjedt el leginkább, a gyógyszerhordozó rendszerek több mint 90%-ának emulzió képezi az alapját (krém, gél²²). A bőr legkülső rétege, a *stratum corneum* 10-20%-ban lipidekből, 70%-ban fehérjékből áll, normál körülmények között víztartalma 10-20%²³. A bőr felszínét alkotó lipofil *sebum* réteg különböző zsírokból és zsírsav észterekből áll, amely kötött állapotban vizet is tartalmaz²³. Dermális- vagy transzdermális készítmények esetén, főként víz az olajban típusú emulziókat alkalmaznak, amelyek szerkezete nagyban hasonlít a bőr *sebum* rétegéhez: a vízcseppek diszpergált állapotban vannak jelen az olajos fázisban²³. Az olajos fázis helyes megválasztásával (pl. trigliceridek vagy kis molekulájú zsírsavak, zsírsav észterek) a bőrrel rendkívüli módon kompatibilis gyógyszerkészítmény állítható elő²⁴. Ennek következtében a HA bőrön keresztül történő penetrációja, felszívódása egyaránt jelentősen megnövelhető²⁵, hidrofil és lipofil HA esetén egyaránt.

Amennyiben az emulziót stabilizáló anyagokat, illetve az emulzió cseppméretét helyesen választjuk meg, a gyógyszerkészítmény célzott HA leadású rendszerként is működhet. Amikor célzott HA leadású emulziós rendszert terveznek, a legfontosabb tényező, amelyet figyelembe kell venni, a célsejt vagy célszerv és az emulziós csepp között létrejövő kölcsönhatások. Ezt a kölcsönhatást három főbb tényező befolyásolja: a kolloid rendszer elektrokinetikai potenciál értéke; az emulziós csepp mérete (továbbiakban részecskeméret); megfelelő, sejtspecifikus ligandumok használata²⁶. Összességében elmondható, hogy amennyiben az emulziós csepp megfelelően nagy pozitív töltéssel rendelkezik ($\zeta \geq 20$ mV), a célsejtek sejtmembránjával kölcsönhatásba lép, és endocitózissal jut a sejtmembránon át a sejt belsejébe^{27,28,29,30}. A célsejt fizikai kémiai és biológiai tulajdonságainak pontos ismeretében olyan ligandumokat is választhatunk (pl. receptor³¹, anitest³²), melyek segítségével specifikus kölcsönhatás alakítható ki, a célsejt és a kolloid részecskék között. Természetesen a részecskék mérete is rendkívül fontos tényező, hiszen transzportjuk mechanizmusa a méretük szerint változik. 50 nm részecskeméret alatt paracelluláris transzport, 50-500 nm között endocitózis, 500 nm felett pedig enterocitózis, illetve nyirokrendszeren keresztül történő transzport játszódik le³³. Az ismertetett tényezőket figyelembe véve számos gyógyszerfejlesztés történt és zajlik ma is. Az FDA több, célzott HA leadásra alkalmas emulziós gyógyszerkészítményt is jegyez, ilyen például a Tipranavir (Aptivus[®]), amelyet HIV fertőzés kezelésére alkalmaznak, és a Fenofibrate (Lipofen[®]) koleszterin szintet csökkentő készítmény³⁴.

A fenti számos előnyös tulajdonságon túl, olyan alapvető gyógyszerészeti problémák megoldására is alkalmas lehet az emulziós gyógyszerforma, mint például a HA kellemetlen ízének vagy szagának elfedése, illetve esetleges kellemetlen mellékhatások kiküszöbölése vagy fényérzékeny anyagok eltarthatóságának növelése. Orálisan alkalmazandó, emulziós készítmények esetén a HA megfelelő íz-és szagfedése miatt a betegek könnyebben elfogadják és alkalmazzák azt, szemben a HA oldatos gyógyszerformájával⁸. Szemészeti felhasználás esetén kimutatták, hogy amennyiben olaj a vízben típusú emulziót alkalmaznak, az emulziós gyógyszerforma jobban tolerálható, mint az egyszerű oldatos vagy szuszpenziós forma, ezáltal számos kellemetlen mellékhatás, pl. szemszárazság, pirosság is elkerülhető¹⁰. A fényérzékeny HAok, mint például az A- vagy E-vitamin tovább eltartható emulziós gyógyszerformában, mivel az emulziót stabilizáló ágensek az olajos és vizes fázis határfelületén, azaz az emulziós csepp felületén elhelyezkedve egyfajta védőréteget alakítanak ki, amely megvédi a fényérzékeny HAokat a degradációtól³⁵.

Az emulziókat, így a gyógyszerészi emulziókat is csoportosíthatjuk a stabilizálásuk módja szerint. A hagyományos emulziókat [HE] felületaktív anyagokkal/tenzidekkel stabilizálják, eltarthatóságukat pedig tartósítószerekkel növelik³⁶. A szilárd részecskékkel stabilizált emulziókat Pickering emulzióknak nevezzük [PE], nevüket *Spencer Umfreville Pickering* brit vegyészről kapták, aki elsőként írta le a szilárd anyagok olaj és víz határfelületén történő felhalmozódásának jelenségét³⁷. HEk esetén a felületaktív anyagok adszorbeálódnak és felhalmozódnak az olaj és víz határfelületén, ezáltal stabilizálva az emulziót. A PEkban a szilárd részecskék a felületaktív anyagokhoz hasonlóan a víz és olaj határfelületén halmozódnak fel, így stabilizálva az emulziós rendszert (ld. 1. ábra).



1. ábra: Pickering emulziós- és hagyományos emulziós csepp sematikus ábrája, olaj a vízben típusú emulzió esetén.

A PEk és HEk fizikai kémiai tulajdonságai és biológiai rendszerekben való viselkedésük meglehetősen különbözik, amely az eltérő stabilizáló ágensnek köszönhető. A termodinamikai összefüggések, melyek leírják az egyes emulziók kialakulását, stabilitását és egyéb kolloidkémiai viselkedését, nem beszélve az élő rendszerekben történő alkalmazásukról, rendkívül összetettek.

1.2. Hagyományos- és Pickering emulziók a gyógyszerészetben

Az emulziós gyógyszerhordozó rendszerek alkalmazása az *1.1 fejezetben* ismertetett előnyös tulajdonságaik ellenére számos hátránnyal is jár. Mivel a legtöbb, jelenleg alkalmazott emulziós készítmény HE, ezért azok kivétel nélkül tartalmaznak felületaktív anyagokat, tenzideket. Alkalmazásuk biztonságossága ezáltal kérdéses, mivel a felületaktív anyagok és tenzidek allergiás reakciókat válthatnak ki, hosszú távon alkalmazva karcinogének is lehetnek³⁸, illetve az orális adagolásra szánt emulziós készítmények emésztőszerv-rendszeri problémákat is okozhatnak³⁹. Ha az emulziókat felületaktív anyagok helyett biokompatibilis szilárd részecskékkel stabilizáljuk, tehát PEkat alkalmazunk, akkor az előbb említett káros hatások kiküszöbölhetőek lehetnek.

A HEk és PEk ugyanolyan előnyösen használhatók, amennyiben a HA kémiai és fizikai behatásoktól történő védelme, a HA oldékonyságának és/vagy biohasznosíthatóságának növelése a cél⁴⁰. PE esetén a HAot tartalmazó emulziós cseppet szilárd részecskék borítják, amely réteg hatékonyabban képes megvédeni a HAot például a fény okozta degradációval szemben, mint a felületaktív anyagok alkotta réteg⁴¹.

Az orális alkalmazásra szánt PEk nagy előnye a HEkal szemben, hogy biokompatibilis részecskéket alkalmazva a cseppeket borító védőréteg megelőzheti a HA okozta gasztrointesztinális irritációt⁴². Továbbá adott pH értéken degradálódó részecskét alkalmazva elérhető a gyomorban/vékony-/vastagbélben történő célzott felszívódás⁴³.

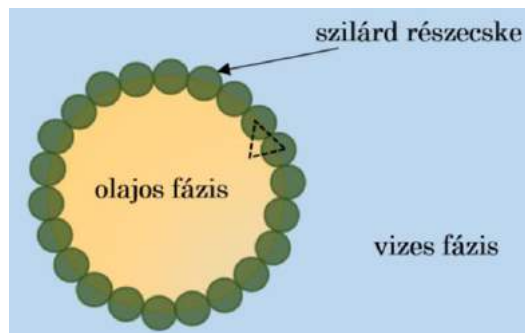
A PEt stabilizáló részecske lehet maga a HA is, nanokristály⁴⁴ vagy nanorészecske⁴⁵ formájában. PE formával több HA alkalmazása is lehetséges egyetlen emulzióban, hiszen a diszpergált fázis is tartalmazhat HAot, illetve maguk a stabilizáló szilárd részecskék is adszorbeált állapotban. Amennyiben összetett PEt készítünk^{46, 47} három vagy több HA formulálása is lehetséges, egyazon készítményben: egy HA a belső diszpergált fázisban, a másik HA a külső diszpergált fázisban, a harmadik HA pedig a részecskékben, kötött állapotban. Ezzel a formulálási módszerrel elérhető akár szinergista hatás is az egyes HAok között, így nemcsak a dózist lehet csökkenteni, hanem egy készítménnyel akár három is kiváltható, ami a betegek számára rendkívül előnyös lehet.

Számos kutatás foglalkozik topikális használatra szánt PEk fejlesztésével, amelyről több átfogó tanulmány is született^{48, 49}. Vizsgálták többek között a HA bőrön történő adszorpcióját, felszívódását⁵⁰, illetve a HA és a PEt stabilizáló részecskék akkumulálódását és biohasznosulását⁵¹. Chevalier és kollégái szilika nanorészecskéket használtak víz az olajban típusú PE formulálásra, a vizes fázisban hidrofil modell HAot oldottak, majd *in vitro*

kísérletekben, bőr modellen vizsgálták a HA bőrön keresztül történő felszívódását⁴⁹. Kísérleteikben megállították, hogy a PEből háromszor több HA szívódik fel, mint a HEből. A PE adszorpciójának mechanizmusa nem teljesen ismert, a nagyobb hatékonyság feltételezhetően annak köszönhető, hogy a szilárd részecskék és a bőr sejtjei között erősebb kölcsönhatás jön létre, mint a felületaktív anyagok és a bőrsejtek között⁴⁹. Ugyanezen kutatócsoport elvégezte lipofil HA PE formulálást is, és vizsgálták topikális terápiában történő alkalmazását⁴⁸. Ebben az esetben is a fenti tendencia volt megfigyelhető. A modellként alkalmazott sertésbőrön végzett kísérletek azt mutatták, hogy 24 óra elteltével a bőr mélyebb rétegeiben, a *stratum corneum*ban a HA felhalmozódik, továbbá lassú és folyamatos HA leadás figyelhető meg. Ezzel szemben, HE esetén a HA nem jut el a bőr mélyebb rétegeibe, az a *sebumban* koncentrálódik. Hasonló eredményeket mutatnak azok a kísérletek is, ahol a topikális terápiára szánt PEkat keményítővel⁵² vagy ciklodextrinnekkel⁵³ stabilizálták. Összességében tehát elmondható, hogy a bőrön keresztül történő felszívódás előnyösen változik, ha PE formát alkalmaznak HE helyett.

A PEk oldatokhoz, illetve HEkhoz képest nagyobb mértékű biohasznosulása, mind orális mind topikális terápiára szánt készítmények esetén, valószínűleg annak köszönhető, hogy a PE cseppjeit borító szilárd részecskék preferáltan kötődnek a sejtekhez⁵⁴. A nanotechnológia fejlődésének köszönhetően egyre több kutatás foglalkozik a nanorészecskék és a sejtek közötti kölcsönhatás felderítésével, melyek mindegyike kimondja, hogy elsősorban a részecskék mérete⁵⁵ és felületi tulajdonsága^{56,57} határozza meg a kölcsönhatás létrejöttét és annak erősségét. A részecskék sejtmembránhoz való kötődését különféle mechanizmusokkal magyarázzák. A részecskék spontán adszorbeálódhatnak a sejtmembrán felületére⁵⁸, vagy a sejtmembránba ágyazódhatnak⁵⁹. Lesniak és kollégái 2013-ban igazolták azt a feltételezést, miszerint a nanorészecskék úgy lépnek kölcsönhatásba a sejtekkel, hogy először a sejtmembrán felszínén található fehérjékkel és lipidekkel kölcsönhatásba lépnek, ún. korona komplexet hoznak létre, majd ez a komplex képes átjutni endocitózissal a sejtmembránon⁶⁰. Jelenleg nincs pontos ismeretünk egyik feltételezett kölcsönhatás mechanizmusát illetően sem. Ennek ellenére azonban Vasir és Labhasetwar kísérletükben mennyiségileg igazolták, hogy a modell hatóanyag a sejtmembránok felületéhez 10-szer nagyobb erővel kötődik, ha oldatos forma helyett nanorészecske hordozóhoz adszorbeálódik⁶¹, ezáltal az intracelluláris hatóanyag leadás lényegesen hatékonyabb.

A PE forma másik előnyös tulajdonsága, hogy segítségével szabályozott HA leadás érhető el. Ez egyrészt a szabályozható cseppméretnek köszönhető (ld. 1.4.3 fejezet), másrészt az ún. diffúzió rétegen át történő HA ledásnak. Simovic és kollégája tanulmányukban bebizonyították, hogy a nanorészecskék spontán határfelületre történő adszorpciója a PE cseppek felületén egy réteget hoz létre (ld. 2. ábra)⁶². Ennek a rétegnek a fizikai kémiai tulajdonságai, úgymint vastagsága, sűrűsége vagy a réteget alkotó részecskék nagysága, mind befolyásolja a HA kioldódását a cseppekből a külső fázisba. A diffúziós rés területét, melyet az ábrán szaggatott vonal jelöl, a részecskék mérete határozza meg. Minél nagyobb a részecskék mérete, annál nagyobb a diffúziós rés területe, azaz nagyobb méretű részecskékkel való stabilizálás esetén nagyobb mértékű lesz a HA kioldódása.



2. ábra: Olaj a vízben típusú Pickering emulziós csepp sematikus ábrája. A szaggatott vonallal jelölt egyenlő szárú háromszög területének nagysága adja meg a diffúziós rés nagyságát, amely a részecskeméret függvénye.

1.3. Pickering emulziók alkalmazása a gyógyszerészet különböző területén

1.3.1. Illóolajok formulálása mikrobiológiai vizsgálatokhoz

Az illóolajok alkalmazása egészen az ókorig nyúlik vissza, napjainkban is nagy népszerűségnek örvendenek, számos előnyös tulajdonságuk miatt. Az illóolajok aromás, illékony, lipofil tulajdonságú vegyületek, melyeket különböző növényi alkotókból vonnak ki⁶³. Az illóolajok rendkívül komplex összetételűek, különböző koncentrációban tartalmaznak többek között terpéneket, savakat, alkoholokat, aldehideket, alifás szénhidrogéneket, lakton származékokat, nitrogén- és kén heterociklusos vegyületeket, kumarin származékokat, stb⁶⁴. A hagyományos orvoslás és megfigyelések alapján az illóolajok több megbetegedés kezelésére és megelőzésére is alkalmasak lehetnek, hatásukat ma már kutatásokkal is alátámasztották. Igazolták többek között antibakteriális⁶⁵, antioxidáns⁶⁶, antivirális⁶⁷, gyulladáscsökkentő⁶⁸ és tumor ellenes⁶⁹ hatékonyságukat is. Az illóolajokról kimutatták, hogy bakteriális- vagy gombás megbetegedés kezelése esetén nem alakul ki velük szemben rezisztencia, amely komplex kémiai összetételűeknek, illetve a komponenseik között esetlegesen fellépő szinergista hatásnak köszönhető^{70,71}.

Az illóolajok alkalmazásával kapcsolatos egyik gyakori tévhit, hogy veszélytelenek, irritációt nem okoznak és hosszú távon is használhatók⁷². Bár komoly mellékhatásokat valóban nem váltanak ki, allergiás reakciók felléphetnek alkalmazásuk során, amely főként külsőleges használatuk alatt figyelhető meg⁷³. Annak érdekében, hogy az illóolajokat megfelelő adagolásban, beviteli úton és biztonságosan lehessen a gyógyászatban alkalmazni, mikrobiológiai vizsgálatok elvégzése és a hatásmechanizmusuk pontos feltérképezése szükséges. Mindemellett szükség lenne olyan gyógyszerforma fejlesztésére, amellyel az esetleges irritációk és mellékhatások kiküszöbölhetők.

Tekintettel arra, hogy az illóolajok lipofil tulajdonságúak, biológiai vizsgálatuk rendkívül nehézkes, mivel azok kivétel nélkül vizes közegben történnek⁶³. Az illóolajok vízdoldhatóságának növelése érdekében általában különböző szerves oldószereket és/vagy felületaktív anyagokat használnak, oldószerek közül ilyen például a DMSO, etanol, metanol⁷⁴, felületaktív anyagok közül pedig a különböző Tween-ek⁷⁵. Az előbb felsorolt anyagok hamisíthatják a vizsgálati eredményeket, mivel megváltoztatják a tesztmédiум fizikai kémiai tulajdonságait, ráadásul önmagukban is rendelkeznek például antibakteriális hatással^{76,77}. Másrészt a szerves oldószerek alkalmazása elősegíti az amúgy is illékony olajok párolgását a vizsgálatok során, különösen magasabb inkubációs hőmérsékleteken ($t > 35$ °C), ez pedig szintén hamis teszteredményekhez vezet.

Az illóolajok formulálására és tesztelésére a PE forma alkalmas lehet. Ahogy azt korábban írtuk, ha formulálásukhoz olyan részecskét választunk, amely biokompatibilis, azzal az alkalmazás során fellépő irritációk és mellékhatások lehetnek kiküszöbölhetőek. Továbbá ha biológiailag inert részecskével dolgozunk, az a biológiai mérések eredményét sem hamisítja. További előnye a PEknak, hogy az illóolaj párolgását csökkentik, olaj a vízben típusú emulzió készítése esetén, melyet Cossu és kollégái⁷⁸, illetve Wang kutatócsoportja⁷⁹ kísérleti úton be is bizonyított. A párolgás csökkenésének oka a már korábban is említett, cseppek felszínén kialakuló, szilárd részecskékből álló védőréteg (ld. 1.2. fejezet és 2. ábra).

1.3.2. Fogászati biofilm helyi kezelése

A fogakon lerakódó fogkő és lepedék számos egészségügyi problémát okozhat, hiszen nem megfelelő szájhigiénia esetén az a baktériumok melegágya lehet⁸⁰. A fogkő baktériumok által képzett biofilm, amelynek fő kórokozói a különböző *Streptococcus* fajok⁸¹. A biofilm baktériumok által képzett, egy felületen összetapadt, egybefüggő réteget jelent⁸². A baktérium sejtek gyakran az általuk termelt, nyálkának is nevezett extracelluláris polimer anyagba ágyazódva helyezkednek el, amely fehérjék és poliszacharidok keverékéből áll⁸¹. A fogászati biofilmek kialakulásáért felelős baktérium, a *Streptococcus mutans*⁸¹ hidrofil jellegű, tortuózus porózus szerkezetű biofilmet képez⁸³, pórusmérete a felsőbb rétegekben 1,7-2,7 μm között van, az alsóbb rétegekben pedig 0,3-0,4 μm között⁸⁴.

A fogkőben és lepedékben lévő baktériumok tevékenységének következtében a száj pH értéke elsavasodik, ami a fog ásványi anyag tartalmát csökkentheti, ezáltal könnyen kialakulhat számos fogászati probléma, úgymint fogszuvasodás, fogínygyulladás vagy fogínyvérzés⁸¹. Természetesen a fogkő kialakulása megelőzhető megfelelően kivitelezett fogmosással és fogselyem használatával⁸⁵. Mivel azonban a fogmosás önmagában nem elég hatékony, ezért szükség van egyéb termékek alkalmazására is, például a szájvizekre, amelyek kémiai úton képesek eltávolítani a fogkövet, vagy megelőzni annak kialakulását⁸⁶. A felnőtt populáció körében szerencsére széles körben elterjedt a szájvíz használata⁸⁷, ezért fontos, hogy az megfelelő és biztonságos összetételű legyen.

A kereskedelemben kapható szájvizek többek között klór-hexidint, hexetidint, oktenidint, triklozánt tartalmaznak⁸⁷. A felsorolt HAok használata hosszú távon számos mellékhatást okozhat, például szájszárazságot vagy fogínyvérzést⁸⁸, illetve a baktériumok egy idő után rezisztenssé válnak velük szemben⁸⁹. A növényi kivonatok alkalmazása szájvizekben az utóbbi időben egyre inkább elterjedt, számos kutatócsoport bizonyította,

hogy a növényi kivonatokkal ugyanolyan hatékonyság érhető el, mint a fenti HAokkal⁹⁰. További előnyük, hogy kedvező mellékhatás profillal rendelkeznek, és velük szemben nem alakul ki bakteriális rezisztencia⁹¹. Oldószerek közül leginkább különböző alkoholokat, például etanolt, propilén-glikolt, glicerint alkalmaznak, a felületaktív anyagok közül pedig különféle poliszorbátok vagy nátrium-lauril-szulfát találhatóak meg a szájvizekben^{92, 93}. Klinikai vizsgálatok bizonyítják, hogy a felületaktív anyagok hosszútávon történő alkalmazása a szájnyálkahártya irritációját okozhatja⁹⁴. Az említett problémák kiküszöbölésére fontos lenne olyan szájvizet készíteni, amely megfelelő mennyiségben tartalmaz illóolajat, a formuláció pedig olyan segédanyagokat tartalmaz, amelyek hosszú távú használata is biztonságos.

A fogkrémekben már régóta alkalmaznak szilikát, mint polírozó vagy abrazív segédanyagot⁹⁵, melynek biztonságosságát több vizsgálatban is bebizonyították⁹⁶. Amennyiben biztonságosan alkalmazható, illóolaj tartalmú szájvizet szeretnénk készíteni, formulációként alternatíva lehet a PE, melyet szilika részecskékkel stabilizálunk.

1.3.3. Körömgomba helyi kezelése és problémái

A körömgomba gyűjtőfogalom, magában foglal minden olyan gomba okozta megbetegedést, ami a kéz- és lábkörmöket érinti⁹⁷. Világszerte a felnőtt lakosság több, mint 11%-át érinti a körömgombás megbetegedés⁹⁸, amely a köröm betegségeinek körülbelül 50%-át teszi ki⁹⁹. A körömgombás megbetegedések kezelésére számos módszer áll rendelkezésre, úgymint orális és topikális készítmények alkalmazása, továbbá a köröm mechanikai- vagy kémiai kezelése¹⁰⁰. Ezek kombinációját is alkalmazzák, elsősorban krónikus megbetegedések esetén¹⁰⁰. A terápia azon túl, hogy hosszú időt vesz igénybe (átlagosan 10-12 hónap), nagyon alacsony gyógyulási rátát mutat, a megbetegedés az esetek több mint 70%-ban visszatérő problémát okoz¹⁰¹.

Az orális készítmények adásával érhető el a legnagyobb hatékonyság, azonban nagy hátrányuk, hogy hosszú ideig kell alkalmazni őket (3-4 hónap), amely alatt számos mellékhatást váltanak ki, továbbá máj- és vese toxicitást is mutatnak¹⁰². Mivel javarészt a idősebb korosztályt érinti a probléma, ezért az orális körömgomba ellenes gyógyszerek interakcióba léphetnek az egyéb gyógyszereikkel, így sok esetben a terápia ezen formája ellenjavallt¹⁰². Ilyen esetekben elsősorban a topikális készítményeket javasolják, amely a betegek számára is sokkal elfogadottabb kezelési módszer. Hátránya azonban a helyileg ható készítményeknek, hogy a köröm szerkezetéből adódóan gátat szab a HAok diffúziójának, így a felszívódás nagyon csekély, ami a terápia hatékonyságát csökkenti, a kezelés

időtartamát pedig tovább növeli¹⁰³. Annak ellenére, hogy a megbetegedést okozó gombák fonalai károsítják a körömlemezt, és mikropórusokat hoznak létre annak felületén¹⁰⁴, a HA diffúziója mégis kismértékű. Ennek oka a köröm hidrophil felületi tulajdonsága és keratinizált szerkezete, amely gátolja a nagy molekulatömegű, lipofil jellegű, antifungális HAok diffúzióját¹⁰⁵. A HA diffúziójának elősegítése érdekében ún. diffúziót fokozó előkezelést és/vagy segédanyagot alkalmaznak, például mechanikai (reszelés)¹⁰⁶, foszforsavas-¹⁰⁷ vagy keratolit enzimekkel történő előkezelést¹⁰⁸. Az előkezelések ellenére a HA még így is csak nagyon kis mennyiségben éri el a fertőzés valódi helyét, a körömágybőrt¹⁰⁹.

Az azolokat, mint antifungális HAokat az 1980-as évektől alkalmazzák orális- és topikális terápiában egyaránt, többek között körömgomba kezelésre, illetve a klinikumban is használatosak bőrfelületi- és szisztémás gombás betegségek kezelésében¹¹⁰. Az azol származékok gyógyszer technológiai formulálásánál gondot okoz, hogy vízben gyakorlatilag oldhatatlanok (<0,01 mg/ml)¹¹⁰, így a topikális terápiában alkalmazott készítmények szerves oldószereket is tartalmaznak. A jelenleg elérhető körömlakkok szinte kivétel nélkül tartalmaznak szerves oldószereket, mint a HA oldékonyságát növelő segédanyagokat. A szerves oldószerek alkalmazásának hátránya, hogy bizonyítottan negatívan hatnak a HA körömlemezen át történő diffúziójára¹¹¹. A kedvezőtlen HA diffúzió többek között abból adódik, hogy a szerves oldószerek a felvitel után gyorsan elpárolognak, így a HA nagy részben a köröm felületén marad¹¹². Számos kutatás bebizonyította, hogy a vizes alapú gyógyszerkészítményekből a HA nagyobb mértékben diffundál át a körömlemezen, mint a szerves oldószer alapú készítményekből^{113, 114}. Ennek oka, hogy a köröm hidrophil tulajdonságú, vizes közegben hidratálódik, duzzad, így a vizes alapú formuláció könnyebben penetrál a körömlemezbe¹¹⁴. További probléma az azol származékokkal, hogy hosszan tartó kezelés mellett a gombák rezisztenssé válnak velük szemben, így a kezelés egy idő után hatástalanná válik¹¹⁵.

Az azol származékok és illóolajok kombinációja megoldást kínálhat a fenti problémára, mivel az antifungális hatással rendelkező illóolajokkal szemben nagyon ritkán alakul ki rezisztencia⁷¹. Rosato és kollégái bebizonyították, hogy az azolok és illóolajok között szinergista hatás is felléphet¹¹⁶, melyet valószínűleg az eltérő hatásmechanizmusuk okoz. Az azol származékok gátolják a gombák citokróom-P-450 és a lanosterol-demetiláz enzimét, ezáltal megakadályozzák az ergosterol szintézisét, ami végül a gombák pusztulását okozza¹¹⁷. Az illóolajok más úton fejtik ki hatásukat: a gombák sejtfalát és sejtalkotóit károsítják¹¹⁸. Az azol származékok lipofil jellege¹¹⁰ miatt jól oldhatók lehetnek illóolajokban, amely lehetővé teszi együttes alkalmazásukat topikális terápiára szánt

gyógyszerkészítményben. Tekintettel arra, hogy a vizes közegű gyógyszerkészítményekből a HAok nagyobb mértékben penetrálnak, ezért az azolok és illóolajok együttes formulálására egy olaj a vízben típusú emulzió készítése nyújthat megoldást.

A körömlemezen keresztül történő HA leadást általában *in vitro* diffúziós vizsgálatokkal végzik, Franz cellát alkalmazva. A jelenleg általánosan elfogadott modell membránok, amelyeket különböző, körömgomba kezelését célzó gyógyszerformák *in vitro* diffúziós/penetrációs tesztelésére használnak, általában természetes eredetűek. Ilyen modell membrán például az önkéntesektől vett körömszelet¹¹⁹, a holttestekről eltávolított körömlemez¹²⁰, a szarvasmarha pata¹²¹ vagy emberi hajból¹²², esetleg állati eredetű szőrből vagy tollból preparált keratin filmek¹²³. A természetes eredetű modell membránok pórusmérete és felületi tulajdonsága rendkívül heterogén, ezért használatuk óriási szórást okoz az eredményekben (akár >46%)¹²⁴,¹²⁵, ami ellehetetleníti a különböző gyógyszerformák diffúziós tulajdonságainak összehasonlítását.

Amennyiben új gyógyszerforma tesztelése a cél, még fontosabbá válik olyan membránok alkalmazása az *in vitro* diffúziós vizsgálatokban, melyek fizikai kémiai tulajdonságai jól definiáltak. Véleményünk szerint a vizsgálatok során a legfontosabb, hogy olyan modell membránokat alkalmazzunk, amelyek hidrofilitása és felületi töltése hasonlatos a körömlemezhez illetve a körömágybőrhez, így érdemben összehasonlítható lehet a különböző gyógyszerformák diffúziós tulajdonsága. A körömlemez negatívan töltött, vizes alapú hidrogélként viselkedik¹²⁶, amely tulajdonságok egyeznek az agar gél tulajdonságával¹²⁷. Irodalmi adatok alapján összehasonlítható egy modell lipofil HA, a klóramfenikol diffúziós együtthatója és fluxus értéke ($C_{\text{klóramfenikol}}=5$ mg/ml, PBS pufferben oldva) különböző membránokon keresztül, úgymint agar gél¹²⁸, szarvasmarha pata és emberi körömlemez¹²⁹. A diffúziós koeficiensek és fluxus értékek a szarvasmarha pata vagy körömlemez esetén is jó egyezést mutattak az agar géllal. A számított fluxus értékek a következők: szarvasmarha pata $4,07 \pm 1,18 \cdot 10^{-6}$ mg/cm²·s, agar gél $1,96 \pm 0,47 \cdot 10^{-6}$ mg/cm²·s, emberi körömlemez $8,21 \pm 2,11 \cdot 10^{-7}$ mg/cm²·s. A fluxus értékek összehasonlítása alapján az agar gél alkalmas modell körömlemez lehet az *in vitro* diffúziós vizsgálatok során.

Tekintettel arra, hogy fertőzés szempontjából a körömágybőr kezelése a legfontosabb, ezért célzott HA leadású készítmény tervezése esetén érdemes lehet kompozit membránnal dolgozni. A kompozit membrán együttesen modellezheti a körömlemezt, és az alatta elhelyezkedő körömágybőrt. Utóbbihoz alkalmas modell a cellulóz-acetát membrán, mert általánosságban használt a topikális készítmények bőrön keresztül történő

penetrációjának vizsgálatára¹³⁰; a körömágybőr anatómiai szempontból pedig rendkívül hasonlatos a bőrrel^{131,132}.

1.4. Pickering emulziók tulajdonságai – Kolloidkémiai áttekintés

1.4.1. Stabilitás

A PEk stabilitását elsősorban a szilárd részecskék olaj-víz határfelületre történő adszorpciója, illetve annak erőssége határozza meg. A részecskék határfelületre történő adszorpciója többek között függ a részecskék nedvesedési szögétől és az alábbi határfelületi feszültség értékektől: szilárd részecske-víz γ_{sz-v} , szilárd részecske-olaj γ_{sz-o} , víz-olaj γ_{v-o} .

Ahhoz, hogy a szilárd anyagot a víz nedvesíteni tudja olajos közegben, azaz olajos folytonos fázisban, a víz adhéziós energiájának pozitívnak kell lennie [$E_{adh}(v/o)$], a víz ún. szétterülési együtthatójának [$S(v/o)$] pedig negatívnak¹³³:

$$E_{adh}(v/o) = \gamma_{sz-o} - \gamma_{o-v} > 0$$

$$S(v/o) = \gamma_{sz-o} - \gamma_{o-v} - \gamma_{sz-v} < 0$$

Ezzel analóg módon a szilárd részecske olajos fázissal történő nedvesedése is felírható vizes közegben, ahol az olajos fázis adhéziós energiájának szintén pozitívnak [$E_{adh}(o/v)$], az olaj szétterülési együtthatójának [$S(o/v)$] pedig negatívnak kell lennie:

$$E_{adh}(o/v) = -S(v/o) = \gamma_{sz-v} + \gamma_{o-v} - \gamma_{sz-o} > 0$$

$$S(o/v) = -E_{adh}(v/o) = \gamma_{sz-v} - \gamma_{o-v} - \gamma_{sz-o} < 0$$

Amennyiben a szilárd részecske felülete hidrofil, úgy azt inkább a víz nedvesíti, míg a hidrofób részecskét inkább az olajos fázis nedvesíti. Könnyen belátható, hogy amennyiben a részecske túl hidrofil, akkor az nem a határfelületen, hanem a vizes fázisban, diszpergált állapotban helyezkedik el, a határfelületi adszorpció tehát nem valósul meg; illetve ha túl hidrofób, akkor az olajos fázisban marad diszpergált állapotban. A részecske részleges nedvesedését vizes (θ_v) és olajos (θ_o) fázisban a Young-egyenlettel írhatjuk le:

$$\cos \theta_v = \frac{\gamma_{sz-o} - \gamma_{sz-v}}{\gamma_{v-o}}$$

$$\cos \theta_o = \frac{\gamma_{sz-v} - \gamma_{sz-o}}{\gamma_{v-o}}$$

Amennyiben a részecskék nedvesedése részleges, azaz az olajos és vizes fázis egyaránt nedvesíti őket, adszorpciójuk a határfelületre nagyon erős lehet. Az adszorpció szabadenergiája (ΔG_{adsz}), azaz egy részecske határfelületről történő kiszakításához

szükséges munka arányos a határfelületi feszültséggel és a részecske méretével (R)^{134,135}. Amennyiben a $\theta_v < 90^\circ$:

$$\Delta G_{adsz} = -\pi R^2 \gamma_{o-v} (1 - \cos \theta_v)$$

ha pedig $\theta_v > 90^\circ$:

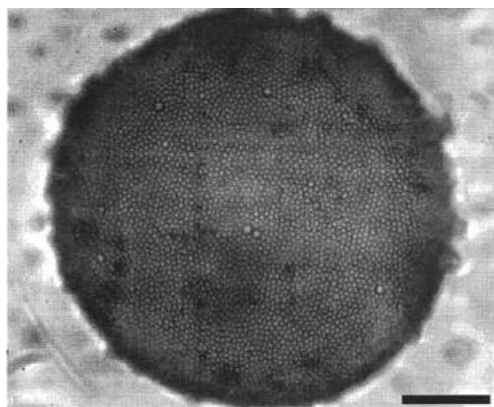
$$\Delta G_{adsz} = -\pi R^2 \gamma_{o-v} (1 + \cos \theta_v)$$

A részecskék adszorpciós energiája akkor a legnagyobb, amikor a nedvesedési szögük 90° , azaz egyformán nedvesíti őket az olajos és vizes fázis, így ebben az esetben érhető el a legnagyobb emulzió stabilitás¹³⁶.

Nagy különbség a PEk és a HEk között, hogy a szilárd részecskék nagyságrenddel nagyobb adszorpciós energiával rendelkezhetnek, mint a felületaktív anyagok, amely bizonyos esetekben olyan mértékű is lehet, hogy az adszorpció irreverzibilisnek tekinthető¹³⁷. French és kollégái különböző részecskék kombinálásával elérték, hogy a PEk termodinamikailag stabilnak tekinthetők¹³⁸. Ezzel szemben a felületaktív anyagok minden esetben reverzibilisen adszorbeálódnak a határfelületre, a molekuláik gyakorlatilag rendkívül gyors adszorpciós-deszorpciós egyensúlyban vesznek részt¹³⁹.

Az adszorpciós szabadenergiát leíró összefüggésből láthatjuk (ΔG_{adsz}), hogy a részecskék nedvesedési szögén túl azok mérete is befolyásolja az adszorpciós energia nagyságát. A képletet vizsgálva megállapítható, hogy minél kisebb a részecske mérete, annál kisebb lesz az adszorpciós szabadenergia értéke. Ennek értelmében a kisebb részecskék gyengébben adszorbeálódnak az olaj-víz határfelületre, mint a nagyobb részecskék, melyet Binks és kollégái számításokkal igazoltak is¹³⁷. Fontos megjegyezni azt is, hogy egy bizonyos részecskeméret alatt ($d < 0,5$ nm, szabályos gömb alakot és sík geometriájú olaj-víz határfelületet feltételezve) az adszorpciós energia mértéke olyan elhanyagolhatóan kicsi, hogy az már a részecskék hőmozgásából adódó kinetikus energia nagyságával összevethető. Ez gyenge adszorpciós kölcsönhatást eredményez, amely a felületaktív anyagok határfelületre történő adszorpciójának energiájával összevethető mértékű¹³⁷.

Általánosságban úgy tekintik, hogy a részecskék elhelyezkedése az olaj-víz határfelületen hexagonális szoros illeszkedéssel, egy rétegben történik (angolul *Hexagonally Closed Pack Monolayer* [HCPM]). Ez gyakorlatilag azt jelenti, hogy a PEt stabilizáló részecskék az emulziós cseppet egy rétegben teljesen befedik, így óvva meg az emulziót a koaleszcenciától. Az alábbi optikai mikroszkópos felvételen jól megfigyelhető az előbb említett HCPM réteg kialakulása, amely Aveyard publikációjában látható eredetiben (ld. 3. ábra).



3. ábra: Víz az olajban típusú emulzió cseppjéről készült optikai mikroszkópos felvétel. Az emulziós csepp monodiszperz méreteloszlású részecskékkel ($d=3,2 \mu\text{m}$) van stabilizálva, a méretskála $50 \mu\text{m}$. Forrás: R. Aveyard *et al. Advances in Colloid and Interface Science* 2003, 100-102, 503–546.

Ha feltételezzük, hogy a PEk készítése során a részecskék minden esetben HCPM rétegben helyezkednek el a cseppeken, akkor arra következtethetünk, hogy a részecskék koncentrációja nagyban befolyásolja a PE stabilitását. Gelot és kollégái végeztek is tanulmányt ezzel kapcsolatban és megállapították, hogy adott olaj-víz rendszerre, amennyiben a fázisok aránya állandó, a részecskék koncentrációjának csökkenésével a PE stabilitása is csökken, azaz itt nem teljesül a HCPM borítottság; azonban túl nagy részecske koncentráció esetén a stabilitás szintén kedvezőtlen irányba változik¹⁴⁰. Utóbbi a részecskék, így a cseppek aggregációjával, koaleszcenciájával magyarázható (DLVO elmélet). Az ideális koncentráció tartományban, azaz ahol a PE a legstabilabbnak bizonyult, feltételezhető a HCPM réteg kialakulása.

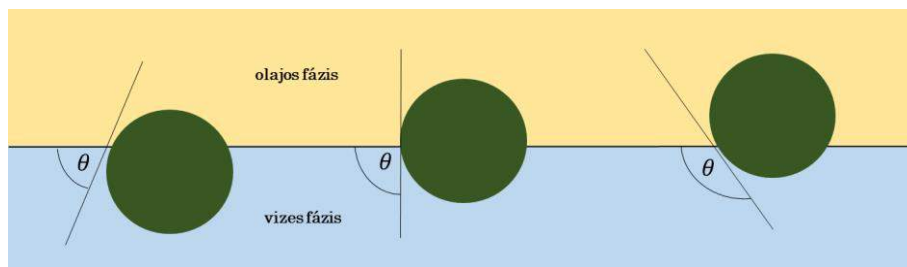
A HCPM réteg kialakulásánál a részecskék koncentrációja mellett nagyon fontos szerepe van a részecskék méretének is. Ha a cseppméretet állandónak tekintjük és csak a részecskeméret változását vizsgáljuk, akkor megállapítható, hogy minél kisebb a részecske mérete, annál több szükséges belőlük ahhoz, hogy a teljes HCPM borítottságot elérjük. Minél több részecske adszorbeálódik az olaj/víz határfelületen, annál inkább lecsökken a határfelületi feszültség, ami megóvja a cseppeket a koaleszcenciától, így a stabilitás is jelentősen megnő^{141, 142}. A nagyobb részecskék lassabban diffundálnak az olaj/víz határfelületre, mint a kisebb részecskék, ezáltal a teljes HCPM borítottság eléréséhez sok idő kell, bizonyos esetekben nem is teljesül a réteg kialakulása a csepp felületén^{143,144}.

A fentieket összegezve elmondható, hogy stabil PEkat állíthatunk elő, ha megfelelően választjuk meg a stabilizáló részecskék méretét, hidrophil/hidrofób jellegét (nedvesedési szögét) és koncentrációját. Gyakorlati, illetve gyógyszerészeti szempontból nincsen egységes kitétel az emulziók stabilitására, azt az alkalmazásnak megfelelően határozzák

meg. A gyógyszerészetben az emulziók stabilitására vonatkozó, irányadó előírást a VII. Magyar Gyógyszerkönyv tartalmazza, mely a következőt írja¹⁴⁵: „... Az emulzió minimum 15 percen belül nem válhat szét, illetve a szétválás jeleit nem mutathatja... Az emulziónak a felhasználásig vagy a felhasználhatósági idő végéig stabilnak kell maradnia”. Ennek alapján az emulziókat stabilnak tekintetem, amennyiben cseppméretük legalább 1 hétig nem változott, továbbá nem lépett fel aggregáció vagy részecskék ülepedése, és fázisszétválás sem volt tapasztalható.

1.4.2. Emulzió típusa

Az 1.4.1 fejezetben tárgyalt részecskék nedvesedése nem csak a stabilitást, hanem a PEk típusát is befolyásolja. Amennyiben a nedvesedési szög $\theta_v < 90^\circ$, akkor olaj a vízben, illetve $\theta_v > 90^\circ$ esetén víz az olajban típusú emulzió képződik (ld. 4. ábra).



4. ábra: Szabályos gömb alakú részecske elhelyezkedése az olaj-víz határfelületen. Amennyiben $\theta_v < 90^\circ$, olaj a vízben (balra), illetve ha $\theta_v > 90^\circ$, akkor víz az olajban típusú emulzió képződik (jobbra).

1.4.3. Cseppméret

A PEk cseppméretét főként négy paraméter befolyásolja: az alkalmazott részecskék mérete és koncentrációja, illetve a diszpergált fázis kémiai összetétele és mennyisége. Az alábbiakban ezeknek a paramétereknek a hatásait tárgyaljuk.

A részecske koncentrációjának és méretének befolyását a PEk cseppméretére, Wiley¹⁴⁶ és Golemanov¹⁴⁷ írták le, amelyet korlátozott koaleszcencia modellnek neveznek. Olaj a vízben típusú emulziók esetén a cseppméret ($D_{o/v}$) az alábbi módon adható meg:

$$D_{o/v} = \left(\frac{6s}{N\pi r^2} \right) \cdot \left(\frac{V_o}{V_v} \right)$$

ahol s a csepp felületének részecskékkel való borítottsága (% HCPM), N a részecskék száma a vizes fázisban, r a részecske sugara, V_o az olajos fázis térfogata, V_v pedig a vizes fázis térfogata. Hasonló összefüggés írható le a víz az olajban típusú emulziók cseppméretére ($D_{v/o}$):

$$D_{v/o} = \left(\frac{6s}{N\pi r^2} \right) \cdot \left(\frac{V_v}{V_o} \right)$$

Ezek a modellszámítások kizárólag abban az esetben alkalmazhatók, ha ideálisak a körülmények, azaz a PEt stabilizáló részecskék szabályos gömb alakúak, felszínük teljesen sima, részecskeméret eloszlásuk monodiszperz, illetve feltételezzük, hogy a cseppek HCPM szerint teljesen borítottak. A számítás a cseppméret előrejelzésére alkalmazható a gyakorlatban.

A 1.4.1 fejezetben említett HCPM kialakulása a cseppméret kialakulásában is meghatározó. A HCPM réteg kialakulását nemcsak a részecskeméret és -koncentráció határozza meg, hanem az emulzió diszpergált fázisának koncentrációja, amely közvetlenül hatással van a cseppméret kialakulására. A PEt stabilizáló részecske méretét és koncentrációját állandó értéken tartva, a diszpergált fázis koncentrációját változtatva azt tapasztaljuk, hogy a koncentráció növekedésével a cseppméret is nő¹⁴⁸. Ennek oka, hogy növekvő diszpergált fázis koncentráció esetén a határfelületet nem tudják teljesen HCPM rétegben beborítani a részecskék, ezáltal a határfelületi feszültség sem csökken le megfelelő mértékben, így a cseppméret fokozatosan nagyobb lesz. Amennyiben a diszpergált fázis koncentrációja elér egy kritikus értéket, az a cseppek koaleszcenciáját okozhatja, ami ezáltal a stabilitásra is kedvezőtlen hatással van¹⁴⁹.

Ideális körülmények között, azaz szabályos gömb alakú, sima felületű, monodiszperz részecskével készített PE esetén, ahol a cseppek HCPM borítását feltételezzük, a cseppméret egyszerű geometriai megközelítéssel is számolható, melyet számos kutatásban alkalmaznak¹⁵⁰. A geometriai számítással összefüggés írható fel a cseppek mérete (D) és a diszpergált fázis/szilárd részecske tömegarányának (M_d/M_{sz}) segítségével:

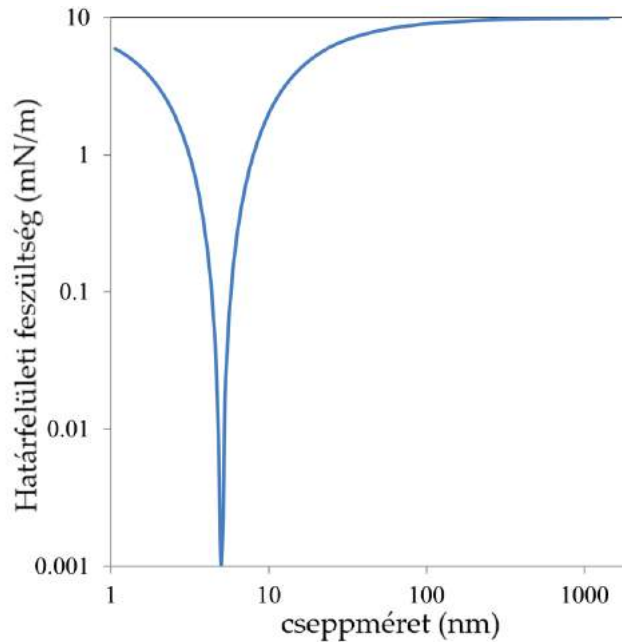
$$D = \frac{6 \cdot M_d}{\rho_d \alpha_{sz} M_{sz}}$$

ahol ρ_d a diszpergált fázis sűrűsége, α_{sz} pedig az összes, szilárd részecskék által borított határfelület.

Természetesen a diszpergált fázis koncentrációján kívül, annak felületi feszültsége is meghatározza a PEk cseppméretét. Eltérő kémiai összetételű diszpergált fázisoknak más-más a határfelületi feszültség értéke, amely befolyásolja egyrészt a PEk stabilitását, mivel közvetett hatása van a részecskékkel való adhézió kialakulására és a nedvesedésre (ld. 1.4.1 fejezet). Másrészt a határfelületi feszültség értéke meghatározza a görbület nagyságát, azaz a csepp méretét egy adott rendszerben. Az alábbi számítással meghatározható, mekkora egy adott rendszerben az az optimális cseppméret, amely mellett a legstabilabb az emulzió. A számolás feltételezi, hogy a PEkat stabilizáló részecskék mérete és koncentrációja, illetve a diszpergált fázis koncentrációja állandó:

$$\gamma = \gamma_0 + (\gamma_\infty - \gamma_0) \frac{(D - r)^2}{D^2 + r^2}$$

A képletben γ_∞ a sík geometriájú, olaj-víz határfelületen mért felületi feszültség; γ_0 a minimális határfelületi feszültség HCPM cseppborítottság esetén; D a csepp átmérője HCPM borítottság esetén; r pedig a stabilizáló részecskék átmérője. Az 5. ábra kiválóan szemlélteti az optimális cseppméretet, ahol a legkisebb a határfelületi feszültség és stabil az emulzió.



5. ábra: Ideális cseppméret – optimális határfelületi összefüggést leíró függvény, HCPM cseppborítottság esetén. A számolási eredmény és a kép forrása: *McClements, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. Soft Matter 2012, 8, 1719-1729.*

A cseppméretet az emulgeálási energiával is változtatni tudjuk. Elméletileg a nagyobb emulgeálási energia kisebb részecskeméretet eredményez, ám ez a gyakorlatban nem mindig figyelhető meg. Nagy emulgeálási energiát alkalmazva a részecskéknek nincs elegendő idejük kialakítani a cseppek felületén a HCPM réteget, ezáltal a cseppek még az emulgeálás során összefolynak, így a valós cseppméret jelentősen nagyobb lesz, mint az elméletileg elérhető¹²⁶. Emiatt nincs egységes összefüggés az emulgeálási energia és a kialakult, végső PE cseppméret között, az optimális körülményeket kísérleti, tapasztalati úton határozzák meg az egyes rendszerekre.

1.4.4. Stabilizáló részecskék típusai

Annak érdekében, hogy kívánt tulajdonságokkal rendelkező PEkat tudjunk készíteni, fontos a stabilizáló részecskék helyes megválasztása, mivel azok mérete, alakja, érdessége, nedvesedési szöge és kémiai összetétele mind befolyásolja a PEk tulajdonságait. Az előző

fejezetekben egyértelműen leírtuk, hogyan hat a részecskék mérete és a nedvesedési szöge az emulziók paramétereire, ezért ezek tárgyalásától ebben a fejezetben eltekintünk.

Ahogy azt a korábbiakban is írtuk, a PEk termodinamikai sajátosságait és egyéb tulajdonságait leíró elméletek ideális körülményekre vonatkoznak, azaz szabályos gömb alakú és sima felületű részecskékre. A gyakorlatban azonban stabilizáló ágensként nagyon sok olyan anyagot alkalmaznak, amelyek alakja eltér az ideális gömbtől, ilyenek például a lemezes szerkezetű agyagásványok¹⁵¹, a rúd alakú szén nanocsövek¹⁵², a lineáris polimerláncokból álló kitozán¹⁵³ vagy a különböző fehérjék¹⁵⁴. Ezekben az esetekben nagyon nehéz előre tervezni vagy megjósolni a PEk tulajdonságait, általában kizárólag tapasztalati úton vonhatók le a PEk fizikai kémiai paramétereire vonatkozó összefüggések.

A részecske alakja mellett az érdesség is szerepet játszik a PEk cseppméretének és stabilitásának alakulásában. Adriana San-Miguel és szerzőtársa speciális eljárással, szisztematikusan változtatták a PEkat stabilizáló nanorészecskék érdességét, és megvizsgálták, hogyan hat az érdesség változtatása a határfelületi adszorpcióra¹⁵⁵. Munkájuk során vizsgálták a részecskék nedvesedési szögének hiszterézisét és a fellépő maximális kapilláris nyomást. Utóbbi leírja a maximális nyomást két folyadék határfelülete, azaz jelen esetben a csepp felülete és a folytonos fázis között, amelyből az emulzió cseppállandóságára tudnak következtetni¹⁵⁶. Eredményeik alapján egyértelműen arra jutottak, hogy az érdesség negatívan befolyásolja a nedvesedést és a határfelületi adszorpciót, ezáltal az emulziók stabilitását. A jelenség oka valószínűleg a nagymértékű nedvesedési szög hiszterézisnek tulajdonítható, amely akár 60° is lehet egyetlen részecskén belül. A nagymértékű nedvesedési szög hiszterézis befolyásolja a részecskék és a folyadékok között fellépő maximális kapilláris nyomást, amely felelős a stabilitásért^{157,158}. Az érdesség növekedésével a maximális kapilláris nyomás csökken, amely az emulzió instabilitásához, koaleszcenciához vezet.

A PEt stabilizáló részecskék sűrűsége is hatással van a cseppállandóságra. A Stokes által definiált eloszlási állandósági törvényt felírva láthatjuk, hogy a két fázis szétválásának, azaz a cseppek koaleszcenciájának a sebességét (v_{Stokes}) nagymértékben meghatározza az olajos (ρ_o) és vizes fázisok (ρ_v) közötti sűrűség különbség¹⁵⁹:

$$v_{Stokes} = - \frac{2gr^2(\rho_v - \rho_o)}{9\eta_v}$$

Ha pontosan ismerjük az alkalmazni kívánt részecsekék méretét, tömegét és sűrűségét, akkor egyszerű geometriai megközelítéssel kiszámítható, hogy egy adott méretű csepp HCPM borítottság mellett mekkora térfogatú és sűrűségű lesz. Az adatokat a Stokes

eloszlási állandóságát leíró egyenletbe behelyettesítve pedig megjósolható a rendszer cseppállandósága, azaz kinetikai stabilitása. A képletből látszik, hogy a fentiekén kívül a cseppek mérete (r) és a folytonos közeg viszkozitása (η_v) is fontos tényező, azonban ha ezeket az értékeket állandónak tekintjük, akkor számítással előrejelezhető a PEk stabilitása, különböző részecskéket alkalmazva.

1.4.5. Pickering emulziókat stabilizáló szilika nanorészecskék

A PE stabilizálására számos szilárd részecske alkalmas, lehet szerves vagy szervetlen anyag is, a teljesség igénye nélkül például természetes agyagásványok¹⁶⁰, polimerek¹⁶¹, fehérjék¹⁶², cellulóz¹⁶³, keményítő¹⁶⁴ vagy szilika¹⁶⁵.

A szilika nanorészecskék [SNk] széles körben elterjedtek a gyógyszertechnológiában, többek között a topikális terápiában is alkalmazzák őket kedvező tulajdonságaik miatt, mivel biokompatibilisek¹⁶⁶ és csak rendkívül nagy koncentrációban toxikusak ($c < 10\text{g/ttkg}$)¹⁶⁷. A SNk a PEk stabilizáló ágenseként is remek alternatívát kínálnak, mivel méretük és hidrofil-lipofil jellegük a szintézisük körülményeivel befolyásolható.

Elsőként Stöber, Fink és Bohn végezte el a SNk szisztematikus szintézisét 1968-ban¹⁶⁸, amely a mai napig alapjául szolgál a SNk előállításának, így az ezzel a módszerrel készített részecskéket Stöber szilikának is nevezik. A részecskék előállítása ún. szol-gél átalakulással történik, melyben a szilanol vegyületek katalitikus hidrolízise, majd kondenzációja és polimerizációja játszódik le. A reakció mechanizmusa meglehetősen összetett, a monomer addíciós^{169,170} és aggregációs növekedési modellen¹⁷¹, illetve ezek kombinációján alapul.

Az eredeti Stöber szintézisben¹⁶⁸ a szabályos gömb alakú SNk előállítását különböző szilanol származékokkal végezték (tetra-metil-szilán, tetra-etil-szilán, tetra-n-propil-szilán, tetra-n-butil-szilán és tetra-n-pentil-szilán), ammónia katalizálta reakcióban, szobahőmérsékleten. A reakcióközeg minden esetben különböző alkohol (metanol, etanol, n-propanol, n-butanol) és víz megfelelő arányú elegye volt. A SNk előállításának első lépéseként a komponenseket összekeverték, majd az ammóniát gázhalmazállapotban adták az elegyhez. A szintézisek időtartama a reakcióelegy opálosodásának kezdetétől függ, amely néhány perctől akár 2 óráig is terjedhet. Kísérleteik során a következő eredményekre jutottak:

- a reakció megindulását, azaz a szol-gél átalakulást az elegy opálosodása jelzi.
- a víz mennyiségének túlzott növelése kedvezőtlenül befolyásolja a szintézist, mivel aggregáció és flokkuláció mehet végbe a szilika részecskék között.
- nagyobb szénatomszámú alkoholok esetén lassabban megy végbe a reakció, illetve nagyobb méretű részecskék keletkeznek, míg alacsonyabb szénatomszámú alkoholoknál a reakció gyorsabban lejátsszódik, a részecskék kisebbek lesznek.
- nagyobb szénatomszámú szilanolok alkalmazásakor nagyobb méretű részecskék jöttek létre, lassabb reakciósebesség mellett, míg a kisebb szénatomszámú szilanolok esetében a reakció gyorsabban megy végbe, és a részecskék mérete is kisebb.
- az ammónia, mint katalizátor mennyisége befolyásolja a részecskék méretét és alakját, nagyobb koncentráció mellett nagyobb részecskék keletkeznek, ezért egy bizonyos koncentráció érték fölött aggregálódást okoz, alkalmazása nélkül viszont alakatlan részecskék jönnek létre.
- a részecskeméret 0,05-2 μm között alakult.

Green és kutatócsoportja¹⁷² a Stöber szintézist tetra-etil-szilán prekuzorral ($c=0,5 \text{ mol/dm}^3$) végezte el, a reakció közege metanol, etanol és propanol volt. A katalizátor szintén ammónia volt, azonban vizes oldat formájában adták a reakcióelegyhez ($c=0,01-0,1 \text{ mol/dm}^3$). Stöberékhez hasonlóan arra a megállapításra jutottak, hogy a reakció közegét biztosító alkohol szénatomszámának növekedésével a végső részecskeméret is nagyobb lesz. Továbbá, hogy $0,01 \text{ mol/dm}^3$ ammónia koncentráció alatt nem keletkeznek részecskék.

Plumeré és kollégái¹⁷³ vizsgálták, hogyan hat a reakció hőmérsékletének változtatása a kialakuló részecskeméretre. Munkájuk során szintén tetra-etil-szilánnal (vagy tetra-etoxi-szilán, [TEOS]) dolgoztak ($c=0,16-0,26 \text{ mol/dm}^3$) és ammónia oldatot használtak katalizátorként ($c=0,41-0,58 \text{ mol/dm}^3$). A hőmérsékletet $25-75 \text{ }^\circ\text{C}$ között változtatva azt találták, hogy a reakció hőmérsékletének növekedésével a részecskeméret csökken ($d=755-100 \text{ nm}$). A részecskék polidiszperzitási indexe 45°C hőmérséklet értékig szintén csökkent, azonban e felett a hőmérséklet felett növekedni kezdett, és a pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján jól látható volt a részecskék aggregációja. Rahman kutatócsoportjának¹⁷⁴, illetve Kim és kollégáinak¹⁷⁵ kísérleti eredményei is ugyanezt támasztották alá, annak ellenére, hogy eltérő TEOS és ammónia koncentrációval dolgoztak. Eredményeik alapján $25-80^\circ\text{C}$ közötti reakcióhőmérséklet emelkedés esetén a részecskeméret csökken, azonban 55°C felett a polidiszperzitási index növekszik. Rahman-ék $0,13-1,65 \text{ mol/dm}^3$ TEOS és $0,78-5,27 \text{ mol/dm}^3$ ammónia koncentrációval dolgoztak, az általuk előállított SNk mérete $40-160 \text{ nm}$ között alakult. Kim kutatócsoportjának kísérletei során a TEOS és ammónia

koncentrációját is állandó értéken tartották, ami $0,5 \text{ mol/dm}^3$ illetve $0,2 \text{ mol/dm}^3$ volt, a szintetizált SNk mérete 35-330 nm között alakult.

A víz koncentrációja szintén meghatározó tényező a kialakuló SNk méretének szempontjából. Lindberg és kollégái¹⁷⁶, továbbá Zukoski és kollégái¹⁷⁷ $0,5-17 \text{ mol/dm}^3$ víz koncentráció érték között az alábbi tendenciát figyelték meg: a részecskeméret csökken, ha a koncentráció $9-0,5 \text{ mol/dm}^3$ érték között csökken, azonban a részecskeméret növekedni kezd 9 mol/dm^3 érték felett. Zukoski-ék $80-800 \text{ nm}$ közötti SNket állítottak elő TEOSból, az ammónia és TEOS molarányát állandó értéken tartva ($c\text{TEOS}=0,1-0,5 \text{ mol/dm}^3$). Lindberg és kollégái $70-640 \text{ nm}$ méretű SNket állítottak elő $0,1-0,4 \text{ mol/dm}^3$ TEOS és $0,2-2 \text{ mol/dm}^3$ ammónia koncentráció esetén. Nagyobb víz koncentrációval egyébként is ritkán dolgoznak a Stöber reakciókban, mivel a víz koncentrációjának túlzott növelése csökkenti a szilanolok oldhatóságát, ezáltal csökkenti a reakció kitermelését és a növeli a reakció idejét¹⁷⁴.

A fentiekből jól látszik, hogy a reakció minden egyes paraméterét rendkívül körültekintően kell megválasztani ahhoz, hogy kívánt méretű és morfológiájú részecskét kapjunk.

A SNk felülete rendkívül hidrophil a felületi szilanol csoportok jelenléte miatt¹⁷⁸, ezért PE stabilizáló ágensként történő alkalmazásuk esetén szükséges elvégezni a felületi módosításukat, hogy megfelelő hidrophil-lipofil felületi tulajdonsággal rendelkezzenek (ld. *1.4.4 fejezet*). A SNk utólagos felületi módosítását egységesen az alábbiak szerint végzik el^{179,180,181}. A SN szintézis végeztével a reakcióelegyhez hozzáadják a kívánt funkciós csoportot tartalmazó szilanol származék alkoholos oldatát (az alkohol egyezik a reakció során alkalmazottal), majd a reakcióelegyet legalább 6 órán át kevertetik. A reakció végeztével a SNket feldolgozzák, az esetlegesen el nem reagált felületi módosító ágenszt mosással eltávolítják.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkám során olyan PEk előállítására törekedtünk, amelyek alkalmasak lehetnek illóolajok és lipofil HA formulálására, azok topikális alkalmazására. A megfelelő gyógyszerhordozó rendszerek előállítása során figyelni kell arra, hogy a PEk stabilitása és cseppmérete mindig az alkalmazásnak megfelelő legyen, továbbá segítségükkel célzott HA leadás legyen elérhető. A PEk megfelelő fizikai kémiai tulajdonságainak eléréséhez első lépésben méretpontos szilika nanorészecske szintézis elvégzését, majd azok felületmódosítását tűztük ki célul; az így elkészült szilika nanorészecskék felhasználhatók PEk stabilizálására.

A nanotechnológia egyre nagyobb térhódítása miatt a mai napig több kutatócsoport dolgozik azon, hogy megfelelő tulajdonságú, lehetőség szerint 200 nm részecskeméret alatti, monodiszperz méreteloszlású és szabályos gömb alakú Stöber szilikát tudjanak előállítani, minél nagyobb reprodukálhatóság mellett. Feldolgozva számos publikációt a témában megállapítottuk, hogy jelenleg nem áll rendelkezésre olyan közlemény, amely lehetővé teszi a SNk méretpontos szintézisét. Ez alatt azt értjük, hogy nincs olyan szisztematikus vizsgálat és eredmény, amely alapján a kívánt SN részecskemérethez kapcsolódóan ki tudnánk választani a reakció egyes paramétereit, és reprodukálhatóan szintetizálni azt. Ezért *kutatómunkám során célul tűztem ki szisztematikus SN szintézis megvalósítását és gyakorlati alkalmazhatóságának, reprodukálhatóságának vizsgálatát.* A kísérletek paramétereinek tervezéséhez a jelenleg rendelkezésre álló kutatási eredményeket használtam fel.

Mivel a formulálni kívánt illóolajok és lipofil HA fizikai kémiai tulajdonságai (sűrűség, viszkozitás, felületi feszültség) esetenként jelentősen különböznek, ezért *empirikus úton határozzuk meg, hogy milyen méretű és felületi tulajdonságú részecskékkel történjen a PEk stabilizálása.*

Kamilla és fehérüröm illóolaj formulálását tervezzük elvégezni, és a PEkat mikrobiológiai vizsgálatokra felhasználni. A mikrobiológiai kísérletek célja többek között a PE formuláció antibakteriális és antifungális hatásának vizsgálata, melyhez Gram negatív, Gram pozitív baktériumokat, továbbá sejtes és fonalas gombákat is felhasználunk. Továbbá vizsgálni kívánjuk, milyen hatása van a PEknak a bakteriális és fungális biofilm degradációjára. *A lehetséges hatásmechanizmus felderítése érdekében célul tűztük ki a PEk és sejtmodell kölcsönhatásának vizsgálatát.* A PE forma mellett, HE és etanolos

oldatokat is vizsgálunk minden egyes kísérletben, az egyes formák hatásának összehasonlíthatósága érdekében.

A fogászati biofilmek helyi kezelését tűztük ki további célul. Ahogy azt a bevezetőben is írtuk, a biofilmek kezelésére szánt szájvizek szerves oldószereket és felületaktív anyagokat tartalmaznak, melyek nem kívánt mellékhatások okozói lehetnek¹⁸². Ezeknek a segédanyagoknak a használata kiküszöbölhető, ha PE formát alkalmazunk. A PE tulajdonságait tárgyalva láthattuk, hogy a cseppméretük változtatható, segítségükkel célzott HA leadás érhető el, amely fogászati biofilmek kezelésénél is előnyös lehet¹⁸³. ***Figyelembe véve a Streptococcus mutans fogászati biofilm fizikai kémiai tulajdonságait, annak kellemtelen mellékhatások nélküli kezelésére, a 0,3 µm méretnél kisebb cseppmérettel rendelkező, olaj a vízben típusú PEk megoldást jelenthetnek. A PE formuláláshoz négy illóolajat választottunk, melyek mindegyike bizonyítottan rendelkezik antibakteriális és biofilm degradációs hatással:*** borsmenta¹⁸⁴, (*Mentha x piperita* L.), fahéj¹⁸⁵ (*Cinnamomum verum* J. Presl.), kakukkfű¹⁸⁶, (*Thymus vulgaris* L.) és szegfűszeg¹⁸⁷, (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. és Perry.). A biofilm degradációját *Streptococcus mutans* baktériumon kívánjuk tesztelni. ***A mikrobiológiai vizsgálatok mellett in vitro diffúziós vizsgálatokat is tervezünk elvégezni, melyben modell biofilm membránnal dolgozunk.*** Modell biofilm membránként agar gélt választottunk, mivel annak hidrofil jellege és tortuózus porózus szerkezete a *S. mutans* biofilm tulajdonságaival nagymértékben megegyezik^{188,189}. A PE forma mellett HEkat és etanos oldatokat is vizsgálunk minden egyes kísérletben, az egyes formák hatásának összehasonlíthatósága érdekében.

A másik, szintén topikális terápiára szánt PE formulációt körömgomba kezelésére szánjuk, mely azol származék és illóolaj kombinációját tartalmazza, amellyel várhatóan elérhető a bevezetőben említett antifungális szinergista hatás. Kísérleteinkhez az azol származékok közül tiokonazol [TIO] választottuk, mivel széles spektrummal rendelkező antifungális HA, amelyet a köröm gombás fertőzéseinek a kezelésére is alkalmaznak¹⁹⁰. Nenoff és kollégái megállapították, hogy a teafa illóolaj (*Melaleuca alternifolia* illóolaj [MA]) gátolja számos klinikailag izolált gomba szaporodását, ezért javaslatot tettek annak topikális antifungális terápiában való alkalmazására¹⁹¹. ***Az olaj a vízben típusú PE, mint gyógyszerforma alkalmazása lehetővé teszi a TIO és MA kellő mennyiségben történő penetrációját a körömlemezen keresztül. Továbbá ha a PE cseppméretét megfelelően alakítjuk, a csepp átdiffundálhat a pórusos körömlemezen, ezáltal eléri a fertőzés valódi helyét, a körömágybőrt. A célzott HA leadást in vitro diffúziós vizsgálatokkal tervezzük***

vizsgálni, melyben modell körömlemez membránt, és kompozit membránt egyaránt használunk. A megfelelő PEk formulálásán és jellemzésén kívül, elvégezzük azok mikrobiológiai vizsgálatát Candida albicans és Trichophyton rubrum ellen, amelyek a körömgomba megbetegedésért leginkább felelős gombafajok¹⁰⁰. A PE forma mellett HEkat és etanolos oldatokat is vizsgálunk minden egyes kísérletben, az egyes formák hatásának összehasonlíthatósága érdekében.

Kísérleteinktől és eredményeinktől összességében azt várjuk, hogy sikerül olyan illóolaj és lipofil HA tartalmú PEk előállítását elvégezni, melyek tulajdonságaiknál fogva nem irritatívak, stabil formulációt eredményeznek és hosszú távon is alkalmazhatók topikális terápiában.

3. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Szilika nanorészecskék szintézise, felületmódosítása és vizsgálata

3.1.1. Szilika nanorészecske szintézis és felületmódosítás során felhasznált vegyszerek és eszközök

Tetra-etoxi-szilán [TEOS] (Alfa Aesar Ltd., tisztaság 98%), metil-trietoxi-szilán [MTES] Alfa Aesar Ltd., tisztaság 98%), etil-trietoxi-szilán [ETES] (Alfa Aesar Ltd., tisztaság 99%), propil-trietoxi-szilán [PTES] (Alfa Aesar Ltd., tisztaság 97%), fenil-trietoxi-szilán [FTES]) Alfa Aesar, tisztaság 98%). Abszolút alkohol (VWR Kft., tisztaság $\geq 99.8\%$), 28 m/m% ammónia oldat (VWR Kft.), utóbbit minden esetben 10 m/m% koncentrációjára hígítottam a felhasználás előtt. A szintézisekhez ultratiszta vizet használtam, melynek vezetőképessége $< 5 \mu\text{S}$ (Membrapure Astacus víztisztító UV kezelőfejjel ellátva, Membrapure GmbH). A TEOS-t minden szintézis előtt frissen desztilláltam, a desztillátumot $75-80^\circ\text{C}$ között gyűjtöttem, a desztilláció során alkalmazott vákuum érték 4 mbar volt. A reakciók reprodukálhatóságának érdekében minden egyes kísérlethez ugyanolyan geometriájú üvegcséket (mennyiségtől függően 8, 40 ml vagy 250 ml-es menetes üveg, Vialab Kft.) mágnesbotot (átmérő: 6/10/12 mm, hossz: 20 mm, PTFE bevonat, VWR Kft.) és mágneskeverőt (IKA Combimag RCO, IKA Werke GmbH) használtam.

3.1.2. Szilika nanorészecskék szintézise és felületmódosítása

A szilika nanorészecskék (SNk) szintézise TEOS etanos közegben végzett hidrolízisével történt, ammónium-hidroxid katalizátor jelenlétében. A TEOS koncentrációja minden esetben állandó volt, $c=0,26 \text{ mol/dm}^3$. A reakció hőmérsékletét, illetve az ammónia és a víz koncentrációját szisztematikusan változtattam az alábbiak szerint:

- változó ammónia koncentráció $0,29-0,097 \text{ mol/dm}^3$ érték között, állandó víz koncentráció 5 mol/dm^3 , hőmérséklet 25°C
- változó víz koncentráció $2-5 \text{ mol/dm}^3$ érték között, állandó ammónia koncentráció $0,29/0,194/0,097 \text{ mol/dm}^3$, hőmérséklet 25°C
- változó hőmérséklet $25-50^\circ\text{C}$ között, állandó ammónia koncentráció $0,29/0,194/0,097 \text{ mol/dm}^3$, állandó víz koncentráció 5 mol/dm^3

Első lépésben elkészítettem a víz, alkohol és TEOS elegyét, és állandó hőmérsékleten kevertettem 15 percig, majd ultrahangos vízfürdőbe helyeztem további 15 percre (Bandelin Sonorex RK 52H, BANDELIN Electronic GmbH). Ezt követően folyamatos kevertetés mellett hozzáadtam a megfelelő mennyiségű ammónium-hidroxid oldatot. A reakcióelegy

24 órán át keveredett 1000 rpm fordulatszámom, állandó hőmérsékleten. A szintézis végeztével, további felhasználásig a SNekeket tartalmazó anyalúgot szobahőmérsékleten tároltam, mivel korábbi tapasztalataink azt mutatták, hogy ilyen körülmények között aggregáció, illetve méret- vagy morfológiaváltozás nélkül hónapokig eltarthatók. Minden kísérletet legalább háromszor ismételt meg. A reakciók kitermelését a *9.1. számú mellékletben* leírtak alapján számoltam ki.

A SNk felületmódosítását különböző szilanol (MTES, ETES, PTES, FTES) származékokkal végeztem el. Annak érdekében, hogy a felületmódosítás jól szabályozható és lehetőség szerint minél jobban reprodukálható legyen, minden egyes kísérlet előtt egyszerű, geometriai megközelítéssel kiszámoltuk, hogy a kívánt felületi borítottság (%) eléréséhez, hány mól szilanol származékra van szükség. A számítás egyszerűsége és a dolgozat véges terjedelme miatt a számolás menete a *9.2 számú mellékletben* olvasható. A felületmódosításhoz adott mennyiségű szilanol származékot abszolút alkoholban oldottam, az oldatot 5 percre ultrahangos fürdőbe helyeztem, majd folyamatos kevertetés mellett (1000 rpm) hozzáadtam a SNekeket tartalmazó szuszpenzióhoz. A reakcióelegyet 6 órán át kevertettem (1000 rpm) szobahőmérsékleten (25°C), majd a reakció végeztével 50°C-ra melegítve, folyamatos kevertetés mellett elpárologtattam belőle az ammóniát. Az így elkészült módosított SN szuszpenziók aggregáció, illetve méret- vagy morfológiaváltozás nélkül hónapokig eltarthatók.

3.1.3. Méretpontos szilika nanorészecske szintézis – Statisztikai módszer

Microsoft Excel[®] program segítségével elemeztük a kísérleti eredményeket, melynek célja volt, hogy összefüggéseket keressünk a SN szintézis reakció körülményei és a kapott részecskeméret között; és vizsgáltuk, hogy a kapott összefüggések alapján méretpontosan tervezhető-e a SN szintézis.

A SN szintézis körülményei és a kialakult részecskeméret közötti összefüggéseket lineáris regresszió segítségével kerestük. A modellek illeszkedésének megállapításához meghatároztuk a lineáris regressziós együtthatót (R_2), és megvizsgáltuk az egyes modellek konfidencia intervallumait, hogy meghatározzuk a modellek által készített előrejelzés pontosságát. A statisztikai elemzéshez legalább három párhuzamos kísérlet eredményéből számított részecskeméret átlagát és szórás értékeit használtuk fel. A statisztikai eredmények segítségével további kísérleteket terveztünk és vizsgáltuk a gyakorlati alkalmazhatóságát.

3.1.4. Részecskeméret meghatározás - Dinamikus fényszórás mérés és transzmissziós elektronmikroszkópai vizsgálat

Az SNk részecskeméretét és részecskeméret eloszlását dinamikus fényszórás méréssel [Dynamic Light Scattering=DLS] vizsgáltam alkoholos és vizes közegű szuszpenzióban egyaránt (Malvern Zetasizer Nano S, Malvern Panalytical Ltd.). A méréseket autokorrelációs üzemmódban végeztem, egyszer használatos, eldobható polisztirol küvettákat használva (optikai úthossz 10 mm, térfogat 4,5 ml, VWR Kft.). A DLS mérésekkel meghatározott eredmények alátámasztásának érdekében, illetve a SNk alakjának meghatározása miatt transzmissziós elektronmikroszkópai [TEM] vizsgálatokat is végeztem (JEM 1200 EX II, JEOL Ltd.). A vizsgálatokhoz a SN szuszpenziókat legalább 100-szorosra hígítottam etanollal, majd ún. TEM gridekre, speciális mintatartó lemezekre cseppentettem és vákuum alatt, szobahőmérsékleten szárítottam őket 2 órán át. A TEM gridek speciális, karbon bevonattal ellátott réz mintatartók voltak, 200-as vagy 400-as hálósűrűséggel (Micro to Nano Ltd.). A TEM felvételek a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában készültek, Prof. Dr. Seress László segítségével.

3.1.5. Felületmódosítás vizsgálata - Infravörös spektroszkópia

Az infravörös spektroszkópai [IR] vizsgálatokhoz Shimadzu FT-IR-8400 S (Shimadzu Corp.) készüléket használtam, DR800A diffúz reflektancia mérésre alkalmas egységgel. A spektroszkópai mérésekhez a SNket tartalmazó anyalúgból először 50°C-on elpárologtattam az ammóniát, majd a szuszpenziót centrifugáltam (15 000 rpm, 40 perc) és ultratiszta vízzel háromszor mostam, illetve a tisztítási lépések között centrifugáltam. Az így kapott szilárd anyagot 120°C-on szárítottam 48 órán át, majd a mintákat a mérésekig vákuum exsikkátorban tároltam (JEOL EM-DSC10E, JEOL Ltd). Az IR mérési paraméterek a következők voltak: pormintákat vizsgáltunk mintaelőkészítés nélkül; hullámhossz tartomány 400-4500 cm^{-1} ; szkennelési sebesség 5 nm/s; szkennelések száma 100; felbontás: 4 cm^{-1} ; referencia: mattított alumínium tükör.

3.2. Illóolajok formulálása mikrobiológiai vizsgálatokhoz

3.2.1. Kamilla és fehérüröm illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása

Munkám során kamilla (*Matricaria chamomilla*, Aromax Kft.) és fehérüröm (*Artemisia annua L.*, PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet, Sourav Das saját gyűjtése és desztillálása) illóolajokkal dolgoztam.

A formulálás során alkalmazott illóolaj koncentrációk 0,1-3,5 mg/ml értékek között változtak. Kamilla illóolaj esetén a PEk stabilizálásához 20 nm méretű és 40%-ban propil funkciós csoporttal módosított SNket [40PET], illetve fehérüröm illóolaj esetén 20%-ban propil funkciós csoporttal módosított SNket [20PET] használtam, mivel előkísérleteim során ezek bizonyultak megfelelő stabilizáló ágensnek (az előkísérletek körülményeit és eredményeit lásd a 9.3. számú mellékletben). A SNk koncentrációja a kísérletek során állandó volt, 1 mg/ml.

Az emulgeálás két lépésben történt: az előemulgeálás során az illóolajok és SN szuszpenziók elegyét ultrahangos vízfürdőbe helyeztem 2 percre (Bandelin Sonorex RK 52H, BANDELIN Electronic GmbH), majd az így kapott emulziót tovább emulgeáltam UltraTurrax segítségével (IKA Werke T-25 basic, IKA Werke GmbH) 2 percig 13 500 rpm fordulatszámon. Az elkészült PEkat további felhasználásig szobahőmérsékleten (25°C), fénytől elzárt helyen tároltam. Minden formulálást legalább háromszor ismételt meg.

3.2.2. Pickering emulziók vizsgálata – Cseppméret, emulzió típusa, stabilitás

Vizsgáltam, hogyan változik az PEk cseppmérete és stabilitása az illóolaj koncentráció függvényében. A PEk cseppméretét DLS méréssel határoztam meg. A méréseket autokorrelációs üzemmódban végeztem és kvarc küvettát használtam (optikai úthossz 10 mm, térfogat 3,5 ml, Hellma Analytics Ltd). Az emulziók stabilitását szintén DLS méréssel határoztam meg, időben követve a cseppméret esetleges változását, továbbá megfigyeltem, hogy időben változik-e a PEk külleme. Az emulziókat stabilnak tekintetem, amennyiben cseppméretük legalább 1 hétig nem változott, továbbá nem lépett fel aggregáció vagy részecskék ülepedése, és fázisszeparáció sem volt tapasztalható.

Az emulziók típusát vezetőképesség mérésekkel határoztam meg, Mettler Toledo Seven2Go S3 konduktométer és InLab® 738-ISM vezetőképességi elektród segítségével (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Germany). A vizsgálatokhoz összehasonlításként minden esetben megmértem a különböző SN vizes szuszpenziók, illetve az illóolajok vezetőképességét is.

3.2.3. Pickering emulziók és sejtmembránok közötti kölcsönhatás vizsgálata sejtmoddellen

Sejtmoddellként 3,5 μm átmérőjű, unilamelláris liposzómákat készítettem Alexander Moscho és munkatársainak munkássága nyomán, foszfatidil-kolin felhasználásával (Phospolipon 90G, Phospholipid GmbH). A foszfatidil-kolint kloroformban (tisztaság $\geq 98\%$, VWR Kft.) oldottam fel 0,1 mol/dm³ koncentrációban, majd az oldatból 150 μl mennyiséget adtam 6 ml kloroform és 1 ml metanol (tisztaság $>99\%$, VWR Kft.) elegyéhez. Az oldatot cseppenként adagoltam 40 ml PBS pufferhez folyamatos kevertetés mellett (600 rpm). Az oldószereket rotációs vákuumbepárlón távolítottam el 40°C-on (Heidolph Laborota 4000, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Germany). Az üledéket 25 ml PBS pufferben szuszpendáltam majd további felhasználásig hűtőszekrényben, 6-8°C között tároltam.

A sejtmoddelles vizsgálatoknál célunk volt különböző formulációkat összehasonlítani, így készítettem HEkat Tween80[®] felületaktív anyaggal (Polysorbate80, Acros Organics Ltd.), illetve etanolos oldatokat is. A formulációkban az illóolajok koncentrációja azonos volt, a HEk Tween80[®] tartalma megegyezett az PEk SN tartalmával, ami 1 mg/ml. A hagyományos emulziók emulgeálásánál a paraméterek a PEk előállításával teljesen egyeztek (ld. 3.2.1 fejezet).

A sejtmoddelles vizsgálatokhoz 5 ml unilamelláris liposzómát tartalmazó szuszpenzióhoz 3 ml mintát adtam. A keveréket 600 rpm fordulatszámon kevertetem 24 vagy 48 órán át 37°C vagy 30°C-on, így a mérési körülmények megegyeztek a kamilla és fehérüröm illóolaj mikrobiológiai vizsgálatainak paramétereivel. 1 ml mintát vettem 1, 2 és 24 vagy 1, 2, 24 és 48 óra elteltével, majd a mintákat 3000 rpm fordulatszámon 20°C-on centrifugáltam 5 percig. Az unilamelláris liposzómákat gyűjtöttem és abszolút etanolban feloldottam. A kamilla és fehérüröm illóolaj tartalmat UV-Vis spektrofotometriás méréssel határoztam meg (Jasco V-550 UV/VIS spektrofotométer), a kamilla illóolaj abszorpciós maximuma $\lambda_{\text{max}}=290$ nm, fehérüröm illóolaj esetén $\lambda_{\text{max}}=248$ nm volt. A spektrofotometriás mérésekhez vak mintákat is készítettem, illóolaj nélkül, azaz az unilamelláris liposzómákat elegyítettem SN szuszpenzióval, Tween80[®] oldattal vagy etanollal, a keverékekkel pedig ugyanúgy jártam el, mint az illóolaj tartalmú minták esetén, majd ezeket alkalmaztam a megfelelő illóolaj tartalmú minták mérése során referenciaként. Minden esetben három párhuzamos mérést végeztem.

3.2.4. Mikrobiológiai vizsgálatok

A mikrobiológiai vizsgálatokat PhD hallgató társam végezte, a vizsgálatok metodikájának leírása az ő PhD disszertációjának részét képezi, ezért részletes ismertetésére itt nem kerül sor. A leírások megtekinthetők a dolgozatban, melynek adatai a következők: *PTE Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola*, PhD hallgató *Sourav Das*, témavezető *Prof. Dr. Kőszegi Tamás*, a disszertáció címe '*Investigation of antimicrobial and cytotoxic action of plant extracts and essential oils*'. Továbbá angol nyelven is olvasható az alábbi publikációkban:

Sourav Das*, Barbara Horváth*, Silviya Šafranko, Stela Jokić, Aleksandar Széchenyi, Tamás Kőszegi: Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations. *Molecules* **2019**, *24*, 4321. *osztott első szerzők

Sourav Das*, Barbara Vörös-Horváth*, Tímea Bencsik, Giuseppe Micalizzi, Luigi Mondello, Györgyi Horváth, Tamás Kőszegi, Aleksandar Széchenyi: Antimicrobial Activity of Different Artemisia Essential Oil Formulations. *Molecules* **2020**, *25*, 2390. *osztott első szerzők

A mikrobiológiai vizsgálatok során az alábbi kórokozókkal dolgoztunk: *Escherichia coli* PMC 201, *Pseudomonas aeruginosa* PMC 103, *Bacillus subtilis* SZMC 0209, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* SZMC 0119, *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 38366, *Candida albicans* ATCC 1001, *Candida tropicalis* SZMC 1368, *Candida dubliniensis* SZMC 1470, *Candida krusei* SZMC0779. Meghatároztuk az illóolajok különböző formulációinak MIC₉₀ [minimális gátlási koncentráció=Minimum Inhibitory Concentration] és MEC₁₀ [minimális effektív koncentráció=Minimum Effective Concentration] értékét, továbbá mikrobiális oxidatív egyensúlyi vizsgálatokat, idő-halálozási kinetikai méréseket, a sejtek életképességének diszkriminatív vizsgálatát, illetve egyes gombafajok esetén biofilm degradációs kísérleteket végeztünk el.

3.3. *Streptococcus mutans* fogászati biofilm kezelése Pickering emulziókkal

3.3.1. Különböző illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása

Munkám során borsmenta (*Mentha x piperita* L.), fahéj (*Cinnamomum verum* J. Presl.), kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) és szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry) illóolajokkal (Aromax Kft.) dolgoztam. A formulálás során alkalmazott illóolaj koncentráció tartomány megfelelt az ún. csőhígítási eljárás során használt koncentráció tartománynak, amellyel a különböző illóolajok MIC értékét lehet meghatározni adott kórokozókra nézve. Az alkalmazott illóolaj koncentrációk ennek megfelelően 0,05-2,00 mg/ml értékek között változtak fahéj, kakukkfű és szegfűszeg olaj esetén, míg borsmenta olajnál 0,15-3,25 mg/ml között. A mikrobiológiai vizsgálatokat PhD hallgató társam végezte, a csőhígítási eljárás metodikájának leírása az ő PhD disszertációjának részét képezi, ezért részletes ismertetésére itt nem kerül sor. A leírások megtekinthetők az alábbi dolgozatban: *PTE Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola*, PhD hallgató *Balázs Viktória Lilla*, témavezetők *Dr. Horváth Györgyi*, *Dr. Krisch Judit*, a disszertáció címe: *Illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálata in vitro módszerekkel*. Továbbá angol nyelven is olvasható az alábbi publikációban: *Barbara Horváth**, *Viktória L. Balázs**, *Adorján Varga*, *Andrea Böszörményi*, *Béla Kocsis*, *Györgyi Horváth*, *Aleksandar Széchenyi*. Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 16611. *osztott első szerzők.

A PEk stabilizálásához 20 nm méretű és 20%-ban etil funkciós csoporttal módosított SNket [20ET], illetve fahéj illóolaj esetén 20 nm méretű hidofil [HS20] és 40%-ban etil funkciós csoporttal módosított SNket [40ET] használtam, mivel előkísérleteim során ezek bizonyultak megfelelő stabilizáló ágensnek (az előkísérletek paramétereit és eredményeit lásd az 9.4. számú mellékletben). A SNk koncentrációja a kísérletek során állandó volt, 1 mg/ml.

Az emulgeálás két lépésben történt: az előemulgeálás során az illóolajok és SN szuszpenziók elegyét ultrahangos vízfürdőbe helyeztem 2 percre (Bandelin Sonorex RK 52H, BANDELIN Electronic GmbH), majd az így kapott emulziót tovább emulgeáltam UltraTurrax segítségével (IKA Werke T-25 basic, IKA Werke GmbH) 2 percig 13 500 rpm fordulatszámon. Az elkészült PEkat további felhasználásig szobahőmérsékleten (25°C), fénytől elzárt helyen tároltam. Minden kísérletet legalább háromszor ismételt meg.

3.3.2. Pickering emulziók vizsgálata – Cseppméret, emulzió típusa, stabilitás

Vizsgáltam, hogyan változik az PEk cseppmérete és stabilitása az illóolaj koncentráció függvényében. A PEk cseppméretét DLS méréssel határoztam meg. A méréseket autokorrelációs üzemmódban végeztem és kvarc küvettát használtam (optikai úthossz 10 mm, térfogat 3,5 ml, Hellma Analytics Ltd). Az emulziók stabilitását szintén DLS méréssel határoztam meg, időben követve a cseppméret esetleges változását, továbbá megfigyeltem, hogy időben változik-e a PEk külleme. Az emulziókat stabilnak tekintetem, amennyiben cseppméretük legalább 1 hétig nem változott, továbbá nem lépett fel aggregáció vagy részecskék ülepedése, és fázisszeparáció sem volt tapasztalható.

Az emulziók típusát vezetőképesség mérésekkel határoztam meg, Mettler Toledo Seven2Go S3 konduktométer és InLab® 738-ISM vezetőképességi elektród segítségével (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Germany). A vizsgálatokhoz összehasonlításként minden esetben megmértem a különböző SN vizes szuszpenziók, illetve az illóolajok vezetőképességét is.

3.3.3. Biofilm degradációjának *in vitro* vizsgálata

A biofilmek készítését, vizsgálatát és kezelését PhD hallgató társam végezte, a vizsgálatok metodikájának leírása az ő PhD disszertációjának részét képezi, ezért részletes ismertetésére itt nem kerül sor. A leírások megtekinthetők a 3.3.1 fejezetben említett dolgozatban és publikációban.

3.3.4. *In vitro* diffúziós vizsgálatok modell biofilmen

Az *in vitro* diffúziós vizsgálatok során a minták illóolaj tartalma megegyezett az *in vitro* biofilm degradációs kísérletek során alkalmazott koncentráció értékekkel, azaz a MIC felével [MIC/2], melyet előzőleg csőhígítással módszerrel állapítottunk meg. A MIC/2 koncentráció értékek az alábbiak: borsmenta 0,98 mg/ml, fahéj 0,4 mg/ml, kakukkfű 0,20 mg/ml, szegfűszeg 0,51 mg/ml.

Mind a biofilm degradációs kísérletek, mind a diffúziós vizsgálatok során célunk volt összehasonlítani különböző formulációkat, így Tween80® felületaktív anyaggal stabilizált emulziókat, HEkat és etanos oldatokat is készítettünk. Az illóolajokat ebben az esetben is a fenti, MIC/2 koncentráció értékben alkalmaztuk, a Tween80® koncentrációja megegyezett a SNk koncentráció értékével, azaz 1 mg/ml volt. A HEk formulálása teljesen megegyezett a PE formulálásával (ld. 3.3.1 fejezet).

A biofilm modellen végzett diffúziós vizsgálatokat az *in vitro* biofilm degradációs kísérleteknek megfelelő, 37°C-os hőmérsékleten végeztem el. A vizsgálatokat statikus, vertikális Franz diffúziós cellákban végeztem (Hanson Microette Plus, Hanson Research 60-301-106), hat párhuzamos cellát alkalmazva, amely mintánként hat párhuzamos mérést eredményezett. A biofilm modell membrán 2,1 mm vastag 2 m/m%-os agar gél volt, melynek effektív penetrációs területe 2,54 cm². A Franz cella térfogata 7 ml, amely foszfátalt só oldat [Phosphated Buffer Saline=PBS puffer] receptor folyadékot tartalmazott (a PBS puffer készítését és pontos összetételét lásd a 9.5. számú mellékletben). A vizsgálandó minták térfogata 600 µl volt. A vizsgálat időtartama 6 óra volt, mintavétel az első fél órában, majd minden egész órában történt. A mintavételi térfogat 2 ml volt, melyet minden esetben pótoltam friss PBS pufferrel. A minták illóolaj tartalmát UV-Vis spektroszkópiai vizsgálattal határoztam meg (Jasco V-550 UV/VIS spektrofotométer, ABL&E-JASCO Magyarország Kft.).

A minták illóolaj tartalmának meghatározását az egyes olajok abszorpciós maximumának értékén végeztem el, melyek a következők: borsmenta $\lambda_{\max}=237$ nm, fahéj $\lambda_{\max}=292$ nm, kakukkfű $\lambda_{\max}=277$ nm, szegfű $\lambda_{\max}=281$ nm. A Tween80[®] felületaktív anyag abszorpciós maximum értéke $\lambda_{\max}=225$ nm, ezért abban az esetben, ahol a borsmenta hagyományos emulzióját vizsgáltam, a mérések kiértékelése során figyelembe kellett vennem, hogy az abszorpciós csúcsok átlapolódnak/összeadódnak. A borsmenta illóolajhoz tartozó abszorpciós értékek pontos meghatározását több-hullámhosszon végzett lineáris regresszió számításával végeztem el, OriginPro8[®] szoftverrel (OriginLab Corp.), melyhez előzetesen meghatároztam a Tween80[®] és a borsmenta illóolaj abszorpciós koefficienseinek értékét az abszorpciós maximumokhoz tartozó hullámhossz értékeken.

3.4. Körömgomba helyi kezelése teafa illóolajat és tiokonazol hatóanyagot tartalmazó Pickering emulzióval

3.4.1. Teafa illóolaj gázkromatográfiás analízise

3.4.1.1. Statikus gőztéranalízis szilárd fázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME)

A teafa illóolaj mintákat [MA] (*Melaleuca alternifolia* illóolaj, Tebamol®, BIO-DIÄT-BERLIN GmbH) 20 ml-es, szilikon/PTFE szeptummal lezárt 'headspace' üvegben vizsgáltuk. A minta statikus gőztéranalízise szilárdfázisú mikroextrakcióval történt, CTC Combi PAL típusú automata mintavevő alkalmazásával (CTC Analytics AG). A minta 5 perces 100°C-on végzett inkubálása után a 65 µm filmvastagságú StableFlex poli-dimetil-sziloxán/karboxen/divinil-benzol (CAR/PDMS/DVB) SPME szálát (Supelco Inc.) a minta gőzterébe juttattuk, az extrakciót 20 percig végeztük 100°C-on, majd a gázkromatográfiás készülék injektorába vittük, ahol deszorpció ment végbe 250°C-on, 1 percig. Az injektálás 'split' módban 1:90 split aránnyal történt. Végül a szálát nagy tisztaságú nitrogén gázban 250°C-on 15 percig tisztítottuk és kondicionáltuk.

3.4.1.2. Gázkromatográfia és tömegspektrometria (GC-MS)

Az analízist Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Agilent Technologies, Inc.) készülékkel, Supelco SLB-5MS kapilláris kolonnán (30 m × 250 µm × 0.25 µm) végeztük. A kolonna hőmérséklete egy 3 perces izoterm szakasz után 60-250 °C-ra emelkedett 8 °C/perc fűtési sebességgel, a végső hőmérsékletet 1 percig tartottuk. A vivőgáz nagy tisztaságú, 6.0 hélium, az áramlási sebesség 1,0 ml/perc (37 cm/s) volt, 'constant flow' módban. A tömegspektrometriás detektálás kvadrupól tömegszelektív detektorral (MSD) elektronionizációs módban (70 eV), teljes scan módban (41–500 amu, 3,2 scan/s) történt. Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent Technologies, Inc.) segítségével értékeltük ki. A komponensek azonosítása során a retenciós adatokat és tömegspektrumokat a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést a csúcs alatti terület normalizációjával végeztük el.

3.4.2. Tiokonazol oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban

3.4.2.1. Oldhatóság meghatározása a Hansen-féle oldhatósági paraméter segítségével

Miután elvégeztük az MA gázkromatográfiás analízisét, és megállapítottuk melyek a főkomponensei, elvégeztem a tiokonazol Hansen-féle oldhatósági paramétereinek számítását, melyhez az 5.0.11 Hansen Solubility Parameters in Practice (HSPiP) szoftverét

használtuk. Az angol betűszóból származó, ún. SMILES azonosítóját használtam fel a főkomponenseknek és a tiokonazolnak [SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification, azaz egyszerűsített, begépelhető molekula-leíró rendszer], melyeket a PubChem weboldal adatbázisából vettem. A Hansen-féle oldhatósági paraméter (δ) számításba veszi a molekulák között létrejövő lehetséges diszperziós (δ_d)-, poláris (δ_p)- és hidrogénkötés (δ_h) kölcsönhatásokat¹⁹².

$$\delta = (\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2)^{0.5}$$

Az oldhatósági paraméterek különbségeit, az ún. HSP különbséget ($\Delta\delta$) számoltuk, ha ennek az értéke 7 alatt van, a komponensek egymással elegyednek, egymásban oldódnak¹⁹³.

$$\Delta\delta = |\delta_{\text{oldószer}} - \delta_{\text{tiokonazol}}|$$

3.4.2.2. Tiokonazol kinetikai oldhatóságának meghatározása

A tiokonazol [TIO] (tisztaság $\geq 98\%$, Alfa Aesar GmbH) kinetikai oldhatóságát vízzel telített MAban oldószer addíciós módszerrel határoztam meg¹⁹⁴. A három párhuzamos kísérletet szobahőmérsékleten (25°C) végeztem el. Szuszpenziót készítettem 25,0 mg TIO és 500 μl MA keverékéből. Az MA térfogatát addig növeltem folyamatosan, amíg a szuszpenzióból valódi oldatot nem kaptam. A szuszpenzió állapotát, illetve a szuszpenzió-valódi oldat közötti átmenetet DLS méréssel és vizuális megfigyeléssel vizsgáltam. DLS mérés esetén manuális korrelációt alkalmaztam, amellyel a mérési paraméterek állandó értéken tarthatók, így a szuszpenzió-valódi oldat közötti átmenet egyértelműen megfigyelhető.

3.4.2.3. Teafa illóolaj és tiokonazol tartalmú Pickering emulziók formulálása

Első lépésben tiszta MAval dolgoztam, a PEK formulálásához különböző méretű, továbbá különböző funkciós csoporttal és változó felületi borítottságban módosított SNket használtam fel. Végeztem kísérleteket arra vonatkozóan, hogyan befolyásolja a SN koncentráció, illetve az emulgeálási energia változtatása a PEK cseppméretét és stabilitását. Minden kísérletet legalább háromszor ismételt meg. Tekintettel a dolgozat terjedelmére és a kísérletek mennyiségére, azokat a kísérleti körülményeket és eredményeket, amelyek nem hozták a várt eredményeket pl. stabilitásra vonatkozóan, a 9.6. számú mellékletben ismertetem részletesen. A továbbiakban a megfelelő fizikai kémia paraméterekkel rendelkező PEK előállításának módját foglalom össze.

MA és TIO MA 20 m/m% olajos fázis esetén is a PEK stabilizálásához három különböző, 20, 50 és 100 nm méretű, 20%-ban etil funkciós csoporttal módosított SNket

használtam fel [20ET20, 20ET50, 20ET100], mivel előkísérleteim során ezek bizonyultak megfelelő stabilizáló ágensnek. A SNk koncentrációja a kísérletek során állandó volt, 1 mg/ml. Az olajos fázisok koncentrációját 0,9-17,9 mg/ml érték között változtattam.

Az emulgeálás két lépésben történt: az elő emulgeálás során az illóolajok és SN szuszpenziók elegyét ultrahangos vízfürdőbe helyeztem 2 percre (Bandelin Sonorex RK 52H, BANDELIN Electronic GmbH), majd az így kapott emulziót tovább emulgeáltam UltraTurrax segítségével (IKA Werke T-25 basic, IKA Werke GmbH) 2 percig 13 500 rpm fordulatszámon. Az elkészült PEkat további felhasználásig szobahőmérsékleten (25°C), fénytől elzárt helyen tároltam. Minden formulálást legalább háromszor ismételt meg.

3.4.2.4. Pickering emulziók tulajdonságainak meghatározása – Cseppméret, emulzió típusa, stabilitás

A mérések során vizsgáltam, hogyan változik a PEk cseppmérete és stabilitása az olajos fázis koncentrációjának, illetve az emulziókat stabilizáló SNk méretének függvényében. Ahogy az a bevezetőben ismertetésre került, a PEk stabilitását számos tényező befolyásolhatja, többek között az olajos fázis fizikai kémiai paramétereinek változása. Emiatt meghatároztam, miként változik a MA dinamikus viszkozitása, ha 20 m/m% mennyiségben TIOt tartalmaz. A méréseket Ostwald-Fenske kapilláris viszkoziméterrel végeztem el, 25°C hőmérsékleten, három párhuzamos vizsgálattal.

A Pickering emulziók cseppméretét DLS méréssel határoztam meg. A méréseket autokorrelációs üzemmódban végeztem és kvarc küvettát használtam (optikai úthossz 10 mm, térfogat 3,5 ml, Hellma Analytics Ltd). Az emulziók stabilitását szintén DLS méréssel határoztam meg, időben követve a cseppméret esetleges változását, továbbá megfigyeltem, hogy időben változik-e a PEk külleme. Az emulziókat stabilnak tekintettem, amennyiben cseppméretük legalább 1 hétig nem változott, továbbá nem lépett fel aggregáció vagy részecskék ülepedése, és fázisszeparáció sem volt tapasztalható.

Az emulziók típusát vezetőképesség mérésekkel határoztam meg, Mettler Toledo Seven2Go S3 konduktométer és InLab® 738-ISM vezetőképességi elektród segítségével (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Germany). A vizsgálatokhoz összehasonlításként minden esetben megmértem a különböző SN vizes szuszpenziók, illetve a MANak és TIO MA 20 m/m% oldatnak a vezetőképességét is.

3.4.2.5. Pickering emulziók in vitro diffúziós vizsgálata körömmodellen

Az *in vitro* diffúziós vizsgálatoknál célunk volt különböző formulációkat összehasonlítani, így készítettem Tween80[®] felületaktív anyaggal stabilizált HEkat, illetve etanolos oldatokat is. A formulációkban az olajos fázis koncentrációja azonos volt, a hagyományos emulziók Tween80[®] koncentrációja megegyezett az PEk SN koncentrációjával, ami 1 mg/ml volt. A hagyományos emulziók emulgeálásánál a paraméterek a PEk előállításával teljesen egyeztek (ld. 3.2.1 fejezet).

Az *in vitro* vizsgálatokhoz 2,1 mm vastag, 6 m/m% agar gélt használtam (tisztaság >95%, VWR Kft.), illetve az agar gélt kombináltam 0,8 mm vastag cellulóz-acetát membránnal (Membranfilter Porafil, Macherey-Nagel GmbH&Co., pórusméret 0.2 µm). Mindkét membrán effektív penetrációs területe 2,54 cm² volt. Az agar gélt minden egyes vizsgálat előtt frissen készítettem el az alábbi módon. Az agar port ultratiszta vízben diszpergáltam, majd a keveréket folyamatos kevertetés közben melegítettem és forraltam, egészen addig, amíg az agar teljesen fel nem oldódott. A még forró agar oldat 10 ml-ét 2,1 mm magas műanyag edénybe öntöttem, és szobahőmérsékleten hagytam teljesen kihűlni, illetve gélesedni. A gélesedést követően az agar gélt PBS pufferben áztattam egy éjszakán át. Végül saját készítésű eszközzel kivágtam és a 3,5 cm² méretű membránt és a Franz cella donor részére helyeztem. A cellulóz-acetát membránt szintén minden mérés előtt beáztattam PBS pufferbe, legalább 1 éjszakán át, szobahőmérsékleten.

A diffúziós vizsgálatokat statikus, vertikális Franz cellában végeztem 32°C-on, hat cellát párhuzamosan alkalmazva, melyek effektív penetrációs területe 2,54 cm² (Hanson Microette Plus, Hanson Research 60-301-106, Hanson Research Corp.). A Franz cellák térfogata 7 ml, mely PBS puffer receptor folyadékot tartalmazott; a vizsgált minták térfogata 600 µl, a kevertetés sebessége 700 rpm volt. A mintavételi térfogat 2 ml volt, melyet minden esetben pótoltam friss PBS pufferrel. A mérés időtartama 2 óra volt, mintavételezés az 5, 10, 15, 30, 60, 90 és 120 percben történt. Minden minta diffúzióját hat párhuzamos méréssel vizsgáltam.

A minták TIO tartalmát HPLC mérésekkel állapítottuk meg (SPD 10-A HPLC UV-Vis detektorral, Shimadzu Europa GmbH), a metodika Bagary és kollégáinak munkáján alapul¹⁹⁵. A minták elválasztása monolit szilika oszlopon történt (ODS-AM302, S-5µm, 120A, YMC Co.). A mozgó fázis (pH=7,0) összetétele a következő volt: metanol és 0,02 mol/dm³ K₂HPO₄=85/15 V/V% elegye, amely 0,2 V/V%-ban trimetil-amint tartalmazott, minden vegyszer HPLC tisztaságú volt (HiPerSolv CHROMANORM®, VWR Kft.). A

mozgó fázist minden mérés előtt frissen szűrtük 0,2 µm pórusátmérőjű membránon (Merck Millipore Nylon szűrő, Merck KGaA). Izokratikus elúciót végeztünk 1,5 ml/min áramlási sebességgel, 32°C-on. A TIO retenciós ideje 3,5 perc, a detektálás hullámhossza 254 nm.

3.4.3. *Mikrobiológiai vizsgálatok *Trichophyton rubrum* és *Candida albicans* gombafajokon*

A mikrobiológia vizsgálatokat *Sourav Das* PhD hallgató társam végezte el a PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszéken.

3.4.3.1. A mikrobiológiai vizsgálatok során használt műszerek

UV-Vis spektrofotométer (Hitachi U-3900, Hitachi High-Tech Corporation); mikrobiológiai inkubátor (Thermo Scientific Heraeus B12, Thermo Fischer Scientific Ltd.); Bürker sejtszámláló kamra (Hirschmann Laborgeräte GmbH.), Multiskan EX 355 spektrofotométer (Thermo Fischer Scientific).

3.4.3.2. Mikrobiológiai kísérletek során használt anyagok

A mikrobiológiai kísérletekhez az alábbi anyagokat és vegyszereket használtuk fel: steril 96-lyukú mikrotiter lemez (Greiner Bio-One), burgonya dextróz agar (BioLab Kft.). Steril 10 µm pórusátmérőjű szűrők (PluriSelect, pluriSelect Life Science GmbH). Dextróz, adenin, bakteriológiai pepton és agar a Reanal Labor Kft.től. Steril centrifuga csövek (TPP Techno Plastic Products). Különböző táptalajokat készítettünk. Sabouraud dextróz agar (összetevők: 4% dextróz, 1% bakteriológiai pepton és 1,5% agar vízben). Élesztős dextróz agar (összetevők: 2% bakteriológiai pepton, 1% élesztő kivonat, 2% dextróz, 1,5% agar vízben). 3-(N-morfolino)-propán-szulfonsav [MOPS] (Serva Electrophoresis GmbH), RPMI 1640 táptalaj (összetevők: 3,4% MOPS, 1,8% dextróz, 0,002% adenin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Ultratiszta vizet használtunk minden kísérlethez (<1.0 µS).

3.4.3.3. Gomba törzsek és tenyésztésük

A körömgombás megbetegedésekért leginkább felelős két gombafajjal dolgoztunk: *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) DSM 21146 (Leibniz Institute DSMZ GmbH) és *Candida albicans* (*C. albicans*), utóbbit az Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék (PTE TTK, Biológiai Intézet) bocsátotta rendelkezésünkre.

Kísérleteink során már korábban leírt metodikát követtünk a *T. rubrum* és *C. albicans* gombák preparálásához^{196,197,198,199}. A *T. rubrum* gombából törzs szuszpenziót készítettünk, 7 napos, burgonya dextróz agaron, 28°C-on, sporuláció céljából készült tenyészetekből. 10 nappal később már megfigyelhetők voltak a gomba kolóniák, amelyek felületét steril

eszközzel kapartuk le és 10 ml ultratiszta vizet adtunk hozzá. Az így kapott, konídium spórákat és gombafonalat egyaránt tartalmazó oltvány szuszpenziót steril centrifugacsőbe pipettáztuk 10 µm pórusátmérőjű szűrőn történő szűrést követően. A szűrés célja a gombafonalak eltávolítása volt, így csak spórák maradtak az oltványban. Az oltvány spóra populációját $0,5 \cdot 10^6$ spóra/ml értékre állítottunk be, a pontos érték meghatározása Bürker sejtszámláló kamrával, illetve turbidimetriás méréssel történt 520 nm hullámhosszon (UV-Vis spektrofotométer). Az így elkészült spórákat tartalmazó oltványt használtuk fel a további kísérletekhez.

A *C. albicans* gombából törzs szuszpenziót készítettünk, 48 órán át, élesztős dextróz agaron, 30°C-on tenyésztett mintából. A 30°C-on végzett, 18 órán át tartó inkubációt követően, a sejteket kihalásztuk, hígítottuk 0,9%-os steril sóoldattal, majd a sejtek számát Bürker sejtszámláló kamrában és turbidimetriás méréssel 595 nm hullámhosszon pontosan meghatároztuk (UV-Vis spektrofotométer). A gombasejtek populációját $1 \cdot 10^6$ sejt/ml értékre állítottuk be. Az így elkészült szuszpenziót használtuk fel a további kísérletekhez.

3.4.3.4. Antifungális aktivitás meghatározása

A *T. rubrum* és *C. albicans* minimális gátlási koncentráció értékének [Minimal Inhibitory Concentration=MIC] meghatározását az alábbiak szerint végeztük el^{198,199,200,201}. Elkészítettük a TIO és MA etanolos oldatát 0,5-300 µg/ml koncentráció tartományban, melyeket 96-lyukú mikrotiter lemezre vittünk. A különböző SNkkel stabilizált PEkat és hagyományos emulziókat egyaránt teszteltük ugyanebben a koncentráció tartományban.

100 µl gomba spórákat vagy sejteket tartalmazó szuszpenziót adtunk 100 µl mintához. A vizsgálatoknál ügyeltünk arra, hogy a szuszpenziók spóra vagy sejt tartalma minden esetben azonos legyen. További információk a 3.4.3.5 és 3.4.3.6 fejezetben olvashatók. Kontrollként meghatároztuk a 20ET20, 20ET50 és 20ET100 SN szuszpenziók, az etanol és a Tween80[®] oldatának antifungális aktivitását is.

3.4.3.5. Minimális gátlási koncentráció [MIC] meghatározása *T. rubrum* esetén

A mérések során $2,5 \cdot 10^4$ spóra/ml koncentrációjú *T. rubrum* szuszpenziót alkalmaztunk. A méréseket a 'Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2A' protokollja szerint végeztük el. A mérések előkészítéséhez 100 µl térfogatú szuszpenziót mikrotiter lemezekre vittünk, majd inkubáltuk 28°C-on 7 napig. Ezt követően rávittük a lemezre a mintákat, melyeket RPMI médiummal hígítottunk, majd inkubáltuk további 7 napig, 28°C-on. A kontroll mintát hatóanyagot nem, csak RPMI médiumot tartalmazó mintával kezeltük.

A MIC értékek meghatározása vizuális megfigyeléssel történt, a kontrollal történő összehasonlítással²⁰². Minden kísérletet hatszor ismételtünk meg.

3.4.3.6. Minimális gátlási koncentráció [MIC] meghatározása *C. albicans* esetén

A mérések során $2 \cdot 10^3$ sejt/ml koncentrációjú *C. albicans* szuszpenziót alkalmaztunk. A mérések a továbbiakban a *T. rubrum* MIC értékeinek meghatározásával analóg módon történtek, RPMI médiumban, különbség az inkubációs időben és hőmérsékletben volt, mely *C. albicans* esetében 48 óra 30°C-on. A MIC értékek meghatározása spektrofotometriás méréssel történt 595 nm hullámhosszon. A kontroll mintát hatóanyagot nem, csak RPMI médiumot tartalmazó mintával kezeltük. Minden kísérletet hatszor ismételtünk meg.

3.4.3.7. A minimális fungicid koncentráció [MFC] meghatározása

Az MFC értékek meghatározása a korábbiakban említett leírás alapján, kisebb módosításokkal történt¹⁹⁸. A MIC értékek meghatározása után, minden egyes mikrotiter lemezen lévő mintából 10 μ l térfogatot vettünk, majd kioltottuk steril Soubaroud dextróz agar lemezre. A lemezeket inkubáltuk 30°C-on 48 órán át. MFC értéknek azt a legalacsonyabb hatóanyag koncentrációt tekintettük, ahol már nem tapasztaltunk gomba növekedést ($\geq 99.9\%$ növekedés gátlás). Minden kísérletet hatszor ismételtünk meg.

3.4.3.8. Statisztikai kiértékelés

A mikrobiológiai vizsgálatokhoz a statisztikai kiértékelést OriginPro7[®] szoftverrel végeztük el (OriginLab Corp.), független mintás varianciaanalízist (ún. egyutas ANOVA) alkalmazva, a szignifikancia szint $p \leq 0.05$ érték volt.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. Szilika nanorészecskék szintézise, felületmódosítása és vizsgálata

4.1.1. Szilika nanorészecskék szintézise és vizsgálata

A SNk szintézisét számos paraméterrel befolyásolhatjuk, a reakció körülményei hatással vannak a kialakult méretre, alakra és a diszperzitás fokára is. Ilyen paraméter a szilanol prekursor koncentrációja, az alkalmazott katalizátor és annak koncentrációja, a víz mennyisége és a reakció hőmérséklete. Annak érdekében, hogy átláthatóvá tegyük az egyes paraméterek változtatásának hatását a SNk tulajdonságaira, a kísérletek során mindig csak az egyik paramétert változtattuk, a többi állandó értéken tartottuk. A TEOS koncentrációja minden egyes kísérlet során állandó volt, $c_{\text{TEOS}}=0,26 \text{ mol/dm}^3$.

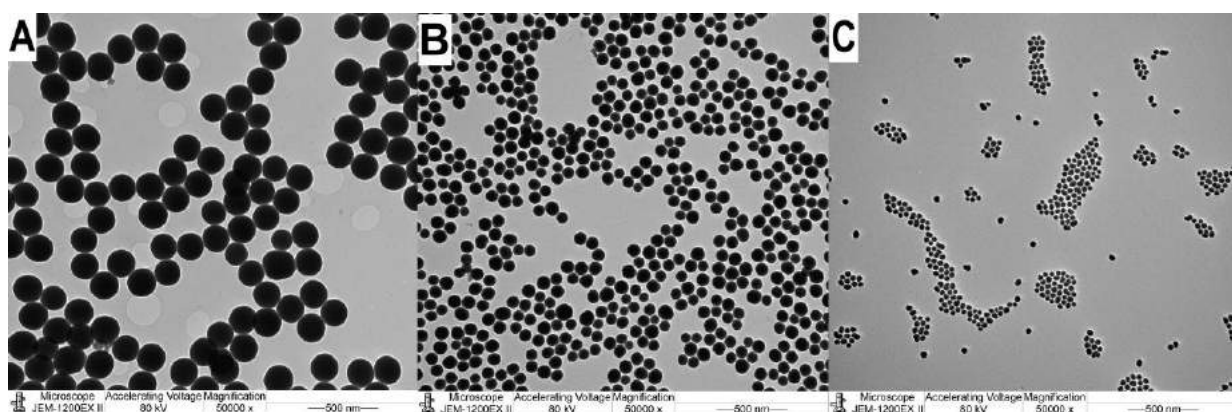
4.1.1.1. Ammónia, mint katalizátor koncentrációjának hatása a SNk szintézisére

Elsőként megvizsgáltam, hogyan hat az ammónia, mint katalizátor koncentrációjának változtatása a kialakult SNk tulajdonságaira. A reakciókat állandó hőmérsékleten végeztem el, 25°C -on, a víz koncentrációja állandó volt, $c_{\text{víz}}=5 \text{ mol/dm}^3$. Az így szintetizált SNk eredményeit az 2. táblázatban láthatjuk.

Minta	$c_{\text{NH}_3} \text{ (mol/dm}^3\text{)}$	$d_{\text{DLS}} \text{ (nm)}$	PDI_{DLS}	$d_{\text{TEM}} \text{ (nm)}$	PDI_{TEM}
A	0,291	$190,80 \pm 0,93$	0,008	191,38	0,003
B	0,194	$99,09 \pm 1,15$	0,021	91,72	0,006
C	0,097	$27,05 \pm 0,80$	0,082	28,33	0,005
D	0,019	-	-	-	-
E	0,009	-	-	-	-
F	0,004	-	-	-	-

2. táblázat: SNk tulajdonságai változó ammónia koncentrációval végzett reakciók esetén. $c_{\text{TEOS}}=0,26 \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{víz}}=5 \text{ mol/dm}^3$, $T=25^\circ\text{C}$. PDI_{DLS} : DLS mérésekből kapott polidiszperzitási index. PDI_{TEM} : TEM felvételek alapján számolt polidiszperzitási index. A szórás értékeket legalább 3 párhuzamos mérés eredményéből számoltuk.

A kísérleti eredményekből arra következtethetünk, hogy $0,019 \text{ mol/dm}^3$ ammónia koncentráció alatt nem alakulnak ki részecskék, ezért a továbbiakban a $0,291\text{--}0,097 \text{ mol/dm}^3$ koncentráció tartományban vizsgáltunk (A-C minta), ahol a méretek $190,80\text{--}27,05 \text{ nm}$ között alakultak. Ebben a tartományban a szintézis nagy kitermeléssel végezhető el ($\geq 80\%$). A SNk részecskeméret eloszlása monodiszperz, amelyet a TEM felvételek is megerősítettek (ld. 6. ábra), illetve mindegyik szabályos gömb alakú.



6. ábra: SNkról készült TEM felvételek. $c_{\text{TEOS}}=0,26 \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{víz}}=5 \text{ mol/dm}^3$, $T=25^\circ\text{C}$ A minta: $d=191 \text{ nm}$, B minta: $d=91.7 \text{ nm}$, C minta: $d=28.3 \text{ nm}$.

4.1.1.2. Hőmérséklet változtatásának hatása a SNk szintézisére

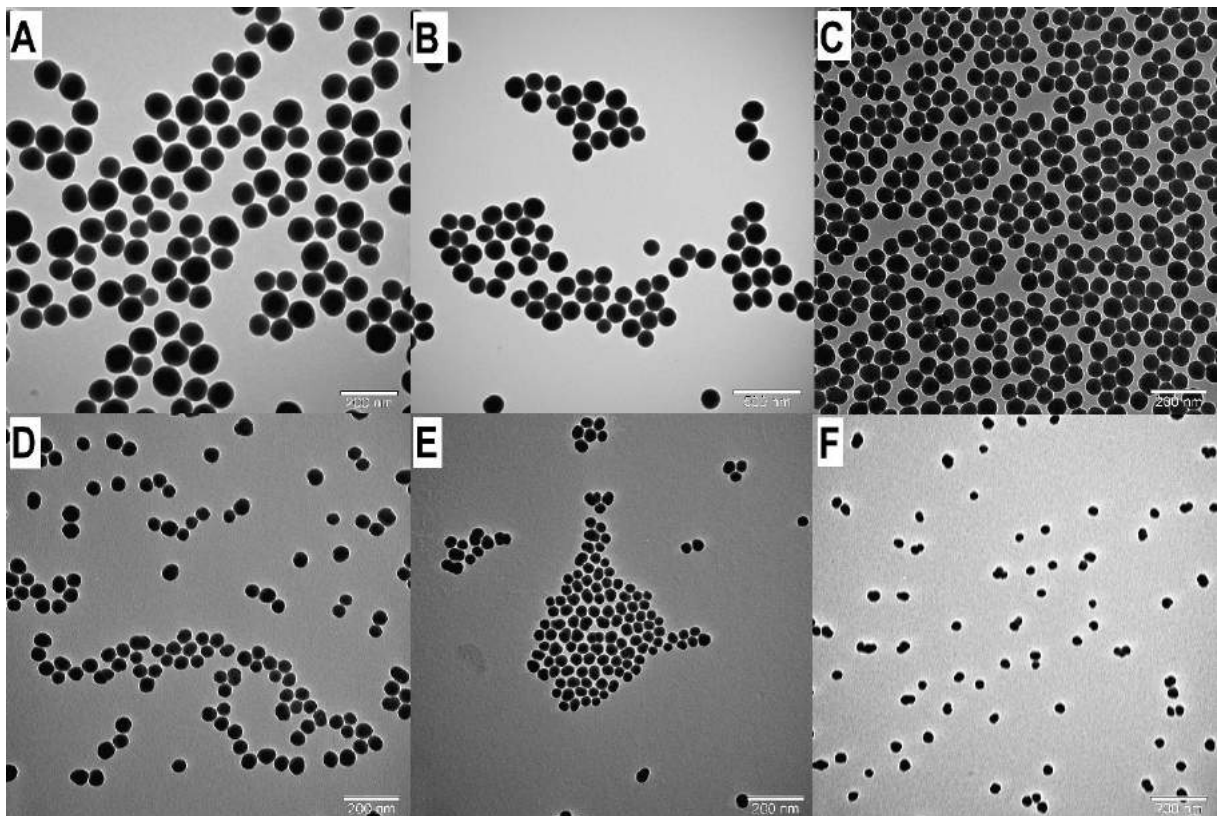
Következő lépésben a hőmérséklet változtatásának hatását vizsgáltam a SNk szintézisére. A reakciók során $25\text{-}50^\circ\text{C}$ között dolgoztam, a víz koncentrációja állandó volt, $c_{\text{víz}}=5 \text{ mol/dm}^3$. Az így szintetizált SNk eredményeit a 3. táblázatban láthatjuk.

Minta	$c_{\text{NH}_3} \text{ (mol/dm}^3\text{)}$	T ($^\circ\text{C}$)	$d_{\text{DLS}} \text{ (nm)}$	PDI_{DLS}	$d_{\text{TEM}} \text{ (nm)}$	PDI_{TEM}
T25A	0,291	25	190,80±0,93	0,008	191,4	0,003
T30A	0,291	30	170,50±1,17	0,002	169,7	0,001
T35A	0,291	35	153,60±0,91	0,014	155,1	0,007
T40A	0,291	40	142,70±1,02	0,023	145,2	0,008
T45A	0,291	45	96,35±0,99	0,041	95,9	0,008
T50A	0,291	50	69,32±0,88	0,016	67,8	0,012
T25B	0,194	25	99,09±1,15	0,021	91,7	0,006
T30B	0,194	30	88,60±1,05	0,018	81,8	0,004
T35B	0,194	35	67,81±0,77	0,005	64,5	0,015
T40B	0,194	40	56,11±0,85	0,041	55,4	0,003
T45B	0,194	45	41,87±±0,75	0,048	42,1	0,007
T50B	0,194	50	30,15±0,69	0,455	32,0	0,031
T25C	0,097	25	27,05±0,80	0,082	28,33	0,005
T30C	0,097	30	22,51±0,25	0,095	23,19	0,002
T35C	0,097	35	12,08±0,06	0,146	14,06	0,026
T40C	0,097	40	10,43±0,12	0,226	10,99	0,018
T45C	0,097	45	7,49±1,04	0,467	6,53	0,019
T50C	0,097	50	6,11±0,20	0,455	8,91	0,074

3. táblázat: SNk tulajdonságai változó hőmérsékleten végzett reakciók esetén. $c_{\text{TEOS}}=0,26 \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{víz}}=5 \text{ mol/dm}^3$. PDI_{DLS} : DLS mérésekből kapott polidiszperzitási index. PDI_{TEM} : TEM felvételek alapján számolt polidiszperzitási index. A szórás értékeket legalább 3 párhuzamos mérés eredményéből számoltuk.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy növelve a reakció hőmérsékletét a SNk mérete csökken. A méret csökkenésének mértéke változó az egyes ammónia koncentrációk esetén: $0,291 \text{ mol/dm}^3$ értéknél a részecskeméret $25\text{-}50^\circ\text{C}$ között $190,80\text{-}69,32 \text{ nm}$ mérettartományban változik; alacsonyabb koncentráció értéknél, $0,194 \text{ mol/dm}^3$ -nél, a részecskeméret $99,09\text{-}30,15 \text{ nm}$ között; illetve a legalacsonyabb koncentrációnál, $0,097$

mol/dm³-nél, az értékek 27,05-6,12 nm között változnak. Minden kísérletet legalább háromszor ismételt meg, és a szórás értékek alapján úgy találtuk, hogy a reakciók reprodukálhatósága kiváló, továbbá a részecskék monodiszperzek (PDI_{DLS}: 0,002-0,091). A SNk monodiszperzitását alátámasztják a TEM felvételek is (ld. 7. ábra), illetve jól látható, hogy a hőmérséklet nem befolyásolja a részecskék alakját, minden hőmérsékleten szabályos gömb alakú részecskék állíthatók elő.



7. ábra: SNkról készült TEM felvételek változó hőmérsékleten végzett reakciók esetén. $c_{\text{TEOS}}=0,26$ mol/dm³, $c_{\text{víz}}=5$ mol/dm³. A: T25B $d=91,7$ nm. B: T30B $d=81,8$ nm. C: T35B $d=65,4$ nm. D: T40B $d=55,4$ nm. E: T45B $d=42,1$, F: T50B $d=32,0$ nm.

Az eredményeket tanulmányozva lineáris összefüggést találtunk a SNk mérete és a reakció hőmérséklete között, melyet méret pontos kísérlettervezésre használtunk fel. Az ezzel kapcsolatos számításokat és eredményeket lásd az 4.1.2 fejezetben.

4.1.1.3. Víz koncentráció változtatásának hatása a SNk szintézisére

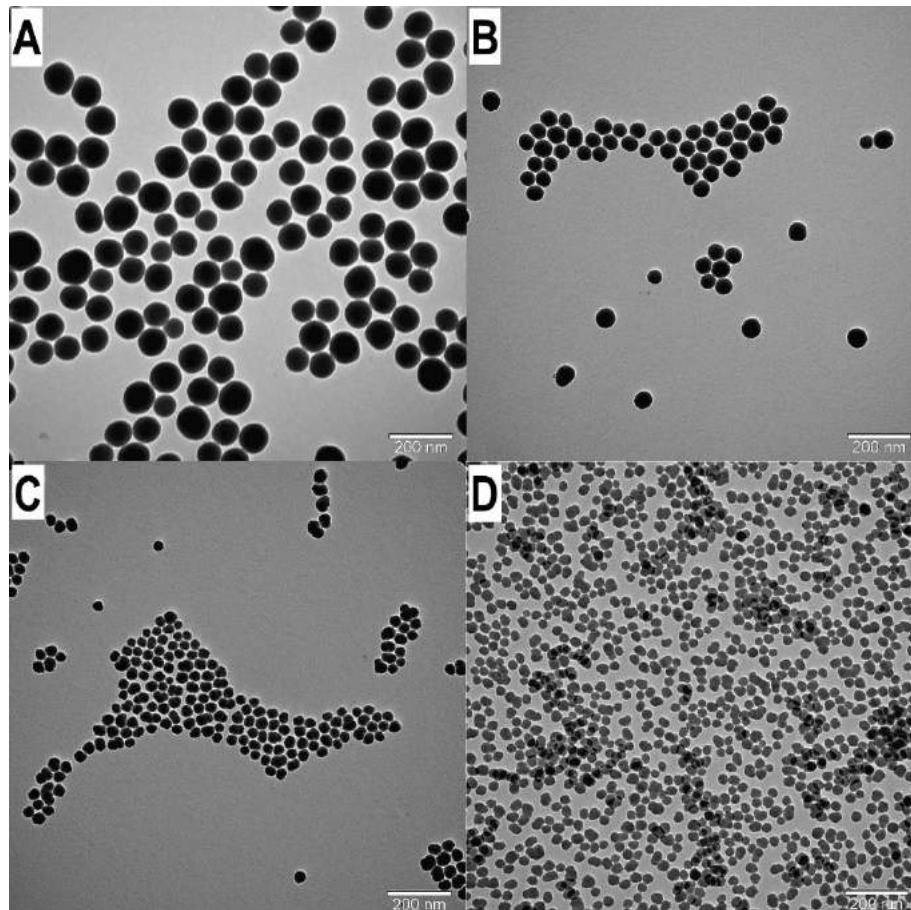
Ezekben a kísérletekben a reakciókat állandó hőmérsékleten, $T=25^{\circ}\text{C}$ -on végeztem el, a víz koncentrációját pedig 2-5 mol/dm³ érték között változtattam. Az így szintetizált SNk eredményeit a 4. táblázatban láthatjuk.

Minta	cNH ₃ (mol/dm ³)	c _{víz} (mol/dm ³)	d _{DLS} (nm)	PDI _{DLS}	d _{TEM} (nm)	PDI _{TEM}
VA1	0,291	5	190,80±0,93	0,008	191,4	0,003
VA2	0,291	4	142,70±3,34	0,041	146,6	0,004
VA3	0,291	3	58,50±2,17	0,061	54,7	0,010
VA4	0,291	2	52,18±3,72	0,059	50,7	0,013
VB1	0,194	5	99,09±1,15	0,021	91,7	0,006
VB2	0,194	4	58,97±1,58	0,043	60,3	0,002
VB3	0,194	3	34,50±2,08	0,095	33,6	0,011
VB4	0,194	2	27,81±8,16	0,073	28,2	0,013
VC1	0,097	5	27,05±0,80	0,082	28,3	0,005
VC2	0,097	4	9,54±1,15	0,263	20,3	0,008
VC3	0,097	3	7,58±1,64	0,190	15,7	0,006
VC4	0,097	2	6,92±2,23	0,250	6,5	0,019

4. táblázat: SNk tulajdonságai változó víz koncentrációval végzett reakciók esetén. c_{TEOS}=0,26 mol/dm³, T=25°C. PDI_{DLS}: DLS mérésekből kapott polidiszperzitási index. PDI_{TEM}: TEM felvételek alapján számolt polidiszperzitási index. A szórás értékeket legalább 3 párhuzamos mérés eredményéből számoltuk.

Az eredmények azt mutatják, hogy a víz koncentrációjának csökkenésével a SNk mérete csökken. Hasonlóan a reakció hőmérsékletével kapcsolatos kísérletek esetén, itt is megfigyelhető, hogy a részecskeméret csökkenésének mértéke változik, ha az ammónia koncentrációja változik. 0,291 mol/dm³ ammónia koncentráció esetén a SNk mérete 190,80-52,18 nm között változik az 5-2 mol/dm³ víz koncentráció tartományban; 0,194 mol/dm³ koncentráció esetén a méretek 99,09-27,81 nm között változnak; míg 0,097 mol/dm³ koncentrációnál a változás 27,05-6,92 nm között figyelhető meg. A SNk polidiszperzitási indexe itt már jóval nagyobb értékek között változik, mint a korábbi kísérletek esetén, amely akár 0,250 is lehet.

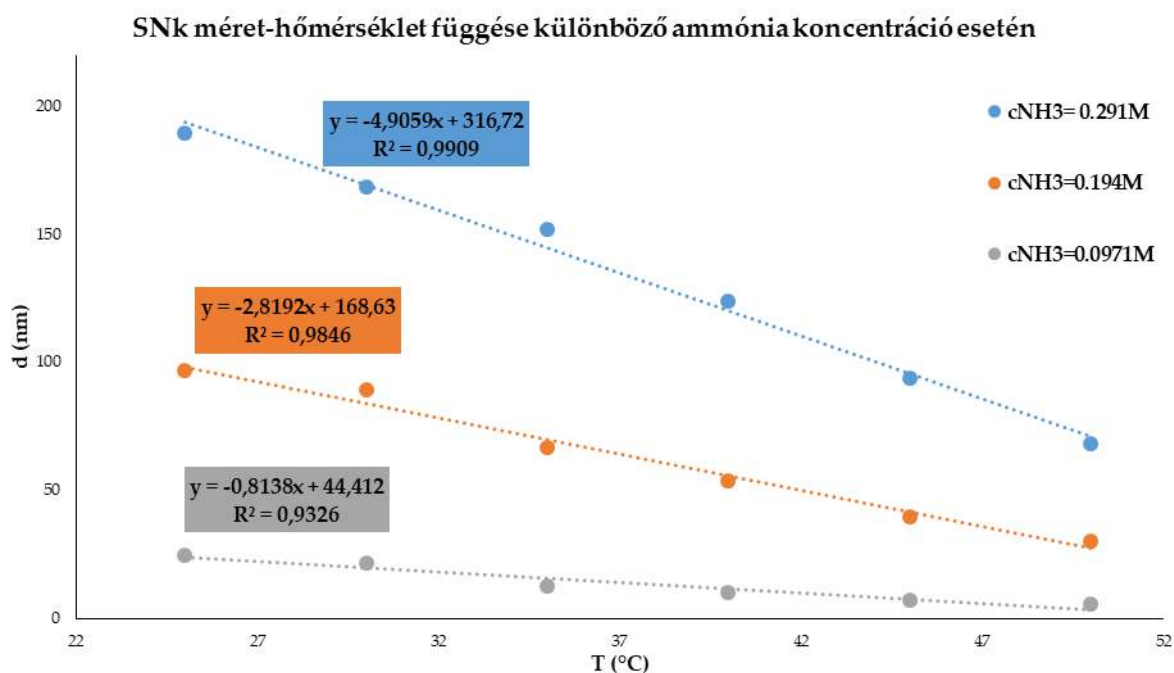
Összességében megállapítottuk, hogy a kevesebb, mint 3 mol/dm³ vízzel szintetizált SNk nagyon polidiszperzek, illetve nem szabályos gömb alakúak, utóbbit a TEM felvételek erősítették meg (ld. 8. ábra). Ebben az esetben is megfigyeltünk lineáris összefüggést a SNk mérete és a reakció során alkalmazott víz koncentrációja között, azonban az adatokat nem használtuk fel méretpontos kísérlettervezésre a jelentős alakváltozás miatt.



8. ábra: SNkról készült TEM felvételek változó víz koncentrációval végzett reakciók esetén. $c_{\text{TEOS}}=0,26$ mol/dm³, $T=25^{\circ}\text{C}$ A: VB1 $d=91,7$ nm. B: VB2 $d=60,3$ nm. C: VB3 $d=33,6$ nm. D: VB4 $d=28,2$ nm.

4.1.2. Szilika nanorészecskék méretpontos szintézise a hőmérséklet befolyásolásával

Kísérleteink során lineáris összefüggést találtunk a hőmérséklet változtatása és a kialakult SNk részecskemérete között, melyet felhasználva méretpontos kísérleteket terveztünk. Az egyes ammónia koncentrációkhoz tartozó összefüggéseket a 9. ábra láthatjuk.



9. ábra: SNk méret-hőmérséklet függése különböző ammónia koncentráció esetén.

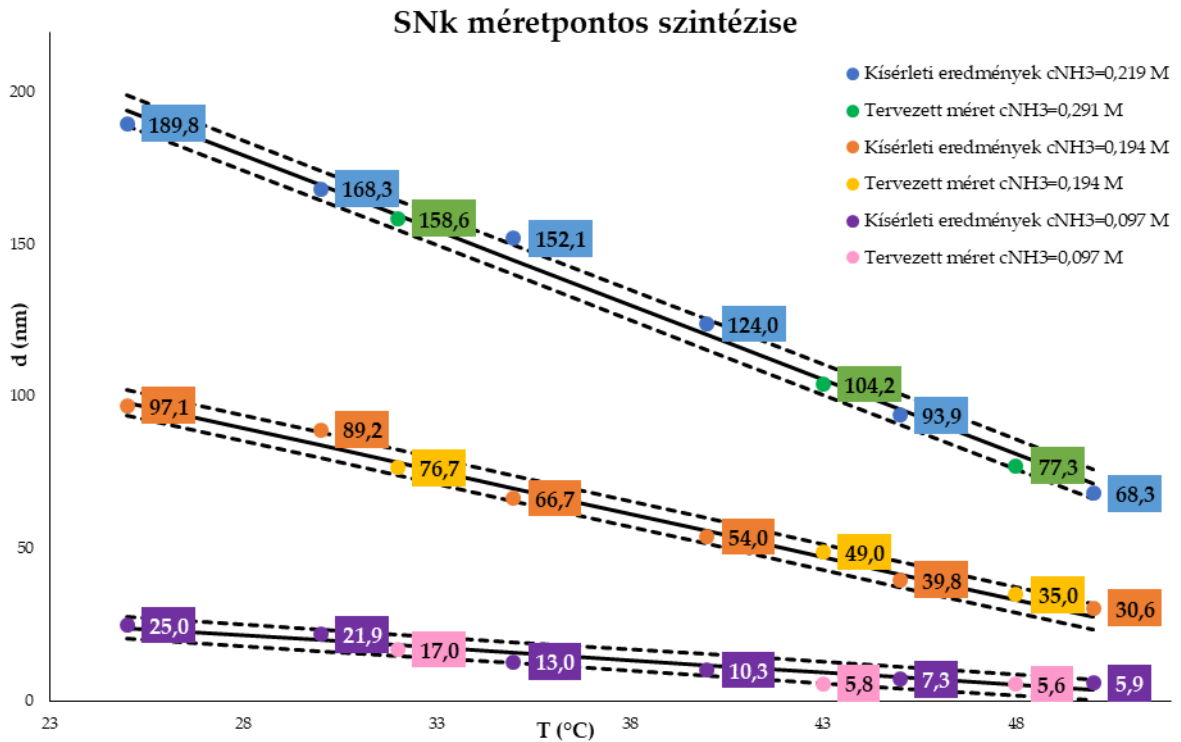
A lineáris regressziós egyenesek segítségével három különböző hőmérséklet értékre (32, 43 és 48°C) számoltuk ki a részecskeméretet, majd a SN szintéziseket el is végeztük ezeken az értékeken. Az 5. táblázatban látható, hogy a számolt és kísérleti eredmények jó egyezést mutatnak.

Lineáris összefüggésből számolt adatok			
T (°C)	cNH ₃ =0,291 mol/dm ³	cNH ₃ =0,194 mol/dm ³	cNH ₃ =0,0971 mol/dm ³
32	159,7	78,4	18,07
43	105,7	47,4	9,13
48	81,24	33,3	5,06
Kísérleti eredmények			
T (°C)	cNH ₃ =0,291 mol/dm ³	cNH ₃ =0,194 mol/dm ³	cNH ₃ =0,0971 mol/dm ³
32	158,6	76,74	16,9
43	104,2	49,04	5,8
48	77,3	35,0	5,6

5. táblázat: SN méret-hőmérséklet lineáris összefüggésből számított adatok, és ez alapján végzett kísérletek eredményei.

Ezt követően a számított és kísérleti adatok felhasználásával statisztikai elemzést végeztünk, célunk volt, hogy megadjuk, milyen megbízhatósággal végezhető el a méretpontos SN

szintézis. A statisztika számítások eredményeit grafikusan a 10. ábrán láthatjuk, az egyes ammónia koncentrációkra számított konfidencia intervallumokat, illetve az illesztés jóságát pedig a 6. táblázatban olvashatjuk.

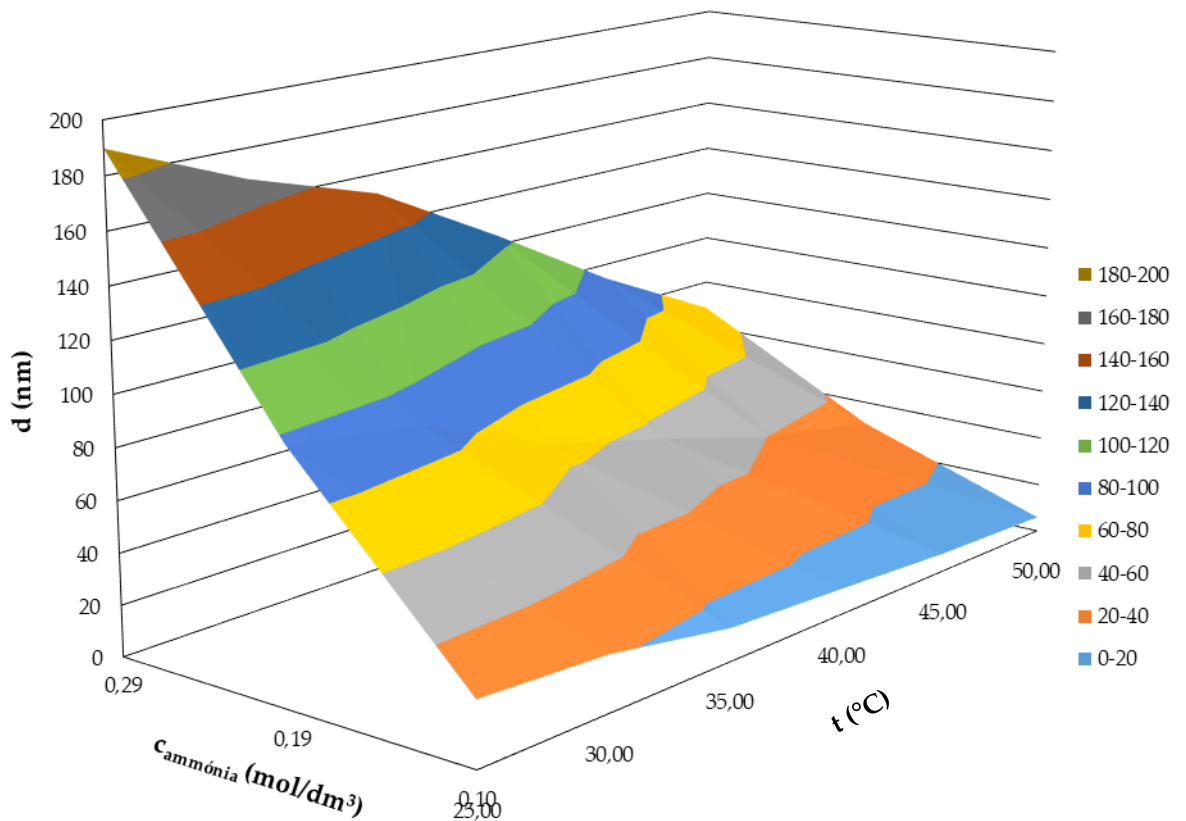


10. ábra: SNk méretpontos szintézise és tervezése. A szaggatott vonalak az alsó- és felső konfidencia intervallumokat jelölik, a folyamatos vonal pedig a kísérleti eredmények alapján számított, várható eredményeket mutatja.

cNH ₃ (mol/dm ³)	Lineáris regresszió	KI	R ²
0,291 M	$y = -4,906x + 316,720$	93%	0,9909
0,194 M	$y = -2,819x + 168,630$	95%	0,9846
0,097 M	$y = -0,814x + 44,412$	92%	0,9326

6. táblázat: SNk hőmérsékletfüggő szintézisének statisztikai elemzése. KI: konfidencia intervallum. R: regressziós érték.

Következtetésképpen elmondható, hogy a hőmérséklet pontos szabályozása lehetővé teszi kívánt részecskeméretű SNk előállítását. A különböző ammónia koncentráció értékek esetén más-más részecskeméret intervallumban tervezhetünk (ld. 11. ábra). 0,291 mol/dm³ ammónia koncentráció érték esetén 65 és 200 nm között tervezhető a méret, 0,194 mol/dm³ értéknél 30 és 100 nm között, míg 0,097 mol/dm³ koncentrációnál 30 nm alatti SNk szintetizálhatók, ahol a méretek egészen finomhangolása lehetséges 6,1-22,5 nm között.



11. ábra: Szilika nanorészecskék méret pontos szintézise az ammónia koncentráció és hőmérséklet befolyásolásával.

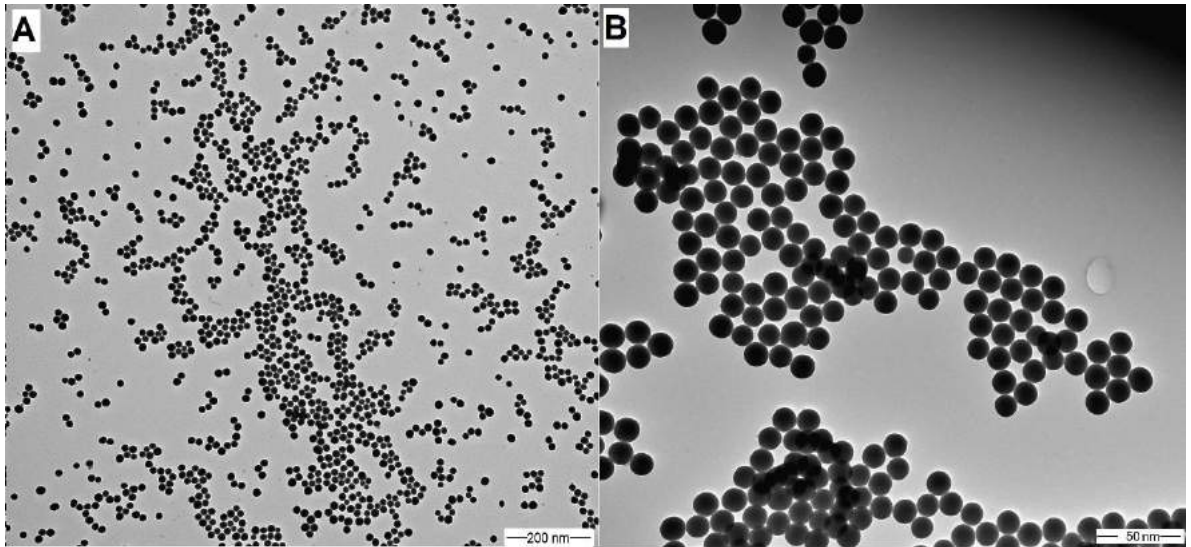
4.1.3. Szilika nanorészecskék felületmódosítása és vizsgálata

Ahogy azt a bevezetőben tárgyaltuk, a SNk felületi módosítására azért volt szükség, hogy a kezdetben csak $-\text{OH}$ funkciós csoportokat tartalmazó, ezáltal rendkívül hidrofil SNk felületi tulajdonságait, azaz hidrofil-lipofil jellegét változtatni tudjuk. Mivel a SNket különböző illóolajokat tartalmazó PEk stabilizálásához szeretnénk a továbbiakban felhasználni, ezért különböző funkciós csoportokkal (metil-, etil-, propil- és fenil) és különböző mértékben borított (10-50%) részecskét állítottunk elő. Az így készült, különböző SNk, illetve a kiindulási hidrofil SNk [HS] tulajdonságait a 7. táblázatban láthatjuk.

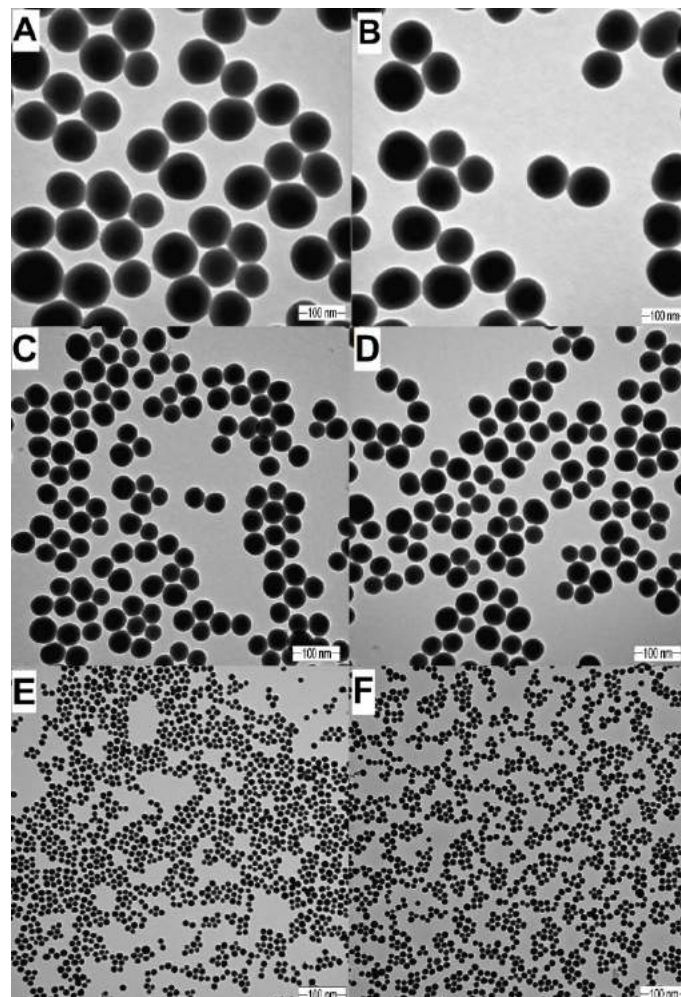
SN minta	Funkciós csoport	Felületi borítottság (%)	D _{DLS} (nm)	PDI _{DLS}	D _{TEM} (nm)	PDI _{TEM}
HS20	-	-	20,1±0,2	0,008	20,0	0,011
HS50	-	-	52,7±0,9	0,017	53,0	0,037
HS100	-	-	105,2±3,6	0,021	103,0	0,083
10MET	metil	10	20,8±0,7	0,051	20,0	0,010
20MET	metil	20	20,5±0,9	0,060	21,0	0,057
10ET	etil	10	20,2±1,3	0,041	20,0	0,044
20ET	etil	20	20,1±0,8	0,072	22,0	0,011
50ET	etil	50	21,0±0,9	0,066	20,0	0,015
20ET50	etil	20	54,2±2,7	0,178	55,0	0,337
20ET100	etil	20	110,7±4,1	0,231	112,0	0,349
10P	propil	10	19,71±0,9	0,082	21,0	0,107
20P	propil	20	21,07±0,9	0,064	20,0	0,083
50P	propil	50	24,1±1,2	0,096	25,5	0,071
10F	fenil	10	20,3±0,9	0,120	21,0	0,095
20F	fenil	20	20,5±1,3	0,125	22,0	0,115

7. táblázat: Különböző funkciós csoportokkal és mértékben módosított SNk tulajdonságai. A DLS méréseknél megadott szórás értékeket legalább 3 párhuzamos mérési eredmény alapján adtuk meg.

Az eredmények alapján jól látható, hogy a SNk részecskemérete és polidiszperzitási indexe nem változott jelentősen a felületmódosítás hatására. A DLS mérések alátámasztására, illetve a módosított SNk morfológiájának vizsgálatára TEM felvételeket is készítettünk. Néhány módosított SN képe a 12. és 13. ábrákon látható. A felvételeken jól látszik, hogy a részecskék valóban megőrizték méretüket és diszperzitás fokukat, illetve szabályos gömb alakjukat. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a SNk utólagos felületmódosítása a méretükre és a morfológiájukra nincs hatással.



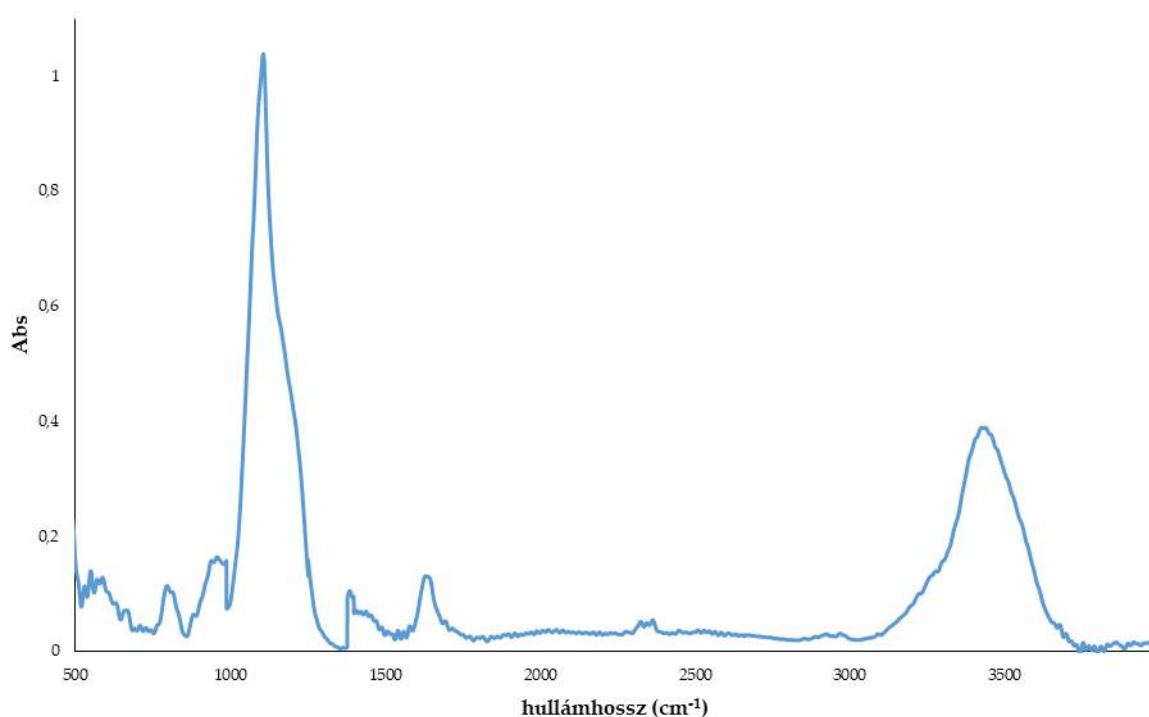
12. ábra: Propil funkciós csoportokkal módosított SNk TEM felvétele. A: 20P $d=20,0$ nm. B: 50P $d=25,5$ nm.



13. ábra: Etil funkciós csoporttal 20%-ban felületmódosított SNk TEM felvételei, módosítás előtt és után. A: HS100, $d=103,0$ nm. B: ET100, $d=110,7$ nm. C: HS50, $d=53,0$ nm. D: ET50, $d=55,0$ nm. E: HS20, $d=20,0$ nm. F: ET20, $d=20,0$ nm.

A SNk felület módosításának sikerességét infravörös spektroszkópia mérésekkel igazoltuk. Annak érdekében, hogy a különböző SNket érdemben össze tudjuk hasonlítani,

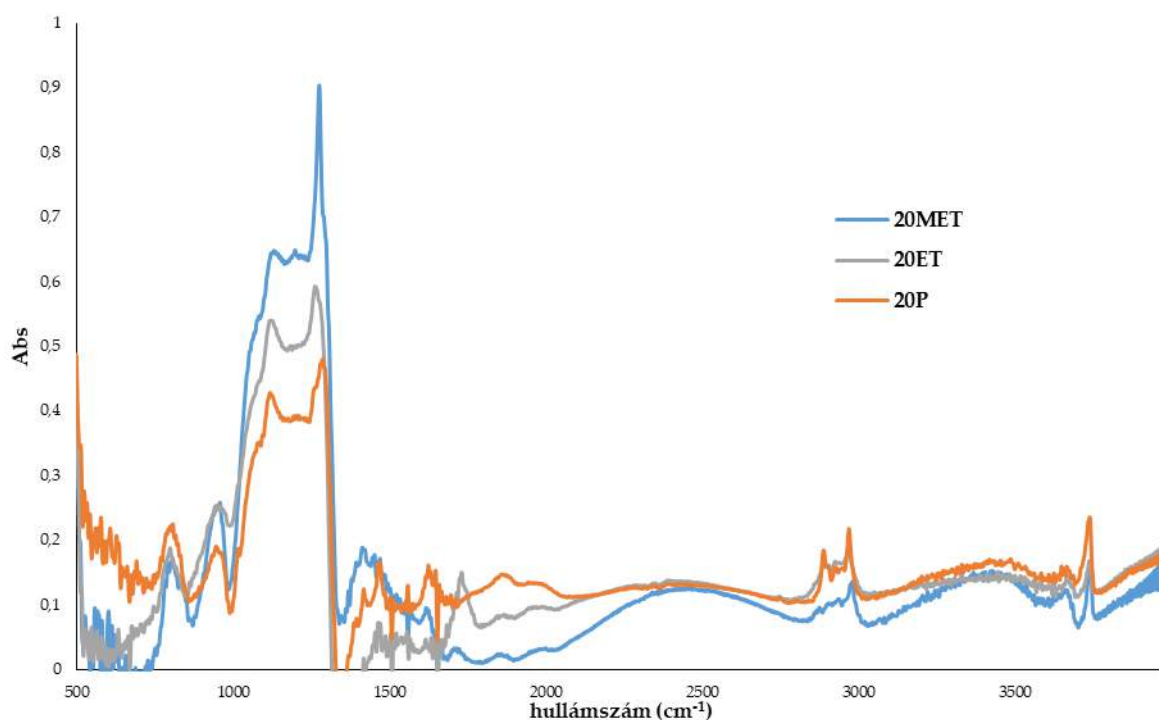
először a felületmódosítás nélküli, hidrofil SNről készítettünk IR spektrumot (ld. 14. ábra). A sziloxán láncokra jellemző összes vegyértékrezgés beazonosítható: 810 cm^{-1} Si-O-C aszimmetrikus vegyértékrezgések; 972 cm^{-1} Si-OH síkban deformálódó vegyértékrezgések; $1090\text{-}1207\text{ cm}^{-1}$ Si-O-Si aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgések; 1393 cm^{-1} –C-H deformációs vegyértékrezgés; 1645 cm^{-1} hullámszámnál a sziloxán láncok között adszorbeált vízre jellemző csúcsot láthatunk; $3100\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ Si-OH kötések és a minta víztartalmából adódó –OH csoportok vegyértékrezgéseinek átlapolása.



14. ábra: HS20 SN infravörös spektruma. Részecskeméret 20 nm, felületi módosítás nélkül.

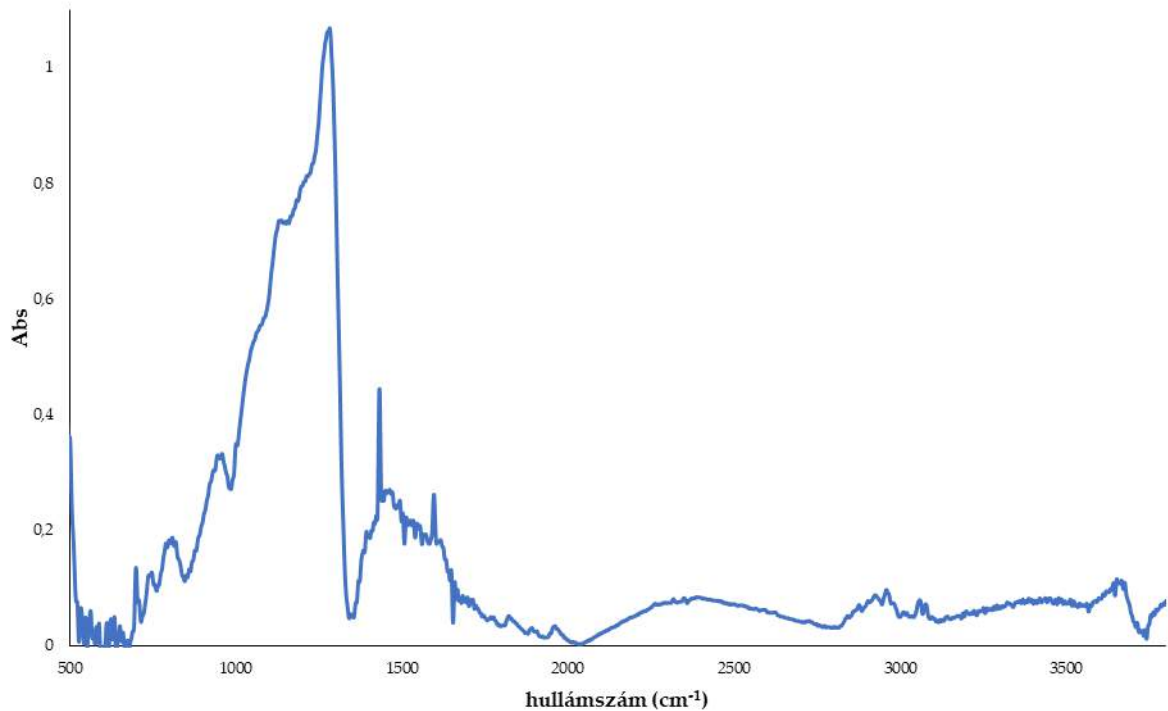
A 15. ábrán láthatóak a 20 nm méretű, metil-, etil- és propil funkciós csoportokkal módosított SNk infravörös spektrumai. Mindegyik SN esetén megfigyelhetjük ugyanazokat a vegyértékrezgéseket, amelyek a hidrofil SNnél is láthatók, tehát amelyek a sziloxán láncokra jellemzőek. 808 és 960 cm^{-1} értékeknél a Si-O-C aszimmetrikus, illetve a Si-OH síkban deformálódó vegyértékrezgéseket láthatjuk. 1645 cm^{-1} hullámszámnál ebben az esetben is a sziloxán láncok között adszorbeált vízre jellemző csúcs figyelhető meg, míg $3176\text{-}3620\text{ cm}^{-1}$ között a Si-OH kötések és a minta víztartalmából adódó –OH csoportok vegyértékrezgéseinek átlapolása látható. Az $1145\text{-}1272\text{ cm}^{-1}$ Si-O-Si aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgések estén a csúcsok intenzitása csökken a hidrofil SN értékeihez viszonyítva, illetve csökkenő tendencia figyelhető meg a felületet borító funkciós csoportok szénatomszámának növekedésével. Továbbá a sikeres SN felületmódosítást

igazolja a 2892 és 2971 cm^{-1} értékeknél megjelenő dublett csúcs, amely a $-\text{CH}_3$, illetve $-\text{CH}_2$ csoportok aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgéseit jelzi, alifás csoportokban, melyek intenzitása nő a funkciós csoportok szénatomszámának növekedésével.



15. ábra: Metil-, etil- és propil funkciós csoportokkal módosított SNk infravörös spektruma.
Részecskeméret 20 nm, felületi borítottság érték minden esetben 20%.

A fenil csoportokkal módosított SNk esetén szintén megfigyelhetjük a sziloxán lánc vegyértékrezgéseit (ld. 16. ábra): 818 és 966 cm^{-1} értékeknél a Si-O-C aszimmetrikus, illetve a Si-OH síkban deformálódó vegyértékrezgéseket láthatjuk; 1149-1285 cm^{-1} értékeknél pedig a Si-O-Si aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgésekre jellemző csúcsokat. Itt is megjelenik a Si-OH kötésekre és a minta víztartalmára jellemző széles csúcs 3080-3560 cm^{-1} között. Az 1434 és 1599 cm^{-1} hullámszámoknál megjelenő csúcsok a fenil csoportok jelenlétére utalnak. Előbbi a ciklusos C-C kötésekre jellemző, síkban történő deformációs vegyértékrezgéshez köthető, utóbbi pedig szintén ezen kötés megnyúlására jellemző vegyértékrezgés. Az ujjlenyomat tartományban jelentkező 700 és 750 cm^{-1} hullámszám értékekhez tartozó csúcsok a fenil csoportok C-H kötései között létrejövő, síkban ollózó rezgéseire; illetve a Si-C szimmetrikus kötésnyúlására vonatznak.



16. ábra: Fenil funkciós csoporttal módosított SNk infravörös spektruma. Részecskeméret 20 nm, felületi borítottság érték 20%.

Az infravörös spektroszkópiai vizsgálatok eredményeiből összességében az következik, hogy minden esetben sikeres volt a SNk felületmódosítása. Továbbá a különböző szénatomszámú funkciós csoportok is jól beazonosíthatók a jellemző vegyértékrezgések megjelenése, illetve azok intenzitásának változása alapján.

Az 4.1 fejezetben tárgyalt eredményeink jelenleg publikálás alatt vannak, a kézirat tervezett címe, a szerzők és a választott folyóirat az alábbiak:

Barbara Vörös-Horváth, Ala' Salem, Szilárd Pál, Aleksandar Széchenyi. Systematic study of reaction conditions for size controlled synthesis of silica nanoparticles.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Elsevier kiadó Q1 besorolás, IF: 3,990

4.2. Illóolajok formulálása mikrobiológiai vizsgálatokhoz

4.2.1. Kamilla és fehérüröm illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása és vizsgálata

A kamilla és fehérüröm illóolajok felhasználásával készült PEk tulajdonságai a 8. táblázatban láthatók. Mindkét illóolaj esetében 20 nm részecskeméretű SNkkel dolgoztam, kamilla illóolaj esetén 50%-ban propil funkciós csoportokkal felületmódosított részecskékkel kaptunk megfelelő stabilitást, míg fehérüröm illóolaj esetén már 20%-os felületi borítottság elegendő volt a kívánt stabilitás eléréséhez, amely akár 5 hónap is lehet. A táblázatban az emulziók cseppméretének szórás értékei nem kerültek feltüntetésre, azok 1,2-11,4% között alakultak.

Az emulziók típusát vezetőképesség méréssel határoztam meg. A vezetőképesség értékek a különböző SN vizes szuszpenziókra az alábbiak: 20P20 223,5 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ és 50P20 193,2 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. A tiszta kamilla és fehérüröm illóolajok vezetőképesség értékei 0,018 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ és 0,056 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. A PEk vezetőképességének értéke a 8. táblázatban látható. Az értékek egyértelműen arra utalnak, hogy mindegyik PE olaj a vízben típusú emulzió.

Illóolaj	Stabilizáló ágens	C ₁₀ (mg/ml)	D _{csepp} (nm)	Stabilitás	Megjelenés	Vezetőképesség ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Kamilla	50P20	0,1-3,5	292-1290	3-5 hónap	opálos	183,5-164,0
Fehérüröm	20P20	0,2-3,5	160-1415	3-5 hónap	opálos	212,0-197,3

8. táblázat: Kamilla és fehérüröm illóolajat tartalmú PEk tulajdonságai

4.2.2. Pickering emulziók és sejtmembránok közötti kölcsönhatás vizsgálata sejtmoddellen

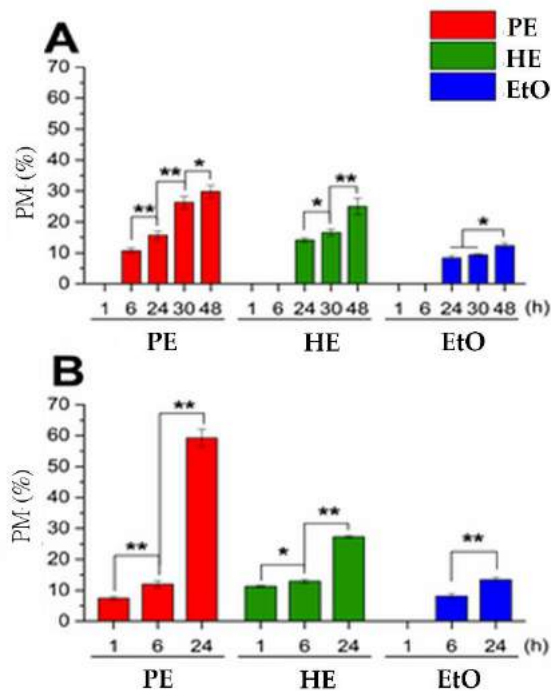
Az unilamelláris liposzómák olyan foszfolipid kettősrétegből felépülő vezikulumok, melyek alkalmasak sejtek vagy biológiai membránok modellezésére²⁰³. Felhasználják őket többek között a sejtek vagy sejtmembránok és különböző hatóanyagok, gyógyszerformák vagy biológiailag aktív vegyületek között létrejövő kölcsönhatások tanulmányozására. Ebben a kísérletben célunk volt megvizsgálni, hogy a kamilla és fehérüröm illóolaj különböző formulációi esetén milyen az intracelluláris hatóanyag leadás, mely esetünkben illóolaj leadást jelent. Az unilamelláris liposzómák és illóolajok közötti kölcsönhatás vizsgálatok során törekedtem arra, hogy a reakciókörülmények megfeleljenek az egyes illóolajok mikrobiológiai vizsgálatait során alkalmazott körülményeknek. A sejtmembránon átjutott illóolaj mennyiséget ún. penetrált kumulatív illóolaj mennyiségben fejeztem ki [PM, %].

Kamilla illóolaj esetén 24 órás vizsgálatokat végeztem 37°C-on, amely megegyezik a baktériumokkal végzett kísérletek körülményeivel. Az első mintavétel 1 óra elteltével történt, itt az illóolaj 27,2%-a penetrált keresztül a sejtmembránon PE esetén, míg a HE és az oldatos mintákból nem penetrált detektálható illóolaj mennyiség (ld. 9. táblázat). A következő mintavétel 2 óra után történt, ahol a PEből már 48,3% illóolaj leadást mértünk, HE esetén ez az érték csupán 0,5% volt, míg az etanos oldatnál továbbra sem volt mérhető mennyiség. Az utolsó, 24 órát követő mintavétel során a PEből 82,2% illóolaj távozott, a HEből 66,8%, az etanos oldatból pedig 35,5%.

Formuláció	PM _{1h}	PM _{2h}	PM _{24h}
PE	27,2 ± 3,7	48,3 ± 5,1	82,2 ± 4,9
HE	-	0,5 ± 0,1	66,8 ± 3,6
EtO	-	-	35,5 ± 1,0

9. táblázat: Unilamelláris liposzómák és kamilla illóolaj különböző formulációi közötti kölcsönhatás vizsgálatának eredményei. PM: Penetrált kumulatív illóolaj mennyiség (%). $C_{\text{kamilla}} = 0,1$ mg/ml. Szórás értékek 3 párhuzamos mérésből számolva.

Fehérüröm illóolaj esetén két különböző vizsgálatot végeztünk a formulációk és unilamelláris liposzómák között; az egyik esetben 24 órán át történt a kísérlet 37°C-on, a másik esetben 48 órán át, 30°C-on. Előbbi a különböző baktériumokkal történő kölcsönhatást, utóbbi a sejtes gombákkal történő kölcsönhatást modellezi. Mindegyik reakciókörülmeny között PEk esetén mértem a legnagyobb PM értékeket (ld. 17. ábra), a fehérüröm illóolaj koncentráció az unilamelláris liposzómák belső, vizes fázisában 29,8% volt 48 órát követően 30°C-on, és 59,2% 24 óra után 37°C-on. A HE formáknál ezek az értékek 25,0% és 27,3%-nak adódtak, míg a legkisebb PM értékeket az etanos oldatoknál mértem.



17. ábra: Unilamelláris liposzómák és fehérüröm illóolaj különböző formulációi közötti kölcsönhatás vizsgálatának eredményei. A: 30°C 48 óra, sejt gomba modell. B: 37°C 24 óra, baktérium modell. Szórás értékek 3 párhuzamos mérésből számolva. $C_{\text{fehérüröm}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ (* $P < 0.05$ és ** $P < 0.01$). PE: Pickering emulzió. HE: hagyományos emulzió. EtO: etanolos oldat.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a kamilla és fehérüröm illóolaj esetén egyaránt a PEk bizonyultak a leghatásosabbnak a különböző formulációk közül, amelyekből már rövid idő után jelentős mértékű az illóolaj penetrációja a sejtmembránon keresztül.

4.2.3. Kamilla és fehérüröm illóolajok különböző formulációinak mikrobiológiai vizsgálata

A kamilla és fehérüröm illóolajok felhasználásával készült PEk, HEk és oldatos formulációk mikrobiológiai eredményei egy PhD disszertáció alapját képezik, ezért ezekről részletesen itt nem esik szó, azok a 3.2.4 fejezetben említett dolgozatban és publikációkban olvashatók.

Összességében elmondható, hogy a PEk kiemelkedő antifungális és antibakteriális hatással rendelkeznek a HEhoz vagy etanolos oldathoz képest. Mivel a mikrobiológiai vizsgálatok eredményei jó egyezést mutatnak a sejtmodellel végzett kísérletekkel, ezért feltételezhetjük, hogy a PEk nagyobb hatékonysága a sejtmembránon keresztül történő effektívebb penetrációnak köszönhető.

4.3. *Streptococcus mutans* fogászati biofilm kezelése Pickering emulziókkal

4.3.1. Különböző illóolajat tartalmazó Pickering emulziók formulálása és vizsgálata

A különböző illóolajokból készült PEk és HEk cseppméretére és stabilitására vonatkozó eredményeket a 10. táblázatban láthatjuk. A táblázatban az emulziók cseppméretének szórás értékei nem kerültek feltüntetésre, azok 1,8-8,3% között alakultak.

Az eredmények azt mutatják, hogy az emulziók cseppmérete nő az olajos fázis koncentrációjának növelésével, PEk és HEk esetén egyaránt. Az *in vitro* biofilm degradációs kísérletekhez és *in vitro* diffúziós vizsgálatokhoz használt emulziók esetén az egyes illóolajok koncentrációja MIC/2 érték volt: borsmenta 0,98 mg/ml, fahéj 0,40 mg/ml, kakukkfű 0,20 mg/ml, szegfűszeg 0,51 mg/ml, ezekhez az emulziókhoz tartozó cseppméret és stabilitás értékek a 11. táblázatban láthatók.

A PEk stabilitása egyértelműen jobb, mint a HEké, a kakukkfű és borsmenta illóolajból készült PEk mutatkoztak a legstabilabbnak, amelyek cseppmérete és külleme több mint 4 hónapig nem változott, míg ugyanezen olajokból készült HEk stabilitása csupán 4 illetve 2 hét volt. Fahéj illóolaj esetén HS20 nanorészecskékkel is elvégeztem a PEk formulálását, amelyek azonban alacsony stabilitásuk (4 nap) miatt kitűnnek a többi PE forma közül.

Az emulziók típusát vezetőképességgel határoztam meg. A vezetőképesség értékek a különböző SN vizes szuszpenziókra az alábbiak: 281,4 215,0 és 207,3 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ HS20, 20ET20 és 40ET20 nanorészecskék esetén. A HEk stabilizáló ágensének, azaz a Tween80[®] vizes oldatának vezetőképessége 199,8 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. A különböző illóolajok vezetőképessége: borsmenta 0,071 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, fahéj 0,043 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, kakukkfű 0,065 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, szegfűszeg 0,048 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. A PEk vezetőképességének értéke olajos fázis és stabilizáló ágens szerint összefoglalva a 10. táblázatban látható. Az értékek egyértelműen arra utalnak, hogy mindegyik PE olaj a vízben típusú emulzió.

Illóolaj	cIO (mg/ml)	Stabilizáló ágens	D _{csepp} (nm)	Stabilitás	Vezetőképesség ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Borsmenta	0,15-3,25	20ET20	295-1445	16 hét	208,1-197,0
	0,15-0,70	Tween80	255-470	1 hét	195,3-178,0
	0,80-3,25	Tween80	510-1090	2 hét	170,5-168,4
Fahéj	0,05-2,00	HS20	400-4800	4 nap	269,0-255,2
	0,05-2,00	20ET20	196-3100	8 hét	210,6-196,0
	0,05-2,00	20ET40	310-5080	8 hét	200,7-194,4
	0,05-0,50	Tween80	240-480	3 hét	195,5-177,0
	0,60-2,00	Tween80	620-3010	2 hét	175,2-166,0
Kakukkfű	0,05-0,4	20ET20	155-395	16 hét	209,8-206,3
	0,50-2,00	20ET20	450-1680	16 hét	205,0-198,6
	0,05-2,00	Tween80	150-1720	4 hét	188,4-175,3
Szegfűszeg	0,05-5	20ET20	180-4300	2 hét	199,2-165,1
	0,05-0,70	Tween80	155-245	2 hét	147,1-130,3
	0,80-2,00	Tween80	355-3920	1 hét	128,8-110,5

10. táblázat: Különböző illóolajok felhasználásával készült PEk és HEk tulajdonságai. IO: illóolaj

Illóolaj	cIO (mg/ml)	Stabilizáló ágens	D _{csepp} (nm)	Stabilitás
Borsmenta	0,98	20ET20	210±10	16 hét
		Tween80	310±9	2 hét
Fahéj	0,40	HS20	220±4	4 nap
		20ET20	245±12	8 hét
		40ET20	255±6	8 hét
		Tween80	240±20	3 hét
Kakukkfű	0,2	20ET20	255±5	16 hét
		Tween80	245±20	4 hét
Szegfűszeg	0,51	20ET20	370±22	2 hét
		Tween80	320±37	1 hét

11. táblázat: Különböző illóolajok felhasználásával készült PEk és HEk tulajdonságai. IO: illóolaj. Az illóolaj koncentrációja a MIC/2 értékkel egyezik meg.

4.3.2. Biofilm degradációjának in vitro vizsgálata

A biofilm degradációjával kapcsolatos mikrobiológiai vizsgálatok eredményei egy másik PhD disszertáció témáját képezik, így ezek részletes ismertetésére itt nem kerül sor.

Összefoglalásként elmondható, hogy a fahéj illóolaj PE formájával sikerült a legjobb eredményeket elérni, ebben az esetben a *Streptococcus mutans* okozta biofilm degradáció 85,9%-os volt. Részletes eredmények, illetve a biofilmek kezelés előtti és utáni állapotáról készült pásztázó elektronmikroszkópos felvételek a 3.3.3 fejezetben említett disszertációban és publikációban olvashatók.

4.3.3. *In vitro* diffúziós vizsgálat biofilm modell membránon

A biofilm modell membránon végzett diffúziós kísérletek célja az volt, hogy összefüggést találjunk az *in vitro* biofilm degradációs kísérletek eredményei és a különböző illóolaj formulációk diffúziós viselkedése között. Mivel a PEk és HEk cseppmérete az egyes illóolajoknál közel egyezett, ezért feltételezhető, hogy eltérő diffúziós viselkedésüket az eltérő kolloidkémiai tulajdonságok okozzák. A különböző illóolajok diffúziós profiljai nagyon hasonlóak, ezért tekintettel a dolgozat terjedelmére, ebben a fejezetben csak a fahéj illóolajra vonatkozó eredményeket ábrázoltam grafikusán (ld. 18. ábra), a többi a 9.7. számú mellékletben megtalálható; illetve minden eredmény látható a 12. táblázatban. A biofilm modell membránon átdiffundált illóolaj mennyiséget kumulatív illóolaj mennyiségben fejeztem ki [KM, %].

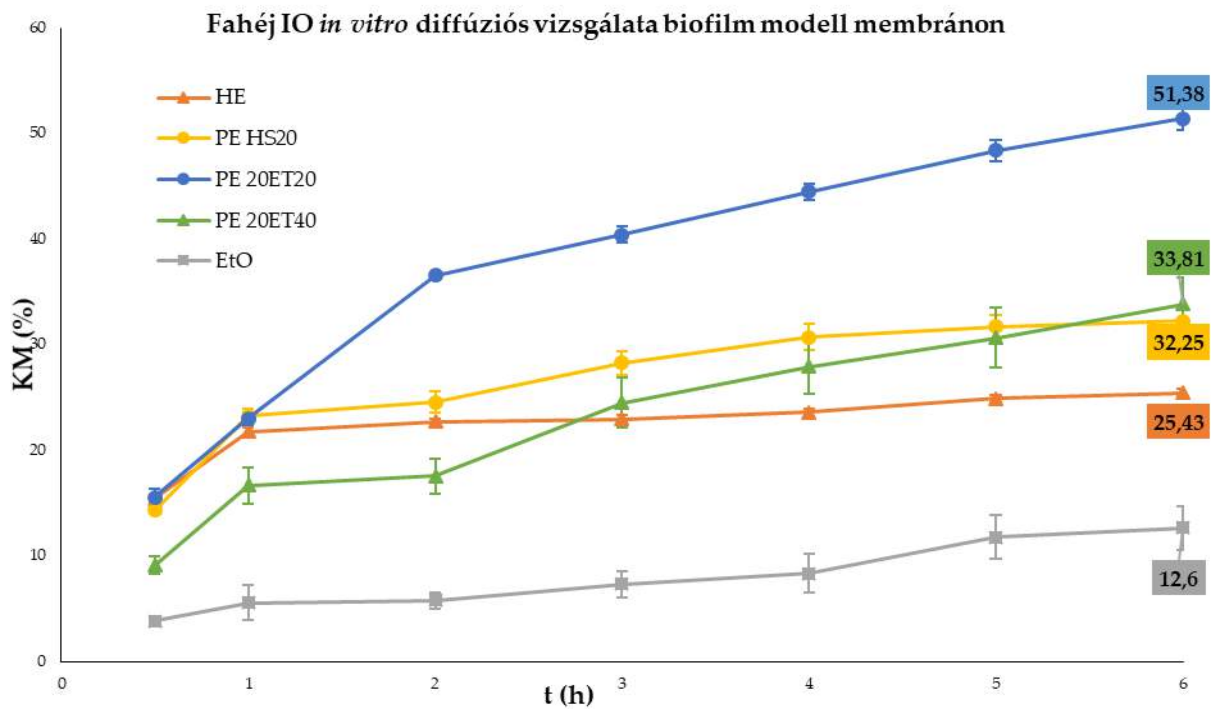
Illóolaj	cIO (mg/ml)	Formuláció	D _{csepp} (nm)	KM (%)
Borsmenta	0,98	EtO	-	69,7±14,1
		HE	310±9	69,0±9,2
		PE 20ET20	210±10	81,1±2,2
Fahéj	0,40	EtO	-	10,5±1,6
		HE	240±20	30,7±1,2
		PE HS20	220±4	32,3±1,2
		PE 20ET20	245±12	51,4±1,0
		PE 40ET20	255±6	33,8±2,5
Kakukkfű	0,20	EtO	-	<LOD
		HE	245±20	9,4±0,4
		PE 20ET20	255±5	18,9±0,5
Szegefűszeg	0,51	EtO	-	12,9±2,8
		HE	320±37	21,5±0,1
		PE 20ET20	370±22	27,5±4,0

12. táblázat. Különböző illóolajok és formulációk *in vitro* diffúziós vizsgálatainak eredményei. IO: illóolaj. KM: kumulatív illóolaj mennyiség 6 óra után.

Általánosságban elmondható, hogy minden illóolaj esetén a PE formából történik legnagyobb mennyiségben a diffúzió, majd ezt követi a HE forma és az etanos oldat. Annak ellenére, hogy a kakukkfű illóolaj MIC értéke a legkisebb, ami a legjobb antibakteriális hatásra utalna, a biofilm degradációs készsége alacsony, ami jó egyezést mutat a diffúziós tulajdonságával. Ebben az esetben ugyanis etanos oldat esetén a biofilm modell membránon átdiffundált KM mennyisége nem is mérhető (<LOD), illetve HE és PE esetén is alacsonyak az értékek, 9,4 és 18,9%. A legnagyobb KM értékek borsmenta illóolaj esetén adódtak, mely PE esetén, több, mint 80% volt. Fahéj illóolaj esetén a legnagyobb KM érték PE 20ET20 forma esetén érhető el, mely 51,4%, szemben a PE HS20 (32,3%) és PE 40ET20 (33,8%) formákkal. Bár a borsmenta PE KM értéke jóval magasabb, mint a fahéj

illóolaj ugyanezen formulációjához tartozó értéke, mégis utóbbival érhető el a leghatékonyabb biofilm degradáció. A jelenséget magyarázhatja, hogy fahéj illóolaj MIC értéke alacsonyabb, mint a borsmenta illóolajé.

Összességében elmondható, hogy az *in vitro* biofilm degradációs és *in vitro* diffúziós vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a megfelelő hidrofil/lipofil karakterrel rendelkező részecskékkel történő PE stabilizálás hozzájárulhat a megfelelő mennyiségű illóolaj célba juttatásához.



18. ábra. Fahéj illóolaj *in vitro* diffúziós vizsgálata biofilm modell membránon. KM: kumulatív illóolaj mennyiség. A különböző formulációk olaj koncentráció $c_{\text{fahéj IO}}=0,40$ mg/ml. Az emulziók cseppmérete $D_{\text{HE}}=240$ nm $D_{\text{HS}}=220$ nm, $D_{\text{PE 20ET20}}=245$, $D_{\text{PE 20ET40}}=255$ nm.

4.4. Körömgomba helyi kezelése teafa illóolajat és tiokonazol tartalmazó Pickering emulziókkal

4.4.1. Teafa illóolaj gázkromatográfiás analizisének eredménye

Az MA pontos összetételét a 13. táblázatban olvashatjuk, illetve a kromatogramot a 9.8. számú mellékletben láthatjuk. A komponensek azonosítása standard vegyületek retenciósidőjének összevetésével és pontosan ismert összetételű teafa illóolaj elemzésének összehasonlításával történt. Két fő komponenst azonosítottunk be, melyek a p-cimén 35,2%-ban, illetve a terpinén-4-ol 32,5%-ban.

Komponens	Retenciósidő t_R (min)	Komponensek százalékos összetétele (%)
α -tujén	5	1.7
α -pinén	5.2	4.6
2-p-mentadién	5.2	0.6
β -pinén	6.2	1.2
β -mircén	6.4	0.8
α -terpinén	7.0	1.4
p-cimén	7.3	35.2
terpinil-acetát	7.3	2.1
cineol	7.4	5.8
γ -terpinén	8	7.6
terpinolén	8.6	1.7
terpinén-4-ol	10.7	32.5
α -terpineol	11	2.6
aromadendrén	15.5	0.7
epiglobulol	16.4	1.2

13. táblázat. Teafa illóolaj gázkromatográfiás analízise. A táblázatban két párhuzamos mérési eredmény átlagértékei vannak feltüntetve. A két fő komponenst vastag betűvel jelöltük.

4.4.2. Tiokonazol oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban

A Hansen-féle oldhatósági paraméterek számítása alapján egyértelműen kijelenthetjük, hogy a TIO oldódik a MAban. A számítás adatait és eredményeit lásd a 9.9 számú mellékletben.

A kinetikai oldhatóság meghatározásának eredménye alapján a TIO maximális oldhatósága 0,213 mg/ml érték volt, ami 23,8 m/m% koncentrációnak felel meg. Ennek alapján a PEk formulálása során kicsivel a maximális oldhatósági érték alatt maradva, 20 m/m% koncentrációban dolgoztunk. A kísérleti adatok a 9.10. számú mellékletben tekinthetők meg.

4.4.3. *Teafaolaj és tiokonazol tartalmú Pickering emulziók formulálása és vizsgálata*

A PEk fizikai kémiai tulajdonságát számos paraméter befolyásolhatja, többek között az olajos és vizes fázisok között kialakuló határfelületi feszültség, a stabilizáló részecskék mérete, nedvesedési szöge, koncentrációja, az olaj/víz fázisok aránya, az emulgeálás energiája. Munkám során megvizsgáltam, miként hat a PEk cseppméretére és stabilitására az olajos fázis koncentrációjának, a stabilizáló részecskék méretének, felületi módosításának és felületi borítottságának és koncentrációjának a változtatása. Ebben a fejeztben csak azokat a kísérleteket tekintem át, amelyek stabilitás és cseppméret szempontjából megfelelő eredményeket hoztak. A további kísérletek és eredményeik a *9.6. számú mellékletben* olvashatók.

Binks és Horozov kutatásaik során kimutatták, hogy a PEk cseppméretét befolyásolni lehet a stabilizáló részecskék méretének változtatásával, ha a többi paramétert, többek között az olajos és vizes fázis arányát állandó értéken tartjuk¹⁵⁶. Az általuk leírt jelenség a mi kísérleti eredményeinkben is megfigyelhető, mind az MA és a TIO MA olajos fázis felhasználásával készült PEk esetén is. Ugyanazon olajos fázis koncentráció esetén a cseppméret növekszik, ha a PEkat stabilizáló SNk mérete nő. Például csak MA-t tartalmazó emulzióknál, 4,48 mg/ml koncentráció esetén a cseppméret PE 20ET20 esetén 1400 nm, míg PE 20ET50 mintánál 1700 nm, PE 20ET100 mintánál pedig 1850 nm (ld. *14. táblázat*). A koncentráció tartomány bármely értékénél vizsgálódva ugyanezt a tendenciát figyelhetjük meg, a maximális cseppméretek 17,91 mg/ml MA értéknél PE 20ET20 esetén 1850 nm, PE 20ET50 emulzióknál 2300 nm, és PE 20ET100 mintánál 3080 nm. A különböző méretű SNk alkalmazása stabilizáló ágensként nem csak a cseppméretre, hanem a stabilitásra is hatással van. Eredményeink alapján megfigyelhető, hogy a kisebb részecskeméret esetén stabilabb emulziót kapunk, ugyanazon MA koncentráció értéknél. 4,48 mg/ml MA-t tartalmazó PE esetén a stabilitás 20 hét 20ET20 részecske alkalmazása esetén, amely 1 hétre csökken 20ET50 és 20ET100 SNnel történő stabilizáláskor (ld. *14. táblázat*).

Ha összehasonlítjuk az MA felhasználásával készült PEk tulajdonságait a TIO MA olajos fázissal készült PEkéval, láthatjuk, hogy a cseppméret-stabilizáló SN méret és cseppméret-olajos fázis koncentráció összefüggések a fent leírt tendenciát mutatják (ld. 15. táblázat). Ugyanazon olajos fázis koncentrációnál végezve az eredmények összehasonlítását megfigyelhetjük, hogy a cseppméret szignifikánsan nem változik, azonban a stabilitás jelentősen csökken. Például a PE 20ET20 típusú emulziónál, 6,27 mg/ml olajos fázis koncentráció értékénél csak MA felhasználásával az emulzió stabilitása 20 hét, míg TIO MA formulálása esetén jelentősen lecsökken 8 hétre. Ugyanez az összefüggés figyelhető meg a PE 20ET50 és PE 20ET100 esetén is, ahol a stabilitás MA és MA TIO esetén 10 hét és 1 hét helyett, 8 hétre és 10 percre csökken (ld. 15. táblázat).

Valószínűleg azért nincs jelentős változás a PEk cseppméretében, amikor MA helyett TIO MA oldatát használjuk, mert a főbb paraméterek, azaz az emulgeálás körülményei, a stabilizáláshoz használt SNk mérete és felületi borítottsága, az olajos és vizes fázis koncentrációjának az aránya nem változik, illetve az olajos fázis viszkozitás értéke és sűrűsége is közel állandó marad, a TIO oldását követően is. Az MA dinamikus viszkozitásának értéke $9,2608 \cdot 10^{-3}$ Pa·s (25°C), sűrűsége $0,895$ g/cm³ (25°C), míg a TIO MA értékei $9,4147 \cdot 10^{-3}$ Pa·s és $0,931$ g/cm³ (25°C).

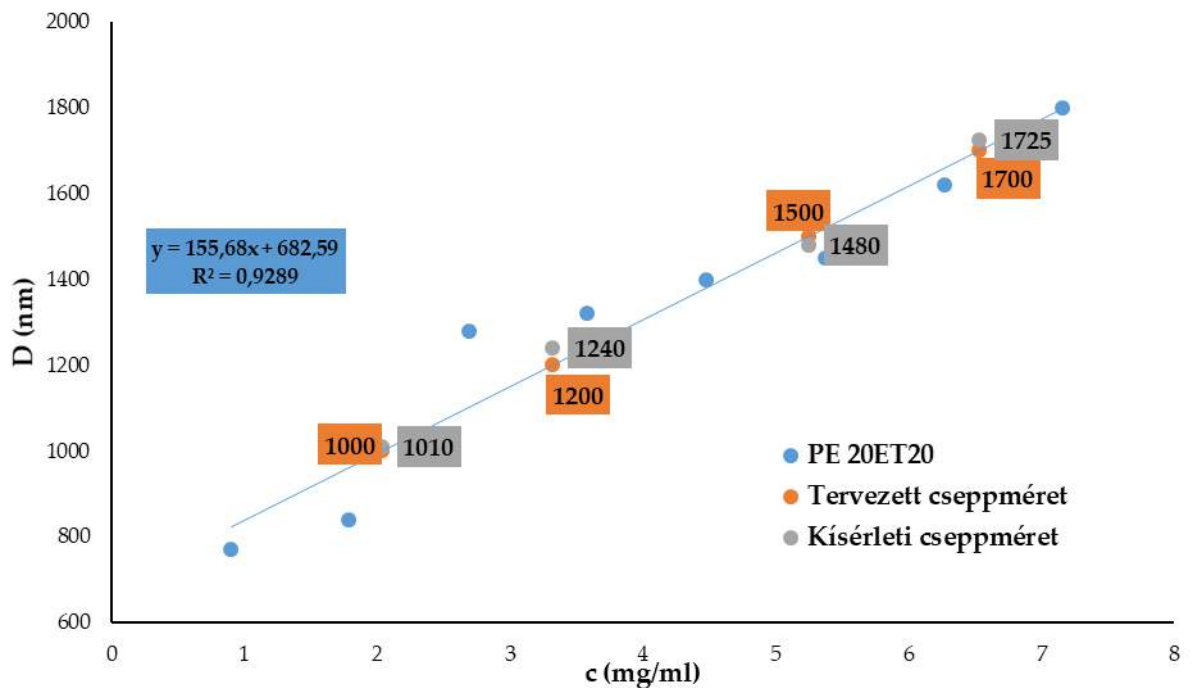
PE 20ET20			PE 20ET50		PE 20ET100	
C olajos fázis (mg/ml)	D _{csepp} (nm)	Stabilitás	D _{csepp} (nm)	Stabilitás	D _{csepp} (nm)	Stabilitás
0,90	770±35,2	1 nap	1010 ± 43,8	1 nap	1050 ± 310,5	1 nap
1,79	840±70,3	1 nap	1080 ± 105,1	1 nap	1290± 300,7	1 nap
2,69	1280±98,2	5 hét	1420 ± 110,7	3 hét	1510± 210,8	1 nap
3,58	1320±100,5	5 hét	1640 ± 95,6	3 hét	1820 ± 360,2	1 hét
4,48	1400±101,2	20 hét	1700 ± 115,3	1 hét	1850 ± 410,6	1 hét
5,37	1450±85,7	20 hét	1690 ± 98,1	10 hét	1910 ± 420,0	1 hét
6,27	1620±62,9	20 hét	1630 ± 57,2	10 hét	2000 ± 100,3	1 hét
7,16	1800±71,0	20 hét	1780 ± 88,5	10 hét	2010 ± 80,1	4 hét
8,96	1660 ± 56,7	20 hét	1690 ± 70,4	8 hét	2050 ± 73,4	4 hét
11,19	1890 ± 41,2	20 hét	2150 ± 210,3	8 hét	2180 ± 27,3	4 hét
13,43	1840 ± 141,0	20 hét	2300± 177,0	8 hét	2690± 100,7	4 hét
16,12	1820,0 ± 99,6	20 hét	2200 ± 98,5	8 hét	3100 ± 105,2	4 hét
17,91	1850 ± 496,6	20 hét	2300± 124,0	8 hét	3080 ± 73,0	4 hét
C olajos fázis (mg/ml)	Megjelenés PE 20ET20	Megjelenés PE 20ET50	Megjelenés PE 20ET100			
0,90	krémesedés	ülededés	krémesedés			
1,79	krémesedés	ülededés	krémesedés			
2,69	opálos	ülededés	krémesedés			
3,58	opálos	opálos	krémesedés			
4,48	opálos	opálos	krémesedés			
5,37	opálos	opálos	opálos			
6,27	opálos	opálos	opálos			
7,16	opálos	opálos	opálos			
8,96	opálos	opálos	opálos			
11,19	opálos	tejszerű	tejszerű			
13,43	opálos	tejszerű	tejszerű			
16,12	tejszerű	tejszerű	tejszerű			
17,91	tejszerű	tejszerű	tejszerű			

14. táblázat. MA olajos fázis felhasználásával készült PEk tulajdonságai. A szórás értékek 3 párhuzamos kísérletből és mérésből számolt adatok.

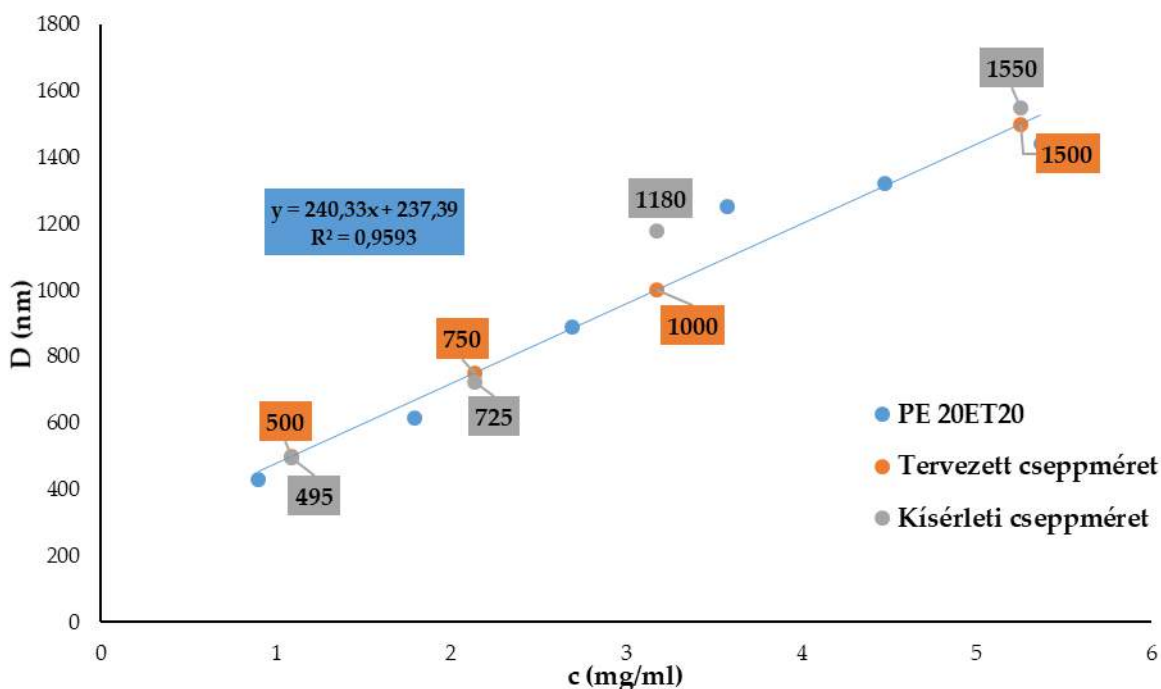
PE 20ET20			PE 20ET50		PE 20ET100	
C olajos fázis (mg/ml)	D _{csepp} (nm)	Stabilitás	D _{csepp} (nm)	Stabilitás	D _{csepp} (nm)	Stabilitás
0,90	430 ± 39,6	10 perc	1280 ± 62,8	1 nap	1070 ± 438,5	30 perc
1,79	615 ± 22,2	30 perc	1320 ± 95,9	1 nap	1350 ± 531,8	30 perc
2,69	890 ± 103,3	30 perc	1440 ± 83,5	1 nap	1630 ± 464,5	30 perc
3,58	1250 ± 94,5	1 nap	1650 ± 51,5	2 nap	1730 ± 514,5	10 perc
4,48	1320 ± 32,5	8 hét	1670 ± 216,8	2 nap	1850 ± 107,9	10 perc
5,37	1440 ± 100,2	8 hét	1620 ± 79,7	8 hét	1890 ± 333,8	10 perc
6,27	1470 ± 35,2	8 hét	1610 ± 34,4	8 hét	1950 ± 95,0	10 perc
7,16	1470 ± 62,5	8 hét	1670 ± 62,8	8 hét	1940 ± 20,1	1 hét*
8,96	1660 ± 56,7	8 hét	1690 ± 70,4	8 hét	2070 ± 51,2	1 hét*
11,19	1890 ± 41,2	20 hét	2200 ± 188,9	8 hét	2200 ± 59,5	1 hét*
13,43	1840 ± 141,0	20 hét	2250 ± 170,8	2 hét*	2800,0 ± 85,7	1 hét
16,12	1820,0 ± 99,6	20 hét	2080 ± 160,1	2 hét*	2850 ± 184,3	1 hét
17,91	1850 ± 496,6	8 hét	2380 ± 157,0	2 hét*	3090 ± 116,6	1 hét
C olajos fázis (mg/ml)	Megjelenés PE 20ET20	Megjelenés PE 20ET50	Megjelenés PE 20ET100			
0,90	krémesedés	ülededés	krémesedés			
1,79	krémesedés	ülededés	krémesedés			
2,69	krémesedés	ülededés	krémesedés			
3,58	opálos	opálos	krémesedés			
4,48	opálos	opálos	krémesedés			
5,37	opálos	tejszerű	krémesedés			
6,27	opálos	tejszerű	krémesedés			
7,16	opálos	tejszerű	tejszerű			
8,96	opálos	tejszerű	tejszerű			
11,19	tejszerű	tejszerű	tejszerű			
13,43	tejszerű	tejszerű	aggregáció, ülededés			
16,12	tejszerű	tejszerű	aggregáció, ülededés			
17,91	opálos	tejszerű	aggregáció, ülededés			

15. táblázat: MA TIO 20 m/m% olajos fázis felhasználásával készült PEk tulajdonságai. *A csillaggal jelölt emulziók 1 hétig őrzik meg stabilitásukat, azonban kb. 30 másodpercig tartó felrázást követően visszanyerik eredeti cseppméretüket és újra 1 hétig stabilak maradnak. A szórás értékek 3 párhuzamos kísérletből és mérésből számolt adatok.

Tovább vizsgálva a cseppméretet megállapítottuk, hogy a 20ET20 PEk esetén lineáris összefüggés van a cseppméret és az olajos fázis koncentrációja között. MA olajos fázis esetén 0,9-7,16 mg/ml, míg MA TIO olajos fázis esetén 0,9-5,37 mg/ml koncentráció tartományban figyelhető meg a linearitás (ld. 19. és 20. ábra) A lineáris összefüggéseket felhasználva kiszámoltuk a tervezett cseppmérethez tartozó olajos fázis koncentrációját, majd elkészítettük az emulziókat. A 16. táblázatban és az ábrákon egyaránt látható, hogy a 20ET20 részecskék alkalmazásával a PEk cseppmérete jól tervezhető, amely hozzájárulhat célzott HA leadású PEk készítéséhez.



19. ábra: MA felhasználásával készült 20ET20 PEk cseppméretének tervezhetősége. Három párhuzamos mérési eredményből, a cseppméretek szórásértékei 2,1-4,4% között alakultak.



20. ábra: MA és TIO felhasználásával készült 20ET20 PEk cseppméretének tervezhetősége. Három párhuzamos mérési eredményből, a cseppméretek szórásértékei 1,8-3,9% között alakultak.

MA 20ET20 PE					MA TIO 20ET20 PE				
Colajos fázis (mg/ml)	D _{csepp} (nm)	D _t (nm)	c _t (mg/ml)	D _k (nm)	Colajos fázis (mg/ml)	D _{csepp} (nm)	D _t (nm)	c _t (mg/ml)	D _k (nm)
0,90	770	1000	2,03	1010±21,2	0,90	430	500	1,09	495±8,9
1,79	840	1200	3,24	1240±35,9	1,79	615	750	2,14	725±26,9
2,69	1280	1500	5,25	1480±47,4	2,69	890	1000	3,17	1180±69,6
3,58	1320	1700	6,53	1725±75,9	3,58	1250	1500	5,25	1550±144,2
4,48	1400				4,48	1320			
5,37	1450				5,37	1440			
6,27	1620								
7,16	1800								

16. táblázat: MA és MA TIO olajos fázis felhasználásával készült, 20ET20 PEK cseppméretének tervezhetősége.* Az alsó indexben megjelenő rövidítések: t=tervezett, k=kísérleti úton meghatározott.

A PEk típusát vezetőképesség méréssel határoztam meg. A vezetőképesség értékek a különböző SN vizes szuszpenziókra az alábbiak: 215,0, 211,4, és 268,3 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 20ET20, 20ET50 és 20ET100 részecskék esetén. Az MA vezetőképessége 0,058 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, míg az MA TIO oldatáé 0,063 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ értéknek adódott. A PEk vezetőképességének értéke olajos fázis és stabilizáló SN típus szerint összefoglalva a 17. táblázatban látható. Az értékek egyértelműen arra utalnak, hogy mindegyik PE olaj a vízben típusú emulzió.

Stabilizáló SN	Olajos fázis	Colajos fázis (mg/ml)	Vezetőképesség ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
20ET20	MA		165,3-261,0
20ET20	MA TIO		149,4-259,3
50ET20	MA	0,9-17,9	167,2-246,0
50ET20	MA TIO		155,8-250,4
100ET20	MA		150,2-263,9
100ET20	MA TIO		139,9-257,50

17. táblázat. Különböző TIO vagy TIO MA olajos fázist tartalmazó PEk vezetőképességének meghatározása. A vezetőképesség értékek alapján mindegyik PE olaj a vízben típusú emulzió.

4.4.4. *In vitro* diffúziós vizsgálatok körömmodellen

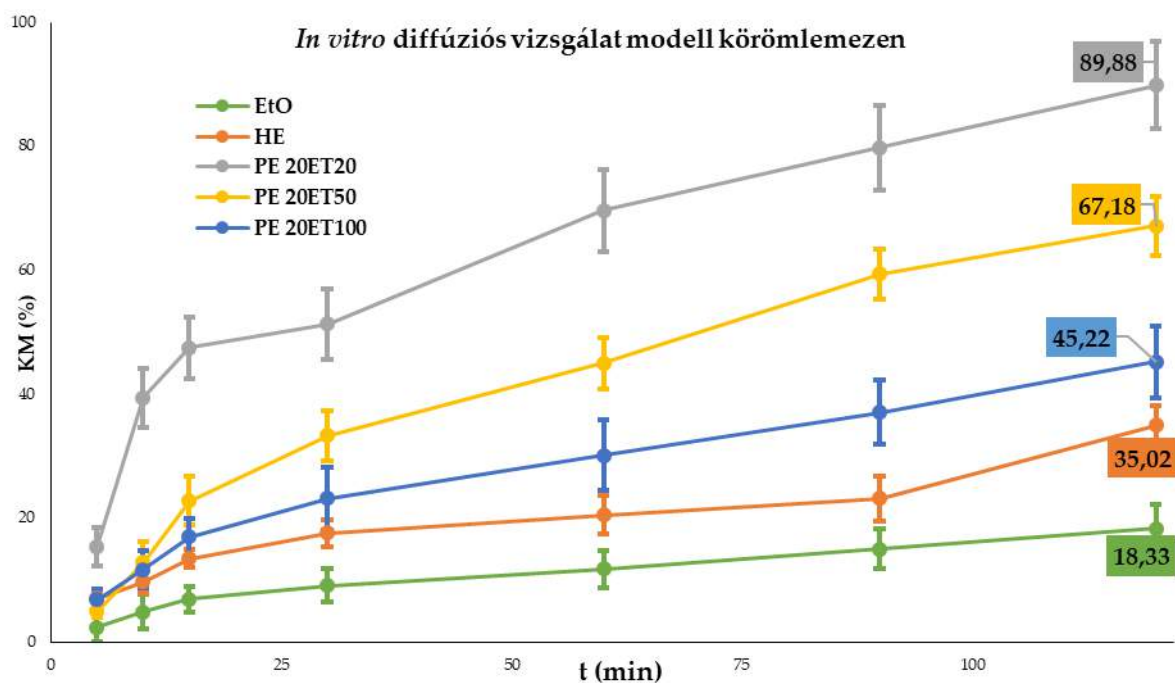
A vizsgálatok során célunk volt a különböző formulációk diffúziós tulajdonságainak összehasonlítása, ezért a PEkon kívül HEkat és etanolos oldatot is készítettem. Három különböző méretű, de azonos felületi borítottságú SNvel készítettem PEkat, melyek a stabilizáló részecske eltérő méretéből adódóan más-más cseppmérettel rendelkeztek, az alábbiak szerint: PE 20ET20 $D_{\text{csepp}}=1850$ nm, a PE 20ET50 $D_{\text{csepp}}=2380$ nm, PE 20ET100 $D_{\text{csepp}}=3090$ nm (ld. 18. táblázat). A HE cseppmérete 2470 nm volt, amely összevethető a PEk cseppméretével, így feltételezhetjük, hogy az eltérő diffúziós viselkedésük a különböző kolloid rendszerek tulajdonságaiból adódik. A formulációkban az olajos fázis koncentrációja azonos volt, 17,91 mg/ml, ami 3,58 mg/ml TIO hatóanyagot jelent. Az ábrákon és a szövegben megjelenő KM rövidítés a kumulatív TIO mennyiségét jelenti, %-ban kifejezve.

A kísérleti eredmények PEk esetén sokkal hatékonyabb TIO diffúziót mutattak az agar membránon keresztül (PE 20ET20 KM=89,88%), mint a HE (KM=35,02%) vagy etanolos oldat esetén (KM=18,33%) (ld.18. táblázat és 21. ábra). Továbbá megfigyelhető, hogy minél kisebb a PE cseppmérete, annál több HA képes átdiffundálni az agar membránon; 1850 nm esetén a KM 89,88%, míg 3090 nm cseppméretnél csak 45,22%.

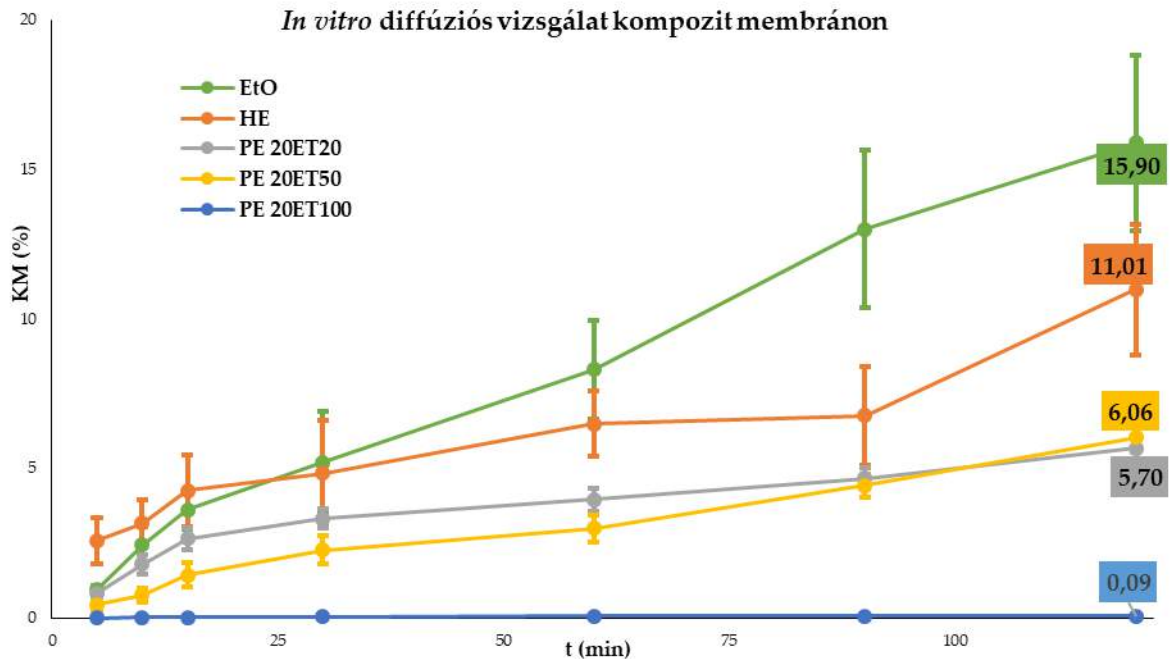
A kompozit membránon történő vizsgálódás esetén megállapítottuk, hogy az oldatos mintából gyakorlatilag a teljes HA mennyiség keresztüljut a membránon, és csak nagyon kis mennyiség marad a célterületen, azaz a modell körömágybőr felületén (2,4%) (ld. 22. ábra és 18. táblázat). A PE 20ET20 minta esetén ez az érték jóval kedvezőbb: agar gélen a TIO 89,88%-a jutott keresztül, a kompozit membránon pedig csupán 5,7%, így a többi TIO tartalom, azaz 84,18% a célterületen maradt. Ez a mennyiség PE 20ET50 esetén 61,1%, míg PE 20ET100 esetén 45,13%. Az eredmények alapján tehát kijelenthetjük, hogy PEk alkalmazásával elérhető a célul kitűzött célzott HA leadás.

Minta	Stabilizáló ágens	D _{csepp} (nm)	KM	KM	KM	KM
			Agar gél (%)	Agar gél (mg/cm ²)	Kompozit membrán (%)	Kompozit membrán (mg/cm ²)
ETO	-	-	18,33	0,26	15,90	0,22
HE	Tween80	2470,0 ± 89,1	35,02	0,49	11,01	0,15
PE 20ET20	20ET20 SN	1850 ± 496,6	89,88	1,26	5,70	0,08
PE 20ET50	20ET50 SN	2380 ± 157,0	67,18	0,95	6,06	0,05
PE 20ET100	20ET100 SN	3090 ± 116,6	45,22	0,63	0,09	0,001

18. táblázat: Körömlémezen történő *in vitro* diffúziós vizsgálatok eredményei TIO MA olajos fázist tartalmazó PEk esetén. ETO: etanos oldat. HE: hagyományos emulzió. KM: kumulatív tiokonazol mennyiség 2 órát követően. A TIO koncentrációja minden esetben 3,58 mg/ml volt.



21. ábra. *In vitro* diffúziós vizsgálatok eredményei modell körömlémezen. KM: kumulatív hatóanyag mennyiség. A formulációk tiokonazol koncentrációja 3,58 mg/ml. A különböző emulziók cseppméretei: HE 2470,0 ± 89,1 nm, PE 20ET20 1850 ± 496,6 nm, PE 20ET50 2380 ± 157,0 nm, PE 20ET100 3090 ± 116,6 nm.



22. ábra. In vitro diffúziós vizsgálatok eredményei kompozit membránon. KM: kumulatív hatóanyag mennyiség. A formulációk tiokonazol koncentrációja 3,58 mg/ml. A különböző emulziók cseppméretei: HE 2470,0 ± 89,1 nm, PE 20ET20 1850 ± 496,6 nm, PE 20ET50 2380 ± 157,0 nm, PE 20ET100 3090 ± 116,6 nm

4.4.5. *T. rubrum* és *C. albicans* gombafajokon végzett mikrobiológiai vizsgálatok eredményei

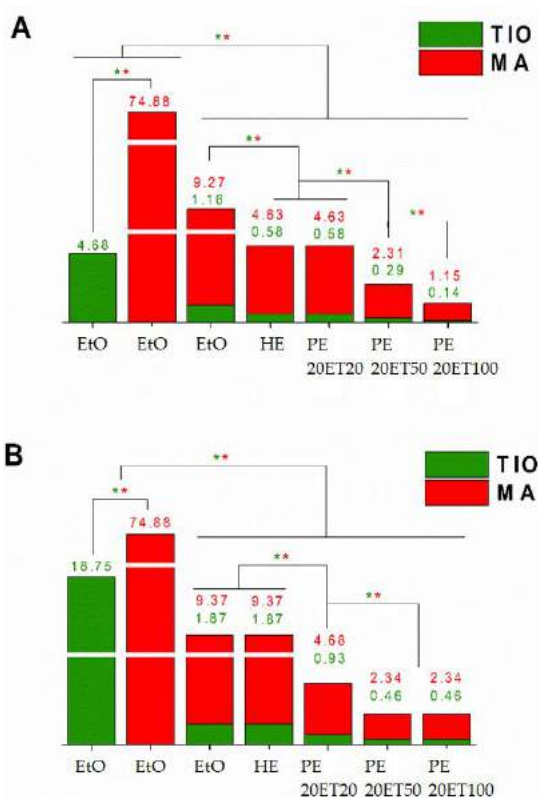
A *T. rubrum* és *C. albicans* gombafajokra meghatározott MIC és MFC értékeket a 19. táblázatban, illetve a 23. és 24. ábrán láthatjuk. Az etanolos oldat formájában történő vizsgálatok alapján egyértelműen látszik, hogy mind a *T. rubrum*, mind a *C. albicans* esetén a kombinációban alkalmazott MA és TIO MFC és MIC értékek is jelentősen csökkentek, a külön-külön alkalmazott MA és TIO értékekhez képest. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy valóban fellép szinergista hatás az illóolaj és az azol származék között.

A különböző formulációk összehasonlításakor láthatjuk, hogy a PEk jóval hatékonyabbak a két gombafaj ellen, mint a TIO MA HE vagy etanolos oldat formája. A 20ET100 PE mutatja a legnagyobb hatékonyságot a gombák ellen, MIC és MFC értéke *T. rubrum* és *C. albicans* esetén is a legalacsonyabb.

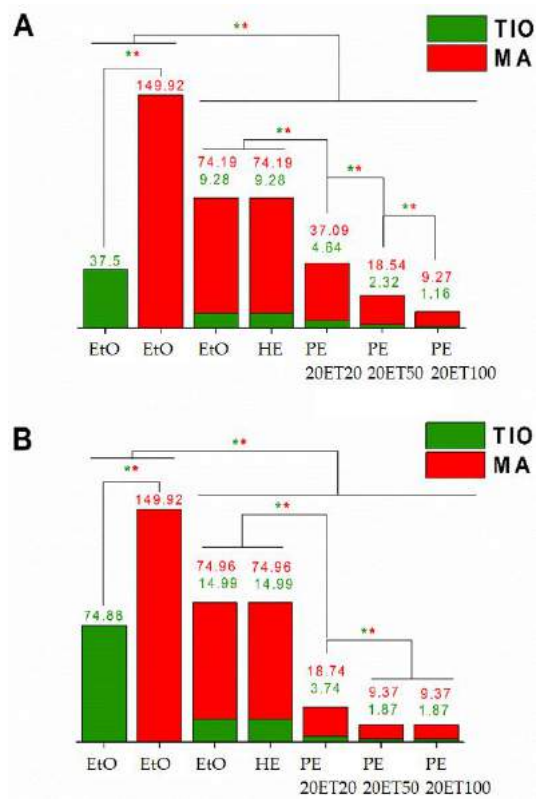
A mikrobiológiai vizsgálatok is igazolják, hogy a TIO és MA kombinációját tartalmazó PE formának van létjogosultsága a körömgomba helyi kezelésében.

Minta	<i>T. rubrum</i>		<i>C. albicans</i>	
	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)
EtO-TIO	4,68	37,5	18,75	74,88
EtO-MA	74,88	149,92	74,88	149,92
EtO-TIO MA	10,43	83,47	11,24	89,95
HE	5,21	83,47	11,24	89,95
PE 20ET20	5,21	41,73	5,61	22,48
PE 20ET50	2,6	20,86	2,8	11,24
PE 20ET100	1,29	10,43	2,8	11,24

19. táblázat: Minimális gátlási koncentráció [MIC] és minimális fungicid koncentráció [MFC] meghatározása *T. rubrum* és *C. albicans* esetén.



23. ábra. Minimális gátlási koncentráció [MIC] meghatározása *T. rubrum* (A) és *C. albicans* (B) gombafajokon. Az ábrán feltüntetett mennyiségek µg/ml értékben vannak kifejezve. A zöld csillag (*) és a piros csillag (*) a szignifikáns értékeket mutatják ($p < 0,01$), TIO és MA esetén.



24. ábra. Minimális fungicid koncentráció [MFC] meghatározása *T. rubrum* (A) és *C. albicans* (B) gombafajokon. Az ábrán feltüntetett mennyiségek µg/ml értékben vannak kifejezve. A zöld csillag (*) és a piros csillag (*) a szignifikáns értékeket mutatják (p<0,01), TIO és MA esetén.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során célunk volt SNk méret pontos, reprodukálható szintézisének megvalósítása, majd ezt követően a nanorészecskék megfelelő mértékű felületi módosítása. Stöber reakcióban, tetra-etoxi-szilán prekursorból állítottunk elő SNket különböző reakciókörülmények között, majd kerestük a reakciók paraméterei és a nanorészecskék tulajdonságai közötti összefüggéseket. **Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy sikerült megvalósítani 6-191 nm közötti szilika nanorészecskék szintézisét, melyek mérete az ammónia koncentrációjának, a hőmérsékletnek és a víz koncentrációjának változtatásával szisztematikusan befolyásolható.** Kísérleteink bebizonyították, hogy az általunk vizsgált körülmények között, lineáris összefüggés áll fenn az ammónia koncentráció és a részecskeméret, a reakció hőmérséklete és a részecskeméret, illetve a víz koncentrációja és a részecskeméret között. **A lineáris összefüggés segítségével pontosan megtervezhető, hogy adott méretű SN előállításához milyen reakció körülményeket kell alkalmaznunk.** A méret szabályozásához elsősorban az ammónia koncentráció és/vagy a hőmérséklet változtatását javasoljuk, mivel ebben az esetben kaptunk szabályos gömb alakú és monodiszperz részecskeméret eloszlású SNket.

A SNk hidrofil-lipofil jellegének változtatásához elvégeztük a felületmódosításukat. A felület módosításának mértékét geometriai megközelítéssel számítottuk ki, majd ez alapján terveztük meg a kísérleteket. A reakciókban különböző funkciós csoportokat tartalmazó szilanol származékokat használtunk fel, úgymint metil-, etil-, propil- és fenil-trietoxi-szilánt. **A sikeres felületmódosítást infravörös spektroszkópiai vizsgálatokkal igazoltuk, továbbá megállapítottuk, hogy a módosítás hatására a részecskék mérete, alakja és polidiszperzitása nem változik.**

A SNket PEk stabilizálására használtuk fel, célunk volt az alkalmazásnak megfelelő cseppméretű és stabilitású emulziók előállítása. Elsőként **kamilla és fehérüröm illóolajok formulálását végeztük el, mikrobiológiai vizsgálatokhoz. Munkám során legalább 3 hónapig stabil, olaj a vízben típusú PEkat állítottam elő, melyek cseppmérete 160-1415 nm között alakult.** A formuláláshoz 20 nm méretű SNket használtam fel. Kamilla illóolaj esetén 50%-ban, míg fehérüröm illóolaj esetén 20%-ban propil funkciós csoportokkal felületmódosított SNk bizonyultak megfelelő stabilizáló ágensnek a 0,1-3,5 mg/ml illóolaj koncentráció tartományban. **Mindkét illóolaj esetén a PE forma jóval hatékonyabbnak bizonyult az oldatos és HE formával szemben, különböző Gram negatív és Gram pozitív baktériumok, illetve gombák kezelésénél egyaránt.**

A különböző formulációk és a sejtmodell közötti kölcsönhatás vizsgálata során megállapítottuk, hogy a PE formából nagyságrenddel nagyobb a sejtmembránon keresztül történő penetráció, mint oldatos vagy HE forma esetén. Amennyiben feltételezzük, hogy a PE cseppek adszorbeálódnak a sejtmembránra, az azon keresztül történő nagyfokú penetrációt két jelenség okozhatja²⁰⁴. Az illóolajok passzív diffúzióval jutnak át a sejtmembránon, amelyet az adszorpció miatt, helyileg kialakuló nagy koncentráció gradiens okoz; vagy a PE cseppek endocitózissal közvetlenül a sejtbe jutnak. A pontos mechanizmus jelenleg tisztázására vár. A mikrobiológiai vizsgálatok során megfigyeltük, hogy míg a SNk inertek, önmagukban nem váltanak ki sem antibakteriális, sem antifungális hatást, addig az etanol, mint oldószer, illetve a Tween80[®] felületaktív anyag önmagában is rendelkezik antimikrobás hatással. **A PEk hatékonyabb sejtmembránon keresztül történő penetrációja, és a SNk inert tulajdonsága mind azt igazolja, hogy a PE megfelelő lehet illóolajok formulálására és mikrobiológiai vizsgálatára.**

Munkánk során, melyben a Streptococcus mutans fogászati biofilm helyi kezelését tűztük ki célul, sikerült kívánt cseppméretű és stabilitású, olaj a vízben típusú PEkat előállítanunk, borsmenta, fahéj, kakukkfű és szegfűszeg illóolajból egyaránt. Stabilizáló ágensként a 20 nm méretű, 20%-ban etil funkciós csoportokkal módosított SNk bizonyultak megfelelőnek. ***A PEk cseppmérete 210-370 nm között alakult, amelyek méretüknél fogva alkalmasak lehetnek a biofilm kisebb pórusaiba, így mélyebb rétegeibe történő célzott illóolaj szállítására.*** Az elkészített emulziók minden esetben legalább 1 hétig stabilak voltak, bizonyos esetekben a stabilitás a 4 hónapos időtartamot is elérte.

A mikrobiológiai vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az illóolajok PEivel jóval hatékonyabb biofilm degradáció érhető el, mint az oldatos vagy HE formával. Feltételezhetően a különbség a formulációk eltérő diffúziós tulajdonságainak köszönhető. Ezt alátámasztandó, elvégeztük mindegyik illóolaj különböző formulációjának *in vitro* diffúziós vizsgálatát modell biofilm membránon. ***A diffúziós vizsgálatok eredményei összhangban voltak a mikrobiológiai vizsgálatokkal.*** A legnagyobb illóolaj mennyiség a PEkből diffundált át a membránon, minden illóolaj esetén, majd ezt követte a HE és az oldatos forma. A kakukkfű illóolaj rendelkezik a legjobb antimikrobás hatással, mivel MIC értéke ennek a legalacsonyabb. Ennek ellenére alacsony biofilm degradációs aktivitást mutat, ami a diffúziós vizsgálatok eredményével magyarázható, mivel PE esetén is kevesebb, mint 19% kakukkfű illóolaj diffundált át a modell biofilm membránon. A leghatékonyabb biofilm degradáció a fahéj illóolaj PE formájával érhető el, mely esetben

85,9%-os a degradáció, és a diffúziós vizsgálat során mért kumulatív illóolaj mennyiség 51,4% volt. **Összességében megállapíthatjuk, hogy a SNkkel stabilizált, olaj a vízben típusú PEk hatékonyabb gyógyszerformának bizonyulnak a *S. mutans* fogászati biofilm helyi kezelésére.**

A körömgombás megbetegedések helyi kezelésére szánt PEk előállítása és vizsgálata során megállapítottuk, hogy a két lipofil hatóanyag, a tiokonazol és a teafa illóolaj formulálása elvégezhető egyazon gyógyszerkészítményben. A Hansen oldhatósági paraméter számításával, majd a kinetikai oldhatóság vizsgálatával **megállapítottuk, hogy a tiokonazol nagy mennyiségben (>20 m/m%) oldható a teafa illóolajban, így oldatuk felhasználható a PEk olajos fázisaként. Mikrobiológiai kísérleteket végeztünk *Trichophyton rubrum* és *Candida albicans* gombafajok esetén, melyek igazolták a kezdeti feltevésünket, miszerint a tiokonazol és teafa illóolaj között szinergista hatás lép fel.** Ezt a MIC és MFC értékek meghatározásával erősítettük meg.

A PEk előállítása során azonos felületi módosítású (20% etil), azonban három különböző méretű SNvel dolgoztunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a PEkat stabilizáló SNk mérete befolyásolja a cseppméretet és a stabilitást is: kisebb részecskeméretű szilikát alkalmazva kisebb cseppméret és nagyobb stabilitás érhető el. Amennyiben 20 nm méretű szilikát használunk, a PEk cseppmérete lineárisan változtatható az olajos fázis koncentrációjának függvényében. Munkánk során a célzott HA leadást tűztük ki célul, melyben a nagy molekulatömegű, lipofil tulajdonságú tiokonazol átjut a körömlemezen, és a fertőzés helyén, azaz a körömágybőrön marad. Ehhez *in vitro* diffúziós vizsgálatokat végeztünk el, modellezve a körömlemezt és a körömágybőrt. ***A diffúziós vizsgálatok eredményei egyértelműen bizonyították, hogy a PE forma alkalmazásával elérhető a célzott hatóanyag leadás, szemben a tiokonazol oldatos vagy HE formájával. Továbbá a leadott hatóanyag mennyisége az emulziót stabilizáló részecskék méretének, így a cseppméretnek a változtatásával befolyásolható.*** Az eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy a PE alkalmazása ígéretes lehet körömgombás megbetegedések célzott, helyi kezelésére.

6. HIVATKOZÁSOK

¹ Goodarz, F. et al. A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **2019**, *97* (1), 281-309. DOI: 10.1002/cjce.23336

² McClements, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1719-1729. DOI: 10.1039/C2SM06903B

³ Anton, N. et al.: Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research* **2011**, *28*, 978–985. DOI: 10.1007/s11095-010-0309-1

⁴ Chappat, M. Some applications of emulsions, *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* **1994**, *91* 57–77. DOI: 10.1016/0927-7757(94)02976-8

⁵ D.K. Sarker, *Pharmaceutical Emulsions: A Drug Developers Toolbag*. John Wiley & Sons Inc, Chichester, West Sussex, UK, **2013**. ISBN: 978-0-470-97683-8

⁶ Komatsu, H. et al.: Pharmaceutical characterization of commercially available intravenous fat emulsions: estimation of average particle size, size distribution and surface potential using photon correlation spectroscopy. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1995**, *43*, 1412–1415. DOI: 10.1248/cpb.43.1412

⁷ Hippalgaonkar, K. et al.: Injectable Lipid Emulsions—Advancements, Opportunities and Challenges. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology* **2010**, *11*(4), 1526–1540. DOI: 10.1208/s12249-010-9526-5

⁸ Mu, H. et al.: Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, *453*(1), 215-224. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.03.054

⁹ Otto, A. et al.: Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *International Journal of Cosmetic Science* **2009**, *1*(1), 1-19. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2008.00467.x.

¹⁰ Saettone, M. F. et al.: Ophthalmic emulsions and suspensions. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology* **2001**, *20*(2-3), 183-201. DOI: 10.1081/CUS-120001857

¹¹ Ghori, M.U. et al.: Nasal drug delivery systems: an overview. *American Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, *3*, 110–119. DOI: 10.12691/ajps-3-5-2

¹² Stegemann, S. et al.: When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *31*(5), 249–261. DOI:10.1016/j.ejps.2007.05.110

¹³ Wadhwa, J. et al.: Emulsion forming drug delivery system for lipophilic drugs. *Acta Poloniae Pharmaceutica in Drug Research* **2012**, *69*(2), 179-191. PMID: 22568032

¹⁴ Nakamoto, Y. et al.: Studies on pharmaceutical modification of anticancer agents. I. Enhancement of lymphatic transport of mitomycin C by parenteral emulsions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1975**, *23*(10), 2232-2238. DOI: 10.1248/cpb.23.2232.

¹⁵ Hashida, M. et al.: An application of water-in-oil and gelatin-microsphere-in-oil emulsions to specific delivery of anticancer agent into stomach lymphatics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **1977**, *5*, 241–255. DOI: 10.1007/BF01065398

¹⁶ Bjerregaard, S. et al.: Parenteral water/oil emulsions containing hydrophilic compounds with enhanced in vivo retention: formulation, rheological characterisation and study of in vivo fate using whole body gamma-scintigraphy. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, *215*(1-2), 13-27. DOI: 10.1016/s0378-5173(00)00656-6.

-
- ¹⁷ Davis, S.S. et al.: The in vivo evaluation of emulsion formulations administered intramuscularly. *International Journal of Pharmaceutics* **1987**, 38, 133–137. DOI: 10.1016/0378-5173(87)90108-6
- ¹⁸ Florence, A.T., et al.: Effect of formulation of intramuscular injections of phenothiazines on duration of activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1976**, 65, 1665–1668. DOI: 10.1002/jps.2600651125
- ¹⁹ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/audenz>
- ²⁰ O von Dardel et al.: Fat emulsion as a vehicle for diazepam. A study of 9492 patients. *British Journal of Anaesthesia* **1983**, 55(1), 41-47. DOI: 10.1093/bja/55.1.41.
- ²¹ Tibell, A. et al.: Dissolving intravenous cyclosporin A in a fat emulsion carrier prevents acute renal side effects in the rat. *Transplant International* **1993**, 6(2), 69-72. DOI: 10.1007/BF00336647.
- ²² Lu, G. W., & Gao, P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems, Elsevier Inc.* **2010**, pages 59–94. DOI: 10.1016/b978-0-8155-2025-2.10003-4
- ²³ Wong, R. et al.: The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology* **2015**, 25(2), 92-98. DOI: 10.1111/exd.12832
- ²⁴ Wiechers, J.W. et al.: Formulating for efficacy. *International Journal of Cosmetic Science* **2004**, 26(4), 173-182. DOI: 10.1111/j.1467-2494.2004.00211.x.
- ²⁵ Marti-Mestres, G. et al.: Emulsions in health care applications—an overview. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2002**, 23, 419–439. DOI: 10.1080/01932690208984214
- ²⁶ Kulkarni, S.A. et al.: Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharmaceutical Research* **2013**, 30, 2512–2522. DOI: 10.1007/s11095-012-0958-3
- ²⁷ Chenevier, P. et al.: Interaction of Cationic Colloids at the Surface of J774 Cells: A Kinetic Analysis. *Biophysical Journal* **2000**, 79(3), 1298–1309. DOI:10.1016/s0006-3495(00)76383-1
- ²⁸ Carmona-Ribeiro, A. et al.: Interactions between Cationic Vesicles and Cultured Mammalian Cells. *Langmuir* **1997**, 13(8), 2215–2218. DOI:10.1021/la960759h
- ²⁹ Wilhelm, C. et al.: Interaction of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles with Cells: Kinetic Analyses of Membrane Adsorption and Subsequent Internalization. *Langmuir* **2002**, 18(21), 8148–8155. DOI:10.1021/la0257337
- ³⁰ Lee, K. D. et al.: Quantitative analysis of liposome-cell interactions in vitro: Rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes. *Biochemistry* **1993**, 32(3), 889–899. DOI:10.1021/bi00054a021
- ³¹ Yeeprae, W. et al.: Effect of mannose density on mannose receptor-mediated cellular uptake of mannosylated O/W emulsions by macrophages. *Journal of Controlled Release* **2006**, 114(2), 193–201. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.04.010
- ³² Goldstein, D. et al.: The design and evaluation of a novel targeted drug delivery system using cationic emulsion–antibody conjugates. *Journal of Controlled Release* **2005**, 108, 418–432. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.08.021
- ³³ Florence A. T. et al.: Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption: Studies on particle uptake and fate. *Journal of Control Release* **1995**, 36, 39–46. DOI: 10.1016/0168-3659(95)00059-H
- ³⁴ Savla, R. et al.: Review and analysis of FDA approved drugs using lipid-based formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2017**, 43(11), 1743-1758. DOI: 10.1080/03639045.2017.1342654
- ³⁵ Eccleston GM. Emulsions and Microemulsions. In: Swarbrick J, editor. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Informa Healthcare USA, Inc; **2007**. pages. 1548–1565. ISBN: 9780429132728

-
- ³⁶ T.F. Tadros: Emulsion Formation and Stability. *Wiley-VCH-Verl, Weinheim*, **2013**. ISBN: 978-3-527-31991-6
- ³⁷ Pickering, S.U. Emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **1907**, *91*, 2001–2021. DOI:10.1039/CT907910200
- ³⁸ Pape, W.J.; Pfannenbecker, U.; Hoppe, U. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Molecular Toxicology* **1987**, *1*, 525–536.
- ³⁹ Kennedy, G. L.: Surfactants, Anionic and Nonionic. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* **2014**, 436-438, Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00541-8
- ⁴⁰ Albert, C. et al.: Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release* **2019**, *309*, 302–332. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.003
- ⁴¹ Wang, L.J. et al.: Fabrication and characterization of antioxidant Pickering emulsions stabilized by Zein/Chitosan Complex Particles (ZCPs). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 2514–2524. DOI: 10.1021/jf505227a.
- ⁴² Tan, H. et al.: Gelatin particle-stabilized high internal phase emulsions for use in oral delivery systems: protection effect and in vitro digestion study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*, 900–907. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04705.
- ⁴³ Marefati, A. et al.: Storage and digestion stability of encapsulated curcumin in emulsions based on starch granule Pickering stabilization. *Food Hydrocolloids* **2017**, *63*, 309–320. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.08.043
- ⁴⁴ Yi, T. et al.: A new drug nanocrystal self-stabilized Pickering emulsion for oral delivery of silybin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2017**, *96*, 420–427. DOI:10.1016/j.ejps.2016.08.047
- ⁴⁵ Luo, Z. et al.: Particle-Stabilizing Effects of Flavonoids at the Oil–Water Interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*(6), 2636–2645. DOI:10.1021/jf1041855
- ⁴⁶ Spyropoulos, F. et al.: W/O/W Emulsions Stabilized by Fat Crystals - Their Formulation, Stability and Ability to Retain Salt. *Procedia Food Science* **2011**, *1*, 1700–1708. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.251
- ⁴⁷ Cunha, A. G. et al.: Preparation of Double Pickering Emulsions Stabilized by Chemically Tailored Nanocelluloses. *Langmuir* **2014**, *30*(31), 9327–9335. DOI:10.1021/la5017577
- ⁴⁸ Frelichowska, J. et al.: Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *368*, 7–15. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.057
- ⁴⁹ Frelichowska, J. et al.: Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *371*, 56–63. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.12.017
- ⁵⁰ Marku, D. et al.: Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *428*(1-2), 1–7. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.031
- ⁵¹ Leclercq, L. et al.: Pickering emulsions based on cyclodextrins: A smart solution for antifungal azole derivatives topical delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *82*, 126–137. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.11.017
- ⁵² Marto, J. et al.: Starch-Based Pickering Emulsions as Platforms for Topical Antibiotic Delivery: In Vitro and In Vivo Studies. *Polymers* **2019**, *11*, 108. DOI:10.3390/polym11010108

-
- ⁵³ Taguchi, H. et al.: Application of Pickering Emulsion with Cyclodextrin as an Emulsifier to a Transdermal Drug Delivery Vehicle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2019**, *42(1)*, 116-122. DOI:10.1248/bpb.b18-00711
- ⁵⁴ Verma, A. et al.: Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Nano-Micro-Small* **2010**, *6, 1*, 12–21. DOI: 10.1002/smll.200901158
- ⁵⁵ Rejman, J. et al.: Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal* **2004**, *377(1)*, 159–169. DOI: 10.1042/bj20031253
- ⁵⁶ Cho, E. C. et al.: Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Letters* **2009**, *9(3)*, 1080–1084. DOI: 10.1021/nl803487r
- ⁵⁷ Dausend, J. et al.: Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in HeLa Cells. *Macromolecular Bioscience* **2008**, *8(12)*, 1135–1143. DOI: 10.1002/mabi.200800123
- ⁵⁸ Mecke, A. et al.: Lipid Bilayer Disruption by Polycationic Polymers: The Roles of Size and Chemical Functional Group. *Langmuir* **2005**, *21*, 10348-10354. DOI: 10.1021/la050629l
- ⁵⁹ Ginzburg, V.V. et al.: Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes. *Nano Letters* **2007**, *7(12)*, 3716-3722. DOI: 10.1021/nl072053l
- ⁶⁰ Lesniak A. et al.: Nanoparticle Adhesion to the Cell Membrane and Its Effect on Nanoparticle Uptake Efficiency. *Journal of American Chemical Society* **2013**, *135*, 1438–1444. DOI: 10.1021/ja309812z
- ⁶¹ Vasir, J. K. et al.: Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4244–4252. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.07.020
- ⁶² Simovic, S. et al.: Nanoparticle layers controlling drug release from emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *67(1)*, 39–47. DOI :10.1016/j.ejpb.2007.01.011
- ⁶³ Marion, C. R. et al.: Essentials of essential oils. *American Journal of Health-System Pharmacy* **2017**, *74(9)*, 153-162. DOI: 10.2146/ajhp151043.
- ⁶⁴ Dhifi, W. et al.: Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* **2016**, *3(4)*: 25. DOI: 10.3390/medicines3040025
- ⁶⁵ Hammer, K. A. et al.: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* **1999**, *86(6)*, 985–990. DOI:10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x
- ⁶⁶ Lee, K.-G. et al.: Determination of Antioxidant Potential of Volatile Extracts Isolated from Various Herbs and Spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50(17)*, 4947–4952. DOI:10.1021/jf0255681
- ⁶⁷ Ma, L. et al.: Antiviral Effects of Plant-Derived Essential Oils and Their Components: An Updated Review. *Molecules* **2020**, *25(11)*, 2627. DOI: 10.3390/molecules25112627
- ⁶⁸ Pérez G, S. et al.: Anti-inflammatory Activity of Some Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research* **2011**, *23(5)*, 38–44. DOI:10.1080/10412905.2011.9700480
- ⁶⁹ Blowman, K. et al.: Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2018**, *1–12*. DOI: 10.1155/2018/3149362
- ⁷⁰ Yap, P. S. X. et al.: Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The Open Microbiology Journal* **2014**, *8(1)*, 6–14. DOI: 10.2174/1874285801408010006

-
- ⁷¹ Nazzaro, F. et al.: Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* **2017**, *10*(4), 86. DOI: 10.3390/ph10040086
- ⁷² Lis-Balchin, M. Aromatherapy science: A guide for healthcare professionals. *Pharmaceutical Press: London*, **2006**. ISBN 978-0-85369-578-3.
- ⁷³ Orchard, A. et al.: Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2017**, *1–92*. DOI: 10.1155/2017/4517971
- ⁷⁴ Alastruey-Izquierdo, A. et al.: Comparison of Dimethyl Sulfoxide and Water as Solvents for Echinocandin Susceptibility Testing by the EUCAST Methodology. *Journal of Clinical Microbiology* **2012**, *50*(7), 2509–2512. DOI: 10.1128/jcm.00791-12
- ⁷⁵ Inouye, S. et al.: Effect of Sealing and Tween 80 on the Antifungal Susceptibility Testing of Essential Oils. *Microbiology and Immunology* **2001**, *45*(3), 201–208. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2001.tb02608.x
- ⁷⁶ Ansel, H. C. et al.: Antimicrobial Activity of Dimethyl Sulfoxide Against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus megaterium*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1969**, *58*(7), 836–839. DOI: 10.1002/jps.2600580708
- ⁷⁷ Nielsen, C. K. et al.: Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*, 1878. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01878
- ⁷⁸ Cossu, A. et al.: Antifungal activity against *Candida albicans* of starch Pickering emulsion with thymol or amphotericin B in suspension and calcium alginate films. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *493*(1-2), 233–242. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.07.065
- ⁷⁹ Wang, J. et al.: Cinnamon oil-loaded composite emulsion hydrogels with antibacterial activity prepared using concentrated emulsion templates. *Industrial Crops and Products* **2018**, *112*, 281–289. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.12.022
- ⁸⁰ Gurenlian, J. R.: The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health. *American Dental Hygienists' Association December* **2007**, *81*, 116. Print ISSN: 1553-0205
- ⁸¹ ten Cate, J.M.: Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* **2006**, *94*, 1–9. DOI: 10.1007/s10266-006-0063-3
- ⁸² S.C. Chew, L. Yang. Biofilms in *Encyclopedia of Food and Health* **2016**, 407-415. Academic Press, ISBN: 978-0-12-384953-3
- ⁸³ Breschi L. et al., Hydrophilicity of dentin bonding systems influences in vitro *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Dental Materials* **2014**, *30*(8), 926-935. DOI: 10.1016/j.dental.2014.05.009
- ⁸⁴ Zhang T.C. et al.: Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Water Research* **1994**, *28*(11), 2267-2277. DOI: 10.1016/0043-1354(94)90042-6
- ⁸⁵ Slot, D.E. et al.: The efficacy of interdental brushes on plaque and parameters of periodontal inflammation: a systematic review. *International Journal of Dental Hygiene* **2008**, *6*, 253–264. DOI: 10.1111/j.1601-5037.2008.00330.x
- ⁸⁶ Takenaka, S. et al.: Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Japanese Dental Science Review* **2019**, *55*(1), 33-40. DOI: 10.1016/j.jdsr.2018.07.001
- ⁸⁷ Macfarlane, T. V. et al.: Mouthwash Use in General Population: Results from Adult Dental Health Survey in Grampian, Scotland. *Journal of Oral Maxillofacial Research* **2010**, *1*(4), 1-9. DOI: 10.5037/jomr.2010.1402
- ⁸⁸ Tartaglia, G.M. et al.: Adverse events associated with home use of mouthrinses: a systematic review. *Therapeutic Advances in Drug Safety*. **2019**, *10*. DOI: 10.1177/2042098619854881
- ⁸⁹ Subramaniam, P. et al.: Effect of xylitol, sodium fluoride and triclosan containing mouth rinse on *Streptococcus mutans*. *Contemporary Clinical Dentistry* **2011**, *2*(4), 287–290. DOI: 10.4103/0976-237X.91790

-
- ⁹⁰ Pizzo, G. et al.: The effects of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse on supragingival plaque regrowth. *Journal of Periodontology* **2008**, 79(7), 1177–1183. DOI: 10.1902/jop.2008.070583.
- ⁹¹ Langeveld, W.T. et al.: Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology* **2014**, 40(1), 76-94. DOI: 10.3109/1040841X.2013.763219
- ⁹² Hussain K. et al.: Solubility of Essentials Oils by Non-alcoholic Agent. *Journal of Medical Sciences* **2003**, 3, 220-226. DOI: 10.3923/jms.2003.220.226
- ⁹³ Zhang, J. et al., The effects of essential oil mouthrinses with or without alcohol on plaque and gingivitis: a randomized controlled clinical study. *BMC Oral Health* **2018**, 18, 6. DOI: 10.1186/s12903-017-0454-6.
- ⁹⁴ Rantanen, I. et al.: The effects of two sodium lauryl sulphate-containing toothpastes with and without betaine on human oral mucosa in vivo. *Swedish Dental Journal* **2003**; 27(1), 31-4. PMID: 12704946
- ⁹⁵ Newby, C. S. et al.: Benefits of a silica-based fluoride toothpaste containing o-cymen-5-ol, zinc chloride and sodium fluoride. *International Dental Journal* **2011**, 61, 74–80. DOI: :10.1111/j.1875-595x.2011.00053.x
- ⁹⁶ Sakai-Kato, K. et al.: Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, 1840(3), 1171–1180. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.12.014
- ⁹⁷ Piraccini, B.A. et al: Onychomycosis: A Review. *Journal of Fungi* **2015**, 1, 30-43. DOI:10.3390/jof1010030
- ⁹⁸ Sigurgeirsson, B. et al. Prevalence of Onychomycosis in the Global Population: A Literature Study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2014**, 28(11), 1480-91. DOI: 10.1111/jdv.12323
- ⁹⁹ Scher, R.K. Onychomycosis is more than a cosmetic problem. *British Journal of Dermatology* 1994, 130, 15. DOI: 10.1111/j.1365-2133.1994.tb06087.x
- ¹⁰⁰ Gupta, A.K et al. Therapies for onychomycosis: a review. *Dermatologic Clinics* **2006**, 24, 375–379. DOI: 10.1016/j.det.2006.03.010
- ¹⁰¹ Ameen, M. et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. *British Journal of Dermatology* **2014**, 171(5), 937–958. DOI: 10.1111/bjd.13358
- ¹⁰² Gauwerky, K. et al. H.C. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discovery Today* **2009**, 14, 214–222. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.11.013
- ¹⁰³ Christenson, J. et al.: Challenges and Opportunities in the Management of Onychomycosis. *Journal of Fungi* **2018**, 4(3), 87. DOI: 10.3390/jof4030087
- ¹⁰⁴ Baraldi, A. et al. Nail Plate Modifications Induced by Onychomycosis: Implications for Topical Therapy. *Pharmaceutical Research* **2015**, 32, 1626–1633. DOI: 10.1007/s11095-014-1562-5
- ¹⁰⁵ Stuttgen, G. et al.. Bioavailability, skin- and nail-penetration of topically applied antimycotics. *Mykoses* **1982**, 25, 74–80. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1982.tb02721.x
- ¹⁰⁶ Di Chiacchio, N. et al. Nail abrasion. *Journal of Cosmetology and Dermatology* **2003**, 2, 150–152. DOI: 10.1111/j.1473-2130.2004.00095.x
- ¹⁰⁷ Repka, M.A. et al. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 282, 95–106. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.06.010
- ¹⁰⁸ Mohorcić, M. et al. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance unguinal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 332, 196–201. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.09.042

-
- ¹⁰⁹ Boni E. Elewski. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Clinical Microbiological Reviews* **1998**, *11*(3), 415–429. PMID: 9665975
- ¹¹⁰ Fromtling, R.A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clinical Microbiological Reviews* **1988**, *1*(2), 187–217. DOI: 10.1128/cmr.1.2.187
- ¹¹¹ Smith, K.A. et al.. Effects of Organic Solvents on the Barrier Properties of Human Nail. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, *100*, 4244–4257. DOI: 10.1002/jps.22590
- ¹¹² Bohn, M. et al. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2000**, *43*(4), 57–69. DOI: 10.1067/mjd.2000.109072
- ¹¹³ Walters, K.A. et al. Physicochemical characterization of the human nail: Permeation pattern for water and the homologous alcohols and differences with respect to the stratum corneum. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1983**, *35*, 28–33. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1985.tb04966.x
- ¹¹⁴ Monti, D. et al. Ciclopirox vs amorolfine: In vitro penetration into and permeation through human healthy nails of commercial nail lacquers. *Journal of Drugs in Dermatology*. **2014**, *13*(2), 143-147. PMID: 24509963
- ¹¹⁵ Canuto, M.M. et al. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet Infectious Disease* **2002**, *2*, 550–63. DOI: 10.1016/s1473-3099(02)00371-7
- ¹¹⁶ Rosato, A. et al. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *International Journal of Phytomedicine* **2009**, *16*, 972–975. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.02.011
- ¹¹⁷ Yang, W. et al. Drug delivery strategies for improved azole antifungal action. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2008**, *5*(11), 1199-1216. DOI: 10.1517/17425240802457188
- ¹¹⁸ Yu, D. et al. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology* **2015**, *119*, 1253-1262. DOI: 10.1111/jam.12939
- ¹¹⁹ Hui, X. et al. In Vitro Penetration of a Novel Oxaborole Antifungal (AN2690) Into the Human Nail Plate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *96*, 2622–2631. DOI: 10.1002/jps.20901.
- ¹²⁰ Shivakumar, H.N. et al. Ungual and Transungual drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2011**, *38*, 901–911. DOI: 10.3109/03639045.2011.637931
- ¹²¹ Monti, D. et al. Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: in vitro ciclopirox transungual permeation. *British Journal of Dermatology* **2011**, *165*, 99–105. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10303.x
- ¹²² Lusiana et al. Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy* **2011**, *78*, 432–440. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.01.022
- ¹²³ Ramakrishnan, N. Keratin based bioplastic film from chicken feathers and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *111*, 352-358. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.037
- ¹²⁴ Van Hoogdalem, E. et al. Nail penetration of the antifungal agent oxiconazole after repeated topical application in healthy volunteers, and the effect of acetylcysteine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **1997**, *5*, 119–127. DOI: 10.1016/s0928-0987(97)00270-4.
- ¹²⁵ Tiwary, A.K. et al. High failure rate of transungual drug delivery: need for new strategies. *Therapeutic. Delivery* **2017**, *8*, 239–242. DOI: 10.4155/tde-2016-0090.
- ¹²⁶ Mercer, D. et al. Improved Methods for Assessing Therapeutic Potential of Antifungal Agents against Dermatophytes and Their Application in the Development of NP213, a Novel

-
- Onychomycosis Therapy Candidate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2019**, *63*, e02117-18. DOI: 10.1128/aac.02117-18
- ¹²⁷ Lahaye, M. et al. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiol* **1991**, *221*, 137–148. DOI: 10.1007/bf00028370.
- ¹²⁸ Meulemans, A. et al. Measurement and clinical and pharmacokinetic implications of diffusion coefficients of antibiotics in tissues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, *33*, 1286–1290. DOI: 10.1128/aac.33.8.1286
- ¹²⁹ Mertin, D. et al. In-vitro Permeability of the Human Nail and of a Keratin Membrane from Bovine Hooves: Penetration of Chloramphenicol from Lipophilic Vehicles and a Nail Lacquer. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology* **1997**, *49*, 241–245. DOI:10.1111/j.2042-7158.1997.tb06788.x
- ¹³⁰ Haigh, J.M. et al. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **1994**, *2*, 311–330. DOI:10.1016/0928-0987(94)90032-9
- ¹³¹ Baran, R. *Agache's Measuring the Skin*; Springer: Cham, Switzerland, **2017**. ISBN: 978-3-319-32383-1
- ¹³² Berker, D. Nail Anatomy. *Clinical Dermatology* **2013**, *31*, 509–515. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2013.06.006
- ¹³³ Y. Chevalier et al. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, **2013**, *439* 23– 34. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.02.054
- ¹³⁴ Levine, S. et al.: Stabilization of emulsions by fine particles I. Partitioning of particles between continuous phase and oil/water interface. *Colloids and Surfaces*, **1989**, *38*, 325–343. DOI: 10.1016/0166-6622(89)80271-9
- ¹³⁵ T.F. Tadros, B. Vincent. Encyclopedia of Emulsion Technology 1. Szerkesztő Paul Becher, *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, **1983**, 129–285. 10.1002/pol.1983.130210820
- ¹³⁶ Binks, B.P. et al. Influence of particle wettability on the type and stability of surfactant-free emulsions, *Langmuir* **2000**, *16*, 8622–8631. DOI: 10.1021/la000189s
- ¹³⁷ B.P. Binks. Particles as surfactants- similarities and differences. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2002**, *7*, 21-41. DOI: 10.1016/S1359-0294(02)00008-0
- ¹³⁸ French, D. et al. The secret life of Pickering emulsions: particle exchange revealed using two colours of particle. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 31401. DOI:10.1038/srep31401
- ¹³⁹ Krassimir D. Danov et al. The standard free energy of surfactant adsorption at air/water and oil/water interfaces: Theoretical vs. empirical approaches. *Colloid Journal*, **2012**, *74*, 172–185. DOI: 10.1134/S1061933X12020032
- ¹⁴⁰ Gelot, A. et al. Emulsification of oil and water in the presence of finely divided solids and surface-active agents. *Colloids and Surfaces* **1984**, *12*, 271–303. DOI: 10.1016/0166-6622(84)80105-5
- ¹⁴¹ Zifu Li et al. Microgel particles at the fluid–fluid interfaces. *Nanoscale* **2013**, *5*, 1399-1410. DOI: 10.1039/C2NR33503D
- ¹⁴² Viganti, E. et al. Pickering Emulsions: Interfacial Tension, Colloidal Layer Morphology, and Trapped-Particle Motion. *Langmuir* **2003**, *19*, 17, 6650–6656. DOI: 10.1021/la034264l
- ¹⁴³ de Folter, J.W.J. et al. Oil-in-water Pickering emulsions stabilized by colloidal particles from the water-insoluble protein zein. *Soft Matter* **2012**, *8*, 6807-6815. DOI: 10.1039/C2SM07417F
- ¹⁴⁴ Kurukji, D. et al. Interfacial behaviour of sodium stearylactylate (SSL) as an oil-in-water pickering emulsion stabiliser. *Journal of Colloid and Interface Science* **2013**, *409*, 88-97. DOI: 10.1016/j.jcis.2013.07.016.

-
- ¹⁴⁵ VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII.) Minőségi követelmények és vizsgálatok, Emulziók fejezet, K/g. 2.2 Gyógyszerforma vizsgálat cikkely, 423.o.
- ¹⁴⁶ Wiley, R. Limited coalescence of oil droplets in coarse oil-in water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* **1954**, *9*, 427–437. DOI: 10.1016/0095-8522(54)90030-6
- ¹⁴⁷ Golemanov, K. et al. Latex-particle-stabilized emulsions of anti-Bancroft type. *Langmuir* **2006**, *22*, 4968–4977. DOI: 10.1021/la0603875
- ¹⁴⁸ Hadnadev, D.T. et al. Influence of oil phase concentration on droplet size distribution and stability of oil-in-water emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2013**, *115*, 313–21. DOI: 10.1002/ejlt.201100321
- ¹⁴⁹ Whitby, C.P. et al. Structure of concentrated oil-in-water Pickering emulsions. *Soft Matter* **2012**, *8*, 7784–7789. DOI: 10.1039/C2SM26014J
- ¹⁵⁰ Arditty, S. et al.: Materials based on solid-stabilized emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2004**, *25*, 659–664. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.03.001
- ¹⁵¹ Guillot, S. et al. Internally structured pickering emulsions stabilized by clay mineral particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, *333*, 563–569. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.01.026
- ¹⁵² Chen, W. et al. Preparation of O/W Pickering emulsion with oxygen plasma treated carbon nanotubes as surfactants. *Journal of Industrial Engineering and Chemistry*, **2011**, *17*, 455–460. DOI: 10.1016/j.jiec.2010.10.027
- ¹⁵³ Wei, Z. et al. Chitosan nanoparticles as particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules. *Polymer* **2012**, *53*, 1229–1235. DOI: 10.1016/j.polymer.2012.02.015
- ¹⁵⁴ Liu, F. et al. Soy protein nanoparticle aggregates as Pickering stabilizers for oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, *61*, 8888–8898. DOI: 10.1021/jf401859y
- ¹⁵⁵ Adriana San-Miguel et al. Influence of Nanoscale Particle Roughness on the Stability of Pickering Emulsions. *Langmuir* **2012**, *28*, 12038–12043. DOI: 10.1021/la302224v
- ¹⁵⁶ Bink, B.P. et al. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Sci.* **2003**, *100*, 503–546. DOI: 10.1016/S0001-8686(02)00069-6.
- ¹⁵⁷ Denkov, N. et al. A possible mechanism of stabilization of emulsions by solid particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *150*(2), 589–593. DOI: 10.1016/0021-9797(92)90228-e
- ¹⁵⁸ Kaptay, G. On the equation of the maximum capillary pressure induced by solid particles to stabilize emulsions and foams and on the emulsion stability diagrams. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *282*–283, 387–401. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.12.021
- ¹⁵⁹ Szántó Ferenc: A kolloidkémia alapjai. 6. fejezet: A kolloid rendszerek állandósága. *Gondolat kiadó, Budapest*, **1987**. ISBN: 9632818407
- ¹⁶⁰ Ganley, W.J. et al.: Steady-state droplet size in montmorillonite stabilised emulsions. *Soft Matter* **2016**, *12*, 6481–6489. DOI:10.1039/C6SM01377E.
- ¹⁶¹ Lumsdon, S.O. et al.: Pickering emulsions stabilized by monodisperse latex particles: effects of particle size. *Langmuir* **2001**, *17*, 4540–4547. DOI:10.1021/la0103822
- ¹⁶² Paunov, V.N. et al.: Emulsions stabilised by food colloid particles: role of particle adsorption and wettability at the liquid interface. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *312*, 381–389. DOI:10.1016/j.jcis.2007.03.031.
- ¹⁶³ Capron, I. et al.: Surfactant-free high internal phase emulsions stabilized by cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 291–296. DOI: 10.1021/bm301871k.
- ¹⁶⁴ Rayner, M. et al.: Biomassbased particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications, *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* **2014**, *458*, 48–62. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.03.053.

-
- ¹⁶⁵ N. Yan, M.R. Gray, J.H. Masliyah, On water-in-oil emulsions stabilized by fine solids, *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, *193*, 97–107. DOI: 10.1016/S0927-7757(01)00748-8
- ¹⁶⁶ R. Steven, C.R. et al.: Bioinspired silica as drug delivery systems and their biocompatibility. *Journal of Material Chemistry B* **2014**, *2*, 5028-5042. DOI: 10.1039/C4TB00510D
- ¹⁶⁷ Joachim, E. et al.: Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2015**, *11(6)*, 1407-1416. DOI: 10.1016/j.nano.2015.03.004
- ¹⁶⁸ Stöber, W. et al.: Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron sized range; *Journal of Colloid and Interface Science*, **1968**, *26*, 62-69. DOI: 10.1016/0021-9797(68)90272-5
- ¹⁶⁹ Matsoukas, T. et al.: Monomer-addition growth with a slow initiation step: A growth model for silica particles from alkoxides; *Journal of Colloid and Interface Science* **1989**, *132*, 13-21. DOI: 10.1016/0021-9797(89)90210-5
- ¹⁷⁰ Matsoukas, T. et al.: Dynamics of growth of silica particles from ammonia-catalyzed hydrolysis of tetra-ethyl-orthosilicate; *Journal of Colloid and Interface Science* **1988**, *124*, 252-261. DOI: 10.1016/0021-9797(88)90346-3
- ¹⁷¹ G. H. Bogush, C. F. Zukoksi: Studies of the Kinetics of the Precipitation of Uniform Silica Particles through the Hydrolysis and Condensation of Silicon Alkoxides; *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *289*, 125–131. DOI: 10.1016/0021-9797(91)90029-8
- ¹⁷² Green, D. et al.: Size, volume fraction, and nucleation of Stöber silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *266(2)*, 346-358. DOI: 10.1016/s0021-9797(03)00610-6
- ¹⁷³ Plumeré, N. et al.: Stöber silica particles as basis for redox modifications: Particle shape, size, polydispersity, and porosity. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, *368(1)*, 208-219. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.10.070
- ¹⁷⁴ Rahman, I.A. et al.: An optimized sol–gel synthesis of stable primary equivalent silica particles. *Colloids and Surfaces A* **2007**, *294*, 102-110. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.08.001
- ¹⁷⁵ Kim, K.D. et al.: Formation of silica nanoparticles by hydrolysis of TEOS using a mixed semi-batch/batch method. *Journal of Sol–Gel Science and Technology* **2002**, *25*, 183-189. DOI: 10.1023/A:1020217105290
- ¹⁷⁶ Lindberg, R. et al.: Preparation of silica particles utilizing the sol-gel and the emulsion-gel processes; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1995**, *99*, 79-88. DOI: 10.1016/0927-7757(95)03117-V
- ¹⁷⁷ Zukoski, C.F. et al.: Preparation of monodisperse silica particles: control of size and mass fraction. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **1988**, *104*, 95-106. DOI: 10.1016/0022-3093(88)90187-1
- ¹⁷⁸ Leung, K. et al.: Elucidating the Bimodal Acid-Base Behavior of the Water-Silica Interface from First Principles. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 18358–18365. DOI: 10.1021/ja906190t
- ¹⁷⁹ Bagwe, R. P et al.: Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding. *Langmuir* **2006**, *22(9)*, 4357–4362. DOI: 10.1021/la052797j
- ¹⁸⁰ Rampazzo, E. et al.: Surface modification of silica nanoparticles: a new strategy for the realization of self-organized fluorescence chemosensors. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15(27-28)*, 2687. DOI:10.1039/b502052b
- ¹⁸¹ Saeid Jalali, S. R. et al.: Surface modification of silica nanoparticle using dichlorodimethylsilane for preparation of self-cleaning coating based on polyurethane and polydimethylsiloxane. *Materials Research Express* **2008**, *5(9)*, 095311. DOI:10.1088/2053-1591/aad607

-
- ¹⁸² Vlachoianis, C. et al.: Effectiveness and safety of a mouthwash containing essential oil ingredients. *Phytotherapy Research* **2013**, 27(5), 685–91. DOI: 10.1002/ptr.4762
- ¹⁸³ Rotello, V.M. et al., Nanoparticle-Stabilized Capsules for the Treatment of Bacterial Biofilms; *ACS Nano* **2015**, 9(8), 7775–7782. DOI: 10.1021/acsnano.5b01696
- ¹⁸⁴ Kang, J. et al.: Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. *LWT-- Food Science and Technology* **2019**, 101, 639–645. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.093
- ¹⁸⁵ Kim, Y.-G. et al.: Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology* **2015**, 195, 30–39. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.028
- ¹⁸⁶ Wang, L. et al.: Thymol kills bacteria, reduces biofilm formation, and protects mice against a fatal infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain L20. *Veterinary Microbiology* **2017**, 203, 202–210. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.02.021
- ¹⁸⁷ Kim, Y.-G. et al.: Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific Reports* **2016**, 6(1), 36377. DOI: 10.1038/srep36377
- ¹⁸⁸ Pernodet, N., et al. B. Pore size of agarose gels by atomic force microscopy. *Electrophoresis* **1997**, 18(1), 55–58. DOI: 10.1002/elps.1150180111
- ¹⁸⁹ Lemos, J.A. et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, **2019**, 7(1). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018
- ¹⁹⁰ Jevons, S. et al.: Antifungal Activity of Tioconazole (UK-20,349), a New Imidazole Derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1979**, 15(4), 597–602. DOI: 10.1128/aac.15.4.597
- ¹⁹¹ Nenoff, P. et al.: Antifungal Activity of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) against Pathogenic Fungi in vitro. *Skin Pharmacology and Physiology* **1996**, 9(6), 388–394. DOI: 10.1159/000211450
- ¹⁹² C.M. Hansen, The three dimensional solubility parameter and solvent diffusion coefficient, in: *Danish Technical Press, Copenhagen, 1967* ISBN: 9780849372483
- ¹⁹³ Mohammad, M.A. et al. Hansen solubility parameter as a tool to predict cocrystal formation. *International Journal of Pharmaceutics*, **2011**, 407, 63–71. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.01.030
- ¹⁹⁴ Reus, M.A. et al. Solubility Determination from Clear Points upon Solvent Addition. *Organic Process Research and Development*, **2015**, 19(8), 1004–1011. DOI: 10.1021/acs.oprd.5b00156
- ¹⁹⁵ Bagary, R.I.E. et al. Simultaneous HPLC and derivative spectrophotometry determination of tioconazole and benzyl alcohol in bulk and cream with tioconazole forced degradation study. *Analytical Chemistry: An Indian Journal* **2014**, 14, 462–473. ISSN: 0974-7419
- ¹⁹⁶ Hammer, K.A. et al. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2004**, 53, 1081–1085. DOI:10.1093/jac/dkh243.
- ¹⁹⁷ Barros, L. et al. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology* **2006**, 225, 151–156. DOI:10.1007/s00217-006-0394-x
- ¹⁹⁸ Araújo, C.R. et al. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **2009**, 51, 9–12, DOI:10.1590/s0036-46652009000100002.
- ¹⁹⁹ Cantón, E. et al. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2003**, 45, 203–206. DOI:10.1016/s0732-8893(02)00525-4.

-
- ²⁰⁰ Das, S. et al. Cytotoxic Action of Artemisinin and Scopoletin on Planktonic Forms and on Biofilms of *Candida* Species. *Molecules* **2020**, *25*, 476. DOI:10.3390/molecules25030476.
- ²⁰¹ Santos, D. et al. In vitro activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. *Mycoses* **2007**, *50*, 286–289. DOI:10.1111/j.1439-0507.2007.01325.x
- ²⁰² Majoros, L. et al. Efficacy of amphotericin B and flucytosine against fluconazole-resistant *Candida inconspicua* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**, *56*, 253–254. DOI:10.1093/jac/dki174.
- ²⁰³ Rideau, E. et al. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chemical Society Reviews* **2018**, *47*, 8572–8610. DOI: 10.1039/C8CS00162F
- ²⁰⁴ Zhou, Y. et al.: Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *112*, 7–13. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.102

7. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

7.1. Publikációk

7.1.1. A doktori értekezés alapját képező publikációk

Barbara Horváth, Szilárd Pál, Aleksandar Széchenyi: Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles. *Flavour and Fragrance Journal* **2018**, 33, 385–396.

IF: 1.97 DOI: 10.1002/ffj.3463

Barbara Horváth*, Viktória L. Balázs*, Adorján Varga, Andrea Böszörményi, Béla Kocsis, Györgyi Horváth, Aleksandar Széchenyi: Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. *Scientific Reports* **2019**, 9, 16611.

*Osztott első szerzők. IF: 4.525 DOI: 10.1038/s41598-019-52998-6

Sourav Das*, Barbara Horváth*, Silvija Šafranko, Stela Jokić, Aleksandar Széchenyi, Tamás Kőszegi: Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations. *Molecules* **2019**, 24, 4321.

*Osztott első szerzők. IF: 3,060 DOI: 10.3390/molecules24234321

Sourav Das*, Barbara Vörös-Horváth*, Tímea Bencsik, Giuseppe Micalizzi, Luigi Mondello, Györgyi Horváth, Tamás Kőszegi, Aleksandar Széchenyi: Antimicrobial Activity of Different Artemisia Essential Oil Formulations. *Molecules* **2020**, 25, 2390.

*Osztott első szerzők. IF: 3,267 DOI: 10.3390/molecules25102390

Barbara Vörös-Horváth, Sourav Das, Ala' Salem, Sándor Nagy, Andrea Böszörményi, Tamás Kőszegi, Szilárd Pál#, Aleksandar Széchenyi#. Formulation of Tioconazole and Melaleuca alternifolia Essential Oil Pickering Emulsions for Onychomycosis Topical Treatment. *Molecules* **2020**, 25(23), 5544.

#Osztott felelős szerzők. IF: 3,267 DOI: 10.3390/molecules25235544

ΣIF: 16,089

7.1.2. Egyéb, a disszertációhoz fel nem használt publikációk

Viktória Lilla Balázs, Barbara Horváth, Erika Kerekes, Kamilla Ács, Béla Kocsis, Adorján Varga, Andrea Böszörményi, Dávid U. Nagy, Judit Krisch, Aleksandar Széchenyi, Györgyi Horváth: Anti-Haemophilus Activity of Selected Essential Oils Detected by TLC-Direct Bioautography and Biofilm Inhibition. *Molecules* **2019**, *24*, 3301. IF: 3,060 DOI: 10.3390/molecules24183301

Salem A., Hagymási A., Vörös-Horváth B., Šafarik T., Balić T., Szabó P., Gősi F., Nagy S., Pál S., Kunsági-Máté S., Széchenyi A. Solvent dependent 4-aminosalicylic acid-sulfamethazine co-crystal polymorph control. *European Journal Of Pharmaceutical Sciences* **2021**, *156*, 105599. IF: 3,616 DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105599

7.2. Konferencia absztraktok

7.2.1. Előadás absztraktok

Barbara Horváth, Szilárd Pál, Aleksandar Széchenyi: Theoretical and practical aspects of essential oil emulsions stabilization with solid nanoparticles. *48th International Symposium on Essential Oils ISEO2017, Pécs, Hungary, 10-13 September 2017.*

Széchenyi A., Horváth B., Šafarik T., Sándori, D., Nagy S., Pál Sz.: Application of solid nanoparticle as emulsifiers and surface modifiers in controlled drug delivery. *7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfüred, Hungary, 5-7 October 2017.*

Horváth Barbara, Nagy Sándor, Balázs Viktória Lilla, Das Sourav, Pál Szilárd, Kocsis Béla, Kőszegi Tamás, Széchenyi Aleksandar. Pickering nano emulziók a gyógyszertechnológiában. *Gyógyszertechnológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia 2019, Siófok, Magyarország, 2019. szeptember 26-28.*

7.2.2. Poszter prezentáció absztraktok

Horváth, B., Bárdonicsek, N., Takácsi-Nagy, A., Pál, Sz., Széchenyi, A. Pickering emulsion of tea tree oil in water, stabilized with silica nanoparticles for onychomycosis topical treatment. *7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfüred, Hungary, 5-7 October 2017.*

K Kvell, B Kollar, B Horvath, A Szechenyi, Sz Pal. Steroid-harboring nanoparticles provide anti-inflammatory response with less adverse effects. *6th International Conference and Exhibition, Austria, Vienna, November 09-11, 2017.*

Barbara Horváth, Viktória Lilla Balázs; Nikolett Bárdonicsek, Szilárd Pál; Györgyi Horváth; Aleksandar Széchenyi. In vitro diffusion study of tee tree essential oil emulsions stabilized by silica nanoparticles. *11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, Spain, 19-22 March 2018*

Balázs Viktória L, Horváth Barbara, Széchenyi Aleksandar, Varga Adorján, Kocsis Béla, Ács Kamilla, Kerekes Erika, Krisch Judit , Horváth Györgyi. A fahéj és a szegfűszeg illóolajának nanotechnológiai formulálása és biofilm gátló hatásvizsgálata. *Gyógyszer Innováció 2018 Konferencia, Velence, Magyarország, 2018. április 9 11.*

Barbara Horváth, Viktória L. Balázs, Györgyi Horváth, Széchenyi Aleksandar. Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles for Streptococcus mutans biofilm inhibition. *49th International Symposium on Essential Oils ISEO 2018, September 13-16, 2018, Niš, Serbia.*

Viktória L. Balázs, Barbara Horváth, Erika Kerekes, Aleksander Széchenyi, Adorján Varga, Béla Kocsis, Kamilla, Ács, Judit Krisch, Györgyi Horváth. The nanotechnological formulation and anti-biofilm activity of thyme essential oil against Streptococcus pneumoniae. *49th International Symposium on Essential Oils ISEO 2018, September 13-16, 2018, Niš, Serbia.*

Horváth, B., Nagy, S., Pál, Sz., Széchenyi, A. Application of nanotechnology in formulation of tioconazole and melaleuca alternifolia essential oil for onychomycosis topical treatment. *12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs and Satellite Symposium on Pharmaceutical Biotechnology, Szeged, Hungary, 20-22 September 2018.*

Barbara Horváth, Ala' Salem, Tatjana Šafarik, Szilárd Pál, Aleksandar Széchenyi. Systematic study of reaction conditions for size controlled synthesis of silica nanoparticles. *6th Nano Today Conference, Lisbon, Portugal, 16-20 June 2019.*

Horváth Barbara, Nagy Sándor, Balázs Viktória Lilla, Pál Szilárd, Széchenyi Aleksandar. Teafaolajban oldott tiokcoanzol tartalmú pickering emulziók előállítása és alkalmazása körömgomba helyi kezelésére. *I. FKF Szimpózium, Fiatal Kémikusok Fóruma Debrecen, Magyarország, 2019. április 3 5.*

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőm, *Dr. Széchenyi Aleksandar* támogatását, akivel 2009 óta, kémia BSc szakos hallgató koromtól fogva van szerencsém együtt dolgozni. Támogatása, szakértelme, örök optimizmusa és töretlen motivációja hozzájárult nemcsak ahhoz, hogy a PhD dolgozatom elkészülhetett, hanem a kutatói szemlélet elsajátításához és pályám megalapozásához. Külön köszönet illeti *Prof. Dr. Perjési Pált* (PTE Gyógyszerészi Kémia Intézet), akinek a segítségével elengedhetetlen volt a PhD tanulmányaim megkezdéséhez, illetve *Dr. Pál Szilárdot*, a PTE Gyógyszertechnológiai Intézet igazgatóját, aki kutatómunkám során végig támogattott az ötletek megvalósításában. Szeretném megköszönni *Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak* (PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet) a lelkes támogatást, és hogy ötleteivel hozzájárult munkánk sikeréhez.

PhD munkám során három hallgató társammal is volt alkalmam együtt dolgozni, akikkel lelkiismeretes és lelkes hozzáállásuk miatt mindig gördülékenyen ment a munka. Szeretném megköszönni *Balázs Viktória Lillának* és *Sourav Das-nak* a mikrobiológia területén végzett munkájukat, amelyek a Pickering emulziók formulálásával kapcsolatos kísérleteket remekül kiegészítették. Továbbá szeretnék köszönetet mondani *Salem Ala'-nak*, hogy a statisztikai kiértékelésekben segítséget nyújtott.

Ezúton szeretném megköszönni kollégáimnak, *Dr. Nagy Sándornak* és *Brunner Jánosnak* az analitikai feladatok megoldásában és asszisztálásában nyújtott segítségét. Köszönöm *Dr. Böszörményi Andreának* a teafa illóolajának GC analízisét (Simmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognóziai Intézet), illetve az *Osip Juraj Strossmayer egyetem kollégáinak* a szilika nanorészecskék IR vizsgálatait.

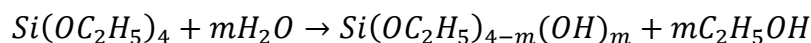
Végül, de természetesen nem utolsósorban szeretném megköszönni a családom és barátaim támogatását, lelkesítését. Külön köszönet illeti *édesanyámat* és *nagyszüleimet*, akik erkölcsi és anyagi támogatása végigsegített egyetemi tanulmányaimon, illetve *férjemet* végtelen türelméért és feltétel nélküli támogatásáért.

9. MELLÉKLETEK

9.1. Szilika nanorészecske szintézis kitermelésének számítása

A szilika nanorészecskék szintézise során a kitermelést az alábbiak szerint határoztuk meg.

Az irodalmi adatok alapján, és mások munkájának megfelelően feltételezzük, hogy a hidrolízis során a TEOS az alábbi reakció szerint alakul át¹:



A reakció egyenlete alapján kiszámítható, hogy az általunk alkalmazott TEOS és víz mennyiségének felhasználásával hány mol, illetve gramm SN képződik.

A ténylegesen keletkezett SN mennyiségének meghatározásához a SNket tartalmazó anyalúgból először 50°C-on elpárologtattam az ammóniát, majd a szuszpenziót centrifugáltam (15 000 rpm, 40 perc) és ultratiszta vízzel háromszor mostam, illetve a tisztítási lépések között centrifugáltam. Az így kapott szilárd anyagot 120°C-on szárítottam 48 órán át, majd a mintákat a mérésekig vákuum exsikkátorban tároltam 3 napig (JEOL EM-DSC10E, JEOL Ltd.). Ezt követően meghatároztam a keletkezett SN tömegét, majd abból számoltam a reakció kitermelését.

¹ T. Koźlecki et al.: Improved Synthesis of Nanosized Silica in Water-in-Oil Microemulsions. *Journal of Nanoparticles* **2016**, 5, 1-9. DOI: 10.1155/2016/8203260

9.2. Felületi borítottság számolása szilika nanorészecskék felületi módosításához

A dolgozat 3.1.2 fejezetében tárgyalt SNk felületi módosítását megelőzően az alábbi geometria megközelítéssel számoltam ki a reakcióhoz szükséges szilanol származékok moláris mennyiségét.

A módosítani kívánt SN méretét (DLS méréssel meghatározott részecske sugara r_{SN}), tömegét (m_{SN}^m) és sűrűségét (ρ)¹ figyelembe véve kiszámítható a megfelelő mennyiségű, módosítani kívánt SN összfelülete (A_{SN}^m). Ehhez első lépésben 1 db SN térfogatát számítjuk ki

$$V_{SN}^1 = \frac{4\pi r_{SN}^3}{3}$$

majd ebből a sűrűség felhasználásával kiszámolható 1 db SN tömege

$$m_{SN}^1 = V_p^1 \cdot \rho$$

Az összes SN tömege (m_{SN}^m), amelynek a felületét módosítani kívánjuk, ismert, mivel az a nanorészecskét tartalmazó szuszpenzió koncentrációjából megadható. Így a módosítani kívánt SN (n_{SN}) száma egyszerű osztással megadható:

$$n_{SN} = \frac{m_{SN}^m}{m_{SN}^1}$$

Ha tudjuk, hogy 1 db SNnek mekkora a felülete

$$A_{SN}^1 = 4\pi r_{SN}^2$$

akkor az összes módosítani kívánt SN felülete (A_{SN}^m) az alábbi képlettel számolható

$$A_{SN}^m = n_{SN} \cdot A_{SN}^1$$

Következő lépésben azt számoltam ki, mekkora 1 db szilanol származék felület igénye. Figyelembe kell vennünk, hogy a szilanol származékok molekula geometriája tetraédes, és a SNk felületi módosítás során a Si-O-CH₂-CH₃ csoportok reakcióján keresztül kötődnek a felülethez. Ezekből az következik, hogy 1 db szilanol molekula 1 db háromszögnek megfelelő területet (T_h) foglal el a SNk felületén. Ennek a háromszögnek a területe kiszámítható, ha tudjuk a Si-O csoportok kötéstávolságát (d_k : 163 pm) és kötésszögét² (α_k : 153,65°):

$$m_h = d_k \cdot \cos \alpha_k$$

ahol m_h a háromszög magassága. Az adatokból a háromszög területe megadható:

$$T_h = \frac{3}{2} \cdot m_h^2 \cdot \sqrt{3}$$

A kívánt felületi borítottság értéket, azaz hogy a SN felületét milyen mértékben kívánjuk módosítani, százalékban adjuk meg (x), így a módosításhoz szükséges szilanolok moláris mennyisége (n_{sz}) megadható:

$$n_{sz} = \frac{A_{SN}^m \cdot x}{T_h}$$

¹ Vladimir M. Masalov et. al. Direct Observation of The Shell-Like Structure of SiO₂ Particles Synthesized by the Multistage Stöber Method. *NANO Brief Reports and Reviews*, **2013**, 8(4) 1350036. DOI: 10.1142/S1793292013500367

² Lickiss, P. D. The Synthesis and Structure of Organosilanols. *Advances in Inorganic Chemistry*, **1995**, 42, 147–262. DOI:10.1016/s0898-8838(08)60053-7

9.3. Kamilla és fehérüröm illóolajokkal készült Pickering emulziók formulálása és vizsgálata - Előkísérletek

Előkísérleteim során 20 nm méretű SNkel dolgoztam, melyek felületi borítottságát változtattam és vizsgáltam, hogyan hat a felületi borítottság változtatása a kamilla és fehérüröm illóolajokból készült PEk cseppméretére és stabilitására. A 20. táblázatban látható SNket használtam a formulálás során, a PEk formulálása és vizsgálata megegyezett a 3.2.1 és 3.2.2 fejezetben leírtakkal.

SN minta	Funkciós csoport	Felületi borítottság (%)
20ET	etil	20
50ET	etil	50
10P	propil	10
20P	propil	20
50P	propil	50

20. táblázat: Kamilla és fehérüröm illóolajok PEinak formulálásához használt SNk tulajdonságai

Tekintettel arra, hogy a fehérüröm illóolaj saját desztillálású olaj és csak véges mennyiség (<5 ml) állt belőle rendelkezésre, ezért az előkísérletek során állandó olaj koncentrációval dolgoztam. A két illóolaj koncentráció értékének meghatározása mikrobiológiai előkísérletekben történt, ez alapján a kamilla illóolaj koncentráció 100 µg/ml, míg a fehérüröm illóolaj koncentrációja 200 µg/ml volt.

A kísérleti eredmények alapján a kamilla illóolaj PE készítésére az 50P, azaz 20 nm méretű és 50%-ban propil funkciós csoportokkal módosított SNk, míg fehérüröm illóolaj esetén a 20P, azaz 20nm méretű és 20%-ban propil funkciós csoportokkal módosított SNk bizonyultak megfelelőnek (ld. 21. táblázat).

Illóolaj	Stabilizáló ágens	C _{IO} (µg/ml)	D _{csepp} (nm)	Stabilitás	Megjelenés
Kamilla	20ET	100	251±2,2	1 nap	fázisszeparáció
	50ET	100	258±11,6	1 hét	opálos
	10P	100	243±29,2	5 nap	fázisszeparáció
	20P	100	260±45,6	1 hónap	opálos
	50P	100	292±4,4	3 hónap	opálos
Fehérüröm	20ET	200	591±15,6	5 nap	fázisszeparáció
	50ET	200	581±57,8	1 hónap	opálos
	10P	200	297±7,6	2 hónap	opálos
	20P	200	160±2,2	3 hónap	opálos
	50P	200	358,7±17,1	1 hónap	fázisszeparáció

21. táblázat: Kamilla és fehérüröm illóolaj tartalmú PEk tulajdonságai. IO: illóolaj.

9.4. Különböző illóolajokkal készült Pickering emulziók formulálása fogászati biofilm kezelésére – Előkísérletek

Előkísérleteim során 20 nm méretű SNkel dolgoztam, melyek felületi borítottságát változtattam és vizsgáltam, hogyan hat a felületi borítottság változtatása a különböző illóolajokat tartalmazó PEK cseppméretére és stabilitására. A 22. táblázatban látható SNket használtam a formulálás során, a PEK formulálása és vizsgálata megegyezett a 3.3.1 és 3.3.2 fejezetben leírtakkal.

SN minta	Funkciós csoport	Felületi borítottság (%)
HS20	-	-
10MET	metil	10
20MET	metil	20
10ET	etil	10
20ET	etil	20
40ET	etil	
10P	propil	10
20P	propil	20

22. táblázat: Különböző illóolajok PEK formulálásához használt SNk tulajdonságai

Összeségében elmondható, hogy mindegyik illóolaj esetén a 20ET, azaz a 20nm méretű és 20%-ban etil funkciós csoportokkal módosított SNk bizonyultak a leginkább megfelelőnek, itt az emulziók 2-16 hét között őrizték meg stabilitásukat, azaz cseppméretük és opálos megjelenésük változatlan maradt (ld. 23. táblázat) A cseppméretek szórásértéke 1,7-7,5% között változott, de az adatok nagy száma miatt nem került feltüntetésre.

Illóolaj	Stabilizáló ágens	C ₁₀ (mg/ml)	D _{cesepp} (nm)	Stabilitás	Megjelenés
Borsmenta	10MET	0,15-3,25	400-1175	5 nap	fázisszeparálódás
	20MET	0,15-3,25	420-1210	5 nap	fázisszeparálódás
	10ET	0,15-3,25	327-1405	4 hét	opálos
	20ET	0,15-3,25	295-1445	16 hét	opálos
	10P	0,15-3,25	310-1650	8 hét	opálos
	20P	0,15-3,25	300-1585	8 hét	opálos
Fahéj	HS20	0,05-2,00	400-4800	4 nap	fázisszeparálódás
	10MET	0,05-2,00	390-3450	5 nap	fázisszeparálódás
	20MET	0,05-2,00	405-3715	5 nap	fázisszeparálódás
	10ET	0,05-2,00	295-3300	2 hét	opálos
	20ET	0,05-2,00	196-3100	8 hét	opálos
	40ET	0,05-2,00	310-5080	8 hét	opálos
	10P	0,05-2,00	380-5060	6 hét	opálos
	20P	0,05-2,00	440-5115	6 hét	opálos
Kakukkfű	10MET	0,05-2,00	230-1480	1 hét	opálos
	20MET	0,05-2,00	225-1570	4 hét	opálos
	10ET	0,05-2,00	190-1880	6 hét	opálos
	20ET	0,05-2,00	155-1680	16 hét	opálos
	10P	0,05-2,00	650-2100	2 nap	fázisszeparálódás
	20P	0,05-2,00	710-2990	2 nap	fázisszeparálódás
Szegefűszeg	10MET	0,05-2,00	485-3050	1 nap	fázisszeparálódás
	20MET	0,05-2,00	390-3320	1 nap	fázisszeparálódás
	10ET	0,05-2,00	210-4730	1 hét	opálos
	20ET	0,05-2,00	180-4300	2 hét	opálos
	10P	0,05-2,00	355-4215	1 hét	opálos
	20P	0,05-2,00	680-5120	5 nap	fázisszeparálódás

23. táblázat: Különböző illóolajat tartalmazó PEK tulajdonságai.

9.5. PBS puffer oldat készítése

A PBS puffer, azaz foszfáttal pufferált sóoldat készítéséhez az alábbi vegyszereket használtam fel: nagy tisztaságú NaCl, nagy tisztaságú KCl (tisztaság 99-100,5%), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (tisztaság $\geq 99.0\%$), és KH_2PO_4 (tisztaság $\geq 99.0\%$), cc. HCl oldat (37 m/m%). Minden anyagot a VWR Kft.-től vásároltunk. A PBS puffer összetétele a következő: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 . pH értékét tömény sósavval 7,4-re állítottam be. A puffert minden mérés előtt, frissen készítettem el.

9.6. Teafa illóolaj tartalmú Pickering emulziók készítése és jellemzése – Előkísérletek

Előkísérleteim során 20 nm méretű SNkel dolgoztam, melyek felületi borítottságát változtattam és vizsgáltam, hogyan hat a felületi borítottság változtatása a MAt tartalmazó PEk tulajdonságaira. A 24. táblázatban látható SNket használtam a formulálás során, melyek koncentrációja 1 mg/ml. Az emulgeálás energia állandó volt: 2 perc UH kezelés, majd UltraTurraxszal történő homogenizálás 13 500 rpm fordulatszámon, 2 percig.

SN minta	Funkciós csoport	Felületi borítottság (%)
10MET	metil	10
20MET	metil	20
10ET	etil	10
20ET	etil	20
10P	propil	10
20P	propil	20
10F	fenil	10
20F	fenil	20

24. táblázat: MA tartalmú PEk formulálásához használt SNk tulajdonságai

A PEk stabilitása a legkevésbé stabiltól a leginkább stabil felé haladva a következő: 10F<20F<10MET<20MET<10P<20P<10ET<20ET. Láthatjuk, hogy a felületmódosító funkciós csoport tekintetében fenil<metil<propil<etil a sorrend, illetve annál stabilabbak az emulziók, minél nagyobb mértékű a szilika nanorészecskék felületi borítottsága (ld. 25. táblázat). 20ET SNk alkalmazása esetén a stabilizáló részecskék koncentrációját is változtattam 15 mg/ml értékig. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy növelve a SN koncentrációját a PEk cseppmérete is nő, illetve a stabilitás romlik.

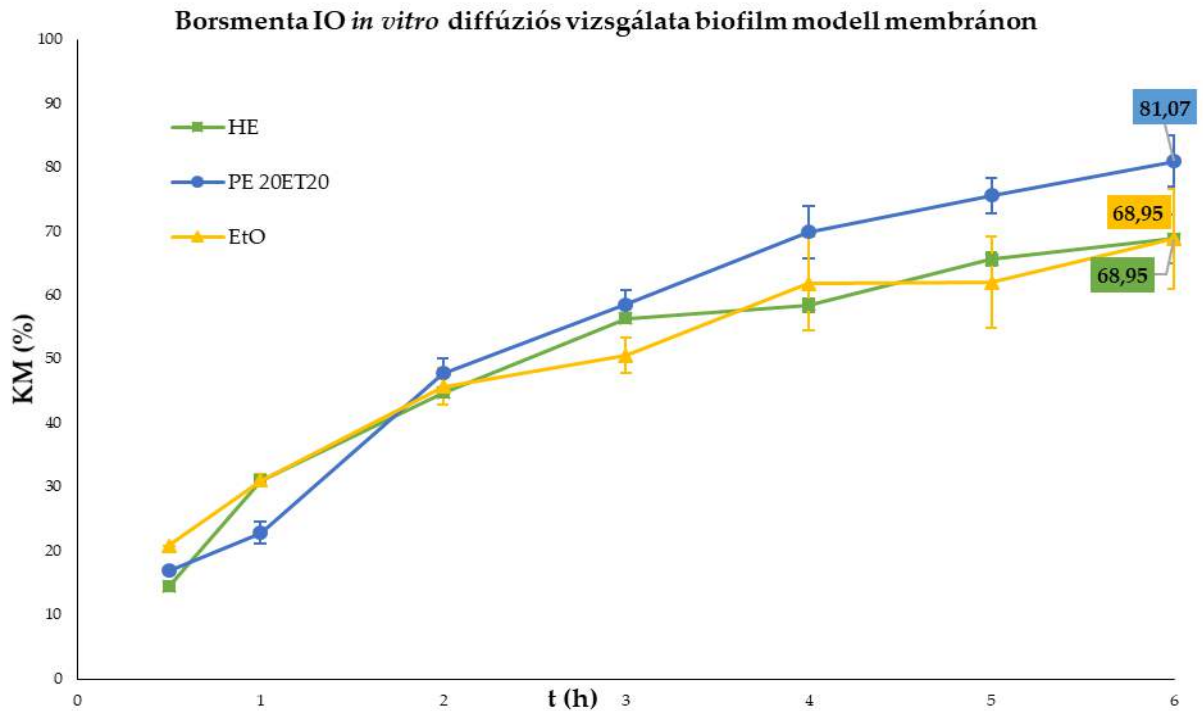
Összeségében elmondható, hogy a 20ET, azaz a 20nm méretű és 20%-ban etil funkciós csoportokkal módosított SNk bizonyultak a leginkább megfelelőnek, itt az emulziók több mint 4 hónapig is megőrizték stabilitásukat, azaz cseppméretük és opálos megjelenésük változatlan maradt.

A cseppméretek szórásértéke a nagy mennyiségű adat miatt a táblázatban nem került feltüntetésre, az értékek 2,3-6,9% között alakultak.

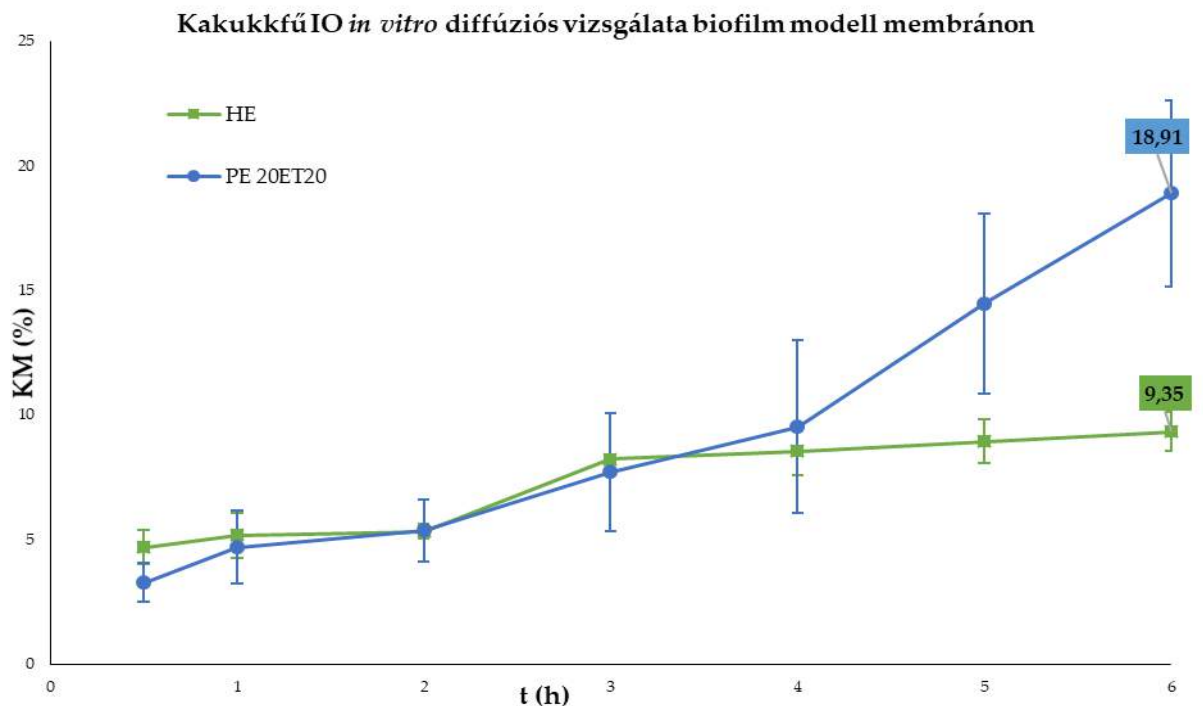
Stabilizáló SN	C _{MA} (mg/ml)	C _{SN} (mg/ml)	D _{cesepp} (nm)	Stabilitás	Megjelenés
10MET	1,791-2,686	1	290-1055	10-30 perc	krémesedés
10MET	3,314-6,268	1	1420-4440	1 nap	opálos
10MET	7,164	1	4525	30 perc	fázisszeparálódás
20MET	1,791-2686	1	480-1560	10-30 perc	krémesedés
20MET	3,314-4,475	1	1355-1420	6 óra - 1 nap	opálos
20MET	5,373-7,164	1	1575-1510	30 perc- 2 óra	fázisszeparálódás
10ET	1,791	1	1630	30 perc	krémesedés
10ET	2,686-5,373	1	1150-6250	1-2 nap	opálos
10ET	6,268-7,164	1	5287-6101	2 óra	fázisszeparálódás
20ET	1,79-3,58	1	770-1320	5 hét	opálos
20ET	4,48-7,16	1	1400-1800	20 hét	opálos
20ET	3,314	0.5	4125	6 óra	opálos
20ET	3,314	1	1690	20 hét	opálos
20ET	3,314	2-15	3130-4200	30 perc	fázisszeparálódás
10P	1,791-3,582	1	515-980	5 hét	opálos
10P	4,477-5,373	1	1020-1350	5 hét	opálos
10P	6,268-7,164	1	1530-1570	10 hét	opálos
20P	1,791-3,582	1	450-1220	8 hét	opálos
20P	4,477-5,373	1	1310-1400	10 hét	opálos
20P	6,268-7,164	1	1480-1510	10 hét	opálos
10F	1,791-3,582	1	440-2360	10-30 perc	krémesedés
10F	4,477-5,373	1	2210-2690	5 óra	opálos
10Ph	6,268-7,164	1	1520-3290	10 perc	fázisszeparálódás
20F	1,791	1	945	30 perc	krémesedés
20F	2,686-4,477	1	1435-1445	6 óra – 1 nap	opálos
20F	5,373-7,164	1	1635-3690	10-30 perc	fázisszeparálódás

25. táblázat. MA tartalmú PEk tulajdonságai.

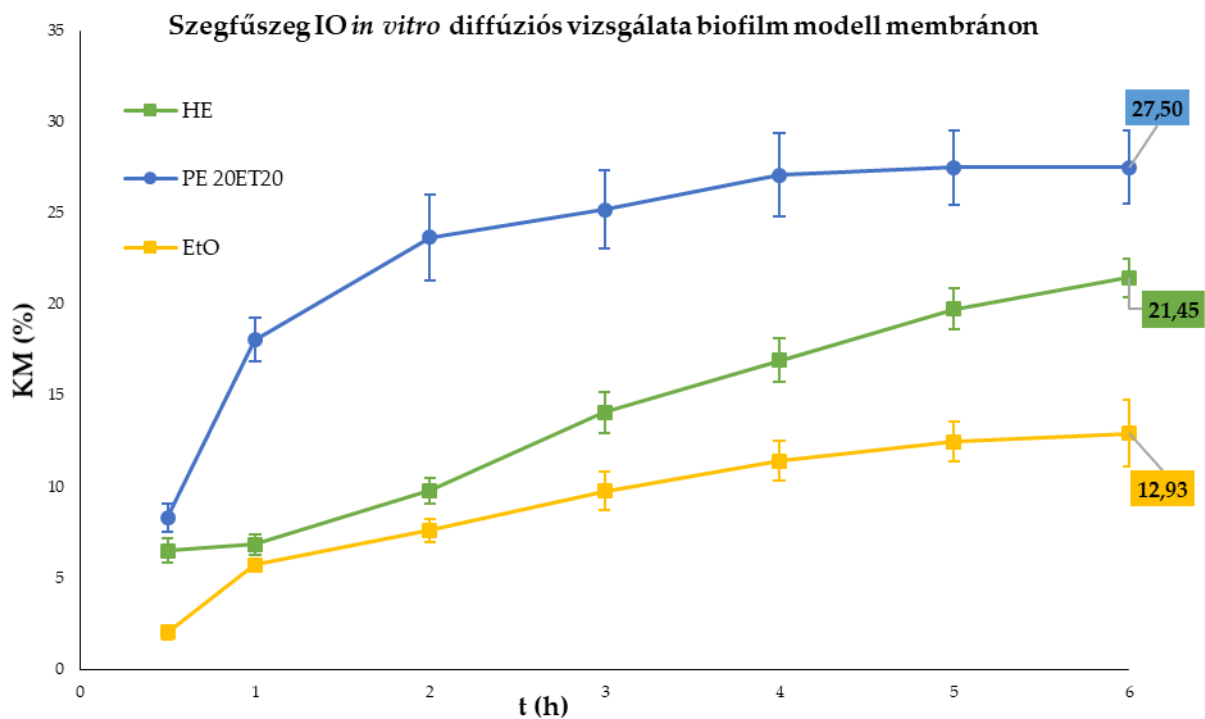
9.7. In vitro diffúziós vizsgálat biofilm modell membránon



25. ábra: Borsmenta illóolaj *in vitro* diffúziós vizsgálata biofilm modell membránon. KM: kumulatív illóolaj mennyiség 6 órát követően. IO: illóolaj. HE: hagyományos emulzió. PE: Pickering emulzió. EtO: etanos oldat. A különböző formulációk olaj koncentrációja $c_{\text{borsmenta io}}=0,98$ mg/ml. Az emulziók cseppmérete $D_{\text{HE}}=310$ nm, $D_{\text{PE 20ET20}}=210$.



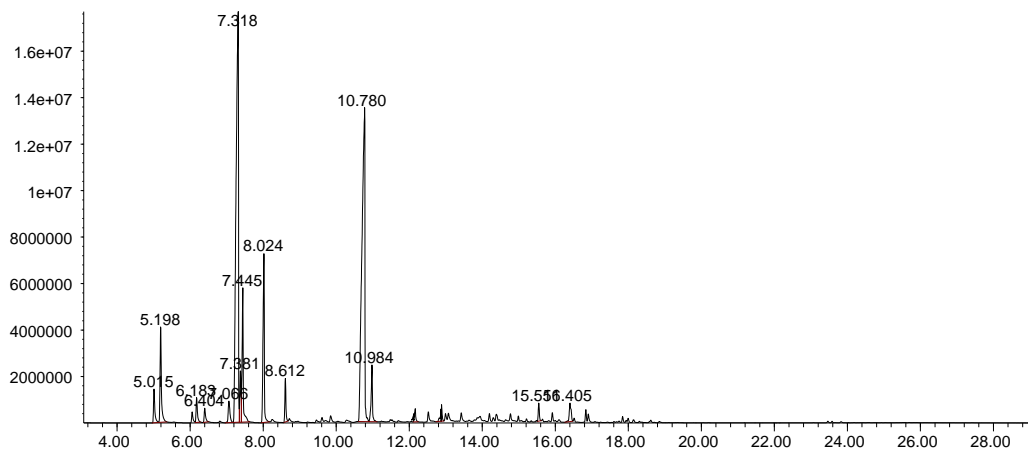
26. ábra: Kakukkfű illóolaj *in vitro* diffúziós vizsgálata biofilm modell membránon. KM: kumulatív illóolaj mennyiség 6 órát követően. IO: illóolaj. HE: hagyományos emulzió. PE: Pickering emulzió. A különböző formulációk olaj koncentrációja $c_{\text{kakukkfű EO}}=0,20$ mg/ml. Az emulziók cseppmérete $D_{\text{HE}}=245$ nm, $D_{\text{PE 20ET20}}=255$ nm.



27. ábra: Szegfűszeg illóolaj *in vitro* diffúziós vizsgálata biofilm modell membránon. KM: kumulatív illóolaj mennyiség 6 órát követően. IO: illóolaj. HE: hagyományos emulzió. PE: Pickering emulzió. EtO: etanos oldat. A különböző formulációk olaj koncentrációja $c_{\text{szegfűszeg IO}}=0,51$ mg/ml. Az emulziók cseppmérete $D_{\text{HE}}=320$ nm, $D_{\text{PE 20ET20}}=370$ nm.

9.8. Teafa illóolaj gázkromatogramja

Abundance



9.9. Tiokonazol oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban Hansen-féle oldhatósági érték számításával

Komponens	δ_d	δ_p	δ_h	δ
p-cimén	17.4	2.27	2.44	17.72
terpinén-4-ol	17.26	4.05	7.15	19.12
γ -terpinén	16.6	1.69	3.68	17.09
tiokonazol	20.59	6.87	5.44	22.38

26. táblázat. A tiokonazol és a teafa illóolaj három komponensének HSP értékei.

Tiokonazol és az egyes komponensek összehasonlítása	Távolság*	$\Delta\delta$	$\Delta\delta_d$	$\Delta\delta_p$	$\Delta\delta_h$
p-cimén	8,4	4,7	3,19	4,6	3
terpinén-4-ol	7,4	3,3	3,33	2,82	1,71
γ -terpinén	9,7	5,3	3,99	5,18	1,76

27. táblázat. Számított oldhatósági paraméterek. A tiokonazol oldhatóságának összehasonlítása a teafa illóolaj három komponensével. *A HSP távolság a szoftver által generált számérték, amely a molekulák közötti távolságot írja le az ún. Hansen térben.

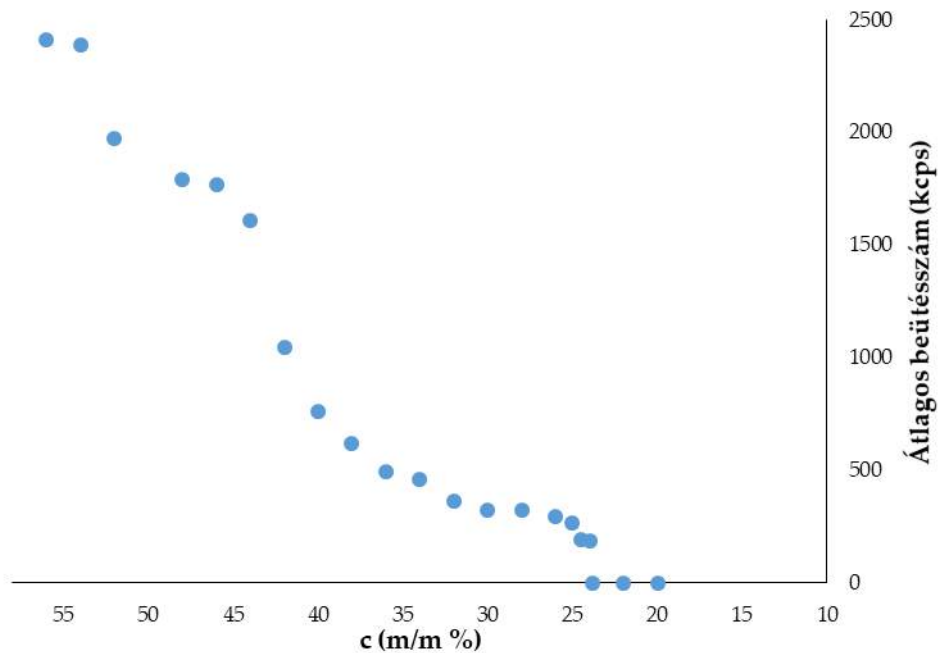
Oldószer 1	Oldószer 2	Oldószer 3	V% 1	V% 2	V% 3
p-ciméne	terpinén-4-ol	γ -terpinén	18	82	0
p-ciméne	terpinén-4-ol	γ -terpinén	46,7	43,2	10,1

28. táblázat. Számított oldhatósági paraméterek

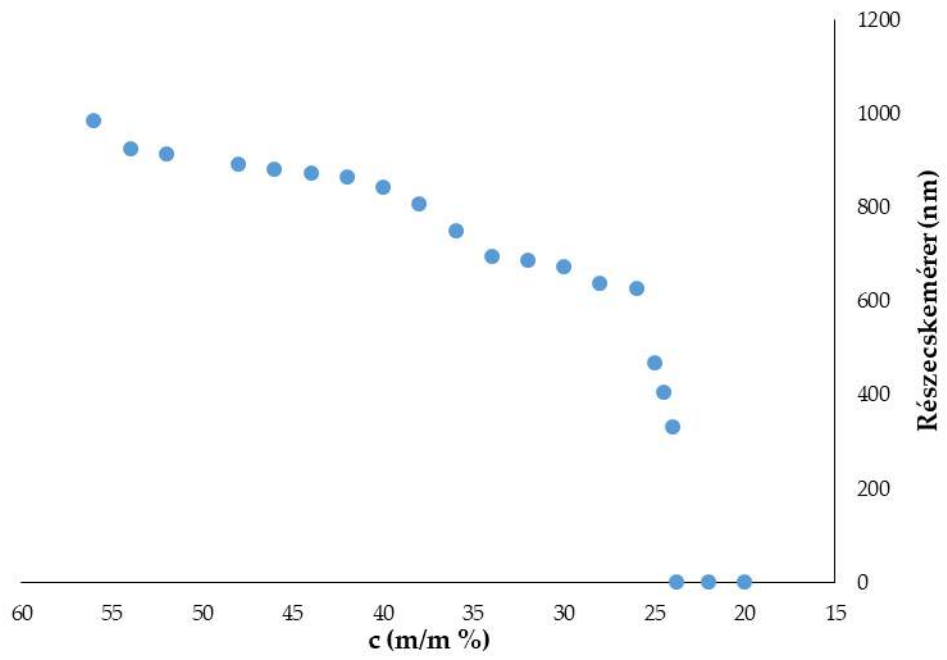
9.10. Tiokonazol kinetikai oldhatóságának meghatározása teafa illóolajban oldószer addíciós módszer segítségével

A DLS mérés során manuális korrelációval történtek a mérések, a paraméterek az alábbiak: minta térfogat 0,5 ml, hőmérséklet 25°C, mérési pozíció 0,45 mm, csillapítás 4, 11 mérés, kvarc kivetta (optikai úthossz 10mm, térfogat 3,5 ml, Hellma Analytics Ltd).

A kezdeti szuszpenzió TIO tartalma 56 m/m% volt, melyhez folyamatosan adagoltam az MA illóolajat és vizsgáltam, hogyan változik a szuszpenzió fényszórásának intenzitása, illetve a szuszpendált részecskék mérete. A 28. és 29. ábra láthatjuk a mérési eredményeket. A részecskék mérete és a fényszórás intenzitása is folyamatosan csökken, majd 30 m/m% TIO koncentráció értéknél az átlagos beütésszám és a részecskék mérete is lecsökken, illetve 24 m/m% alatt nincs értékelhető adat. Az eredmények alapján a 24 m/m% határértéket tekintjük a kinetikai oldhatóság értékének, mivel itt történik meg a szuszpenzió-valódi oldat közötti átmenet.



28. ábra: TIO kinetikai oldhatóságának meghatározása DLS méréssel.



29. ábra: TIO kinetikai oldhatóságának meghatározása DLS méréssel.

A doktori disszertáció alapját képező közlemények



Vörös-Horváth Barbara

Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Pintér Erika

Gyógyszerészi kémia alprogram

Programvezető: Dr. Perjési Pál

Témavezető

Dr. Secenji Aleksandar

tudományos főmunkatárs

RESEARCH ARTICLE

Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles

Barbara Horváth  | Szilárd Pál | Aleksandar Széchenyi

Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Rókus Str., Pécs, H-7624, Hungary

Correspondence

Aleksandar Széchenyi, Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Rókus Str., Pécs, H-7624, Hungary.

Email: szealex@gamma.ttk.pte.hu

Abstract

In the field of essential oil research, the low water solubility of essential oils (EOs) causes several problems, not only in pharmaceutical applications, but also in microbiological experiments. The aim of our work was to prepare Pickering emulsions with tea tree, thyme, and anise EOs stabilized with silica nanoparticles, in order to enhance their availability for microbiological tests. We have examined the influence of surface properties and concentration of silica nanoparticles and dispergation energy on emulsion stability and droplet size. In vitro diffusion experiments have been performed on model agar gel membranes, with the stable Pickering emulsions and conventional emulsions of EOs stabilized with Tween 80 surfactant. We have examined the influence of surface modifying group type, surface coverage of silica nanoparticles, and droplet size of the emulsions on the diffusion properties of the EOs. Our results show that highly stable Pickering emulsions can be prepared with silica nanoparticles of 20 nm diameter and 20% of surface covered with ethyl groups, in a wide EO concentration range. The cumulative amount of the EO was more effective in Pickering emulsions than in conventional emulsions for tea tree and thyme EOs, whereas the opposite case was true for anise EO. As the droplet size of the Pickering emulsion decreases, the cumulative concentration of the EO increases. In this work, we have shown that the Pickering emulsions of EOs are a suitable form for EO transport through complex membranes, and hopefully can be effectively applied in microbiological and pharmaceutical experiments.

KEYWORDS

emulsion preparation, essential oils, Pickering emulsion, silica nanoparticles, static Franz diffusion cell method

1 | INTRODUCTION

In recent times, essential oils (EOs) have increased in popularity because they come from natural sources, and have proven antimicrobial,¹ antioxidant,² and anticancer activities,³ among others. The main advantages of EOs is their natural complexity, and the fact that they cause less unfavourable side effects than other active substances. Unfortunately, their behaviours and mechanisms of action are not well described scientifically, so our current knowledge is often based on data from traditional medicine. Scientists must make a huge effort in

order to establish the bioavailability and biopharmacy of EOs, but the pharmaceutical examinations are made difficult because of the unfavourable physical chemical properties of EOs, such as hydrophobicity and low water solubility. In the case of testing antimicrobial activity, the direct use of EOs is almost implausible: without any solvents the oil remains on the surface of the cell culture medium and cannot interact with bacteria.⁴ As a result of these unfavourable physical chemical properties, the use of EOs in pharmaceuticals is limited.

We can overcome some of these problems by preparing oil-in-water EO emulsions, but the materials used for the stabilization of

emulsions, like surfactants and co-solvents, can cause irritation or other side effects.⁵ They can even influence the role and the effect of active components, which then can lead to the misinterpretation of experimental data. To avoid the use of these materials we can use solid particles to prepare stable emulsions of EOs, termed Pickering emulsions. These emulsions were named after Spencer Umfreville Pickering, who was the first to describe the physical chemical phenomenon of the adsorption of solid particles on the interface of two immiscible liquids.⁶ Pickering emulsions can be oil-in-water (O/W), water-in-oil (W/O), or multiple-type emulsions, similar to surfactant-stabilized emulsions.

The surfactants are amphiphilic molecules, with a hydrophilic and a lipophilic group. When surfactants are used for emulsion stabilization they adsorb on the liquid–liquid interface: the hydrophilic group stays in the water phase, whereas the lipophilic group remains in the oil phase.⁷ The adsorption of solid particles at liquid–liquid interfaces is determined by the wettability or the contact angle of the particles.⁸ For hydrophilic particles the contact angle is less than 90°, and a larger portion of the particle resides in the water phase, whereas for hydrophobic particles the contact angle is greater than 90°, and a larger portion of the particle resides in the oil phase. The ideal state is when the wettability of the particles is the same in both oil and water, with a contact angle of 90°. In this case the same portion of the particle is in both phases. This state can be achieved by the systematic surface modification of stabilizing particles.

The adsorption of surfactants and solid particles is a spontaneous, reversible process. The surfactants adsorb more weakly than the solid particles at the liquid–liquid interface, and the surfactant molecules are in a state of rapid adsorption–desorption equilibrium at the interface. On the other hand, the solid particles have higher adsorption energy, and their adsorption and desorption is slower than surfactant molecules,⁹ and in some cases we can consider this as irreversible adsorption. Because of this phenomenon the stability of Pickering emulsions can be the same or better than conventional emulsions. The stability of Pickering emulsions is advantageous in pharmaceutical studies, where the duration of an experiment can be several days, and this can be advantageous for therapeutic applications.

Besides the stability of the emulsion, two important parameters for pharmaceutical experiments and therapy are the size and the density of the emulsion droplets. Both of these characteristics can influence the uptake of EOs by the target cells or tissues.¹⁰ If we apply solid nanoparticles as an emulsion stabilizer, the adsorption of nanoparticles on the cell culture medium (e.g. agar medium), on the cell membrane, or on the surface of microorganisms can also enhance the adsorption or resorption of EOs, and their components.¹¹ In some cases, we can achieve targeted delivery of pharmaceutically active substances as the surface of the stabilizer nanoparticles can be easily modified with different targeting chemical groups, proteins, or enzymes.¹¹

As a result of the rapid development of nanotechnology, several types of nanoparticles used for pharmaceuticals are available for use as emulsion stabilizing agents, e.g. chitosan,¹² starch,¹³ cellulose,¹⁴ poly(lactide-co-glycolide) (PLGA),¹⁵ or metal- and semi metal oxides, such as silica.¹⁶

Silica nanoparticles are widespread because they are biologically inert, their synthesis can be easily performed by the one-step sol gel method,¹⁷ the synthesized particles are monodispersed,¹⁸ their surface can be simply modified with different chemical groups,¹⁹ they are physically stable, and they are non-toxic over a wide range of the concentrations²⁰.

The aim of this work was to prepare silica nanoparticle stabilized Pickering emulsions of tea tree EO (*Melaleuca aetheroleum*), thyme EO (*Thymi aetheroleum*), and anise EO (*Anisi aetheroleum*) with well-defined properties, such as droplet size and stability. We have chosen these essential oils because in the future we would like to use Pickering emulsions of these EOs for onychomycosis topical treatments, and their antimicrobial activities have already been examined against *Trichophyton rubrum* fungi.^{21–23} In these tests the EOs have been used in the form of a solution or an emulsion. For the diffusion experiments, agar gel has been chosen as the model membrane because the agar plate method is often used in antimicrobial studies.²⁴ We have investigated the influence of the ratio of EO, water, and silica nanoparticles, the type of surface modification of nanoparticles, and the energy of emulsification on droplet size and the stability of the formulated emulsions, and their diffusion through agar gel membrane.

2 | EXPERIMENTAL

2.1 | Materials

The following chemicals were used for the experiments: absolute ethanol (AnalaR NORMAPUR®; purity ≥99.8%; VWR Chemicals, Debrecen, Hungary); ammonium solution (AnalaR NORMAPUR® analytical reagent; 28w/w%; VWR Chemicals); Butvar B-98 (Acros Organics, USA); ethyltriethoxysilane (ETES; purity 96%; Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA); HCl (37w/w% Ph. Eur.; VWR Chemicals); KCl (AnalaR NORMAPUR®, Reag. Ph. Eur.; VWR Chemicals); KH₂PO₄ (AnalaR NORMAPUR®, Reag. Ph. Eur.; VWR Chemicals); methyltriethoxysilane (MTES; purity 98%; Alfa Aesar); NaCl (AnalaR NORMAPUR®, Reag. Ph. Eur.; VWR Chemicals); Na₂HPO₄ (anhydrous ≥99%; AnalaR NORMAPUR®, Reag. Ph. Eur.; VWR Chemicals); phenyltriethoxysilane (PhTES; purity 98%; Alfa Aesar); tetraethoxysilane (TEOS; purity 98%; Alfa Aesar); ultrapure water (Astacus, analytical with UV; membraPure, Hennigsdorf, Germany). The EOs were anise EO (Aromax Ltd, Budapest, Hungary), tea tree EO (Aromax Ltd), and thyme EO (Aromax Ltd).

Agar gel membranes were prepared as described previously,²⁵ and prior to the diffusion experiments the membranes were cut into discs (38 mm in diameter and 2.1 mm thick) and placed into the membrane holder of the vertical diffusion cells.

2.2 | Synthesis and surface modification of hydrophilic silica nanoparticles

The synthesis of 20-nm diameter hydrophilic silica was performed in a mixture optimized in our previous work,²⁶ based on the original work of Stöber, Fink, and Bohn.¹⁷ Briefly, a solution of TEOS and water in ethanol was prepared (Table 1). After 20 min of vigorous stirring and 20 min of ultrasonic treatment (Sonorex RK 52H; Bandelin, Berlin, Germany), ammonium hydroxide was then added to the mixture. The reaction mixture was stirred at 1000 rpm with a magnetic stirrer for 24 h at room temperature 20–25°C. The synthesised hydrophilic silica nanoparticles were stored and were found to be stable without aggregation and any change in size or morphology for several months in the residual reaction solution.

Surface of hydrophilic silica was modified with MTES, ETES, or PhTES in a post-modification process. The desired surface coverage of silica nanoparticles was calculated. The calculation is based on a simple geometrical approach, and the parameters used for calculations were size, weight, and density of silica nanoparticles, with a surface requirement of three silanol group, presuming that it will bound to the surface of the silica nanoparticle by all three bonds. The surface modifying agents were dissolved in ethanol and then added to a native silica nanoparticle suspension, and the mixture was stirred for 6 h at room temperature at 1000 rpm. Seven different modified silica nanoparticles were prepared (Table 1).

The ammonium hydroxide and ethanol content were always removed by fractional distillation (Laborota 4000; Heidolph, Schwabach, Germany) from the modified silica suspension, prior to emulsion preparation. The water content was supplemented three times. The concentration of silica nanoparticle water-based suspension was finally adjusted to 1 mg/cm³.

TABLE 1 Parameters of hydrophilic and surface-modified silica nanoparticle synthesis

Parameters of hydrophilic silica nanoparticle synthesis						
Sample	cTEOS (mol/dm ³)	cNH ₃ (mol/dm ³)	cH ₂ O (mol/dm ³)	cEtOH (mol/dm ³)	T (K)	t (h)
HS	0.26	0.05	5	15	298	24
Parameters of surface modified silica nanoparticle synthesis						
Sample	Modifying agent	Surface coverage (%)	V _{modifying agent} (μl)*	T (K)	t (h)	
10MET	methyltriethoxysilane	10	24.40	298	6	
20MET		20	48.80	298	6	
5ET	ethyltriethoxysilane	5	26.32	298	6	
10ET		10	52.64	298	6	
20ET		20	105.27	298	6	
10Ph	phenyltriethoxysilane	10	59.11	298	6	
20Ph		20	118.23	298	6	

*The volume of the modifying agent refers to 500 mg of hydrophilic silica nanoparticles. In the name of samples the number signs the surface coverage in percent, and the ET, MET or Ph abbreviations sign the modifying groups. HS signs hydrophilic silica nanoparticles.

2.3 | Physicochemical characterization of hydrophilic and modified silica nanoparticles

The hydrodynamic diameter (*d*) and polydispersity index (PDI) were determined by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer Nano S instrument (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK). The zeta potential of silica nanoparticles was determined by electrophoretic light scattering (ELS) using a Malvern Zetasizer Nano Z instrument. We examined the size and morphology of silica nanoparticles with transmission electron microscopy (TEM) (JEM 1200 EX II; JEOL Ltd, Akishima, Tokyo, Japan). For microscopic experiments, 200 mesh copper grids (Micro to Nano Ltd., Haarlem, Netherland) were coated with Butvar B-98 thin film (Sigma Aldrich Ltd., Budapest, Hungary).

2.4 | Preparation of O/W-type EO emulsions

We have worked with different emulsifier concentrations, with the suspension of surface-modified silica nanoparticles in the case of Pickering emulsions and Tween 80 in the case of conventional emulsions. We have also varied the concentration of EOs. In the pre-emulsification process the mixtures were sonicated for 2 minutes, and then were homogenized with UltraTurrax (IKA Werke T-25 basic) for 2 minutes at 13 500 rpm. For the examination of the influence of emulsification energy on emulsion droplet size and stability, the emulsions were homogenized for different, longer times at 21 000 rpm (Table 2).

2.5 | Physicochemical characterization of emulsions

The droplet size of the emulsion was determined with DLS using a Malvern Zetasizer Nano S instrument. Each sample was prepared in triplicate. We consider the emulsions to be stable for the diffusion experiments, when the droplet size does not change within at least 24 hours, and creaming, sedimentation, or disproportionation do not occur in this period. The emulsions were stored at a constant temperature: 25 °C. The stability of the emulsions was monitored by periodical droplet size determination. With the large volume of experimental data obtained, the standard deviations of droplet sizes have not been indicated in the tables or in the text. All the values were between 0.8–13.5%.

2.6 | In vitro diffusion studies – static Franz diffusion cell method

Agar gel membranes (2 w/w%) were used in six parallel static vertical Franz diffusion cells (Hanson Microette Plus, 60-301-106; Teledyne Hanson Research, Chatsworth, CA, USA). The effective penetration area was 2.54 cm², and the volume of the receiver chamber was 7 ml. The receiver solution was phosphate-buffered saline (PBS) buffer. The volume of the sample emulsions was 600 μl, and 2ml samples were collected after half an hour, and then every hour, for a total duration 6 hours. The withdrawn sample volume was replaced with fresh PBS buffer. The temperature was 37 °C. The EO content was determined by UV-Vis spectroscopy (Jasco V-550 UV/VIS Spectrophotometer; Jasco Inc., Easton, MD, USA).

TABLE 2 Parameters of preparation of Pickering and conventional emulsions of essential oils (EOs). All the samples were homogenized by UltraTurrax

Preparation of Pickering and conventional emulsions of tea tree EO				
Stabilizing agent	c_{oil} (g/L)	$c_{stabilizing\ agent}$ (g/L)	$t_{homogenization}$ (min)	$v_{homogenization}$ (1/min)
10MET	1.791–7.164	1	2	13 500
20MET	1.791–7.164	1	2	13 500
5ET	1.791–7.164	1	2	13 500
10ET	1.791–7.164	1	2	13 500
20ET	0.895–7.164	1	2	13 500
20ET	3.314	0.5–15.0	2	13 500
20ET	3.314	1	2	21 000
10Ph	1.791–7.164	1	2	13 500
20Ph	1.791–7.164	1	2	13 500
Tween 80	0.895	1	2	13 500
Tween 80	3.314	1	2	13 500
Tween 80	4.775	1	2	13 500
Preparation of Pickering and conventional emulsions of thyme EO				
Stabilizing agent	c_{oil} (g/L)	$c_{stabilizing\ agent}$ (g/L)	$t_{homogenization}$ (min)	$v_{homogenization}$ (1/min)
20ET	0.9135–7.308	1	2	13 500
20ET	2.740	0.5–15.0	2	13 500
20ET	2.740	1	2	21 000
Tween 80	2.740	1	2	13 500
Preparation of Pickering and conventional emulsions of anise EO				
Stabilizing agent	c_{oil} (g/L)	$c_{stabilizing\ agent}$ (g/L)	$t_{homogenization}$ (min)	$v_{homogenization}$ (1/min)
20ET	0.979–7.832	1	2	13 500
20ET	2.937	0.5–15.0	2	13 500
20ET	2.937	1	2	21 000
Tween 80	2.937	1	2	13 500

TABLE 3 Physical and chemical parameters of the silica nanoparticles

Sample	d_{DLS} (nm)	Polydispersity index (PDI_{DLS})	d_{TEM} (nm)	Zeta potential ζ (mV)
HS	20.1	0.008	20	-116
10MET	20.8	0.051	20	-34.9
20MET	20.5	0.060	20	-24.0
5ET	20.4	0.010	20	-10.8
10ET	20.2	0.041	20	-9.5
20ET	19.8	0.072	20	-6.0
10Ph	20.3	0.120	20	20.3
20Ph	20.5	0.125	20	83.1

The wavelengths of the absorption maxima are as follows: tea tree EO, $\lambda_{max} = 204$ nm; hyme EO, $\lambda_{max} = 275$ nm; and anise EO, $\lambda_{max} = 261$ nm. As the Tween 80 surfactant has maximum absorption at 209 nm and the silica nanoparticle absorbs UV light at 220 nm, this

value is based on our previous experiments. The absorption of EOs and Tween 80 or silica nanoparticles added to the absorbance spectra over the course of measurements, and so every adsorption spectrum was resolved with ORIGINPRO 8 (OriginLab, Northampton, MA, USA), and the peaks were calculated according to Gaussian distribution.

The standard deviation of diffusion study results have been indicated in the figures with error bars.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Synthesis and characterization of silica nanoparticles

On the basis of our previous work we have successfully synthesized 20-nm hydrophilic silica nanoparticles (HS), with a mean diameter of 20.1 nm and PDI of 0.008, measured by DLS (Table 3).

In order to confirm the size determined by DLS, and to investigate the morphology, we have examined the samples with TEM. The TEM images show that the HS are 20-nm in diameter, highly monodispersed, nearly spherical, and have a smooth surface (see Figure 1).

Our aim was to prepare silica nanoparticles with different surface properties, in order to tune the hydrophilic/lipophilic characters of the particles. After the modification process all the samples were examined with DLS and TEM. The results show that all the silica nanoparticles retained their initial size, and that all the samples are spherical, highly monodispersed, and have a smooth surface (Table 3).

The ELS measurements give us information about successful surface modification, as it can be clearly seen that zeta potential decreases with increasing surface coverage, e.g. at 5ET, $\zeta = -10.8$ mV, and at 20ET $\zeta = -6.0$ mV. The modifying agent also influences the surface potential: at less lipophilic methyl functional groups the zeta potential is $\zeta = -34.9$ mV at 10MET sample, and at the same surface coverage but with a more lipophilic functional phenyl group this value is $\zeta = 20.3$ mV (Table 3).

3.2 | Formulation and characterization of Pickering emulsions

3.2.1 | Influence of the surface modification of silica nanoparticles on the emulsion stability

We have used tea tree EO, and silica nanoparticles modified with methyl, ethyl, and phenyl groups to different extents: 10MET, 20MET, 5ET, 10ET, 20ET, 10Ph, and 20Ph. We have chosen the concentration range between the minimum inhibitory concentration value of *Trichophyton rubrum* and the toxic level, so that the concentration of tea tree EO was systematically varied in the range of 0.895–7.164 g/L. All the emulsion parameters can be seen in Table 4.

The least stable emulsions are emulsions stabilized with 10Ph nanoparticles. With this stabilizing agent the Pickering emulsions are stable in a concentration range of 4.477–5.373 g/L, and only for

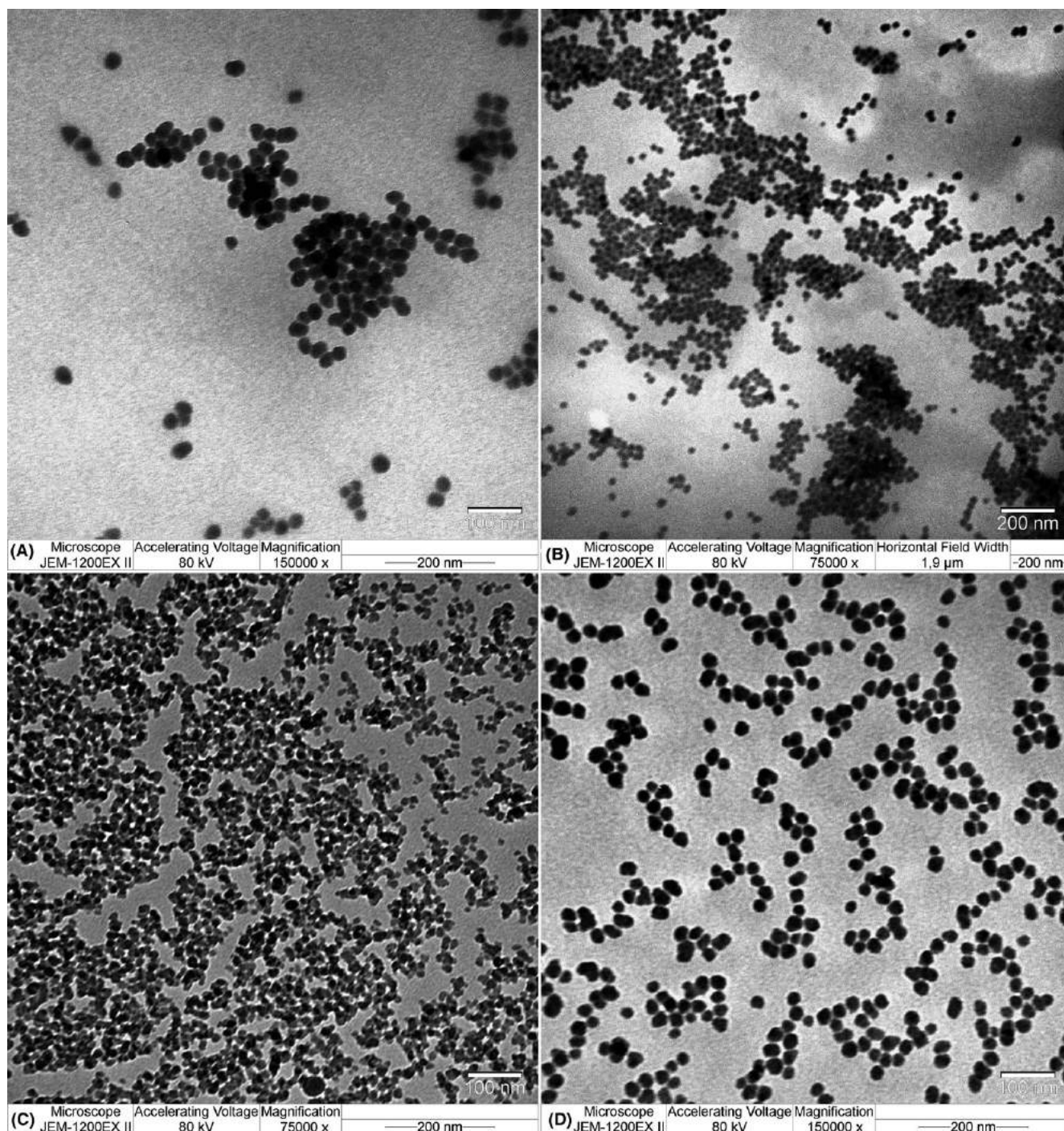


FIGURE 1 Transmission electron microscopy (TEM) images of silica nanoparticles: A, HS nanoparticles; B, 5ET nanoparticles; C, 10ET nanoparticles; D, 20ET nanoparticles. The size of the nanoparticles is 20 nm

5 hours. The most stable Pickering emulsions are stabilized with 20ET. In the concentration range of 2.238–4.477 g/L, the stability is 4 months, whereas in the concentration range of 0.895–2.238 g/L, the emulsions remain stable for 1 day. The appearance of the stable emulsions in every case is opalescent.

As we have found here, and in our previous studies,²⁷ the most stable emulsions are stabilized with 20ET nanoparticles, and so

further examinations and emulsion formulations were performed with these nanoparticles.

In the case of thyme EO, the emulsions were stable in the concentration range of 2.274–4.567 g/L: at a concentration of 2.274 g/L the emulsion was stable for 2 months, and at a concentration of 4.4567 g/L the emulsion was stable for 1 day (Table 5.)

TABLE 4 Droplet size and stability of Pickering and conventional emulsions of tea tree essential oil (EO). The stability was measured with dynamic light scattering (DLS) periodically for at least 1 week

Parameters of Pickering and conventional emulsions of tea tree EO							
Stabilizing agent	C _{oil} (g/L)	C _{stabilizing agent} (g/L)	t _{homogenization} (min)	v _{homogenization} (1/min)	D _{average droplet*} (nm)	Stability	Appearance
10MET	1.791–2.686	1	2	13 500	292–1055	10–30 min	creaming
10MET	3.314–6.268	1	2	13 500	1420–4442	1 day	opalescent
10MET	7.164	1	2	13 500	4525	30 min	disproportionation
20MET	1.791–2.686	1	2	13 500	478–1557	10–30 min	creaming
20MET	3.314–4.475	1	2	13 500	1355–1421	6 h–1 day	opalescent
20MET	5.373–7.164	1	2	13 500	1574–1513	30 min–2 h	disproportionation
5ET	1.791–2.686	1	2	13 500	1025–1436	6 h	opalescent
5ET	3.314–3.582	1	2	13 500	1436–3702	2 days	opalescent
5ET	4.475–7.164	1	2	13 500	2731–4469	10 min–2 h	disproportionation
10ET	1.791	1	2	13 500	1628	30 min	creaming
10ET	2.686–5.373	1	2	13 500	1147–6247	1–2 days	opalescent
10ET	6.268–7.164	1	2	13 500	5287–6101	2 h	disproportionation
20ET	0.895–4.477	1	2	13 500	775–3202	1 day–4 months	opalescent
20ET	5.373	1	2	13 500	2793	2 h	creaming
20ET	6.268–7.164	1	2	13 500	3740–4209–	30 min	disproportionation
20ET	3.314	0.5	2	13 500	4126	6 h	opalescent
20ET	3.314	1	2	13 500	1686	4 months	opalescent
20ET	3.314	2–15	2	13 500	3128–4199	30 min	disproportionation
10Ph	1.791–3.582	1	2	13 500	443–2359	10–30 min	creaming
10Ph	4.477–5.373	1	2	13 500	2213–2686	5 h	opalescent
10Ph	6.268–7.164	1	2	13 500	1522–3292	10 min	disproportionation
20Ph	1.791	1	2	13 500	945	30 min	creaming
20Ph	2.686–4.477	1	2	13 500	1435–1447	6 h–1 day	opalescent
20Ph	5.373–7.164	1	2	13 500	1638–3686	10–30 min	disproportionation
Tween 80	0.895–4.775	1	2	13 500	701–1851	1 week	opalescent

*Three parallel samples and measurements

The stability of anise EO is similar, with the emulsions being stable in the concentration range of 1.958–4.895 g/L: stable for 2 days at 1.958 g/L, and stable for 1 week at 4.895 g/L (Table 6).

3.2.2 | Influence of the energy of emulsification on emulsion stability

We changed the rotational speed and the duration of homogenization with a constant 20ET nanoparticle concentration (1 g/L) and with a constant EO concentration. The droplet size of the Pickering emulsion of thyme EO can be reduced by the application of a higher shear rate and an extended time of emulsification, which correlates with the energy of emulsification. We have found that the size changed from 1586 nm (13 500 rpm, 2 min) to 1015 nm (21 000 rpm, 4 min). Both emulsions remained stable

for 2 months, and the stability did not change with droplet size. More significant decreases were observed with the Pickering emulsion of anise EO, with droplet sizes changing from 5274 to 1477 nm, and with the stability reduced from 7 to 5 days (Table 6).

3.2.3 | Influence of different formulation parameters on the emulsion droplet size of tea tree EO

We have investigated how the surface coverage influences the droplet size of Pickering emulsions with a tea tree EO concentration of at 3.582 g/L, with a stabilizing agent concentration of 1 g/L, and with constant emulsification energy. We have found that the phenyl group-modified, silica nanoparticle-stabilized emulsions have a smaller droplet size than the methyl- or ethyl-modified silica

TABLE 5 Droplet size and stability of Pickering and conventional emulsions of thyme essential oil (EO). The stability was measured with dynamic light scattering (DLS) periodically for at least 1 week

Parameters Pickering and conventional emulsions of thyme EO							
Stabilizing agent	C_{oil} (g/L)	$C_{stabilizing\ agent}$ (g/L)	$t_{homogenization}$ (min)	$\nu_{homogenization}$ (1/min)	$D_{average\ droplet}^*$ (nm)	Stability	Appearance
20ET	0.914	1	2	13 500	613	30 min	creaming
20ET	1.827–4.567	1	2	13 500	1649–2942	5 h–4 months	opalescent
20ET	5.481–7.308	1	2	13 500	4720–5435	1 h	disproportionation
20ET	2.740	0.5	2	13 500	3524	1 h	opalescent
20ET	2.740	1–2	2	13 500	1668–2205	1 day–4 months	opalescent
20ET	2.740	5–15	2	13 500	1598–2358	1 h	disproportionation
20ET	2.740	1	2	13 500	1568	4 months	opalescent
20ET	2.740	1	2	13 500	1251	1 day	opalescent
20ET	2.740	1	4	21 000	1015	1 day	opalescent
20ET	2.740	1	6	21 000	4139	10 min	disproportionation
Tween 80	2.740	1	2	13 500	1476	1 week	opalescent

*Three parallel samples and measurements

TABLE 6 Droplet size and stability of Pickering and conventional emulsions of anise essential oil (EO). The stability was measured with dynamic light scattering (DLS) periodically for at least 1 week

Parameters for Pickering and conventional emulsions of anise EO							
Stabilizing agent	C_{oil} (g/L)	$C_{stabilizing\ agent}$ (g/L)	$t_{homogenization}$ (min)	$\nu_{homogenization}$ (1/min)	$D_{average\ droplet}^*$ (nm)	Stability	Appearance
20ET	0.979	1	2	13 500	5084	30 min	creaming
20ET	1.958–4.895	1	2	13 500	4555–5240	2 day–4 months	opalescent
20ET	5.874–7.832	1	2	13 500	5564–5065	1 hour	disproportionation
20ET	2.937	0.5–2	2	13 500	2718–5362	1 week–4 months	opalescent
20ET	2.937	5–7.5	2	13 500	1391–1501	2 hours	creaming
20ET	2.937	10–15	2	13 500	4090–4900	20 min	disproportionation
20ET	2.937	1	2	13 500	5274	4 months	opalescent
20ET	2.937	1	2	21 000	2640	4 months	opalescent
20ET	2.937	1	4	21 000	1393	4 months	opalescent
20ET	2.937	1	6	21 000	1544	5 days	opalescent
Tween 80	2.937	0.5–2	2	13 500	816–1249	1 week	opalescent

*Three parallel samples and measurements

nanoparticles, e.g. at 20Ph the droplet size is 2065 nm, at 20ET the droplet size is 2662 nm, and at 20MET the droplet size is 2820 nm. The higher surface coverage results in larger droplet sizes: the 5ET stabilized emulsion droplet size is 1436 nm, the 10ET size is 2063 nm, and the 20ET is 2662 nm (Table 7).

In the concentration range of 0.895–4.447 g/L for tea tree EO and for a concentration of 1 g/L for 20ET, where the emulsions are stable, there is a linear correlation between the tea tree EO concentration and the droplet size (Figure 2; Table 8).

Based on this finding, we have calculated the desired droplet size of emulsions, and founded that the droplet size of tea tree EO can be exactly planed in this range (Figure 2, emulsions with tailored droplet size).

TABLE 7 Droplet size of Pickering emulsions of tea tree essential oil (EO). The concentration of the oil was held constant at 3.582 g/L, and the concentration of the modified silica nanoparticles was also kept constant at 1 g/L

Stabilizing agent	Modifying agent	Surface coverage (%)	Droplet size (nm)
10MET	methyltriethoxysilane	10	1420
20MET		20	2820
5ET	ethyltriethoxysilane	5	1436
10ET		10	2063
20ET		20	2662
10Ph	phenyltriethoxysilane	10	1141
20Ph		20	2065

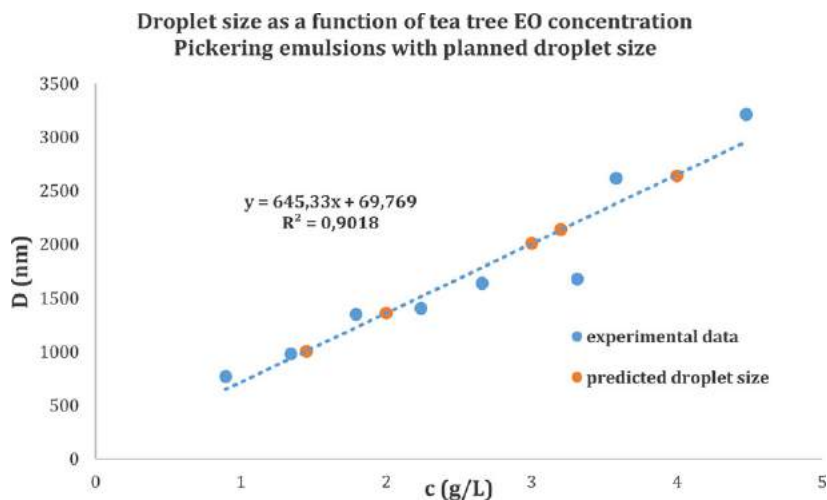


FIGURE 2 Droplet size as a function of tea tree essential oil (EO) concentration. The droplet size of tea tree EO can be predicted in the 0.895–4.477 g/L concentration range. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 8 Droplet size of Pickering emulsions of tea tree essential oil (EO) stabilized by 20ET silica nanoparticles. The concentration of 20ET is 1 g/L

Sample	$c_{TT\ EO}$ (g/L)	Droplet size (nm)
20ET-TT-1	0.895	775
20ET-TT-2	1.343	968
20ET-TT-3	1.791	1346
20ET-TT-4	2.238	1394
20ET-TT-5	2.685	1658
20ET-TT-6	3.134	1686
20ET-TT-7	3.582	2662
20ET-TT-8	4.477	3202

3.3 | In vitro diffusion studies – static Franz diffusion cell method

For the in vitro diffusion studies, we chose samples where the droplet size remained stable for at least 1 day. In order to ensure comparability, we used Tween 80 surfactant-stabilized emulsions of the same composition as the Pickering emulsions, namely the concentration of the stabilizing agent in the emulsions – the modified silica nanoparticles or Tween 80 – and the EO and the emulsification energies were always kept the same.

3.3.1 | In vitro diffusion studies with Pickering emulsions of tea tree EO

The influence of silica nanoparticle surface coverage on tea tree EO diffusion through agar membrane has been determined. Because the

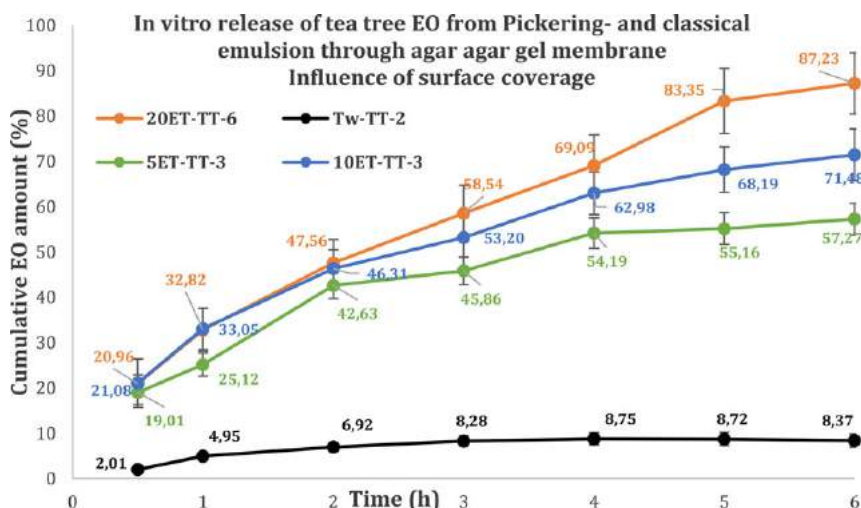


FIGURE 3 In vitro diffusion of tea tree essential oil (EO) from Pickering and conventional emulsions through agar gel membrane. The influence of silica surface coverage was examined. The stabilizing agents for the Pickering emulsions were: 5ET, 10ET, and 20ET. The stabilizing agent of the conventional emulsion is Tween-80 surfactant. The concentration of tea tree EO is 3.314 g/L. The concentration used for all of the emulsion stabilizing agents is 1 g/L. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

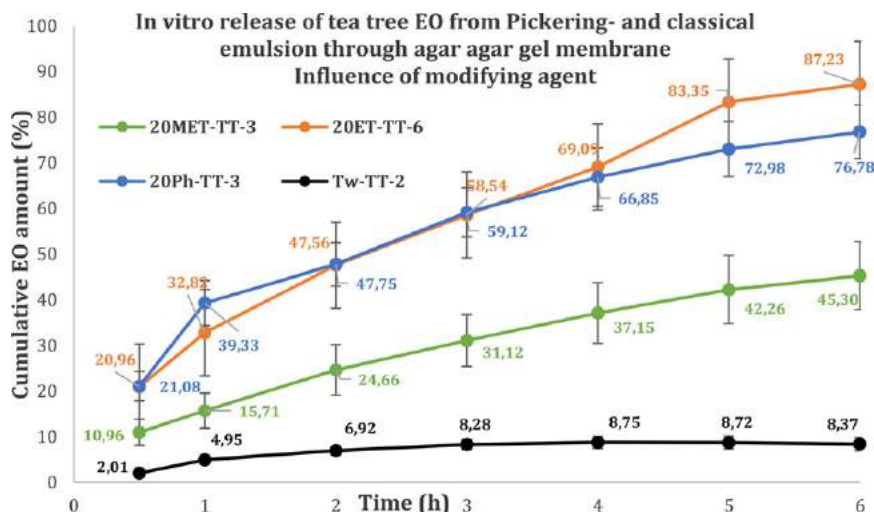


FIGURE 4 In vitro diffusion of tea tree essential oil (EO) from Pickering and conventional emulsions through agar gel membrane. The influence of the silica surface modifying agent was examined. The stabilizing agents of the Pickering emulsions were: 20MET, 20ET, and 20Ph. The stabilizing agent of the conventional emulsion is Tween-80 surfactant. The concentration of tea tree EO is 3.314 g/L. The concentration used for all of the emulsion stabilizing agents is 1 g/L. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

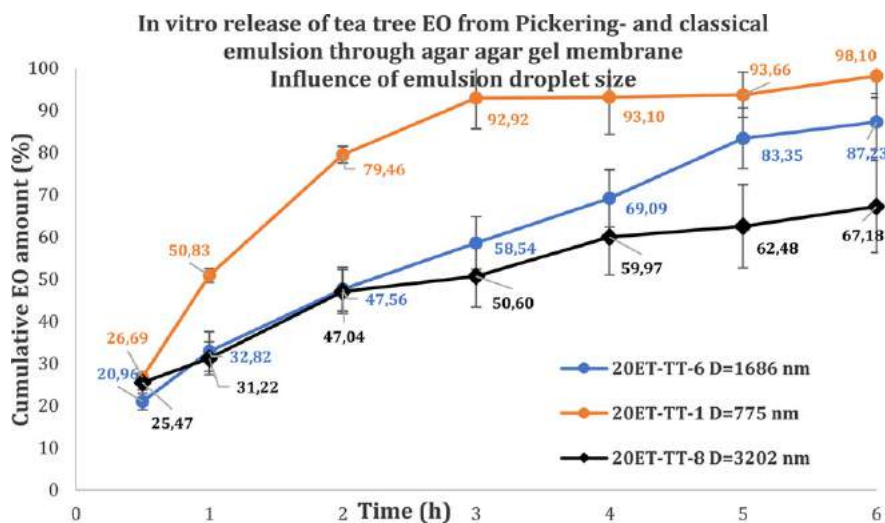


FIGURE 5 In vitro diffusion of tea tree essential oil (EO) from Pickering emulsions through agar gel membrane. The influence of the droplet size of the emulsion was examined. The stabilizing agent used for the Pickering emulsions was ET20, at a concentration of 1 g/L. The concentrations of tea tree EO were: 0.895, 3.314, and 4.775 g/L. The droplet sizes of the Pickering emulsions were: 775, 1686, and 3202 nm. The figure clearly shows that the smaller droplet size gives the most effective diffusion of the Pickering emulsions. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

ethyl group modified silica nanoparticle-stabilized Pickering emulsions were the most stable emulsions, and the first diffusion studies were performed with 5ET, 10ET, and 20ET emulsion stabilizing agents. The concentration of nanoparticles and EO was constant: 1 g/L for 20ET and 3.314 g/L for EO. The highest cumulative level was obtained with the highest ethyl group coverage: 87.23% with 20ET, 71.48% with 10ET, and 65.37% with 5ET (Figure 3).

In the second set of experiments, the influence of the stabilizing agent used for the Pickering emulsions of tea tree EO were examined. For the experiment we used 20MET, 20ET, and 20Ph stabilizing agents, the concentrations of which were kept constant at 1 g/L. The tea tree EO concentration was the same as used in previous

experiments: 3.314 g/L. The results clearly show that the highest cumulative EO level was 87.23% using 20ET stabilizing silica nanoparticles, and that EO diffusion was least effective with Tween 80 surfactant-stabilized emulsion, in this case only 8.76% (Figure 4).

In the next step the influence of droplet size on diffusion was examined. The droplet sizes examined were 775, 1686, and 3202 nm. The concentration of 20ET was the same in each emulsion: 1 g/L. Predictably, the highest cumulative level was obtained with the smallest droplet size: at 775 nm, almost all of the tea tree EO oil (98.10%) diffused through the agar membrane. By contrast, with the biggest droplet size of 3202 nm, the cumulative level was

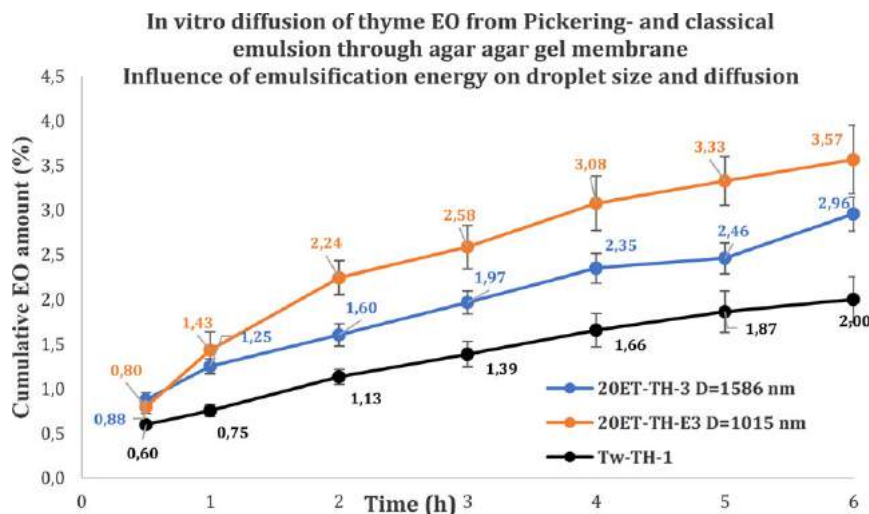


FIGURE 6 In vitro diffusion of thyme essential oil (EO) from Pickering and conventional emulsions through agar gel membrane. The emulsification energy has an influence on droplet size, and so the effectiveness of diffusion was examined. The stabilizing agent of the Pickering emulsions was ET20, and the stabilizing agent in the conventional emulsion was Tween-80 surfactant. The concentration of thyme EO was 2.740 g/L, and the concentration of all of the emulsion stabilizing agents was 1 g/L. The droplet size of 20ET-TH-3 was 1586 nm, whereas the droplet size of 20ET-TH-E3 was 1015 nm. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

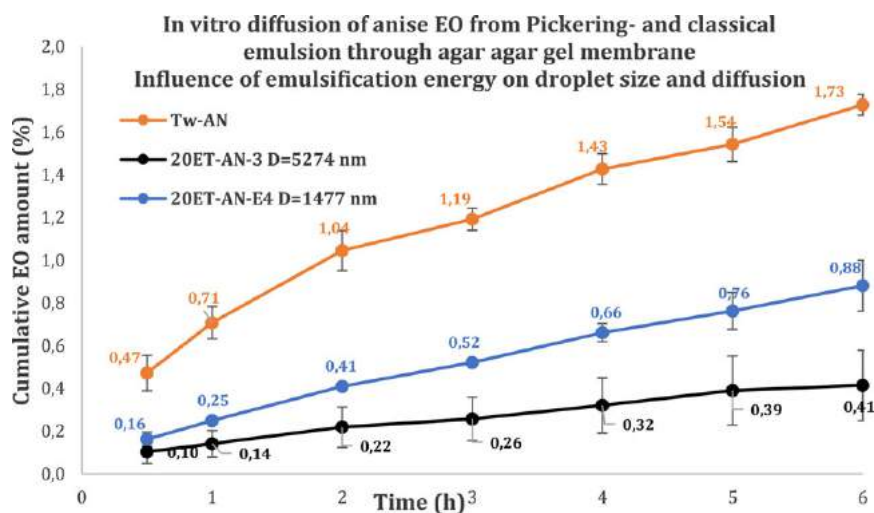


FIGURE 7 In vitro diffusion of anise essential oil (EO) from Pickering and conventional emulsions through agar gel membrane. The emulsification energy has an influence on droplet size, and so the effectiveness of diffusion was examined. The stabilizing agent of the Pickering emulsions was ET20, and the stabilizing agent in the conventional emulsion was Tween-80 surfactant. The concentration of anise EO was 2.937 g/L, and the concentration of all of the emulsion stabilizing agents was 1 g/L. The droplet size of 20ET-AN-3 was 5274 nm, whereas the droplet size of 20ET-AN-E4 was 1477 nm. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

much lower, at 67.18%. Diffusion with the same composition using conventional Tween 80-stabilized emulsions is far less effective, with an accumulative level of tea tree EO in the range of 0.53–8.76% (see Figure 5).

3.3.2 | In vitro diffusion studies with Pickering emulsions of thyme and anise EOs

In the case of Pickering emulsions of thyme and anise EOs, the influence of the droplet size of the emulsion on diffusion was

investigated. In every case the emulsion stabilizing agent was 20ET, and its concentration was 1 g/L. For Tween 80 surfactant-stabilized emulsions the surfactant concentration was also 1 g/L. Similarly, to tea tree EO diffusion, the cumulative level was higher with the smaller droplet size. In the case of thyme EO diffusion, the cumulative level of EO was 3.57% with a droplet size of 1015 nm, and it was 2.96% with a droplet size of 1586 nm. For the conventional emulsion this value was lower, at 2.0% (Figure 6).

The diffusion of anise EO differs from that of tea tree EO and thyme EO. The cumulative level of EO was 0.88% with a droplet size

of 1477 ± 98.2 nm, and dropped to 0.41% with a droplet size of 5274 nm. As opposed to tree tea EO and thyme EO, the cumulative release of anise EO was higher for the conventional emulsion, at 1.73% (Figure 7).

4 | CONCLUSION

The synthesis of hydrophilic silica nanoparticles and their engineered surface modifications with ethyl, methyl, and phenyl functional groups have been successfully performed. The synthesized silica nanoparticles were highly monodispersed, spherical, and have a smooth surface.

We have prepared Pickering emulsions with tea tree, thyme, and anise EOs, stabilized with 20-nm silica nanoparticles. The most stable emulsions were stabilized with particles modified by ethyl group, with a calculated surface coverage of 20%, and in some cases the emulsions are stable for up to 4 months. For tea tree EO the desired droplet size can be tailored to the stable range, where the concentration of EO is between 0.895 and 4.447 g/L, and the concentration of 20ET is 1 g/L. With these conditions we can make emulsions with the desired droplet size that can be used for droplet size-dependant targeting.

Furthermore, in vitro diffusion experiments have been performed with EOs in agar gel membranes with vertical static Franz diffusion cells. The cumulative level of tea tree EO is outstanding with 20ET-stabilized Pickering emulsions, and notwithstanding the low cumulative level of thyme EOs, the results clearly show that the cumulative levels of EOs are higher with Pickering emulsions than with conventional Tween 80-stabilized emulsions, excepting the case of anise EO. This information is very useful for researchers who deal with the microbiological properties of EOs using the agar-plate method, or for other pharmaceutical examinations. The difference between the cumulative levels of tea tree EO and thyme or anise EOs can arise from differences in the physical chemical properties of the EOs, such as surface tension and viscosity, which also determine the formulation and diffusion of EOs.

We hope that our work will contribute to a better understanding of the effect of EOs in microbiological, biotechnological, and pharmaceutical experiments, and could plausibly open new routes for the potential exploitation of EOs in pharmaceutical applications.

ACKNOWLEDGEMENT

The project was supported by the ÚNKP-17-3-I-PTE-21 New National Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities (Hungary).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

ORCID

Barbara Horváth  <http://orcid.org/0000-0003-4355-1059>

REFERENCES

1. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol.* 1999;86:985-990.
2. Lee KG, Shibamoto T. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J Agric Food Chem.* 2002;50:4947-4952.
3. Banerjee S, Ecavade A, Rao AR. Modulatory influence of sandalwood oil on mouse hepatic glutathione S-transferase activity and acid soluble sulphhydryl level. *Cancer Lett.* 1993;68:105-109.
4. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Pollisiou M, Sökmen A, Akpulat HA. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol.* 2003;87:215-220.
5. Pape WJ, Pfannenbecker U, Hoppe U. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol Toxicol.* 1987-1988;4:525-536.
6. Pickering SU. Emulsions. *J Chem Soc Trans.* 1907;91:2001-202.
7. O'Rear III, EO. Review of *An Introduction to Surfactants*. *J Chem Educ.* 2015;92:1779-1780.
8. Aveyard R, Binks BP, Clint JH. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Adv Colloid Interface Sci.* 2003;100-102:503-546.
9. Binks BP. Particles as surfactants – similarities and differences. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2002;7:21-41.
10. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotech.* 2008;3:145-150.
11. Singh R, Lillard Jr, JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* 2009;86:215-223.
12. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, Wang SL. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:765-774.
13. Hee-Young K, Sung Soo P, Seung-Taik L. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2015;126:607-620.
14. Zhang J, Elder TJ, Pu Y, Ragauskas AJ. Facile synthesis of spherical cellulose nanoparticles. *Carbohydrate Polymers.* 2007;69:607-611.
15. Astete CE, Sabilov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomater Sci Poly Ed.* 2006;17:247-289.
16. Chen JF, Ding HM, Wang JX, Shao L. Preparation and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug delivery application. *Biomaterials.* 2004;24:723-727.
17. Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodispersed silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci.* 1968;26:62-69.
18. Jung CY, Kim JS, Kim HY, Ha JM, Kim YH, Koo SM. One-pot synthesis and surface modifications of organically modified silica particles having multiple functional groups. *J Colloid Interface Sci.* 2012;367:67-73.
19. Liberman A, Mendez N, Trogler WC, Kummel AC. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surface Science Reports.* 2014;69:132-158.
20. McCarthy J, Stępnik II, Corbalan JJ, Radomski MW. Mechanisms of toxicity of amorphous silica nanoparticles on human lung submucosal cells in vitro: Protective effects of fisetin. *Chem Res Toxicol.* 2012;25:2227-2235.
21. Borugă O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I, Gruia AT, Horhat FG. Thymus vulgaris essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life.* 2014;7(sp. issue 3):56-60.

22. Gende LB, Maggi MD, Fritz R, Eguaras MJ, Bailac PN, Ponzi MI. Antimicrobial activity of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* essential oils against *Paenibacillus larvae*. *J Essent Oil Res.* 2009;21:91-93.
23. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:50-32.
24. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:909-915.
25. Sanders ER. Aseptic laboratory techniques: plating methods. *J Vis Exp.* 2012;63:e3064.
26. Széchenyi A, Horváth B, Kunsági-Máté S, Kovács B. Study on influence of size and surface properties of silica nanobeads in the performance of optical sensors. Conference paper presented at the 3rd International Colloids Conference – Colloids & Energy, 21–24 April 2013, Xiamen, China.
27. Horváth B, Szilárd P, Széchenyi A. Theoretical and practical aspects of essential oil emulsions stabilization with solid nanoparticles. *Natural Volatiles and Essential Oils* 4(3) 54 YS-O4, 48th International Symposium on Essential Oils, Hungary, Pécs, 2017.

How to cite this article: Horváth B, Pál S, Széchenyi A. Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles. *Flavour Fragr J.* 2018;33:385–396. <https://doi.org/10.1002/ffj.3463>

OPEN

Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment

Barbara Horváth^{1,5}, Viktória L. Balázs^{2,5}, Adorján Varga³, Andrea Böszörményi⁴, Béla Kocsis³, Györgyi Horváth² & Aleksandar Széchenyi^{1*}

Essential oils (EOs) are commonly applied in mouth care products like mouthwashes, mostly as an ethanolic solution or by usage of surfactants as solubilising agents. In this study, we present a formulation for preparation of Pickering nano-emulsions (PnE) of EOs as a novel form for application of EOs in mouth care. For the preparation of PnE, we have synthesised surface-modified silica nanoparticles with a mean diameter of 20 nm, as well as we have examined the effect of EOs concentration on PnE droplet size and stability. *In vitro* study of their effect on the *Streptococcus mutans* biofilm as the main pathogen of dental health problems has been performed. We have found that EOs in the PnE form has the highest effectiveness against biofilm formation. Diffusion through the biofilm model membrane was studied to explain this observation. We have found that PnEs have a better performance in the transportation of EOs through model membrane than the ethanolic solutions and conventional emulsions (CEs).

Dental plaque is a thin biofilm layer built by microorganisms, mainly *Streptococcus* species¹. Microbial activity in the dental plaque causes a local decrease of pH value and weakens the mineralised tooth structures that can lead to several tooth diseases like caries, gingivitis, and periodontitis. For this reason, the removal of dental plaque is the most important part of mouth hygiene. The daily removal is commonly achieved by mechanical methods, such as tooth brushing, usage of tooth floss or interdental brushing². Tooth brushing is used by most of the population, while only a small percentage uses tooth floss or interdental brushing regularly³. The efficacy of mechanical methods differs in a great extent. The plaque removal by tooth brushing mainly depends on the time and technique of brushing, and on the quality of toothbrushes⁴, but usually, the desired plaque removal is not reached by this method. That is why an additional technique, such as chemical plaque removal or prevention, is often used. Chemical plaque removal or prevention can be achieved by application of mouthwashes, whose usage is widespread among the grown population. The commercially available mouthwashes usually contain amine-fluoridine, chlorhexidine, hexetidine, octenidine, triclosan or plant extracts as antibacterial agents⁵. Most of them cause some side effect after prolonged usage, except plant extracts like EOs. G. Pizzo *et al.* demonstrated that EOs have the same efficacy as aminefluoridin or CHX so that they can replace these ingredients in mouthwashes⁶.

¹Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Rókus str. 2., H-7624, Pécs, Hungary. ²Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Rókus str. 2., H-7624, Pécs, Hungary. ³Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Szigeti str. 12, H-7624, Pécs, Hungary. ⁴Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy Semmelweis University, Üllői str. 26, H-1085, Budapest, Hungary. ⁵These authors contributed equally: Barbara Horváth and Viktória L. Balázs. *email: szealex@gammat.ttk.pte.hu

The EOs based commercial products that are used for treatment or prevention of dental diseases are containing surfactants, solvents or co-solvents to enhance the water solubility of EOs⁷. Among the solvents, different alcohols (e.g. ethanol, propylene glycol, glycerine) are applied in mouthwash or gargles. Commonly used surfactants are polysorbates (20, 60 or 80)⁸ and SLS (Na-lauryl-sulphate)⁹, which are used as emulsion stabilisers or EO solubilising agents. Unfortunately, the surfactants can cause mucous membrane irritation by damaging their cell membranes; additionally, at long-term usage, they can get into the blood circulation and cause other side effects¹⁰. The alcohols can cause dehydration of the mouth, which makes the mucous membrane more sensitive to infections or other diseases¹¹.

Additionally, the application of solvents and surfactants in microbiological tests can lead to misinterpretation of the experimental data, because alcohols and surfactants also have antimicrobial activity¹² that is why the effect of essential oils cannot be unambiguously determined. To avoid the use of solvents and surfactants, yet to provide the availability of EOs on the test or treatment site, Pickering emulsions can be prepared, which are emulsions stabilised with solid particles¹³. For this purpose, we can use biologically inert, non-toxic particles, e.g. cellulose¹⁴, silica¹⁵ or PLGA¹⁶ particles, which are widely used in pharmaceutical technology.

Pickering emulsions can have the same or better stability than the conventional, surfactant stabilised emulsions interface¹⁷. The adsorption of the solid particles and surfactants on the liquid-liquid interface is a spontaneous, reversible process. The adsorption energy of solid particles on the liquid-liquid interface is higher than the adsorption energy of surfactants. In some cases, where the adsorption energy of solid particles is extremely high, adsorption process can be considered as irreversible¹⁷. Because of their stability, Pickering emulsions can be used in pharmaceutical and medical applications.

Beside emulsion stabilisation, the solid particles may interact with biofilm, and targeted EO transportation can also be achieved¹⁸. The effectiveness of targeted EO delivery depends on the emulsion type, the emulsion stabilisation agent and emulsion droplet size^{19,20}. Usually, the biofilm consists of polysaccharide matrix, and it is impermeable for many pharmaceutically active ingredients, that is why the treatment of stiff bacterial colonies is challenging²¹. Because of the hydrophilic properties of *Streptococcus mutans* biofilm²², an O/W type emulsion should be applied. When the emulsion is stabilised by the particles with appropriate hydrophilic/lipophilic surface character, which can adsorbed preferably on the biofilm, targeted delivery can be reached. The emulsion droplet size also plays an important role in the delivery of EOs: the mean pore size of biofilms in the top layer ranges from approximately 1.7–2.7 μm and 0.3–0.4 μm in the bottom layers²³. Because of the pore size of biofilms we can assume, that if the emulsion droplet size is less than 300 nm, the droplets can penetrate deep into the biofilm matrix.

We aimed to prepare O/W type Pickering emulsions with four EOs, such as cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J. Presl.), clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry), peppermint (*Mentha x piperita* L.) and thyme EO (*Thymus vulgaris* L.) and to examine the influence of the EOs concentration on droplet size and stability of Pickering emulsions. Their antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* have been studied before²⁴, moreover several researchers have found that these EOs can act as biofilm inhibitors with other bacterial strains^{25–28}. Their ethanolic solutions and conventional emulsions (CEs) have also been tested to compare the effectiveness of different EO delivery forms.

We have also examined the diffusion properties of different EO forms through model membrane, to explain the difference in their antibacterial or inhibitory effects. In the case of cinnamon EO we have prepared and examined PnE with SNPs that have different hydrophilic/lipophilic surface character to determine its influence on the antibacterial activity and diffusion properties as model membrane agar gel was used, which is a suitable *Streptococcus mutans* biofilm model because they have similar hydrophilic properties and tortuous pore structure²⁹.

Results and Discussion

Synthesis and characterisation of silica nanoparticles. Hydrophilic silica nanoparticles (HS) were synthesised by a method established by Stöber, Fink and Bohn, the mean diameter was 20 nm, and the PDI was 0.008, determined by DLS. The stability of the PnEs can be influenced by the hydrophilic/lipophilic surface properties of silica nanoparticles³⁰. In our previous work³¹, we have ascertained that the PnEs with appropriate stability and tailored size can be prepared with silica nanoparticles, which were partially surface modified with ethyl groups. For this reason, we have modified the surface of HS by ethyl functional groups with a theoretical surface coverage of 20% (20ET) and 40% (40ET).

The TEM examinations showed that the mean diameter of silica samples was mean 20 nm; they are highly monodispersed, nearly spherical and have a smooth surface (see Fig. 1). In the case of HS high negative zeta potential is expected, and the measurements confirm it. High number of free silanol groups at the surface causes the negative zeta potential, as their pK value is approximately 4.5, which means that some of them are dissociated in the water suspension. The surface modification will decrease the number of free silanol groups on the surface, which should cause the decrease of the zeta potential under the same conditions. The zeta potential of HS suspended in water was $\zeta = -116$ mV. After surface modification the zeta potential values decreased with increasing surface coverage. The values were $\zeta = -79$ mV for 20ET and $\zeta = -63$ mV for 40ET.

The surface modification of SNPs was examined with FT IR spectroscopy. No significant difference in the position of the vibrational frequency for the SiO₂ functional groups was observed (see Fig. 2). The surface modification of HS with ethyl functional groups caused the decrease of the number of Si-OH groups on the surface of SNPs, hence intensity of peaks belonging to $\nu_{\text{as}}\text{Si-O-Si}$ (1105 cm⁻¹), $\nu_{\text{defrom}}\text{Si-OH}$ (1395 and 1645 cm⁻¹) and $\nu_{\text{stretch}}\text{Si-OH}$ (3095–3685 cm⁻¹) decreased, while the intensity of peaks of $\nu_{\text{s}}\text{Si-O-C}$ increased (815 cm⁻¹). New peak attributed to the $\nu\text{-CH}_2$ have appeared for the surface modified samples. Their vibrational frequencies are the same in both cases, 2855 and 2930 cm⁻¹, but intensities are higher for the sample 40ET. The results clearly

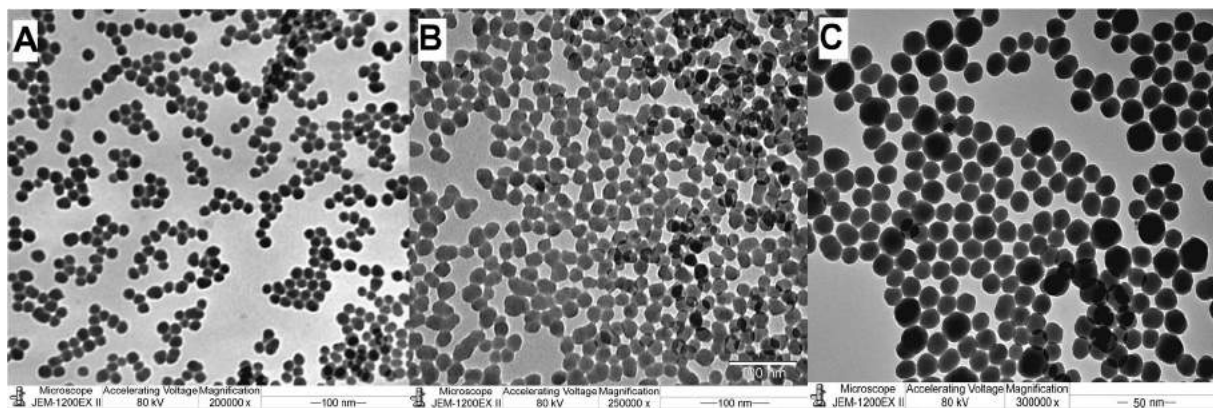


Figure 1. TEM images of silica nanoparticles. (A) HS. (B) 20ET. (C) 40ET.

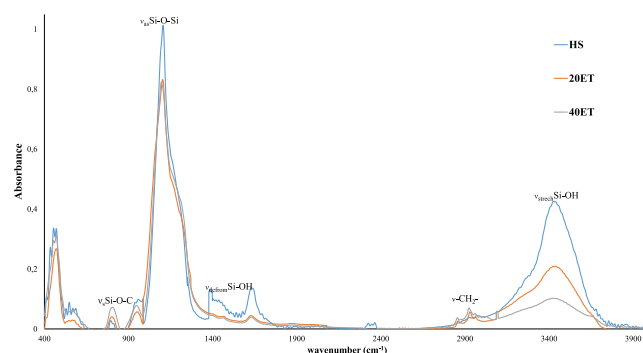


Figure 2. FT-IR spectra of silica nanoparticles.

show that the surface modification was successful, and the intensity of peaks $\nu_{\text{s}}\text{Si-O-C}$ and $\nu\text{-CH}_2$ correlate to the surface coverage with ethyl functional groups.

GC-MS and GC-FID analysis of essential oils. The exact composition of EOs was determined with gas chromatography. The components were identified by comparing their retention times and relative retention factors with standards and oils of known composition. Two parallel measurements have been performed. The main components are the follows eugenol 78.64% in clove EO, cinnamaldehyde 63.77% in cinnamon bark EO, menthol 50.4% and menthon 19.8% in peppermint EO, thymol 39.88% and p-cymene 19.2% in thyme EO. In Table 1. other major components can be seen. We did not indicate or identify the compounds which were present significantly under 1%; this is the reason why the totals are not 100%.

Preparation and characterisation of pickering nano-emulsions. The maximum concentration of EOs was set to MIC value for all examined emulsions. The MIC values of pure EOs in ethanolic solutions were previously determined against *Streptococcus mutans* with broth macrodilution test (see Part 3.4), for different EOs these were: clove EO 1.02 g/L, cinnamon EO 0.80 g/L, peppermint EO 1.96 g/L, thyme EO 0.40 g/L. We have prepared PnEs with HS, 20ET or 40ET stabilising agents, for CEs Tween80 surfactant was used, the concentrations of stabilising agents were 1 g/L for all experiments. The emulsions were stored at room temperature; $t = 25^\circ\text{C}$. Each experiment was made in triplicates. Stability of emulsions was determined from periodical droplet size determination with DLS (see Table 2.). The emulsions were considered to stable when the droplet size did not change within 24 hours, and creaming, sedimentation or disproportionation did not occur. Because of the large number of experimental data, we did not indicate data for the standard deviations of droplet size in Table 2. All values were in 1.2–8.3% range.

Because the volume fraction of EO (Θ_o) was under 0.01 in every case, we could assume, that all PnEs and CEs were O/W type emulsions. We have performed filter paper tests with CoCl_2 and dye test with Sudan red G to confirm this assumption²⁹.

The results confirmed that the PnEs could have same or better stability than CEs (see Table 2), because of the high adsorption energy of solid nanoparticles on the liquid-liquid interface. The most stable emulsions are the thyme EO containing ones, in this case the stability of PnEs was 4 months, while its CEs were stable for only 1 month.

Results of GC measurements of essential oils					
Component	RI	Percentage of compounds (%)			
		Peppermint EO	Thyme EO	Clove EO	Cinnamon bark EO
α -Pinene	939	1.1	1.0	—	5.1
Camphene	951	—	2.0	—	-
β -Myrcene	992	—	1.0	—	—
Carvacrol		—	5.9	—	—
α -Terpinene	1017	—	3.2	—	—
<i>p</i> -Cymene	1026	—	19.2	—	1.9
Limonene	1044	1.4	—	—	1.8
1,8-Cineole	1046	5.5	4.6	—	2.8
γ -Terpinene	1060	—	6.7	—	—
Linalool	1104	—	5.6	—	4.0
Isopulegol	1150	1.0	—	—	—
Menthone	1156	19.8	—	—	—
Isomenthone	1159	7.0	—	—	—
Menthol	1172	50.4	—	—	—
Isomenthol	1183	4.3	—	—	—
α -Terpineol	1190	—	1.0	—	2.2
Pulegone	1215	1.9	—	—	—
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	1266	—	—	—	63.7
Bornyl acetate	1289	—	1.0	—	—
Thymol	1297	—	39.8	—	—
Isomenthyl acetate	1305	5.5	—	—	—
Eugenol	1373	—	—	78.8	4.6
β -Elemene	1394	—	—	—	—
β -Caryophyllene	1417	1.3	4.2	13.5	4.2
Cinnamyl acetate	1446	—	—	—	9.4
α -Humulene	1452	—	—	4.6	—
β -Cadinene	1473	—	—	1.1	—
Total:		99.2	98.2	98.0	99.7

Table 1. Composition of essential oils. The results of GC analysis show the average per cent of the two parallel measurements of volatile compounds in every case. The values of standard deviation were below 4.5%. RI: retention indices relative to C8–C30 n-alkanes. We did not indicate the unknown compounds and compounds under 1%.

Parameters of Pickering- and conventional emulsions of essential oils				
Essential oil	c_{oil} (g/L)	Stabilizing agent	$D_{droplet}$ (nm)	Stability
Clove EO	0.05–1.02	20ET	155–1660	2 weeks
	0.05–0.7	Tween80	155–245	2 weeks
	0.8–1.02	Tween80	335–455	1 weeks
Cinnamon EO	0.03–0.8	HS	400–4880	4 days
	0.03–0.8	20ET	185–280	2 months
	0.03–0.8	40ET	315–550	2 months
	0.03–0.5	Tween80	240–265	3 weeks
	0.6–0.8	Tween80	275–3010	2 weeks
Peppermint EO	0.11–1.96	20ET	210–11450	4 month
	0.105–0.7	Tween80	255–310	1 weeks
	0.8–1.96	Tween80	350–1090	2 weeks
Thyme EO	0.05–0.4	20ET	155–395	4 months
	0.05–0.4	Tween80	150–240	1 month

Table 2. Composition and characterisation of emulsions. Droplet size and stability were calculated from data of 3 parallel samples. The concentration of stabilizing agent was constant 1 g/L. Droplet size standard deviation = ± 1.2 –8.3%. All emulsions are O/W type, which was determined with conductivity tests.

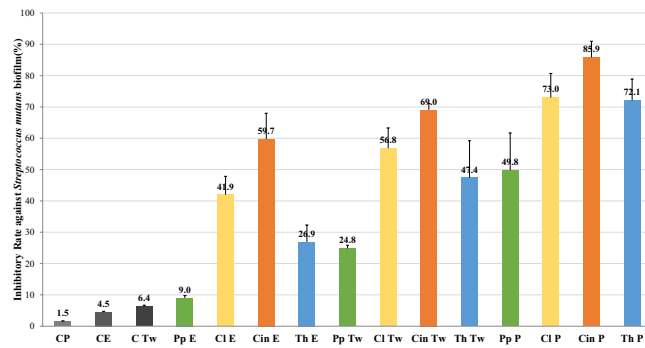


Figure 3. Results of biofilm inhibition tests. Biofilm inhibition activity of different formulated EOs against *Streptococcus mutans*, the concentration of EOs were the MIC/2 values. C: control. P: PnE form. E: ethanol/ethanolic solution. Tw: Tween80 solution/CEs with Tween80 surfactant. Pp: peppermint EO, MIC/2: 0.98 g/L. Cl: clove EO, MIC/2: 0.51 g/L. Cin: cinnamon EO, MIC/2: 0.40 g/L. Th: thyme EO, MIC/2: 0.20 g/L.

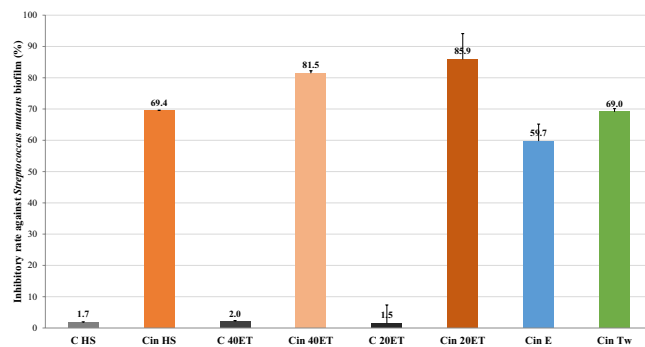


Figure 4. Results of biofilm inhibition tests in case of cinnamon EO. Biofilm inhibition activity of different formulated cinnamon EO against *Streptococcus mutans*. The concentration of cinnamon EO was its MIC/2 values, 0.40 g/L. C: control. HS: PnE with HS stabilising agent. 20ET: PnE with 20ET stabilising agent. 40ET: PnE with 40ET stabilising agent. E: ethanol/ethanolic solution. Tw: CE with Tween80 surfactant.

Biofilm formation and treatment. The EOs concentration was MIC/2 value in all examined emulsions or solutions, which is a standard concentration for biofilm inhibition tests³². Our results of the crystal violet assay showed that the absolute ethanol and Tween80 solution have antibacterial effect, and they reduced the biofilm mass, while the HS, 20ET and 40ET nanoparticle suspensions had no antibacterial effect, and they did not reduce the biomass significantly.

Even so, the PnEs prepared with 20ET were the most effective forms in biofilm inhibition. For each EOs, the ethanolic solutions and CEs showed less biofilm inhibition (see Fig. 3.); e.g. in the case of thyme EO, the inhibitory rates (IR) were 26.9, 47.4 and 72.1% for ethanolic solution, CE and PnE respectively.

We have found cinnamon EO have the highest inhibition effect among tested EOs. The inhibitory rates for its different forms are 59.7 for ethanolic solution, 69.0% for CE and 85.9% for PnE respectively. In this case we have performed tests on the influence of the hydrophilic/lipophilic surface properties of stabilising SNPs on the inhibitory effect on PnE. HS and 40ET nanoparticles stabilised PnEs were also tested in biofilm inhibition. The results showed (Fig. 4), that in the case of 20ET nanoparticles stabilised PnE had better biofilm inhibition effect (IR 85.9%) than 40ET (IR 81.5%), and HS stabilised ones (IR 69.4%).

In Fig. 5 we can see the SEM images of untreated and treated biofilms. Figure 5A,B are the images of untreated control biofilms. The *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* colonies can be clearly seen, and thick coherent biofilm has formed on the surface. The SEM images bear out the results of biofilm inhibition experiments. The PnE of peppermint EO reduced the biofilm mass (Fig. 5C) minimally, while in the images of biofilms treated with PnE of clove (Fig. 5D) and thyme EO (Fig. 5E) we can see bacterial colonies on the surface, but the adherence of coherent biofilm was reduced.

The SEM images clearly show, high inhibitory effect of the PnEs of cinnamon EO. On the images of biofilms treated with HS (Fig. F) and 40ET (Fig. H) stabilized PnEs of cinnamon EO we can see some coherent biofilm spots, while on the image of biofilm treated with 20ET stabilized PnE of cinnamon EO (Fig. G), no coherent biofilm formation can be observed.

In all the cases, a very good correlation of the inhibitory rate obtained by the crystal violet assay and the data obtained from SEM images can be found.

In vitro diffusion studies. After the discussion on the results obtained from biofilm inhibition tests, an assumption has been made that there should be a correlation between inhibitory rate and diffusion properties

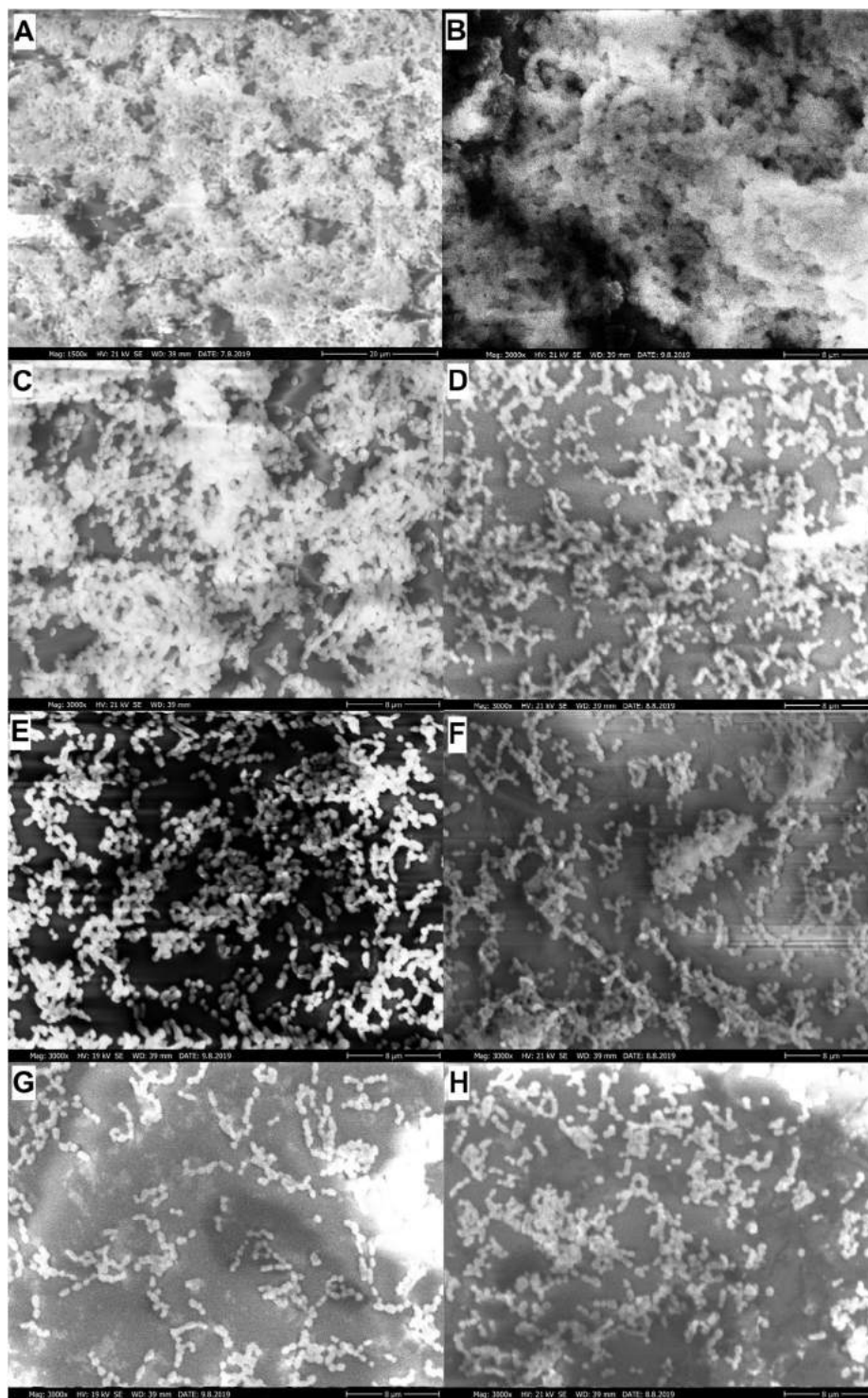


Figure 5. SEM images of biofilm and biofilms after treatment with a different formulation of cinnamon EO. The EO concentrations equal with the MIC/2. **(A,B)** Control *Streptococcus mutans* biofilm, untreated. **(C)** Biofilm treated with PnE of peppermint EO. **(D)** Biofilm treated with PnE of clove EO. **(E)** Biofilm treated with PnE of thyme EO. **(F)** Biofilm treated with HS stabilised PnE of cinnamon EO. **(G)** Biofilm treated with 20ET stabilised PnE of cinnamon EO. **(H)** Biofilm treated with 40ET stabilised PnE of cinnamon EO. The magnification is 1500x and 3000x for biofilm control, and 3000x for other samples, scale bar is 8 μ m.

trough biofilm of the EOs in different forms. To confirm this assumption, *in vitro* diffusion tests were performed. Static Franz diffusion cell method was used with agar gel as model membrane. The EOs concentration was the same that was used for the biofilm inhibition tests, MIC/2 values. The droplet size of the different types of

Results of <i>in vitro</i> diffusion studies				
Essential oil	c_{oil} g/l	Formula	Droplet size D (nm)	Cumulative EO release(%)
Clove	0.51	Ethanol solution	—	12.9 ± 2.8
		Conventional emulsion	320 ± 37	21.5 ± 0.1
		Pickering nano-emulsion	370 ± 22	27.5 ± 4.0
Cinnamon	0.40	Ethanol solution	—	10.5 ± 1.6
		Conventional emulsion	240 ± 20	30.7 ± 1.2
		Pickering nano-emulsion HS	220 ± 4	32.3 ± 1.2
		Pickering nano-emulsion 20ET	245 ± 12	51.4 ± 1.0
		Pickering nano-emulsion 40ET	255 ± 6	33.8 ± 2.5
Peppermint	0.98	Ethanol solution	—	69.7 ± 14.1
		Conventional emulsion	310 ± 9	69.0 ± 9.2
		Pickering nano-emulsion	210 ± 10	81.1 ± 2.2
Thyme	0.20	Ethanol solution	—	under LOD
		Conventional emulsion	245 ± 20	9.4 ± 0.4
		Pickering nano-emulsion	255 ± 5	18.9 ± 0.5

Table 3. Results of *in vitro* diffusion studies. The oil concentrations equal to MIC/2 values against *Streptococcus mutans*. Droplet sizes and cumulative EO releases were calculated from three parallel samples.

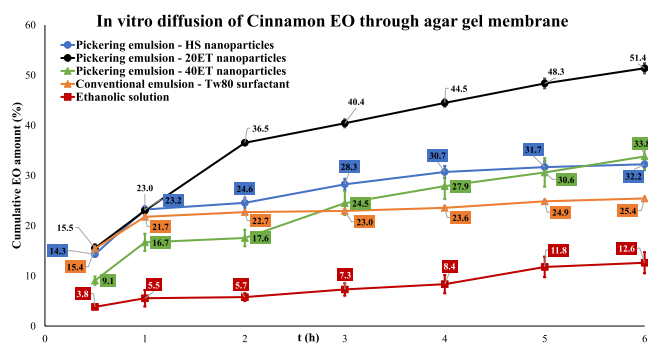


Figure 6. *In vitro* diffusion of cinnamon EO through agar gel membrane. The cinnamon EO concentration is 0.40 g/l (MIC/2 against *Streptococcus mutans*). The stabilising agent of PnEs are HS, 20ET, and 40ET nanoparticles, the stabilising agent of CE is Tween80. The concentration of emulsion stabilising agents is 1 g/l. The droplet size of CE is D = 320 nm, the PnE with HS D = 220, PnE with 20ET D = 245 nm, and PnE with 40ET D = 255.

emulsions was similar (see Table 3), and we could assume that the diffusion properties depend only on the type of the emulsion or surface properties of emulsion stabilising agent. The diffusion profiles of different EOs are very similar; this is why we have graphically presented only the *in vitro* diffusion study curve of cinnamon EO as it has shown the highest inhibitory rate (see Fig. 6). The results of cumulative amount after 6 hours for all samples can be seen in Table 3. The cumulative amount of EO means the diffused EO amount after 6 hours. The diffusion curves of all the other samples can be seen in Supplementary Information.

Generally, we can conclude that the cumulative EO amounts were highest for PnEs. In the case of cinnamon EO these values are: 51.4% for 20ET stabilised PnE, 30.7% for CE and 10.5% for ethanol solution respectively. At thyme EO, cumulative EO amount for ethanol solution was under the limit of detection value.

Conclusions. We have successfully prepared O/W type PnEs of EOs with droplet size tailored for diffusion through biofilm porous structure (210–370 nm). For the stabilisation of PnEs, we have synthesised and surface-modified spherical silica nanoparticles. These emulsions remained stable for at least 1 week, in some cases more, then 4 months.

We have determined MIC values against *Streptococcus mutans* for all examined EOs, and we have performed a biofilm inhibition tests applying EOs in MIC/2 amount. We have tested tree forms for all examined EOs, ethanol solution, CE and PnE. The test results shown that the PnE form has highest antimicrobial effectiveness compared to CE or ethanol solutions for all examined EOs. We assume that the difference in effect should correlate with the penetration of EOs in different form through polysaccharide biofilm structure. To confirm this idea we have studied the diffusion through model membrane (agar gel). The results have shown that for all samples, there is a direct relation of antimicrobial or inhibitory effect with diffusion properties of EOs in different form. The PnE form had the highest cumulative amount for all EOs, and ethanol solution had the lowest cumulative amount. This result is an explanation why the PnE have antibacterial effect while ethanol solution with the same EO concentration have inhibitory effect, which is clearly seen on the SEM images. The highest difference in the inhibitory

rate of different forms has been observed in the case of thyme oil. The thyme oil has the highest antimicrobial effectiveness in comparison with other examined EOs as its MIC value is lowest. The ethanolic solution did not provide a measurable amount of thyme EO through model membrane, and it had a very low inhibitory rate (27%). The CE form had a cumulative amount of 9%, and the inhibition rate has increased to 47%, while the PnE form had 19% of cumulative amount, and the inhibition rate increased to 72%. These results indicate that the delivered amount of an EO with high antimicrobial effectiveness to the biofilm has the greatest effect on the inhibition activity. Beside the droplet size, the appropriate hydrophilic/lipophilic surface character is very important for effective delivery of EO to biofilm. We have found that PnEs stabilised with silica that has a moderate hydrophobic character (20ET), shows the highest delivery of EOs to biofilm that is accompanied with highest inhibitory effect.

We can conclude that O/W type PnEs stabilised by nanoparticles with appropriate hydrophilic/hydrophobic surface properties, provide a new possibility for the application of EOs in pharmaceutical treatment against *Streptococcus mutans* biofilm formation.

Materials and Methods

Materials. Chemicals for experiments were all analytical grade and used as received. The sources and grade of all chemicals and materials used for experiments are discussed in the Supplementary Information.

Synthesis- surface modification and characterisation of silica nanoparticles. Synthesis of hydrophilic silica was performed based on the work of Stöber, Fink, and Bohn³³. The optimisation of the synthesis process and surface modification with ETES was performed in our previous work³¹. We characterised the silica nanoparticles with DLS, TEM and FT-IR measurements. The brief synthesis route and further information about the measurements are given in the Supplementary Information.

GC-MS and GC-FID conditions. Detailed information on the applied analytical method can be read in the Supplementary Information.

Broth macrodilution test (BDT). With this test, we determined the MIC and MIC/2 values of each EO against *Streptococcus mutans*. The test was based on the recommendations of the Manual of Clinical Microbiology³⁴ associated with modifications published before³⁵. Further details are given in the Supplementary Information.

Preparation and characterisation of O/W type PnEs. The concentration of emulsifiers was set to 1 mg/ml and was kept constant for all experiments. The influence of EOs concentration on the emulsion droplet size was examined; it was varied until the minimum inhibitory concentration against *Streptococcus mutans* (see Table 2.) The exact emulsification process, the droplet size, and stability measurements can be seen in the Supplementary Information.

In vitro diffusion studies – Static Franz Diffusion cell method. The examination of diffusion properties was performed in static vertical Franz diffusion cells (Hanson Microette Plus. Hanson Research 60-301-106). The essential oil content of samples was determined with UV-Vis spectroscopy (Jasco V-550 UV/VIS Spectrophotometer). To compare the effectiveness of PnEs, we examined the diffusion of EOs in an ethanolic solution and emulsion stabilised with Tween80 surfactant. Further information and details about the *in vitro* diffusion study are given in the Supplementary Information.

Biofilm inhibition experiments. The biofilm inhibition experiments were performed on the base of Peeters and co-worker's study, with the crystal violet assay³⁶. The detailed method is written in the Supplementary Information.

Preparation of the biofilm samples for Scanning Electron Microscopy. The biofilm was imaged by SEM (JEOL JSM-6300) as previously described³⁷ with some modification (briefly see Supplementary Information). To determine the effect of EOs and different formulations, we have used control samples that were treated with ethanol and Tween80 solutions as well with the suspension of HS, 20ET or 40ET nanoparticles. Their concentration was the same as it was in the ethanolic solution, CEs, and PnEs³⁸.

Received: 2 April 2019; Accepted: 15 October 2019;

Published online: 12 November 2019

References

- Jacob, M. Ten Cate Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* **94**, 1–9 (2006).
- Slot, D. E., Dorfer, C. E. & Van der Weijden, G. A. The efficacy of interdental brushes on plaque and parameters of periodontal inflammation: a systematic review. *Int. J. Dent. Hyg.* **6**, 253–264 (2008).
- Jackson, M. A., Kellett, M., Worthington, H. V. & Clerehugh, V. Comparison of Interdental Cleaning Methods: A Randomized Controlled. *Trial. J. Periodont.* **77**(8), 1421–1429 (2006).
- Harrison, P. Plaque control and oral hygiene methods. *J. Ir Dent Assoc.* **63**(3), 153–156 (2017).
- Farah, C. S., McIntosh, L. & McCullough, M. J. Mouthwashes. *Aust Prescr* **32**(6), 162–164 (2009).
- Pizzo, G., La Cara, M., Licata, M. E., Pizzo, I. & D'Angelo, M. The effects of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse on supragingival plaque regrowth. *J. Periodont.* **79**(7), 1177–1183 (2008).
- Vlachojannis, C., Winsauer, H. & Chrubasik, S. Effectiveness and safety of a mouthwash containing essential oil ingredients. *Phytother Res.* **27**(5), 685–91 (2013).
- Hussain, K. & Saeed-ul-Hassan, S. Solubility of Essentials Oils by Non-alcoholic Agent. *J. Med Sci* **3**, 220–226 (2003).
- Zhang, J. *et al.* The effects of essential oil mouthrinses with or without alcohol on plaque and gingivitis: a randomized controlled clinical study. *BMC Oral Health* **18**, 6 (2018).

10. Mehling, A., Kleber, M. & Hensen, H. Comparative studies on the irritation potential of surfactants. *Food Chem. Toxicol* **45**(5), 747–58 (2007).
11. Leyes Borraro, J. L. *et al.* Efficacy of Chlorhexidine Mouthrinses With and Without Alcohol: A Clinical Study. *J. Periodont.* **73**(3), 317–321 (2002).
12. Golebiowski, M. *et al.* Antimicrobial activity of alcohols from *Musca domestica*. *J. Exp Biol.* **215**, 3419–3428 (2012).
13. Pickering, S. U. Emulsions. *J. Chem. Soc.* **91**, 2001–2021 (1907).
14. Zhang, J., Elder, T. J., Pu, Y. & Ragauskas, A. J. Facile synthesis of spherical cellulose nanoparticles. *Carbohydr Polym.* **69**, 607–611 (2007).
15. Chen, J. F., Ding, H. M., Wang, J. X. & Shao, L. Preparation and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug delivery application. *Biomaterials* **24**(4), 723–727 (2004).
16. Astete, C. E. & Sabilov, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **17**(3), 247–289 (2006).
17. Binks, B. P. Particles as surfactants – similarities and differences. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **7**, 21–41 (2002).
18. Rotello, V. M. *et al.* Nanoparticle-Stabilized Capsules for the Treatment of Bacterial Biofilms. *ACS Nano* **9**(8), 7775–7782 (2015).
19. Lu G.W. & Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery in *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* (ed. Kulkarni, V. S.) 59–94 (Elsevier Inc., 2010).
20. Chen, Y. *et al.* An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications. *Front Pharmacol.* **8**(287), 1–20 (2017).
21. Flemming, H. C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**(9), 623–633 (2010).
22. Breschi, L. *et al.* Hydrophilicity of dentin bonding systems influences *in vitro* *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Dent Mater.* **30**(8), 926–935 (2014).
23. Zhang, T. C. & Bishop, P. L. Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Wat. Res.* **28**(11), 2267–2277 (1994).
24. Ács, K. *et al.* Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement Altern Med* **18**, 227 (2018).
25. Kim, Y.-G., Lee, J.-H., Kim, S.-I., Baek, K.-H. & Lee, J. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *Int J Food Microbiol* **195**, 30–39 (2015).
26. Kim, Y.-G. *et al.* Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep* **36**(1), 363–377 (2016).
27. Kang, J. *et al.* Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food Sci Technol.* **101** (2019)
28. Wang, L. *et al.* Thymol kills bacteria, reduces biofilm formation, and protects mice against a fatal infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain L20. *Vet Microbiol* **203**, 202–210 (2015).
29. Pernodet, N., Maaloum, M. & Tinland, B. Pore size of agarose gels by atomic force microscopy. *Electrophoresis* **18**(1), 55–58 (1997).
30. Lopetinsky, R. J. G., Masliyah, J. H. & Xu, Z. Colloidal particles at liquid interfaces - : Chapter 61.5.: Particle wettability and interfacial position; Cambridge University Press (2006).
31. Horváth, B., Szilárd, P. & Széchenyi, A. Preparation and *in vitro* diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles. *Flavour Fragr. J.* **33**(6), 385–396 (2018).
32. Jaiswal, M., Dudhe, R. & Sharma, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech.* **5**(2), 123–127 (2015).
33. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodispersed silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
34. Jorgensen, J. H. & Turnidge, J. D. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods in *Manual of clinical microbiology* (ed. Jorgensen, J. H.) 1253–1272 (ASM Press, 2015).
35. Ács, K., Bencsik, T., Böszörményi, A. & Kocsis, B. Horváth Gy. Essential oils and their vapors as potential antibacterial agents against respiratory tract pathogens. *Nat Prod Commun.* **11**(11), 1709–1712 (2016).
36. Peeters, E., Nelis, H. J. & Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microliter plates. *J. Microbiol. Meth.* **72**, 157–165 (2008).
37. Vidács, A. *et al.* Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surface. *J. Mol. Liq.* **255**, 257–262 (2018).
38. Kerekes, E. B. *et al.* Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 933–942 (2013).

Acknowledgements

Authors are grateful to Dr. Hajnalka Ábrahám and Prof. Dr. László Seress (University of Pécs, Faculty of Medicine. Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory) for the help and support by the sample analysis with SEM and TEM. Some TEM studies were performed using JEOL-1400 TEM electron microscope that was funded by the grant GINOP-2.3.3-15-2016-0002 (New generation electron microscope: 3D ultrastructure). We would also like to thank Erika Kerekes, PhD (University of Szeged, Faculty of Science and Informatics. Department of Microbiology, Hungary) for her help to acquire the process of biofilm formation and inhibition protocol. The project has been supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund (grant No. EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, grant title: Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs).

Author contributions

A.Sz. Conceived and designed the study and edited the manuscript. B.H. performed synthesis and surface modification of silica nanoparticles, formulation, characterisation and diffusion study of Pickering emulsions, FT-IR, TEM and SEM experiments, she has written the draft of the paper and generated figures and tables. V.L.B have performed the microbiological tests and prepared the samples for SEM. A.V. and B.K. helped with the microbiological experiments. Gy.H. helped with the choice of essential oils and their analysis. A.B. performed the GC analysis. All authors have read and revised the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52998-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Article

Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations

Sourav Das ^{1,4,†}, Barbara Horváth ^{2,†}, Silviya Šafranko ³, Stela Jokić ³, Aleksandar Széchenyi ² and Tamás Kőszegi ^{1,4,*}

¹ Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; pharma.souravdas@gmail.com (S.D.)

² Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; barbara.horvath@aok.pte.hu (B.H.); szechenyi.aleksandar@gytk.pte.hu (A.S.)

³ Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek, Franje Kuhaca 20, 31000 Osijek, Croatia; silviya.safranko@ptfos.hr. (S.Š.); stela.jokic@ptfos.hr (S.J.)

⁴ János Szentágotthai Research Center, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary

* Correspondence: koszegi.tamas@pte.hu; Tel.: +36-72-501-500 (ext. 29249)

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Igor Jerković

Received: 31 October 2019; Accepted: 21 November 2019; Published: 26 November 2019

Abstract: Essential oils (EOs) are highly lipophilic, which makes the measurement of their biological action difficult in an aqueous environment. We formulated a Pickering nanoemulsion of chamomile EO (C_{Pe}). Surface-modified Stöber silica nanoparticles (20 nm) were prepared and used as a stabilizing agent of C_{Pe} . The antimicrobial activity of C_{Pe} was compared with that of emulsion stabilized with Tween 80 (C_{T80}) and ethanolic solution (C_{Et}). The antimicrobial effects were assessed by their minimum inhibitory concentration (MIC_{90}) and minimum effective (MEC_{10}) concentrations. Besides growth inhibition (CFU/mL), the metabolic activity and viability of Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as *Candida* species, in addition to the generation of oxygen free radical species (ROS), were studied. We followed the killing activity of C_{Pe} and analyzed the efficiency of the EO delivery for examined formulations by using unilamellar liposomes as a cellular model. C_{Pe} showed significantly higher antibacterial and antifungal activities than C_{T80} and C_{Et} . Chamomile EOs generated superoxide anion and peroxide related oxidative stress which might be the major mode of action of Ch essential oil. We could also demonstrate that C_{Pe} was the most effective in donation of the active EO components when compared with C_{T80} and C_{Et} . Our data suggest that C_{Pe} formulation is useful in the fight against microbial infections.

Keywords: chamomile essential oil; Pickering emulsion; antimicrobial activity; free radical generation

1. Introduction

Essential oils (EOs) have been widely used in folk medicine throughout the history of humankind. The application of EOs covers a wide range from therapeutic, hygienic, and spiritual to ritualistic purposes. EOs are aromatic, volatile, lipophilic liquids extracted from different parts of plant materials such as barks, buds, flowers, fruits, seeds, and roots [1]. EOs are mixtures of complex compounds with variable individual chemical composition and concentrations that includes primarily terpenoids, like monoterpenes (C₁₀), sesquiterpenes (C₁₅), diterpenes (C₂₀), acids, alcohols, aldehydes, aliphatic hydrocarbons, acyclic esters or lactones, rare nitrogen- and sulfur-containing compounds, coumarin, and homologues of phenylpropanoids [1,2]. The biological effects

of EOs cover a wide range of effects, including antioxidant, antimicrobial, antitumor, anti-inflammatory, and antiviral activity [3].

The increase in demand for the use of aromatherapy as complementary and alternative medicine has led people to believe in the myth that EOs are harmless because they are natural and have been used for a long time [4]. However, there might be several side effects of EOs even if topical administration is applied and, among these, allergic reactions are the most frequent (many EOs can cause, e.g., rashes on the skin). Some of them can be poisonous if absorbed through the skin, breathed, or swallowed. Previous studies also report the interaction of EOs with other drugs [5]. The continuous production of new aroma chemicals and their widespread and uncontrolled usage as alternative therapies together with many carrier diluents have brought serious problems, especially among children. In this regard, it is of utmost importance to study the mode of action of essential oils and to find a proper, unarmful formulation. Another serious problem is the highly lipophilic nature of EOs, which makes it impossible to measure their biological effects in an aqueous environment [1,6,7].

One major characteristic and application of EOs are their strong antimicrobial activity, including antibacterial and antifungal effects without the development of microbial resistance. Numerous studies are found in the literature describing the antimicrobial activities of a large variety of EOs [8–13]. Most of these assays include conventional broth dilution method, disk diffusion method, and bioautography assay to measure the antimicrobial activity of EOs. Efforts have been made to overcome the lipophilic nature of the oils usually by application of EOs diluted in seemingly suitable solvents/detergents. In the case of natural lipophilic volatile compounds like EOs, solvents of varying polarity, e.g., DMSO, ethanol, and methanol, are most commonly used. However, previous studies have reported the antimicrobial effects of the solvents themselves (DMSO, ethanol, and other solvents in various microbial assays) or their influence on the true antimicrobial effects of EOs [14]. The usage of solubilizing agents limits the precise determination of the antimicrobial activities of EOs. Also, a major problem might arise in the classical assays due to the evaporation of EOs during the assay or the inability of the test microbes to reach the lipophilic range of the tested EOs (in bioautography, as an example) [15,16].

Therefore, new formulations have been determined to increase the solubility or to emulsify the EOs in an aqueous environment. These efforts help to stabilize the oils, to produce an even release of the active components into the required environment, and to maintain their antioxidant and antimicrobial activities [6,11,17,18]. Detergents and organic solvents are not welcome in this regard. Attempts have been made to entrap EOs by modified cyclodextrins for the exact determination of their antimicrobial characteristics [19,20].

The application of Pickering nanoemulsion is a quite novel approach to stabilize oil-in-water (O/W) and water-in-oil (W/O) emulsions by solid particles instead of surfactants. The mechanism involves the adsorption of solid particles on the oil–water interface, causing a significant decrease in the interfacial surface tension that results in high emulsion stability [18]. Previous studies have reported decreased evaporation of EOs from O/W emulsion of nanoparticle-stabilized formulations versus EO–surfactant systems to be a beneficial factor [21,22].

Despite the numerous existing studies on EO–Pickering emulsion, we could not find any literature data on chamomile volatile oil–nanoparticle formulation [7,23]. The main aim of the present work is to use Pickering emulsion of chamomile EO stabilized with modified Stöber silica nanoparticles and characterize its antimicrobial effect using Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as *Candida* fungal species. We could demonstrate the strong antimicrobial effects of the chamomile EO–Pickering emulsion and suggest a plausible mode of action of this formulation. Experimental efforts were made to support the suggested mode of action.

2. Results

2.1. Characteristics of Stöber Silica Nanoparticles

The mean diameter, PDI value (polydispersity index), and zeta potential of modified Stöber silica nanoparticles (SNPs) were determined by dynamic light scattering (DLS), and these values were

20 nm, 0.01, and -21.3 mV, respectively. The size and morphology of SNPs were examined by TEM (see Figure 1). The size distribution obtained by DLS was confirmed by TEM, which showed that the mean diameter of silica samples was 20 nm; they are highly monodisperse and have a spherical shape.

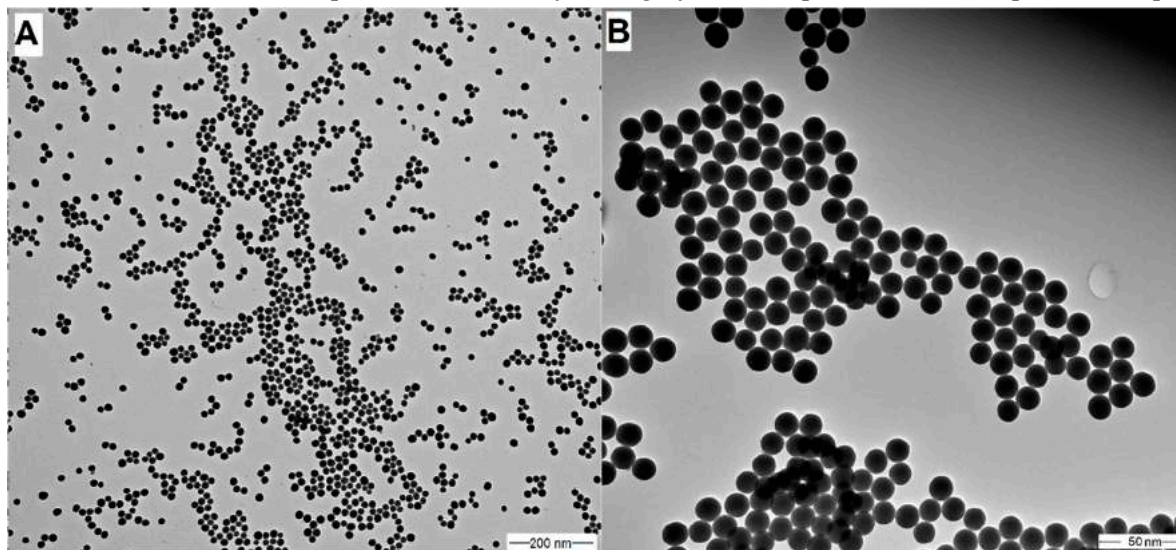


Figure 1. TEM images of silica nanoparticles (SNPs) with different resolutions: 100,000 \times magnification (A) and 500,000 \times magnification (B), accelerating voltage: 80 kV; $d_{\text{TEM}} = 20$ nm. PDI = 0.015.

2.2. Nanoemulsion Stability

We have prepared a Pickering nanoemulsion with surface-modified silica nanoparticles as a stabilizing agent; the particle concentration was 1 mg/mL in every case. The chamomile EO concentration was 100 $\mu\text{g/mL}$. To compare properties of chamomile EO–Pickering nanoemulsion (C_{Pe}) with the conventional, surfactant-stabilized nanoemulsions, and an emulsion with the Tween 80 stabilizing agent was also prepared. The concentration of surfactant was the same as nanoparticles, 1 mg/mL. The emulsions were stored at room temperature (25 $^{\circ}\text{C}$).

We considered the emulsion to be stable when its droplet size does not change and sedimentation, aggregation of particles, or phase separation cannot be observed. The results show that the prepared Pickering emulsion is more stable than conventional emulsion (see Table 1). When the volume fraction of chamomile EO was very low, we assumed that all emulsions were of O/W type and this was confirmed by filter paper tests with CoCl_2 and dye test with Sudan Red G.

Table 1. Parameters of Pickering nanoemulsion and conventional emulsion.

Stabilizing Agent	D_{droplet} (nm)	Stability
SNP	290 ± 4.5	3 months
Tw80	210 ± 10.5	1 month

2.3. Antibacterial and Antifungal Activities (MIC_{90}) of Prepared Emulsions

The effect of chamomile Pickering nanoemulsion, conventional emulsion, and essential oil in ethanol on the growth of some foodborne microbes and opportunistic fungi have been evaluated. The C_{Pe} has been shown to have good antibacterial and antifungal activities (MIC_{90}) on *Escherichia coli* (*E. coli*) (2.19 $\mu\text{g/mL}$), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (1.02 $\mu\text{g/mL}$), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) (1.13 $\mu\text{g/mL}$), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (1.06 $\mu\text{g/mL}$), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) (2.45 $\mu\text{g/mL}$), *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) (1.28 $\mu\text{g/mL}$), *Candida albicans* (*C. albicans*) (2.65 $\mu\text{g/mL}$), and *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) (1.69 $\mu\text{g/mL}$), respectively when compared to C_{T80} counterpart ($P < 0.01$). C_{Pe} showed antimicrobial activity on the selected microbes at an average of fourteen-fold less concentration compared with free essential oil in ethanol (C_{Et}). Simultaneously, C_{Pe} showed a similar

antifungal effect as caspofungin (Cas) on *Candida tropicalis*. The comparative dose–response curves are shown in Figures 2 and 3 for bacteria and fungi, respectively.

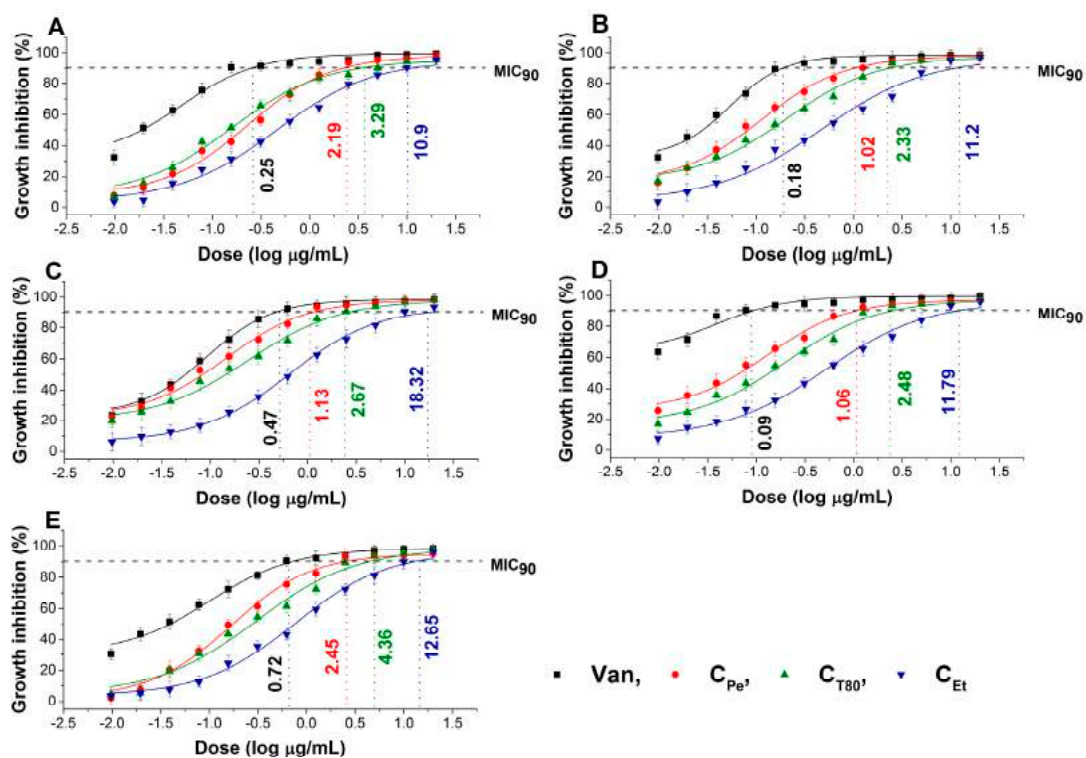


Figure 2. Minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of C_{Pe}, C_{T80}, C_{Et}, and vancomycin (Van, µg/mL) on *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E).

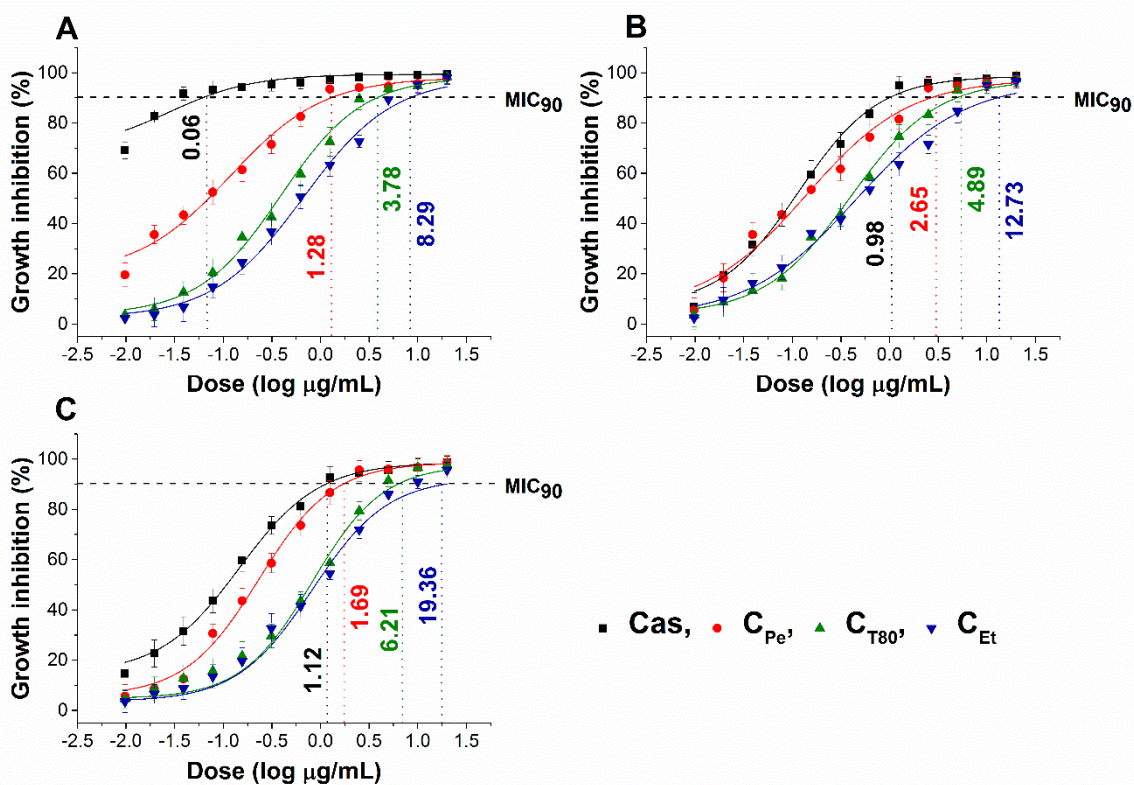


Figure 3. Minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of C_{Pe}, C_{T80}, C_{Et}, and caspofungin (Cas, µg/mL) on *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), and *C. tropicalis* (C).

2.4. Minimum Effective Concentrations (MEC₁₀) for Tested Bacteria and Fungi

The minimum effective concentration (MEC₁₀) of C_{Pe}, C_{T80}, and C_{Et} on foodborne Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as fungi have been determined. The dose–response curve shows a slow killing effect (≤10% of the population) of C_{Pe} after 1 h of treatment at a two-fold higher concentration compared with MIC₉₀ data. The MEC₁₀ also highlights the effective killing effect of C_{Pe} when compared to C_{T80} and C_{Et} (Figures 4 and 5) ($P < 0.01$).

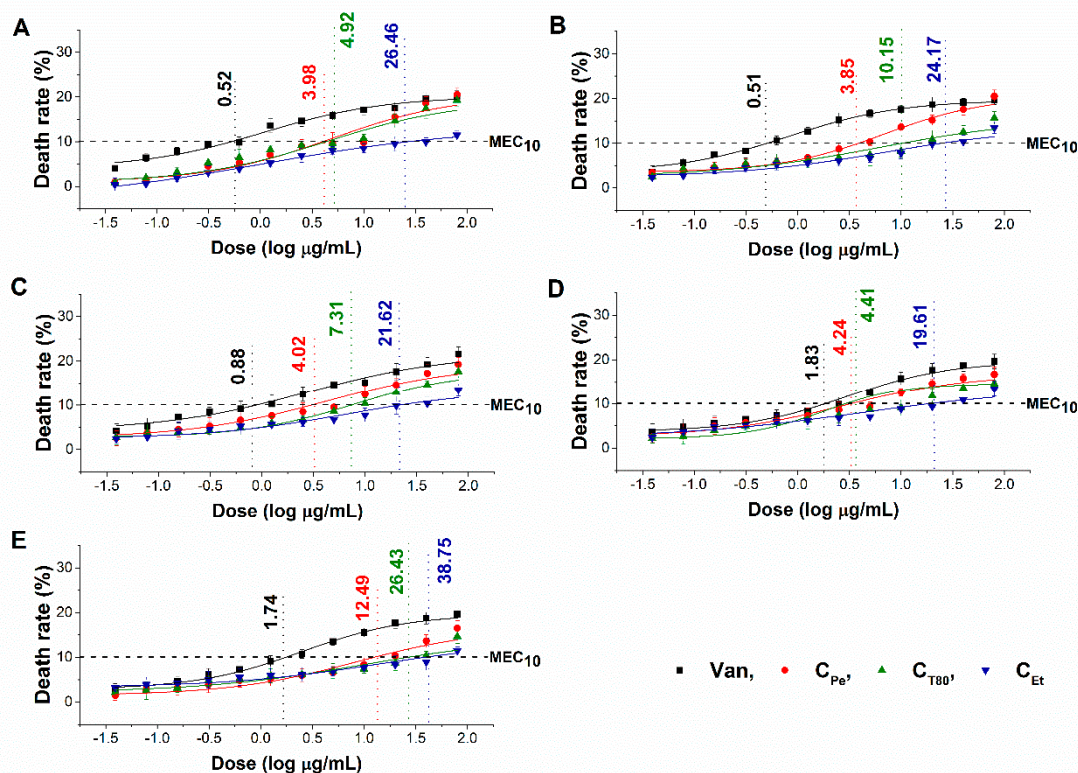


Figure 4. Minimum effective concentration (MEC₁₀) of C_{Pe}, C_{T80}, C_{Et}, and Van (µg/mL) on *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E).

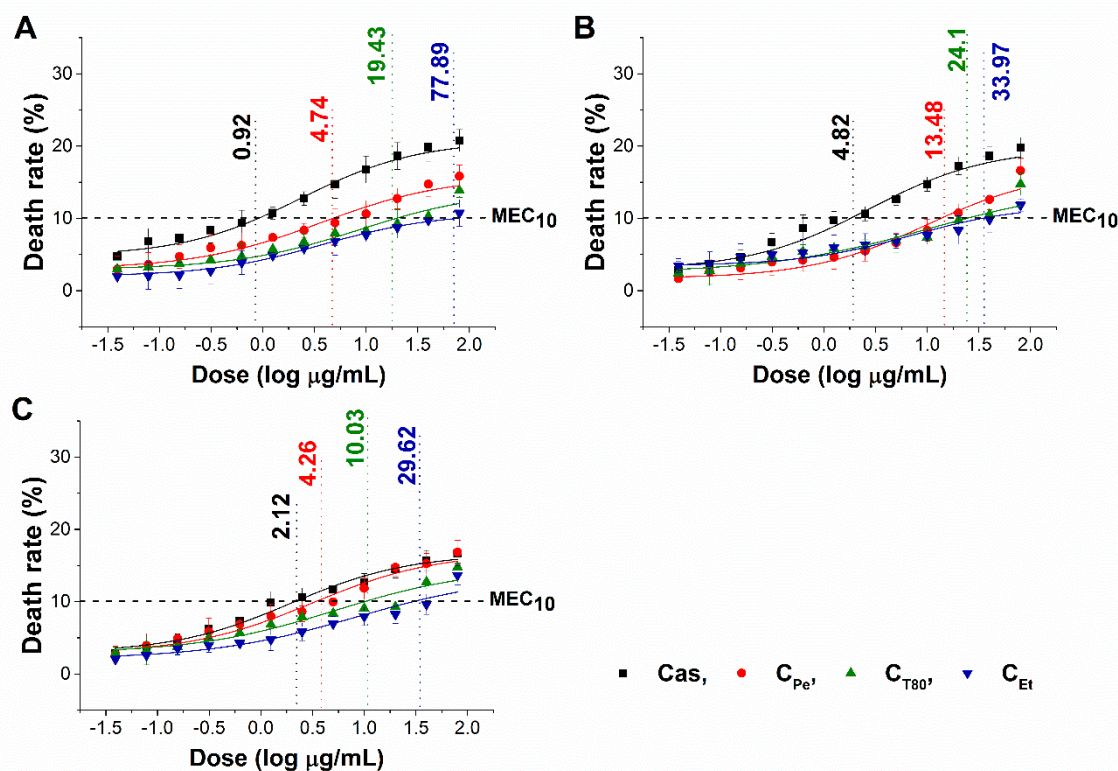


Figure 5. Minimum effective concentration (MEC₁₀) of C_{Pe}, C_{T80}, C_{Et}, and Cas (µg/mL) on *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), and *C. tropicalis* (C).

2.5. Effect on Microbial Oxidative Balance

Reactive oxygen species (ROS) production and accumulation in the cells initiates oxidative stress, leading to cellular structural damage followed by induced apoptosis [6]. We have investigated the relationship between oxidative stress generation after 1 h of treatment and microbial killing activity. The results are demonstrated in Figures 6 and 7 for bacteria and fungi, respectively. Data expressed as % of the control are as follows: the ROS (1085.86 ± 126.36), peroxide (1229.86 ± 164.52) and superoxide (1276.86 ± 165.42) generation were the highest in case of *S. aureus*. The C_{Pe} showed an effective increment of ROS, peroxide, and superoxide generation in both Gram-positive and -negative bacteria when compared to C_{T80} and C_{Et} ($P < 0.01$). C_{Pe} showed increased oxidative stress in both bacteria and fungi at least seven-fold higher than the negative control whereas the positive control (menadione) produced an eight- to nine-fold increase in 1 h. The C_{Et} has generated a two to four-fold increment in oxidative stress which is the lowest among all tested compounds.

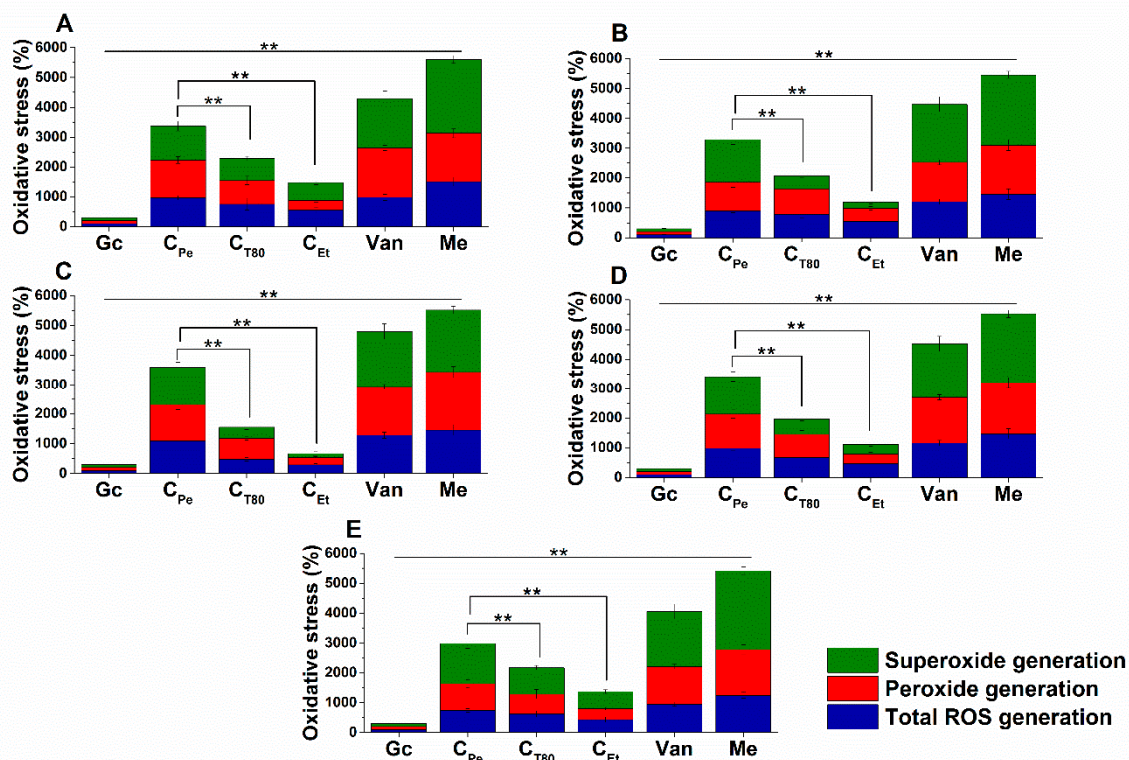


Figure 6. Percentage oxidative stress generation by C_{Pe}, C_{T80}, C_{Et}, and Van on *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E). Six independent experiments, each with 3 replicates, compared with menadione (Me) and growth control (Gc) as controls after 1 h of treatment (** $P < 0.01$).

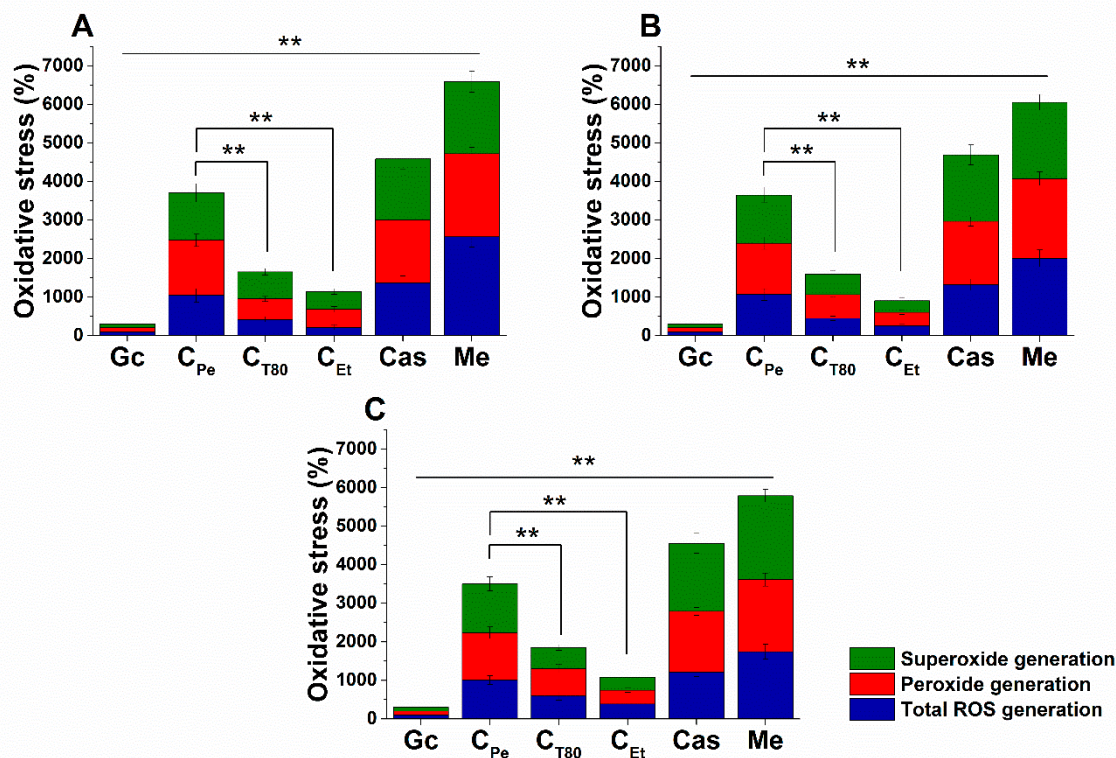


Figure 7. Percentage oxidative stress generation by C_{Pe} , C_{T80} , C_{Et} , and Cas on *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), and *C. tropicalis* (C). Six independent experiments, each with 3 replicates, compared with Me and Gc as positive and growth controls after 1 h of treatment (** $P < 0.01$).

2.6. Time–Kill Kinetics Study

The time–kill kinetics curve was performed to quantify living populations after a definite time interval under different sample MEC_{10} concentrations. A significant reduction (four log-fold) in the cell survivability has been observed in case of C_{Pe} when compared to Gc ($P < 0.01$) (Figures 8 and 9). Fifty percent of cell death occurred by C_{Pe} at 16 and 36 h in the case of bacteria and fungi, and was most effective in reducing living colonies in case of *C. albicans* (1.73 ± 0.15 CFU/mL) after 48 h of treatment. At an average of a two-fold higher concentration, C_{Et} was able to show a killing effect compared to C_{Pe} ($P < 0.01$).

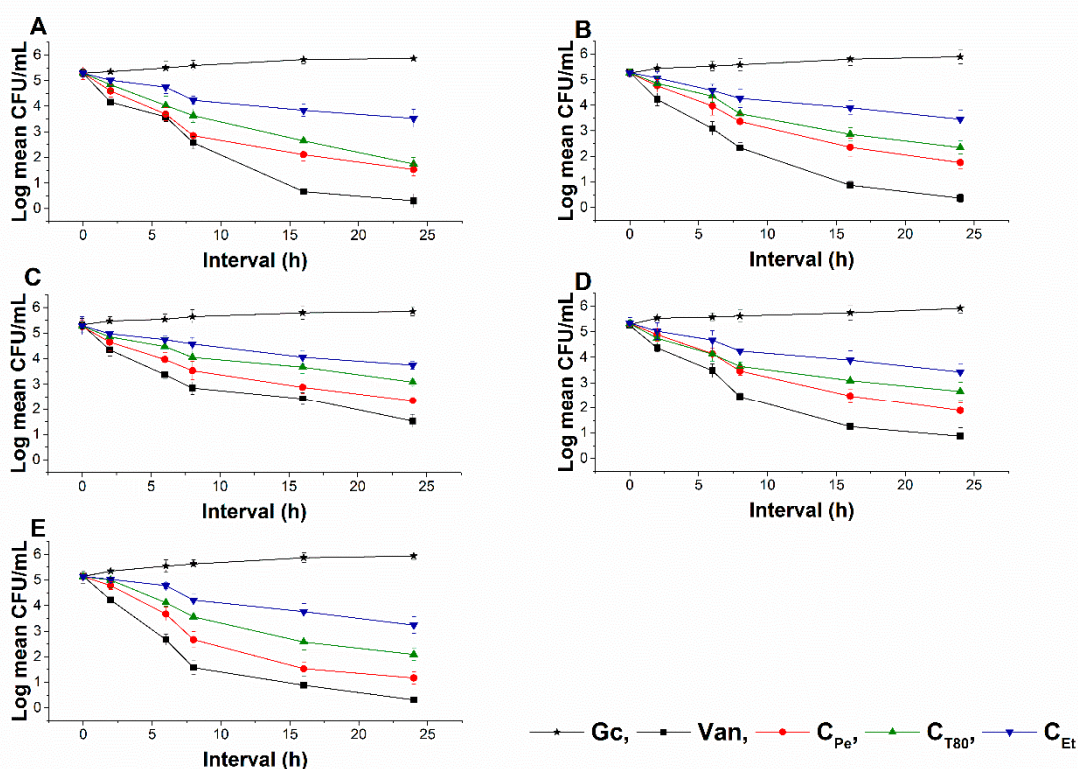


Figure 8. Colony-forming unit (CFU/mL) of C_{Pe} , C_{T80} , and C_{Et} on *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E). Six independent experiments, each with 3 replicates, compared with Van and Gc as positive and growth controls.

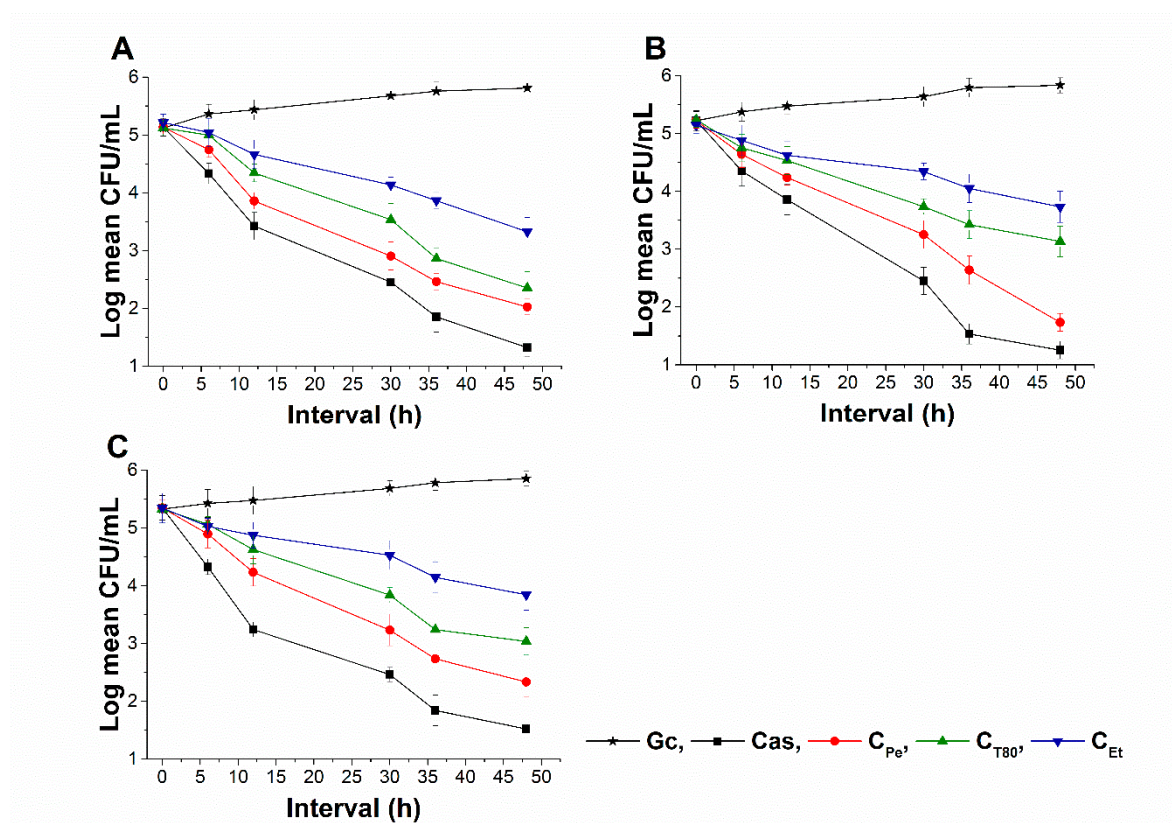


Figure 9. Colony-forming unit (CFU/mL) of C_{Pe}, C_{T80}, and C_{Et} on *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), and *C. tropicalis* (C). Six independent experiments, each with 3 replicates, compared with Cas and Gc as positive and growth controls.

2.7. Live/dead Cell Viability Discrimination

The effect of C_{Pe}, C_{T80}, and C_{Et} on the viability of selected bacteria and fungi were tested (Figures 10 and 11). C_{Pe} decreases the viability of the tested bacteria and fungi with an average viability reduction to $42.36\% \pm 3.74\%$ and $49.62\% \pm 5.25\%$ of mean percentage viability compared to Gc after 16 and 36 h of treatments in bacteria and fungi respectively ($P < 0.01$), whereas C_{T80} and C_{Et} were less effective than C_{Pe} with mean percentage viabilities of $\geq 60\%$ and 70% , respectively.

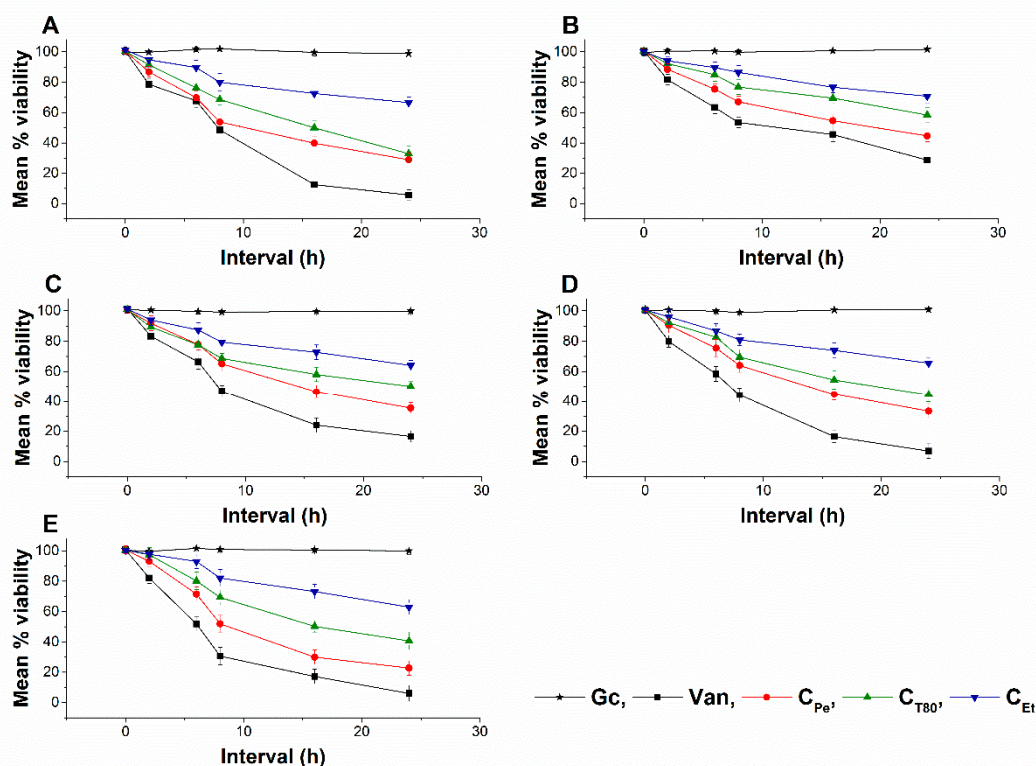


Figure 10. Mean percentage viability of C_{Pe}, C_{T80}, and C_{Et} on *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E). Six independent experiments, each with 3 replicates, compared with Van and Gc as positive and growth controls.

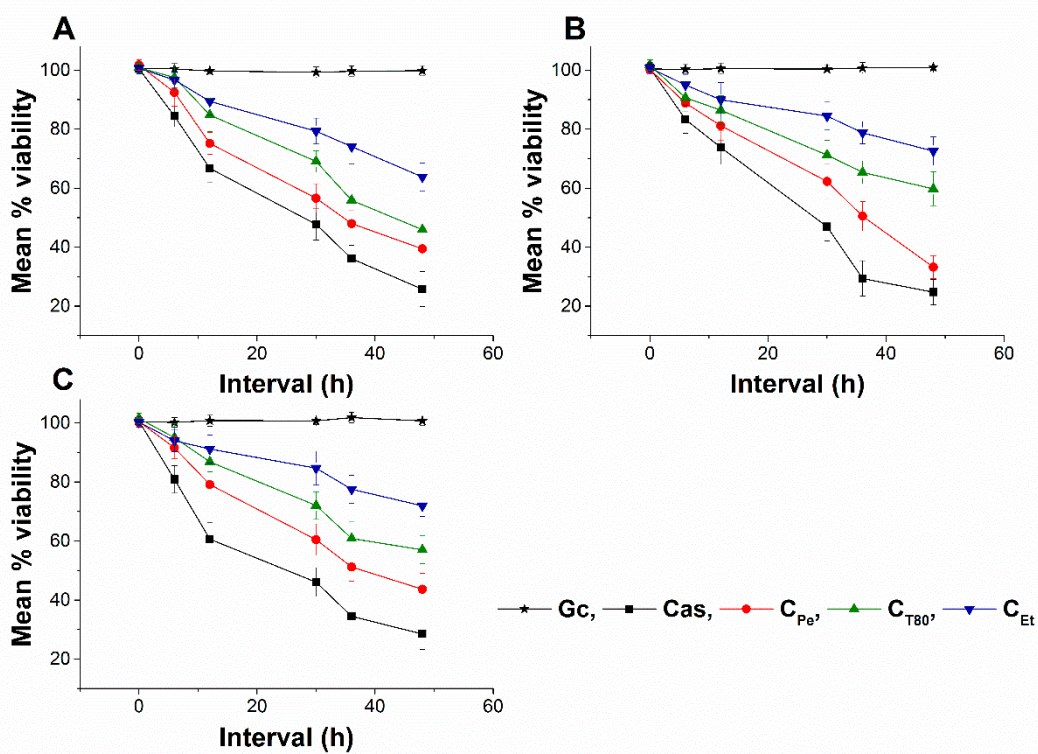


Figure 11. Mean percentage viability of C_{Pe} , C_{T80} , and C_{Et} on *S. pombe* (A), *C. albicans* (B) and *C. tropicalis* (C). Six independent experiments, each with 3 replicates, compared with Cas and Gc as positive and growth controls.

2.8. Interaction Study between Cell Model and Different Formulations of Chamomile EO

The unilamellar liposomes (ULs), consisting of a single phospholipid, can be used as artificial cells or biological membrane model for studying the interactions between cells or cell membranes and drugs or biologically active components [24]. This study was conducted to determine the intracellular delivery ability of active components from chamomile EO for different formulations.

We have studied the interaction of ULs and different forms of chamomile EO for 24 h at 35 °C. After 1 h of interaction, 27.2% of EO have penetrated the liposomes from Pickering nanoemulsion, while conventional emulsion and the ethanolic solution did not provide a measurable amount. The next sampling was after 2 h, where Pickering emulsion has delivered 48.3% of EO, conventional emulsion 0.5%, while the amount of EO delivered by the ethanolic solution was not measurable. Final sampling was after 24 h, with 82.2% of chamomile EO found in the ULs when it was introduced in Pickering nanoemulsion form, and this value was 66.8% for conventional emulsion and 32.5% for the ethanolic solution (see Table 2).

Table 2. Results of the interaction study between unilamellar liposomes (ULs) and different formulations of chamomile EO. PA means the amount in the percentage of penetrated chamomile EO. Standard deviations were calculated from 3 independent experiments.

Formulation	PA _{1h}	PA _{2h}	PA _{24h}
C_{Pe}	27.2 ± 3.7	48.3 ± 5.1	82.2 ± 4.9
C_{T80}	-	0.5 ± 0.1	66.8 ± 3.6
C_{Et}	-	-	35.5 ± 1.0

3. Discussion

The effect of three different formulations on antimicrobial activity of chamomile essential oil has been examined. We have successfully prepared stable Pickering nanoemulsion using silica nanoparticles with appropriate lipophilicity. The emulsion was stable for three months. The effectiveness of Pickering emulsion was compared with conventional emulsion and ethanolic solution.

Based on our antimicrobial activity analyses, C_{Pe} shows higher growth inhibitory action and consequently lower MICs compared to C_{T80} and C_{Et} . Many researchers have studied the antimicrobial activity of chamomile oil [3,7,13,23,25], however, the mechanism of action at subinhibitory concentrations has not previously been studied. Our data suggest an effective killing activity of C_{Pe} on selected bacteria and fungi. It is believed that EOs act against cell cytoplasmic membrane and induce stress in microorganisms [26–29]. To visualize the effects of C_{Pe} , C_{T80} , and C_{Et} , we introduced different staining methods to understand their mechanism. C_{Pe} was able to generate higher oxidative stress compared to the conventional emulsion and ethanolic solution followed by metabolic interference and cell wall disruption and finally caused cell death at subinhibitory concentration [21,30–33].

The results obtained in the model experiment show that C_{Pe} is the most effective form for the intracellular delivery of chamomile EO. Based on these results it can be established that the different antibacterial and antifungal effects may be caused by the difference of adsorption properties of EO forms to the microbial cells. The mechanism of delivery has not been revealed in this study, but evidence for the adsorption of Pickering emulsion droplets on the cell membrane has been previously reported [18]. Assuming the adsorption of C_{Pe} droplets on the cell membrane of investigated microbes, intracellular delivery of active components from EO is feasible in two ways. Passive diffusion is caused by the higher local concentration gradient of EO on the cell membrane, or fusion of C_{Pe} droplets with microbial cells. Overall, our observations demonstrate that C_{Pe} facilitates

chamomile oil to permeate cells, inducing oxidative stress and disrupting the membrane integrity because of higher adsorption efficacy of chamomile EO. SNP acts as a stabilizer, inhibiting the easy escape of EOs from the emulsion system compared to the conventional emulsion and free oils.

4. Materials and Methods

4.1. Synthesis, Surface Modification, and Characterization of Stöber Silica Nanoparticles

We have performed the synthesis of 20 nm hydrophilic silica nanoparticles with the previously reported modified Stöber method [9]. Briefly, a solution of tetraethoxysilane (TEOS) and ultrapure water in ethanol was prepared by using tetraethoxysilane, (Thermo Fisher GmbH, Kandel, Germany, pur. 98%); absolute ethanol AnalaR Normapur $\geq 99.8\%$ purity (VWR Chemicals, Debrecen, Hungary) and water (membraPure Astacus Analytical with UV, VWR Chemicals, Debrecen, Hungary). The solution was stirred for 20 min and sonicated for another 20 min (Bandelin Sonorex RK 52H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany). An appropriate amount of NH_3 solution (28% (*w/w*) ammonium solution, VWR Chemicals, Debrecen, Hungary) was added to the reaction mixture and was stirred at 1000 rpm for 24 h at room temperature (25 °C). The molar ratio of components was water/ethanol/TEOS/ NH_3 = 100:300:5.2:1. The surface of hydrophilic silica nanoparticles was modified with propyltriethoxysilane (PTES Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA, pur. 99%) in a post-synthesis modification reaction [32]. The ethanolic solution of the modifying agent was added to the freshly prepared hydrophilic silica nanoparticle suspensions; the mixtures were stirred for 6 h with 1000 rpm at room temperature. Before further use of the SNPs, the ammonium hydroxide and ethanol were always removed from the reaction mixture by distillation (Heidolph Laborota 4000, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Germany). The water content was supplemented three times. The concentration of silica nanoparticle water-based suspension was finally adjusted to 1 mg/cm³.

The size distribution and zeta potential of silica nanoparticles were determined by dynamic light scattering (DLS) using Malvern Zetasizer NanoS and NanoZ instruments (Malvern Instruments-Malvern Panalytical, Worcester, UK). The morphology and size distribution were also examined with transmission electron microscopy (TEM), (JEOL JEM-1200 EX II and JEM-1400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). The samples were dropped onto 200 mesh copper grids coated with carbon film (EMR Carbon support grids, Micro to Nano Ltd, Haarlem, The Netherlands) from diluted suspensions.

4.2. Preparation and Characterization of Pickering Nanoemulsion

As stabilizing agents, surface-modified silica nanoparticles or Tween 80 surfactant (Polysorbate80, Acros Organics, New Jersey, NJ, USA) were used. The concentration of stabilizing agents and chamomile essential oil (bluish *Matricaria chamomilla* oil, Aromax Ltd., Budapest, Hungary) was kept constant for all experiments, the values were 1 mg/mL and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The first step of the emulsification process was sonication for 2 minutes (Bandelin Sonorex RK 52H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Germany), then emulsification using UltraTurrax (IKA Werke T-25 basic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany) for 5 min at 21,000 rpm. To compare the different formulations, an ethanolic solution was also prepared; chamomile essential oil was added to absolute ethanol at 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration, and the solution was sonicated for 5 min.

The stability of Pickering emulsion was studied from periodical droplet size determination using DLS measurements (Malvern Zetasizer Nano S, Malvern Panalytical Ltd, Worcester, UK).

4.3. Materials for Biological Experiments

In these experiments, the sterile 96-well microtiter plates were from Greiner Bio-One (Kremsmunster, Austria), potassium phosphate monobasic, glucose, adenine, 96% ethanol (Et), peptone, yeast extract, agar-agar, and Mueller Hinton agar were from Reanal Labor (Budapest, Hungary), modified RPMI 1640 (contains 3.4% MOPS, 1.8% glucose, and 0.002% adenine), SYBR green I 10,000 \times , propidium iodide, dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 2',7'-dichlorofluorescein

diacetate (DCFDA), dihydroethidine (DHE) and menadione (Me) were from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany), disodium phosphate and dimethyl sulfoxide (DMSO) were from Chemolab Ltd. (Budapest, Hungary), sodium chloride from VWR Chemicals (Debrecen, Hungary), potassium chloride was from Scharlau Chemie S.A (Barcelona, Spain), 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) was from Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany), caspofungin (Cas) from Merck Sharp & Dohme Ltd (Hertfordshire, UK), vancomycin (Van) from Fresenius Kabi Ltd. (Budapest, Hungary), 0.22 µm vacuum filters from Millipore (Molsheim, France) and the cell spreader was from Sarstedt AG & Co. KG (Numbrecht, Germany). All other chemicals used in the study were of analytical or spectroscopic grade. For fungi, we used an in-house nutrient agar medium [34] while phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) was from Life Technologies Ltd. (Budapest, Hungary). Highly purified water (<1.0 µS) was applied throughout the studies.

4.4. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC₉₀)

4.4.1. Microorganisms

Escherichia coli (*E. coli*) PMC 201, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) PMC 103, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) SZMC 0209, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) SZMC 0119, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) ATCC 38366, *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 1001, and *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) SZMC 1368 were obtained from Szeged Microbial Collection, Department of Microbiology, University of Szeged, Hungary (SZMC) and Department of General and Environmental Microbiology, Institute of Biology, University of Pecs, Hungary (PMC).

4.4.2. Antimicrobial Activity Tests

The antibacterial activity of the tested drugs was separately evaluated on *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, and *S. pyogenes* according to our previously published protocol [35]. In brief, bacterial populations of ~10⁵ CFU/mL were inoculated into RPMI media and incubated for 16 h at 35 ± 2 °C with test compounds (C_{Pe}, C_{T80}, C_{Et}, and Van) over a wide concentration range (0.3–0.01 µg/mL). The absorbance was measured by a Thermo Scientific Multiskan EX 355 plate reader (InterLabsystems, Budapest, Hungary) at 600 nm.

The antifungal activity against *S. pombe*, *C. albicans*, and *C. tropicalis* species were also carried out according to our previously published method [35]. Briefly, ~10³ cells/mL were incubated for 48 h at 30 ± 2 °C with test compounds (C_{Pe}, C_{T80}, C_{Et} and Cas) at wide concentration range (20–0.01 µg/mL) in modified RPMI media. The absorbance was measured by a Thermo Scientific Multiskan EX 355 plate reader (InterLabsystems, Budapest, Hungary) at 595 nm. Absorbance values were converted to percentages compared to growth control (~100%) and data were fitted by nonlinear dose–response curve method to calculate the dose producing ≥90% growth inhibition (MIC₉₀). All the measurements were performed by applying three technical replicates in six independent experiments. Van and Cas were used as a standard antibacterial and antifungal drug, respectively, throughout the experiments.

4.5. Determination of Minimum Effective Concentration (MEC₁₀)

The assay has been designed to determine the killing effects of the test compounds for a certain period of time. In brief, a wide concentration range (0.03–80 µg/mL) of the test samples were used to treat ~10⁶ cells/mL for one hour. One milliliter of treated and untreated samples were taken and were diluted 10⁵ times followed by spreading 50 µL samples onto 20 mL nutrient agar media and incubated for 24 h at 35 °C (bacteria) and 30 °C (fungi) for colony-forming unit (CFU/mL) quantification. The data were compared with growth control and positive control (Van for bacteria and Cas for fungi) for percentage mortality (~10% death) determination. It is noteworthy that in the MEC₁₀ experiments, the inoculated microbial cell number was 10³ times higher than was used in the MIC₉₀ determinations (10⁶ vs. 10³). However, in both cases, the same formula was used (see Section 4.7). All the measurements were performed by applying three technical replicates in six independent experiments.

4.6. Determination of Microbial Oxidative Generation and Killing Activity

4.6.1. Quantification of Total ROS Generation

Total ROS generation was assayed according to previously published protocols [27,28,34,36]. Briefly, $\sim 10^6$ cells/mL were collected and centrifuged at 1500g for 5 min and were suspended in PBS. The cells were stained with a 20 mM stock solution of DCFDA in PBS (pH 7.4) to achieve an end concentration of 25 μ M, and were incubated at 35 °C (for bacteria) and 30 °C (for fungi) for 30 min in the dark with mild shaking. The cells were centrifuged (Hettich Rotina 420R, Auro-Science Consulting Ltd., Budapest, Hungary) and suspended in RPMI media. The cells were treated with C_{Pe} , C_{T80} , C_{Et} , Van (bacteria), and Cas (fungi) at their respective MEC_{10} concentrations for one hour. The fluorescence signals were recorded at Ex/Em = 485/535 nm wavelengths by a Hitachi F-7000 fluorescence spectrophotometer/plate reader (Auro-Science Consulting Ltd., Budapest, Hungary). The percentage increase in oxidative balance was measured by comparing the signals to those of the growth controls (Gc). Six independent experiments were done with three technical replicates for each treatment.

4.6.2. Detection of Peroxide (O_2^{2-}) and Superoxide Anion ($O_2^{\cdot-}$) Generation

The previously described protocol was adapted for peroxide [36,37] and superoxide anion radicals [34,38] with modifications. A positive control, Me (0.5 mmol/L as end concentration), C_{Pe} , C_{T80} , C_{Et} , Van (bacteria), and Cas (fungi) at their respective MEC_{10} concentrations were used to treat the cell suspensions ($\sim 10^6$ cells/mL) for an hour at 35 °C (bacteria) and 30 °C (fungi) in RPMI media. Thereafter, the cells were centrifuged at 1500g for 5 min at room temperature followed by resuspension of pellets in PBS of the same volume. DHR 123 (10 μ mol/L, end concentration) and DHE (15 μ mol/L, end concentration) were added separately to the cell samples for peroxide and superoxide determination. The stained cells were further incubated at 35 °C (bacteria) and 30 °C (fungi) in the dark with mild shaking. The samples were centrifuged and resuspended in PBS followed by the distribution of the samples into the wells of 96-well microplates. The fluorescence was measured at excitation/emission wavelengths of 500/536 nm for peroxides and 473/521 nm for superoxide detection by a Hitachi F-7000 fluorescence spectrophotometer/plate reader (Auro-Science Consulting Ltd., Budapest, Hungary). The percentage increase in oxidative stress was measured by comparing the signals to those of the growth controls (Gc). Six independent experiments were done with three technical replicates for each treatment.

4.6.3. Time–Kill Kinetics Assay

We followed a protocol previously published by T. Appiah et. al., with modifications [39]. In brief, C_{Pe} , C_{T80} , C_{Et} , Van (bacteria), and Cas (fungi) at their respective MEC_{10} concentrations were used to treat the microbial population of $\sim 10^6$ CFU/mL and were incubated at 35 °C (bacteria) and 30 °C (fungi). One milliliter of the treated and untreated samples was pipetted at time intervals of 0, 2, 6, 8, 16, and 24 h for bacteria, and 0, 6, 12, 30, 36, and 48 h for fungi, and were diluted 10^5 times followed by spreading 50 μ L onto 20 mL nutrient agar media using a cell spreader and incubated at 35 °C (bacteria) and 30 °C (fungi) for 24 h. Van and Cas were used as reference controls for bacteria and fungi. Control without treatment was considered as growth control (Gc). The colony-forming unit (CFU/mL) of the microorganisms were determined, performed in triplicate and was plotted against time (h). Six independent experiments were done with three technical replicates for each treatment.

4.6.4. Live/dead Discrimination of Microbial Cells

For live/dead cell discrimination, we followed the protocol published previously [35]. In brief, the cell population of $\sim 10^6$ cells/mL were treated with C_{Pe} , C_{T80} , C_{Et} , Van (bacteria), and Cas (fungi) at their respective MEC_{10} concentrations and were incubated at 35 °C (bacteria) and 30 °C (fungi). Treated and untreated samples were pipetted at time intervals of 0, 2, 6, 8, 16, and 24 h for bacteria, and 0, 6, 12, 30, 36 and 48 h for fungi followed by centrifugation at 1000g for 5 min, washed, and resuspended in PBS (100 μ L/well). One hundred microliters of freshly prepared working dye solution in PBS (using 20 μ L SYBR green I and 4 μ L propidium iodide diluted solutions as described earlier)

were added to the samples. The plate was incubated at room temperature for 15 min in the dark with mild shaking. A Hitachi F-7000 fluorescence spectrophotometer/plate reader (Auro-Science, Consulting Ltd., Budapest, Hungary) was used to measure the fluorescence intensities of SYBR green I (excitation/emission wavelengths: 490/525 nm) and propidium iodide (excitation/emission wavelengths: 530/620 nm), respectively. A green to red fluorescence ratio for each sample and for each dose was achieved and the % of dead cells with the response to the applied dose was plotted against the applied test compound doses using a previously published formula [35]. All treatments were done in triplicates and six independent experiments were performed.

4.7. Statistical Analysis of Microbiological Experiments

All data were given as mean \pm SD. Graphs and statistical analyses were conducted using OriginPro 2016 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA). All experiments were performed independently six times and data were analyzed by one-way ANOVA test. $P < 0.01$ was considered statistically significant. The growth inhibition concentration (MIC_{90}) and minimum effective concentration (MEC_{10}) were calculated using a nonlinear dose–response sigmoidal curve function as follows:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log_{10} 0 - x)p}}$$

where A_1 , A_2 , $\log_{10} 0$ and p as the bottom asymptote, top asymptote, center, and hill slope of the curve have been considered.

4.8. Interaction Study between the Cell Model (Unilamellar Liposomes) and Different Formulations of Chamomile EO

Unilamellar liposomes (ULs) have been prepared from phosphatidylcholine (Phospholipon 90G, Phospholipid GmbH, Berlin, Germany) by the modified method described before by Alexander Moscho et al. [40]. Phosphatidylcholine was dissolved in chloroform ($\geq 98\%$ stabilized, VWR Chemicals, Debrecen, Hungary) in 0.1 M concentration, and 150 μ L of this solution was diluted in a mixture of 6 mL chloroform and 1 mL of methanol. This solution was added dropwise to 40 mL of PBS buffer while stirring on a magnetic stirrer at 600 rpm (VELP Scientifica Microstirrer, Magnetic Stirrer, Usmate Velate MB, Italy). The solvents were removed on a rotational evaporator at 40 °C (Heidolph Laborota 4000, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Germany). The resulting suspension volume was set to 25 mL with PBS buffer and stored in the refrigerator at 8 °C until further use. A 5 mL suspension of ULs was mixed with 3 mL Pickering nanoemulsion, conventional emulsion, or ethanolic solution, and the chamomile EO concentration was 100 μ g/mL for the different formulations. The mixture was stirred at 600 rpm for 24 h at 35 °C, and 1 mL aliquots were taken after 1, 2, and 24 h. The samples were centrifuged at 3000 rpm and 20 °C for 5 min, and the ULs were collected and dissolved in absolute ethanol. The chamomile–EO content of samples was determined with UV/VIS Spectroscopy at 290 nm (Jasco V-550 UV/VIS Spectrophotometer; Jasco Inc., Easton, MD, USA). For UV/VIS measurements we have prepared samples without chamomile–EOs, i.e., ULs with SNP suspension, Tween 80 solution, or ethanol were also mixed and centrifuged and were used as blanks.

4.9. GC-MS Analysis of Chamomile EO

Gas chromatography and mass spectrometry (GC–MS) analyses were carried out on an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) gas chromatograph model 7890A with 5975C mass detector. Operating conditions were as follows: column HP-5MS (5% phenylmethyl polysiloxane), 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m coating thickness. Helium was used as the carrier gas at 1 mL/min, injector temperature was 250 °C. HP-5MS column temperature was programmed at 70 °C isothermal for 2 min, and then increased to 200 °C at a rate of 3 °C/min and held isothermal for 18 min. The split ratio was 1:50, ionization voltage 70 eV; ion source temperature 230 °C; mass scan range: 45–450 mass

units. The percentage composition was calculated from the GC peak areas using the normalization method (without correction factors). The component percentages were calculated as mean values from duplicate GC–MS analyses of the oil sample. The results of GC–MS analysis can be seen in Supplementary Material.

Supplementary Materials: The followings are available online: Composition of chamomile essential oil analyzed by GC-MS method. Results can be seen in Supplementary Table S1 and Figure S1).

Author Contributions: Conceptualization T.K., and A.S.; methodology S.D., B.H., T.K. and A.S.; software, S.D.; formal analysis, S.D. and B.H.; investigation, S.D. and B.H.; GC analysis S.Š. and S.J. resources, A.S.; data curation, S.D., B.H.; writing—original draft preparation, S.D. and B.H.; writing—review and editing, T.K. and A.S.; visualization, S.D. and B.H.; supervision, T.K. and A.S.; funding acquisition A.S. and T.K.

Funding: This work was supported by EFOP 3.6.1-16-2016-00004 project (Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs), University of Pécs, Medical School, KA-2018-17 and NKFI-EPR K/115394/2015 grants.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Manion, C.R.; Widder, R.M. Essentials of essential oils. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2017**, *74*, e153–e162.
2. Omonijo, F.A.; Ni, L.; Gong, J.; Wang, Q.; Lahaye, L.; Yang, C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim. Nutr.* **2018**, *4*, 126–136.
3. McKay, D.L.; Blumberg, J.B. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 519–530.
4. Lis-Balchin, M. *Aromatherapy science: A guide for healthcare professionals*; Pharmaceutical Press: London, 2006; ISBN 978-0-85369-578-3.
5. Pfaller, M.A.; Sheehan, D.J.; Rex, J.H. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 268–280.
6. Donsì, F.; Ferrari, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J. Biotechnol.* **2016**, *233*, 106–120.
7. Singh, O.; Khanam, Z.; Misra, N.; Srivastava, M. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacogn. Rev.* **2011**, *5*, 82.
8. Alizadeh Behbahani, B.; Tabatabaei Yazdi, F.; Vasiee, A.; Mortazavi, S.A. *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microb. Pathog.* **2018**, *114*, 449–452.
9. Balázs, V.L.; Horváth, B.; Kerekes, E.; Ács, K.; Kocsis, B.; Varga, A.; Böszörményi, A.; Nagy, D.U.; Krisch, J.; Széchenyi, A.; et al. Anti-Haemophilus Activity of Selected Essential Oils Detected by TLC-Direct Bioautography and Biofilm Inhibition. *Molecules* **2019**, *24*, 3301.
10. Ćavar, S.; Maksimović, M.; Vidic, D.; Parić, A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Ind. Crop. Prod.* **2012**, *37*, 479–485.
11. Fasihi, H.; Noshirvani, N.; Hashemi, M.; Fazilati, M.; Salavati, H.; Coma, V. Antioxidant and antimicrobial properties of carbohydrate-based films enriched with cinnamon essential oil by Pickering emulsion method. *Food Packag. Shelf Life* **2019**, *19*, 147–154.
12. Tang, X.; Shao, Y.-L.; Tang, Y.-J.; Zhou, W.-W. Antifungal Activity of Essential Oil Compounds (Geraniol and Citral) and Inhibitory Mechanisms on Grain Pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). *Molecules* **2018**, *23*, 2108.
13. Stanojevic, L.P.; Marjanovic-Balaban, Z.R.; Kalaba, V.D.; Stanojevic, J.S.; Cvetkovic, D.J. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chamomile Flowers Essential Oil (*Matricaria chamomilla* L.). *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2016**, *19*, 2017–2028.
14. Alastruey-Izquierdo, A.; Gomez-Lopez, A.; Arendrup, M.C.; Lass-Flörl, C.; Hope, W.W.; Perlin, D.S.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M. Comparison of Dimethyl Sulfoxide and Water as Solvents for Echinocandin Susceptibility Testing by the EUCAST Methodology. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2509–2512.
15. Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Uchida, K.; Yamaguchi, H. Effect of Sealing and Tween 80 on the Antifungal Susceptibility Testing of Essential Oils. *Microbiol. Immunol.* **2001**, *45*, 201–208.

16. Thielmann, J.; Muranyi, P.; Kazman, P. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon* **2019**, *5*, e01860.
17. Pina-Barrera, A.M.; Alvarez-Roman, R.; Baez-Gonzalez, J.G.; Amaya-Guerra, C.A.; Rivas-Morales, C.; Gallardo-Rivera, C.T.; Galindo-Rodriguez, S.A. Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). *IEEE Trans. NanoBiosci.* **2019**, 549–557.
18. Zhou, Y.; Sun, S.; Bei, W.; Zahi, M.R.; Yuan, Q.; Liang, H. Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *112*, 7–13.
19. Abarca, R.L.; Rodríguez, F.J.; Guarda, A.; Galotto, M.J.; Bruna, J.E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chem.* **2016**, *196*, 968–975.
20. Ciobanu, A.; Landy, D.; Fourmentin, S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food Res. Int.* **2013**, *53*, 110–114.
21. Cossu, A.; Wang, M.S.; Chaudhari, A.; Nitin, N. Antifungal activity against *Candida albicans* of starch Pickering emulsion with thymol or amphotericin B in suspension and calcium alginate films. *Int. J. Pharm.* **2015**, *493*, 233–242.
22. Wang, J.; Li, Y.; Gao, Y.; Xie, Z.; Zhou, M.; He, Y.; Wu, H.; Zhou, W.; Dong, X.; Yang, Z.; et al. Cinnamon oil-loaded composite emulsion hydrogels with antibacterial activity prepared using concentrated emulsion templates. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *112*, 281–289.
23. Srivastava, J.K.; Shankar, E.; Gupta, S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Mol Med Report* **2010**, *3*, 895–901.
24. Rideau, E.; Dimova, R.; Schwille, P.; Wurm, F.R.; Landfester, K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 8572–8610.
25. Göger, G.; Demirci, B.; Ilgin, S.; Demirci, F. Antimicrobial and toxicity profiles evaluation of the Chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil combination with standard antimicrobial agents. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *120*, 279–285.
26. Memar, M.Y.; Ghotaslou, R.; Samiei, M.; Adibkia, K. Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: Current insights. *Infect Drug Resist* **2018**, *11*, 567–576.
27. Eruslanov, E.; Kusmartsev, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*; Armstrong, D., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2010; Vol. 594, pp. 57–72 ISBN 978-1-60761-410-4.
28. Dong, T.G.; Dong, S.; Catalano, C.; Moore, R.; Liang, X.; Mekalanos, J.J. Generation of reactive oxygen species by lethal attacks from competing microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 2181–2186.
29. Máté, G.; Gazdag, Z.; Mike, N.; Papp, G.; Pócsi, I.; Pesti, M. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicon* **2014**, *90*, 155–166.
30. Dohare, S.; Dubey, S.D.; Kalia, M.; Verma, P.; Pandey, H.; Singh, K.; Agarwal, V. Anti-biofilm activity of *Eucalyptus globulus* oil encapsulated silica nanoparticles against *E. coli* biofilm. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2014**, *5*, 5013–5018.
31. Saad, N.Y.; Muller, C.D.; Lobstein, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components: Essential oils and their bioactive components. *Flavour Fragr. J.* **2013**, *28*, 269–279.
32. Horváth, B.; Balázs, V.L.; Horváth, G.; Széchenyi, A. Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles for *Streptococcus mutans* biofilm inhibition. *Flavour Fragr. J.* **2018**, *33*, 385–396.
33. Bravo Cadena, M.; Preston, G.M.; Van der Hoorn, R.A.L.; Townley, H.E.; Thompson, I.P. Species-specific antimicrobial activity of essential oils and enhancement by encapsulation in mesoporous silica nanoparticles. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *122*, 582–590.
34. Fujs, S.; Gazdag, Z.; Poljsak, B.; Stibilj, V.; Milacic, R.; Pesti, M.; Raspor, P.; Batic, M. The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. *J. Basic Microbiol.* **2005**, *45*, 125–135.
35. Das, S.; Gazdag, Z.; Szente, L.; Meggyes, M.; Horváth, G.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Kuzma, M.; Kószegei, T. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin—captured essential oils. *Food Chem.* **2019**, *278*, 305–313.
36. Stromájer-Rácz, T.; Gazdag, Z.; Belágyi, J.; Vágvölgyi, C.; Zhao, R.Y.; Pesti, M. Oxidative stress induced by HIV-1 F34IVpr in *Schizosaccharomyces pombe* is one of its multiple functions. *Exp. Mol. Pathol.* **2010**, *88*, 38–44.

37. Gazdag, Z.; Máté, G.; Čertík, M.; Türmer, K.; Virág, E.; Pócsi, I.; Pesti, M. *tert*-Butyl hydroperoxide-induced differing plasma membrane and oxidative stress processes in yeast strains BY4741 and *erg5* Δ : *t*-BuOOH-induced cytotoxic processes in yeast. *J. Basic Microbiol.* **2014**, *54*, S50–S62.
38. Henderson, L.M.; Chappell, J.B. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 973–980.
39. Appiah, T.; Boakye, Y.D.; Agyare, C. Antimicrobial Activities and Time-Kill Kinetics of Extracts of Selected Ghanaian Mushrooms. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2017**, *2017*, 1–15.
40. Moscho, A.; Orwar, O.; Chiu, D.T.; Modi, B.P.; Zare, R.N. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 11443–11447.

Sample Availability: Samples of the compounds chamomile EO and SNPs are available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Antimicrobial Activity of Different *Artemisia* Essential Oil Formulations

Sourav Das ^{1,2,†}, Barbara Vörös-Horváth ^{3,†}, Tímea Bencsik ⁴, Giuseppe Micalizzi ⁵,
Luigi Mondello ^{5,6,7}, Györgyi Horváth ⁴, Tamás Kőszegi ^{1,2,*} and Aleksandar Széchenyi ^{3,*}

¹ Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Medical School, Ifjúság u. 13., 7624 Pécs, Hungary; pharma.souravdas@gmail.com

² János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság u. 20., 7624 Pécs, Hungary

³ Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Rókus u. 2., 7624 Pécs, Hungary; barbara.horvath@aok.pte.hu

⁴ Department of Pharmacognosy, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Rókus u. 2., 7624 Pécs, Hungary; timea.bencsik@aok.pte.hu (T.B.); horvath.gyorgyi@gytk.pte.hu (G.H.)

⁵ Chromaleont s.r.l., c/o Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, 98168 Messina, Italy; giuseppe.micalizzi@chromaleont.it (G.M.); lmondello@unime.it (L.M.)

⁶ Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, 98168 Messina, Italy

⁷ Unit of Food Science and Nutrition, Department of Medicine, University Campus Bio-Medico of Rome, 00128 Rome, Italy

* Correspondence: koszegi.tamas@pte.hu (T.K.); szechenyi.aleksandar@gytk.pte.hu (A.S.); Tel.: +36-30-4917719 (T.K.); +36-70-3814462 (A.S.)

† First authors with equal contribution.

Academic Editor: Daniela Rigano

Received: 17 April 2020; Accepted: 20 May 2020; Published: 21 May 2020



Abstract: The extreme lipophilicity of essential oils (EOs) impedes the measurement of their biological actions in an aqueous environment. We formulated oil in water type Pickering *Artemisia annua* EO nanoemulsions (AEP) with surface-modified Stöber silica nanoparticles (20 nm) as the stabilizing agent. The antimicrobial activity of AEP and its effects on mature *Candida* biofilms were compared with those of Tween 80 stabilized emulsion (AET) and ethanolic solution (AEE) of the *Artemisia* EO. The antimicrobial activity was evaluated by using the minimum inhibitory concentrations (MIC₉₀) and minimum effective concentrations (MEC₁₀) of the compounds. On planktonic bacterial and fungal cells beside growth inhibition, colony formation (CFU/mL), metabolic activity, viability, intracellular ATP/total protein (ATP/TP), along with reactive oxygen species (ROS) were also studied. *Artemisia annua* EO nanoemulsion (AEP) showed significantly higher antimicrobial activity than AET and AEE. *Artemisia annua* EO nanoemulsions (AEP) generated superoxide anion and peroxides-related oxidative stress, which might be the underlying mode of action of the *Artemisia* EO. Unilamellar liposomes, as a cellular model, were used to examine the delivery efficacy of the EO of our tested formulations. We could demonstrate higher effectiveness of AEP in the EO components' donation compared to AET and AEE. Our data suggest the superiority of the AEP formulation against microbial infections.

Keywords: *Artemisia* essential oil; Pickering emulsion; oxidative stress; mature biofilm; antimicrobial activity

1. Introduction

Artemisia annua L. (Sweet Wormwood, Sweet Annie, Sweet Sagewort, Annual Wormwood, or Qinghaosu) is a very important member of the Asteraceae family, and is widely distributed

throughout Asia, South Africa, Europe and North America [1–3]. The use of this plant for the treatment of malaria has been recorded before 168 BC in Chinese traditional medicine [2–5]. Discovery of the artemisinin, a sesquiterpene with the antimalarial property made this plant to have potential commercial importance [4–7]. The search for other active components has led to the discovery of many phytochemicals including, monoterpenoids, sesquiterpenoids, flavonoids and coumarins, and aliphatic and lipid compounds [6,8]. Apart from its antimalarial activity, the plant has shown anti-tumor, anti-inflammatory, antipyretic, antimicrobial, antiparasitic, antiulcerogenic, and cytotoxic activities [2–10]. Several studies on the chemical composition of the *Artemisia annua* L. essential oil (AE) have been performed, and active components like camphor, artemisia ketone, germacrene D, and 1,8-cineole have been found [11,12]. Variability in the chemical composition of AE depending on the geographical origin and plant's development stages has led to considerable research interests in the investigation of biological properties of AE [3,6].

With the increasing demand for the AE in aromatherapy as complementary and as alternative medicine, people believe in the myth that it is harmless; therefore, it has been used for a long time [1]. Previous studies have reported many drug–drug interactions in essential oils [4,13,14]. Several side effects of essential oils, which include allergic reactions, may occur if administered topically. Furthermore, some essential oils can be poisonous if absorbed through the skin, breathed, or swallowed. Uncontrolled widespread usage and continuous production of essential oils as alternative therapy along with carrier diluents have created severe problems, especially among children [13,15–17]. Additionally, the highly lipophilic nature of the essential oils makes it difficult to examine their biological properties in aqueous environments [18,19]. Therefore, it is highly important to perform research on the formulations for EOs' usage, to determine the exact mode of their action, with such knowledge we can suggest appropriate formulation, and avoid the danger of misuse of EOs.

The antimicrobial effectiveness is often described in terms of minimum inhibitory concentration (MIC). Conventional broth dilution techniques and disc diffusion data have provided numerous antimicrobial activities of the AE. However, the diffusion assay is not suitable for essential oil testing, as the components are partitioned through the agar because of their low affinity to water [20,21]. Furthermore, the ability to compare data from the broth and agar dilution methods are limited due to the wide spectrum of test methodologies and selection criteria for end-point determinations [16,22,23]. Several techniques have been used to overcome the lipophilicity of the AE, by the application of suitable solvents such as ethanol, methanol, and dimethyl-sulfoxide (DMSO) or surfactants like Tween 80 (Polyoxyethylene (80) sorbitan monooleate) and Tween 20 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate) [21,24,25]. However, previous studies have repeatedly reported that usage of the solvents/surfactants in various microbiological experiments may contribute to changes in the physicochemical properties of the testing microenvironment, leading to enhancement or reduction of the antimicrobial properties [26–28]. Furthermore, the evaporation of the essential oils during the assay or the inability of the active components to reach the test microbes might cause some misleading results [29,30].

Thus, novel formulations have been used to enhance the solubility or to emulsify the essential oils in the aqueous environment, resulting in sustained release of the active components in the testing system [29]. The suitability of the organic solvents/surfactants has been questioned, and therefore they are not welcomed in this regard. Efforts to entrap the essential oils by modified cyclodextrins and silica nanoparticles have been made for the precise characterization of the antimicrobial properties [24,31,32].

Approaches to stabilizing the oil-in-water (O/W) and water-in-oil (W/O) emulsions, by the application of solid particles instead of surfactants as stabilizing agents, is novel in the field of essential oil research. The fundamental mechanism involves the adsorption of the solid particles on the oil-water interface, resulting in a significant decrement of the interfacial tension, causing high emulsion stability [21,33]. Decreased evaporation of the essential oils from the nanoparticle-stabilized O/W emulsion formulations, when compared to essential oil-surfactant systems, has been reported

previously [34,35]. By application of inert and biocompatible particles instead of surfactants, the irritative and toxic effect of surfactants can be avoided [36].

Even though numerous studies have been performed on the essential oil–Pickering emulsion, literature data on AE (obtained from *Artemisia annua* L. cultivated in Hungary)–nanoparticle formulations related to their application as antimicrobial and anti-biofilm agents are not found [1,3,6,11,14,19]. The primary aim of our present study is to formulate the Pickering nanoemulsion of AE stabilized with surface-modified spherical silica nanoparticles (AEP) and characterize its antimicrobial activity on Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi as well as its effects on mature *Candida* species' biofilms. We could also demonstrate an effective biofilm-related microbial cytotoxicity and antimicrobial activity of the AEP on planktonic cells and suggest a plausible mode of action of this formulation. Efforts were made in the experiments to support the proposed mode of action.

2. Results

2.1. Artemisia Essential Oil and Its Components

The amount of the essential oil obtained by steam distillation was 3% *w/w* of plant powder. Our gas chromatography–mass spectrometry/flame ionization detection (GC-MS/FID) analyses (Table S1 and Figures S1–S6) has documented β -pinene (1.25%), artemisia ketone (4.43%), yomogi alcohol (1.29%), artemisia alcohol (1.68%), (E)-pinocarveol (7.55%), pinocarvone (3.22%), camphor (7.06%), terpinen-4-ol (1.75%), α -copaene (2.75%), caryophyllene (5.26%), β -farnesene (4.8%), β -selinene (12.27%), spathulenol (1.75%), caryophyllene oxide (8.64%), eudesma-4(15),11-dien-5-ol (1.06%) and mustakone (1.27%) as the major components of the essential oil of *Artemisia annua* L. essential oil, that has been used throughout the experiments.

2.2. Preparation and Stability Studies of O/W Type Pickering Nanoemulsions

We found that AEPs and AETs have the same stability. The droplet size of the prepared emulsions increased when the concentration of AE has been raised (Table 1). Since the volume fraction of AE is very low (0.004 or less), we can be sure that the Pickering emulsion is o/w type, as it has been proven before [37].

Table 1. Stability parameters and droplet sizes of Pickering nanoemulsion and conventional emulsion.

Stabilizing Agent	c_{oil} (mg/mL)	$D_{droplet}$ (nm) \pm SD	Stability
SNP	0.2–3.5	160 ± 2.2 – 670 ± 37.2	2–3 months
Tw80	0.2–3.5	130 ± 0.9 – 590 ± 19.6	2–3 months

2.3. In Vitro Diffusion Study of Artemisia EO (AE) Formulations

We assumed that the different formulations of AE have different diffusion properties, which could cause different activities in biofilm treatment. To confirm this assumption, in vitro diffusion studies were performed with an ethanolic solution of AE (AEE), in addition to AET and AEP. The concentration of AE was the same for all three formulations, and the droplet sizes of AEP and AET were similar, 160 ± 2.2 and 130 ± 0.9 nm, respectively to avoid the droplet size exclusion effect (Figure 1).

The diffusion profiles were very similar in each case. Still, it can be seen that the cumulative amounts (CA) of AE were the highest in the case of AEP in both experimental circumstances. These were 28.71% at bacterial and 32.30% at fungal experimental temperatures, where AET samples showed lower values, 19.36%, and 30.43%, respectively, while for AEE only 17.60% and 22.82% of AE diffused after 24 h.

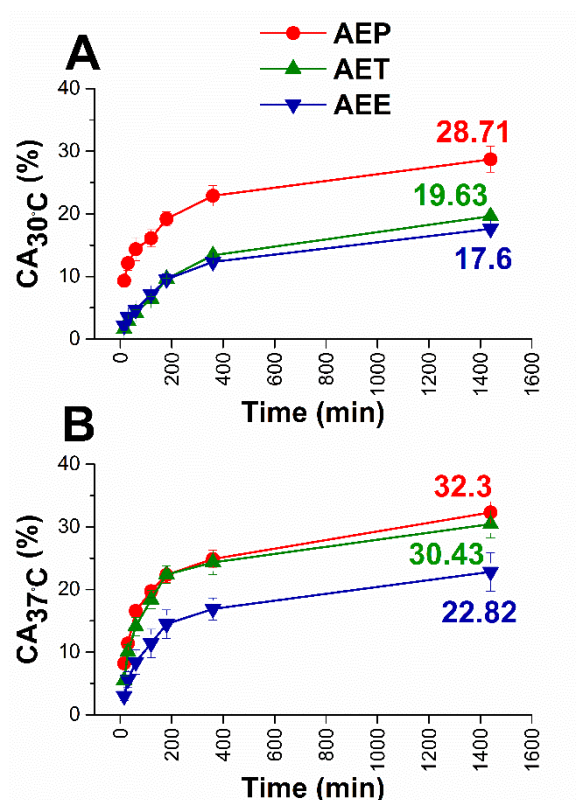


Figure 1. Results of in vitro diffusion studies through agar gel membrane as biofilm model for AEE, AET, and AEP at 30 °C (A) and 37 °C (B), respectively. The AE concentration is 200 µg/mL. CA: cumulative amounts of essential oil in percentage; the experiments were performed in triplicate (mean ± SD).

2.4. Interaction Studies with Unilamellar Liposomes as Cellular Models

Similar to our previous studies, unilamellar liposomes (ULs) were used as a cellular model for studying the intracellular delivery ability of AE for different formulations [20]. We studied the interaction between 3.5 µm sized ULs and different formulations of AE (AEP, AET, AEE) for 48 h at 30 °C and 24 h at 37 °C. The incubation times and temperatures were the same as in the case of cellular microbiological experiments with fungi and bacteria (Figure 2).

For both experimental circumstances, AEP showed the best ability to deliver AE to the internal water phase of ULs; it was 29.8% after 48 hours at 30 °C, and 59.2% after 24 hours at 37 °C. For the AET samples, these values were 25.0% and 27.3%, respectively, and the lowest values were obtained in the case of AEE samples.

2.5. Antibacterial and Antifungal Activities of the Prepared Emulsions

The effects of the *Artemisia* Pickering nanoemulsion, conventional emulsion, and essential oil in ethanol on Gram-positive and Gram-negative bacteria, and on opportunistic fungi were studied. The AEP showed acceptable antibacterial and antifungal activities (MIC₉₀) on *E. coli* PMC 201 (1.68 ± 0.72 µg/mL), *S. aureus* ATCC 29213 (1.62 ± 0.37 µg/mL), *B. subtilis* SZMC 0209 (1.42 ± 0.64 µg/mL), *P. aeruginosa* PMC 103 (1.46 ± 0.22 µg/mL), *S. pyogenes* SZMC 0119 (3.15 ± 0.16 µg/mL), *S. pombe* ATCC 38366 (2.01 ± 0.46 µg/mL), *C. albicans* SZMC 1372 (3.62 ± 0.65 µg/mL), *C. tropicalis* SZMC 1368 (4.29 ± 0.82 µg/mL), *C. dubliniensis* SZMC 1470 (3.63 ± 0.57 µg/mL) and *C. krusei* SZMC 0779 (3.79 ± 0.57 µg/mL), respectively, when compared to AET ($P < 0.01$). The Pickering *Artemisia annua* EO nanoemulsion (AEP) showed higher antimicrobial activity at an average of twelve-fold less concentration when compared to the free essential oil in ethanol (AEE). The comparative dose–response curves are shown in Figures 3 and 4 for bacteria and fungi, respectively.

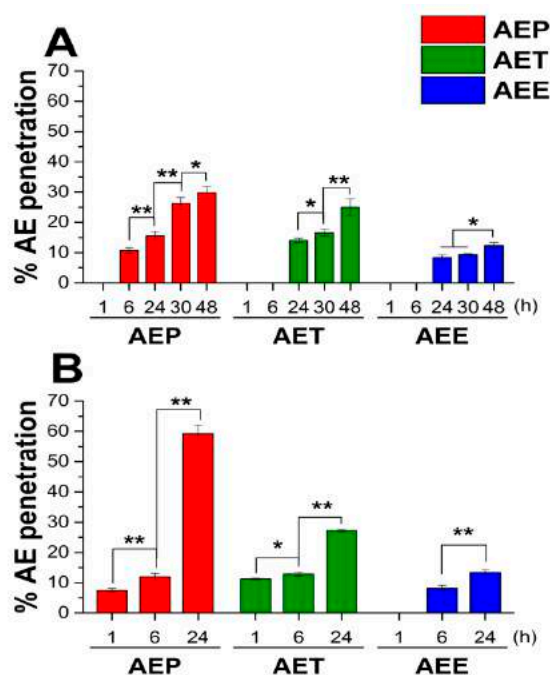


Figure 2. Results of the interaction study between unilamellar liposomes (ULs) and different formulations of *Artemisia* essential oil (AE) at 30 °C for 48 h (A) and at 37 °C for 24 h (B), experiments were performed in triplicate. AEP: Pickering emulsion, AET: conventional emulsion, AEE: ethanolic solution. c[AE] = 200 µg/mL (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, mean \pm SD).

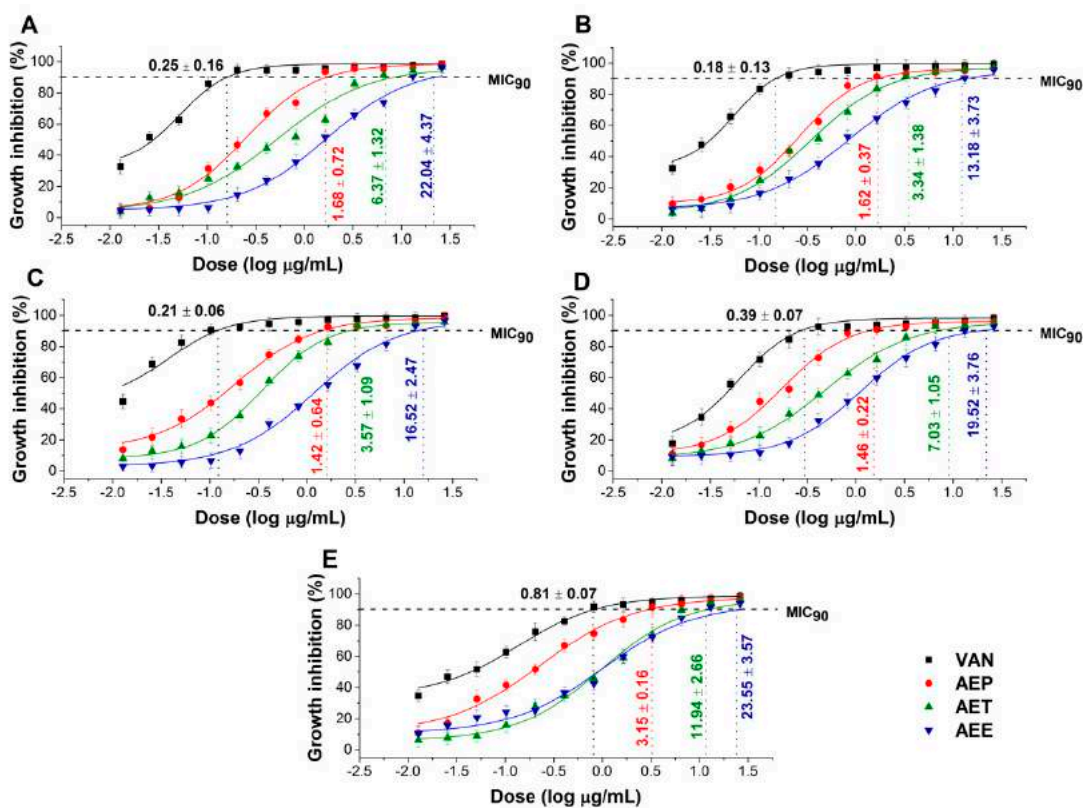


Figure 3. Minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of AEP, AET, AEE, and vancomycin (VAN) in µg/mL on *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E). Six independent experiments each with three technical replicates were performed (mean \pm SD).

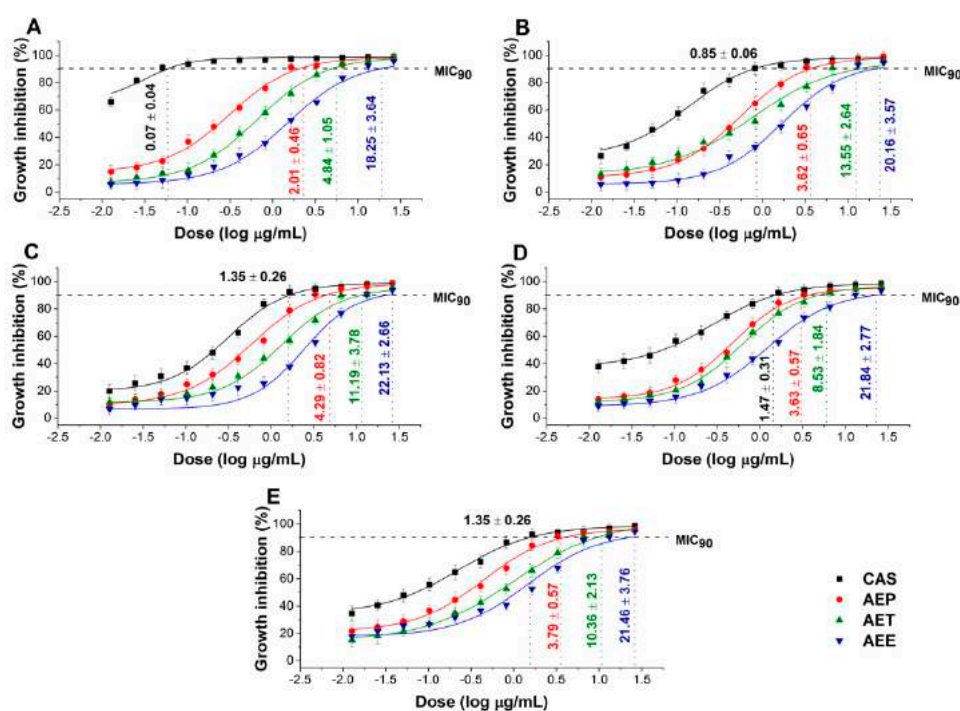


Figure 4. Minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of AEP, AET, AEE, and caspofungin (CAS) in µg/mL on *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), *C. tropicalis* (C), *C. dubliniensis* (D) and *C. krusei* (E). Six independent experiments each with three technical replicates were performed (mean ± SD).

2.6. Effects of the Minimum Effective Concentration (MEC₁₀) on Planktonic Microbial Cells

The minimum effective concentration (MEC₁₀) of the *Artemisia* Pickering nanoemulsion, conventional emulsion and essential oil in ethanol on Gram-positive and Gram-negative bacteria, and on opportunistic fungi are shown in Figures 5 and 6. For the AEP the MEC₁₀ concentrations are as follows: *E. coli* (4.05 ± 0.69 µg/mL), *S. aureus* (4.79 ± 0.84 µg/mL), *B. subtilis* (5.54 ± 1.05 µg/mL), *P. aeruginosa* (6.39 ± 0.95 µg/mL), *S. pyogenes* (9.25 ± 1.03 µg/mL), *S. pombe* (7.02 ± 1.55 µg/mL), *C. albicans* (7.12 ± 2.11 µg/mL), *C. tropicalis* (13.79 ± 2.74 µg/mL), *C. dubliniensis* (10.49 ± 3.77 µg/mL) and *C. krusei* (11.67 ± 3.62 µg/mL). The curves expressed a dose-dependent cell survival rate (by CFU quantification) after 60 min exposure to AEP, AET, and AEE. The doses corresponding to MEC₁₀ (average 90% survival rate of the ~10⁵ CFU/mL, mid-log phased cell population) were then used in further study on planktonic cells and on mature biofilms.

2.7. Effects on the Microbial Oxidative Balance

Various reactive oxygen species (ROS) production and accumulation in the bacterial and fungal cells initiate oxidative stress followed by cellular structural damages and apoptosis induction [5]. The oxidative stress generation after 60 min of treatment has been investigated (Figures 7 and 8). Data expressed as % of control are as follows: combined ROS detected by DCFDA (1235.46 ± 133.63%), peroxide by DHR 123 (1053.74 ± 146.26%) and superoxide by DHE (1153.84 ± 142.67%) were the highest in the case of *P. aeruginosa*. The AEP caused an effective increase in the combined ROS, peroxide, and superoxide generations as well, in both Gram-positive and negative bacteria and fungi when compared to AET and AEE ($P < 0.01$). The AEE has generated a three to four-fold increment in oxidative stress compared to the growth control (GC), which was the lowest among all treatments.

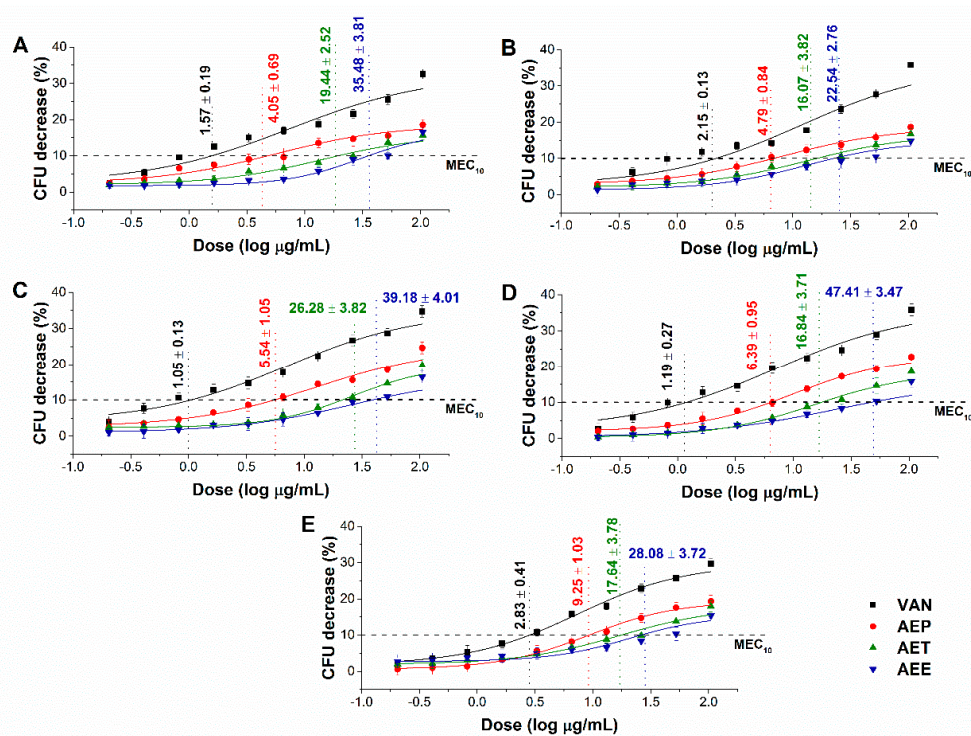


Figure 5. Minimum effective concentration (MEC₁₀) of AEP, AET and AEE (µg/mL) on *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E). Six independent experiments, each with three technical replicates, compared to vancomycin (VAN) were considered (mean ± SD).

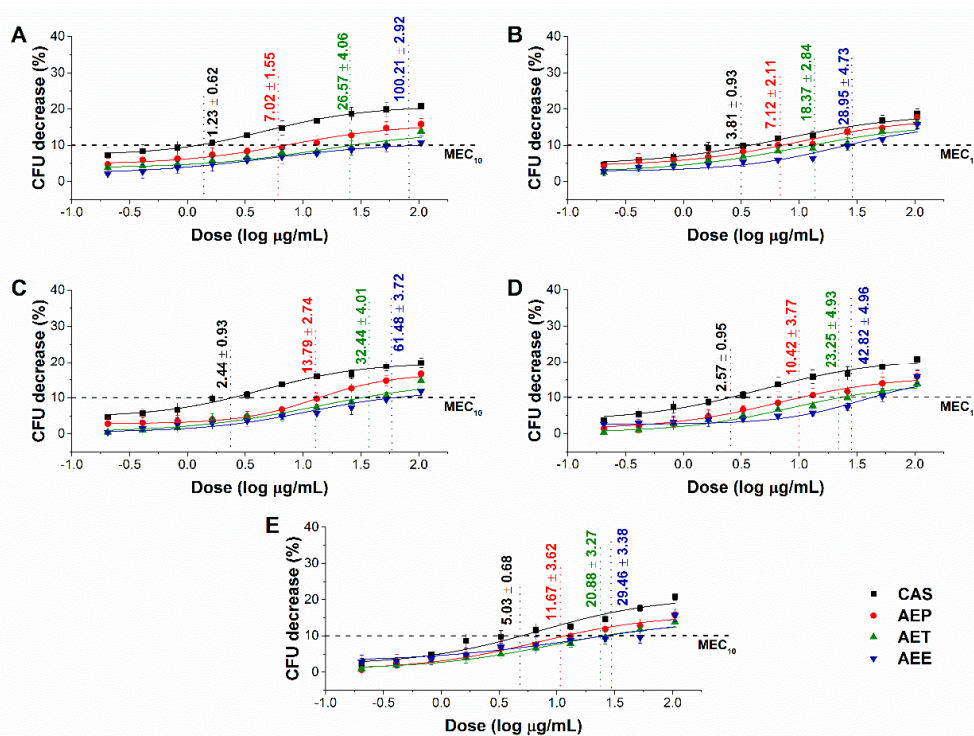


Figure 6. Minimum effective concentration (MEC₁₀) of AEP, AET, and AEE (µg/mL) on *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), *C. tropicalis* (C), *C. dubliniensis* (D) and *C. krusei* (E). Six independent experiments, each with three technical replicates, compared to caspofungin (CAS) were considered (mean ± SD).

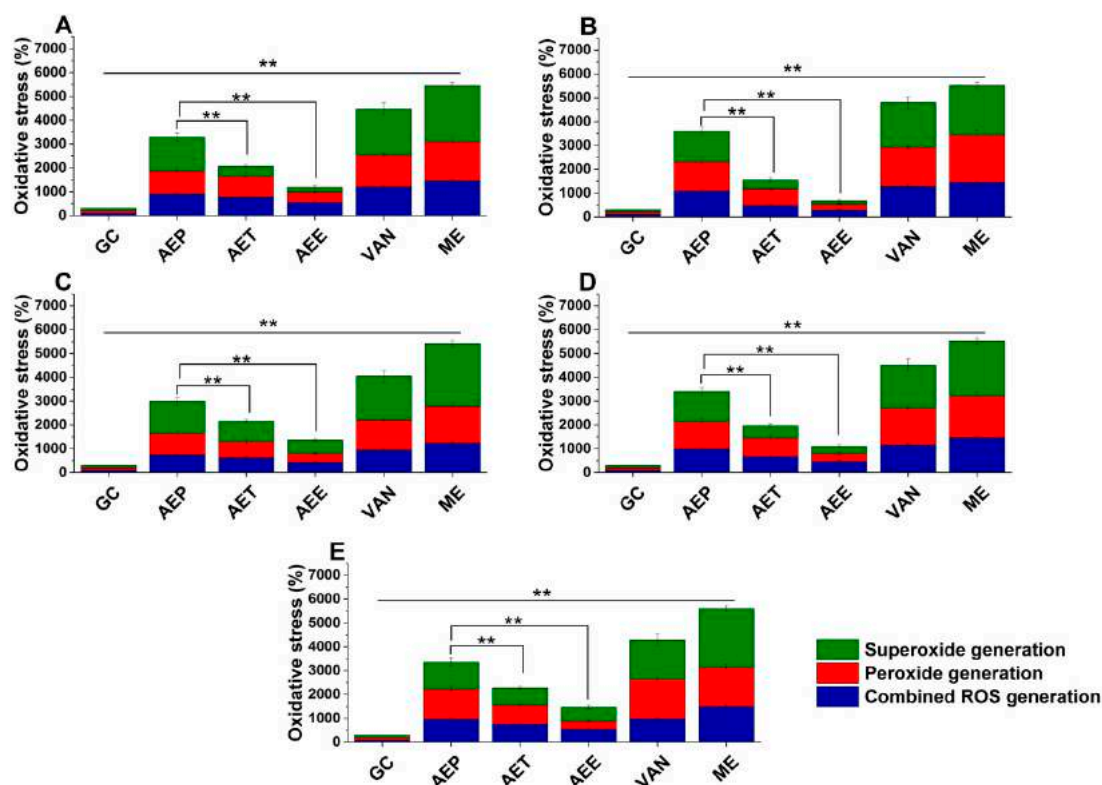


Figure 7. Percentage oxidative stress generation by AEP, AET, AEE, and VAN on *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E) at their respective MEC₁₀ concentrations after one-hour treatment. All results were compared to those for menadione (ME) and growth control (GC). The three formulations were evaluated separately as well. Six independent experiments, each with three technical replicates (** $P < 0.01$, mean \pm SD).

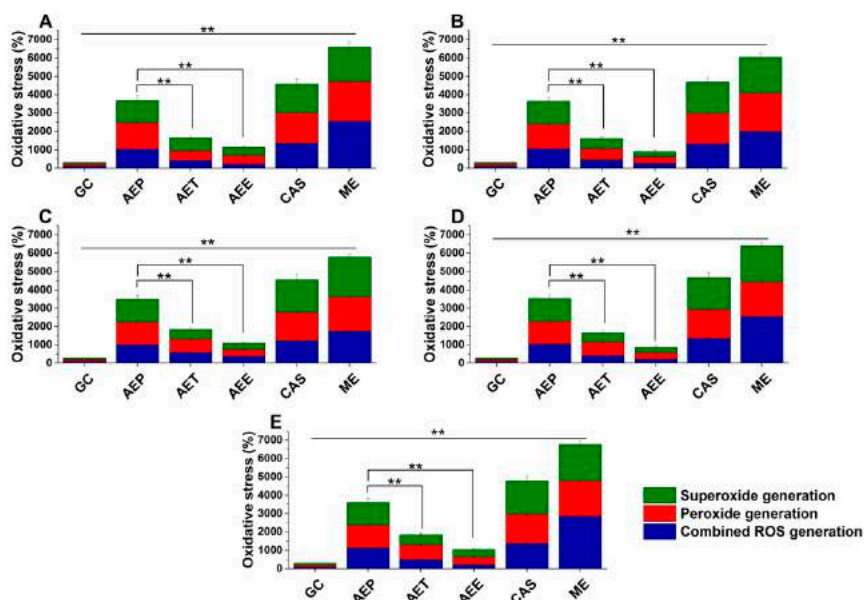


Figure 8. Percentage oxidative stress generation by AEP, AET, AEE, and CAS on *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), *C. tropicalis* (C), *C. dubliniensis* (D) and *C. krusei* (E) at their respective MEC₁₀ concentrations and after one-hour treatment. All results were compared to those for menadione (ME) and growth control (GC). The three formulations were evaluated separately as well. Six independent experiments, each with three technical replicates (** $P < 0.01$, mean \pm SD).

2.8. Effects on the Microbial Planktonics' Behavior

2.8.1. Colony Formation Changes

The changes in the colony formation of the microbial cells were followed using a time-kinetic means of investigating the quantity of the living population after a definite time interval under different samples' MEC₁₀ concentrations (Figures 9 and 10). A significant 50% reduction in the bacterial and fungal cell survivability after 6 and 18 h, respectively, was observed in the case of the AEP exposure when compared to that of AET and AEE ($P < 0.01$). AEE was the least effective among all other treatments.

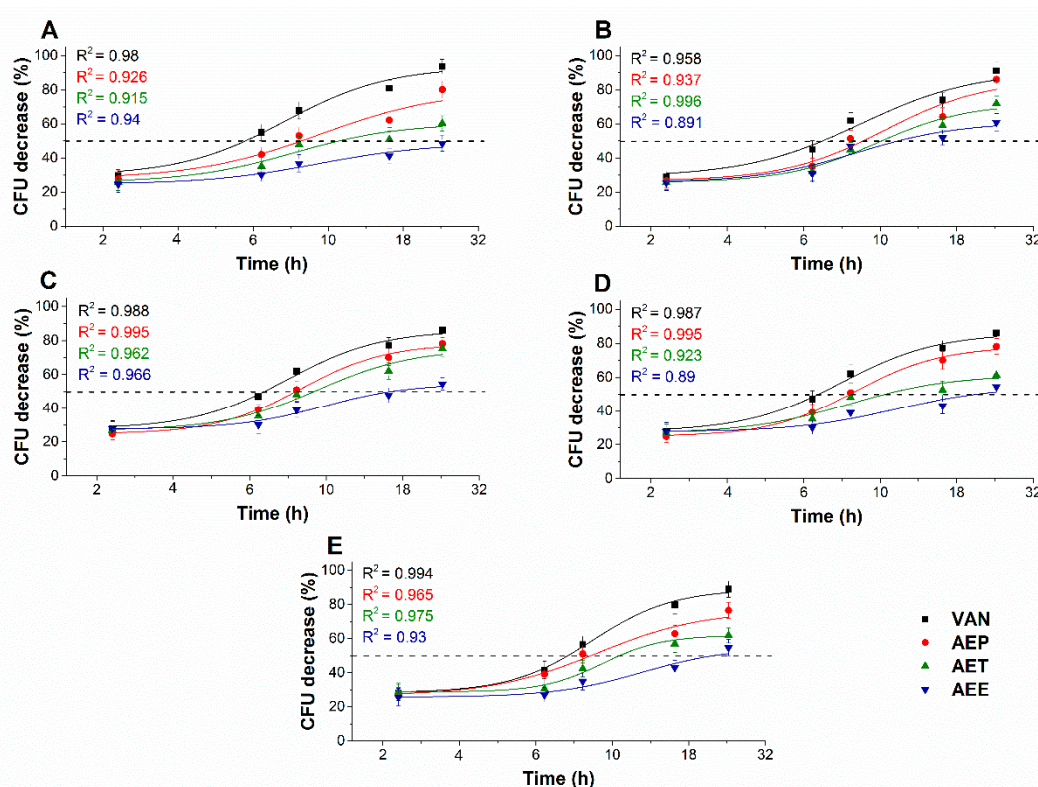


Figure 9. Effects of AEP, AET, and AEE at their MEC₁₀ concentrations on the mean percentage colony-forming unit (CFU/mL) decrement of the planktonic *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E) compared to their respective 0 h samples and vancomycin (VAN) standard antimicrobial controls after 2, 6, 8, 16 and 24 h of treatment (mean \pm SD, $n = 6$ independent experiments each with three technical replicates).

2.8.2. Variations in the Intracellular ATP to Total Protein Content Ratios

The energy depletive effects of AEP, AET, and AEE at their MEC₁₀ concentrations on the selected Gram-positive and -negative bacteria, and fungi were studied (Figures 11 and 12). Although no significant change in the total protein content (TP) over time in the planktonic cells was observed, a significant $60.37 \pm 5.35\%$ decrement in the ATP/TP ratio was found in the case of the AEP treated samples when compared to the 0 h samples ($P < 0.01$). Both AET and AEE have shown a decrease up to an average of 40% in the ATP/TP ratio in the cases of bacteria and fungi when compared to the 0 h samples.

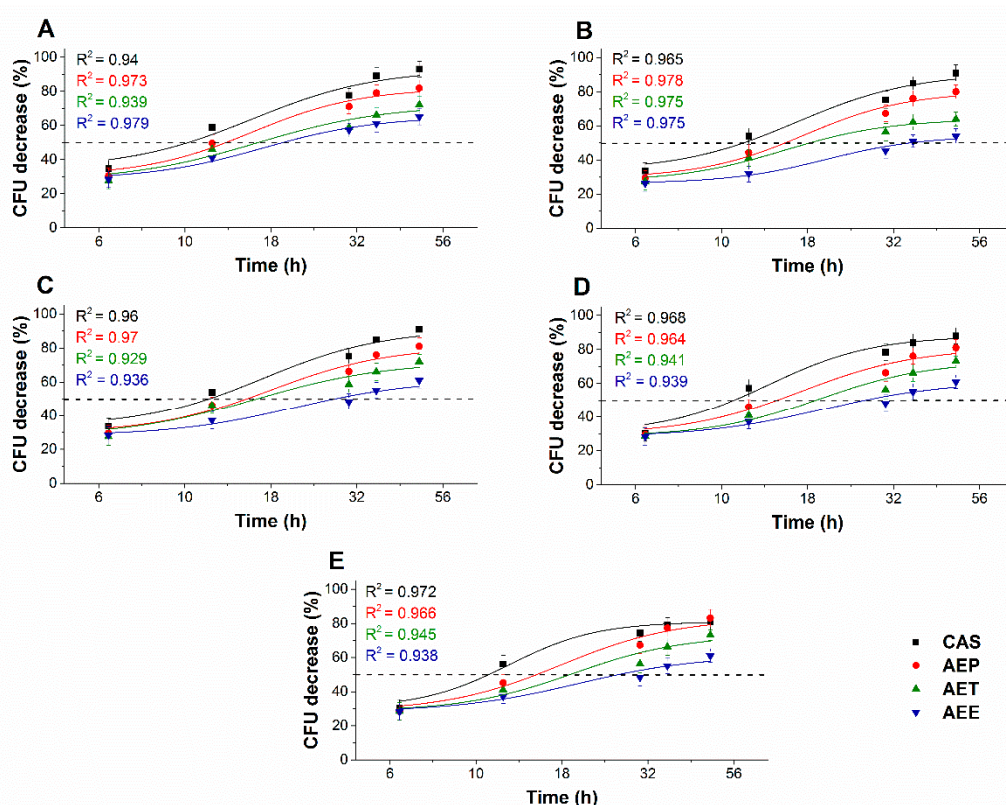


Figure 10. Effects of AEP, AET, and AEE at their MEC_{10} concentrations on the metabolic activities of the mean percentage colony-forming unit (CFU/mL) decrement of the planktonic *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), *C. tropicalis* (C), *C. dubliniensis* (D) and *C. krusei* (E) compared to their respective 0 h samples and caspofungin (CAS) standard antimicrobial controls after 6, 12, 30, 36 and 48 h of treatment (mean \pm SD, $n = 6$ independent experiments each with three technical replicates).

2.8.3. Effects on Microbial Cell Viability and Metabolic Activity

The multi-parametric cytotoxicity assay has been performed to evaluate the viability of the microbial cells using SYBR green I/PI live-dead cell technique while the resazurin fluorometric method was applied for reflecting the metabolic changes caused by the test samples. The cytotoxic effects of AEP, AET, and AEE on the viability (Figures 13 and 14) and on the metabolic activity (Figures 15 and 16) of the selected bacteria and fungi were evaluated. The 50% reduction in the viable cell population was reached at an average of 9.9 ± 0.71 h and 17.09 ± 0.45 h in the case of the Gram-positive and -negative bacteria, and fungi under AEP exposure. A delayed effect at an average of 9.74 ± 1.65 h was observed in the case of AET to initiate a 50% mean non-viability in the microbial populations when compared to AEP ($P < 0.01$). The AEE has shown the slowest induction of microbial non-viability with a delay of 20.63 ± 3.73 h compared to AEP ($P < 0.01$). A significant 50% decrement in the metabolic activity was observed in the case AEP treated bacteria and fungi at an average of 10.63 ± 0.55 h and 26.35 ± 0.36 h, respectively (Figures 15 and 16). The AET treatment showed an average of 7.42 ± 2.63 h delay in reducing metabolic activity by 50% when compared to AEP treated samples ($P < 0.01$). No significant decrease in the metabolic activity was found in the case of the AEE treated fungal samples.

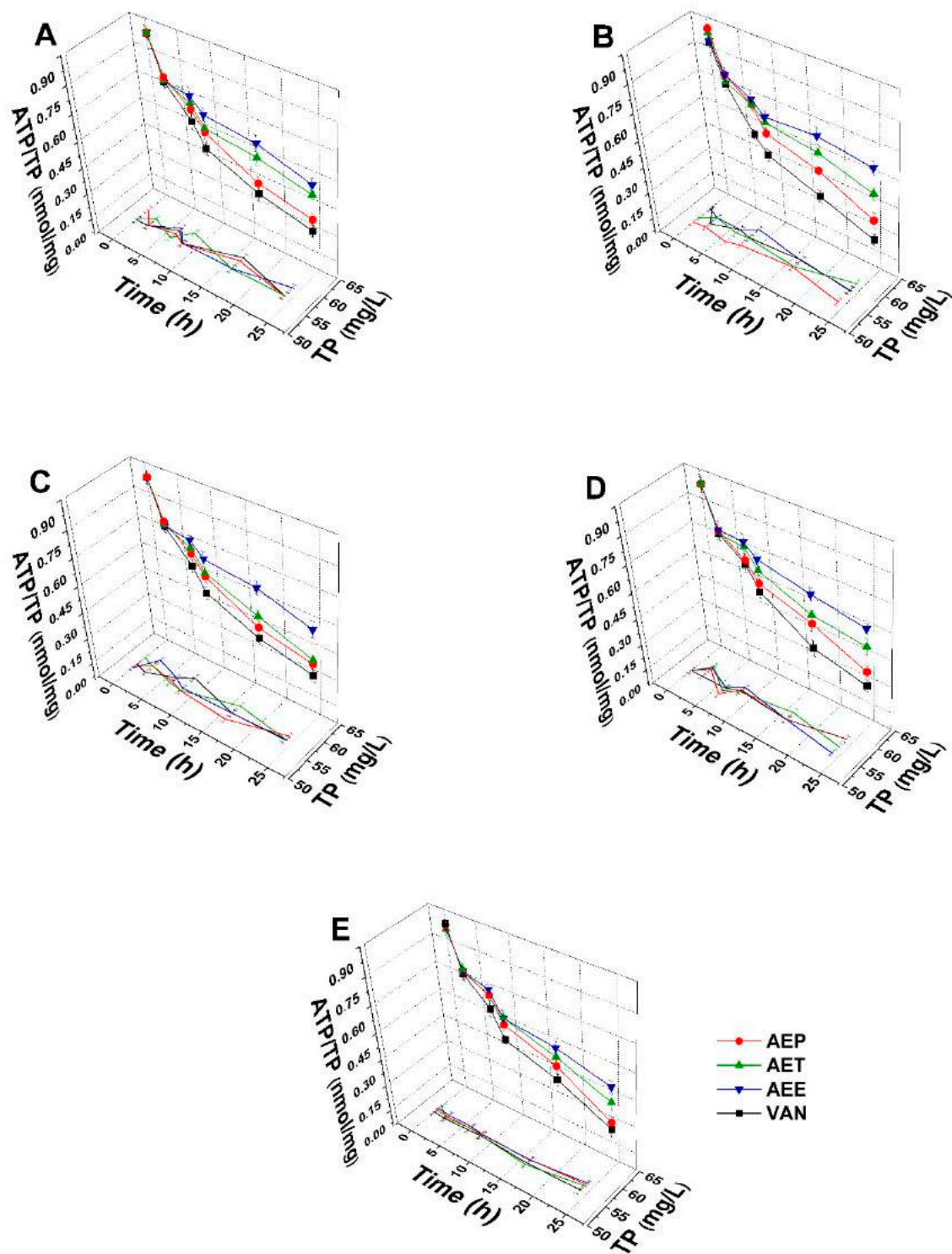


Figure 11. Effects of AEP, AET and AEE at their MEC₁₀ concentrations on the total protein content (TP) and intracellular ATP/TP ratio of the planktonic *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E) compared to their respective 0 h samples and vancomycin (VAN) standard antimicrobial controls after 2, 6, 8, 16 and 24 h of treatment (mean ± SD, $n = 6$ independent experiments each with three technical replicates).

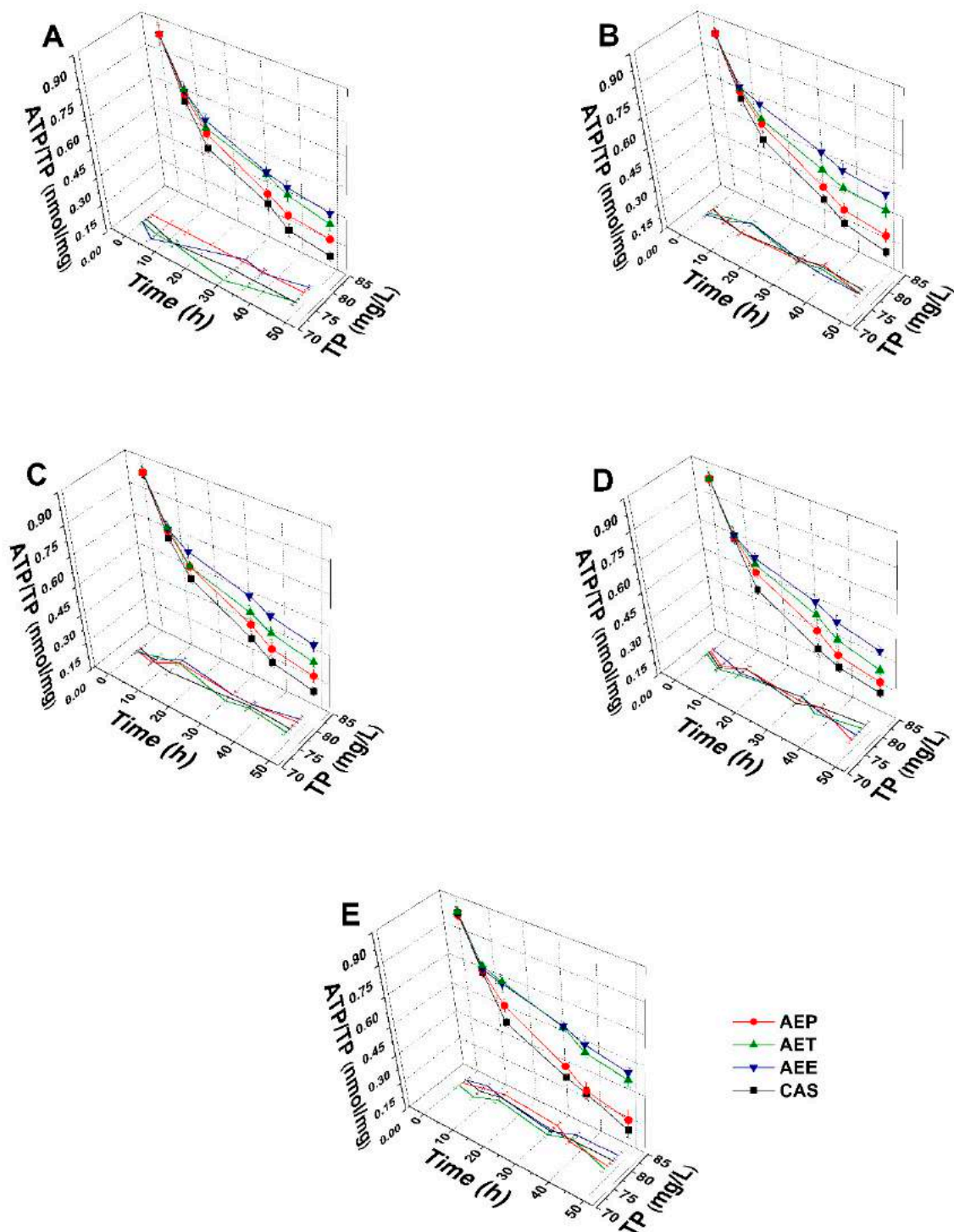


Figure 12. Effects of AEP, AET, and AEE at their MEC₁₀ concentrations on the total protein content (TP) and intracellular ATP/TP ratio of the planktonic *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), *C. tropicalis* (C), *C. dubliniensis* (D) and *C. krusei* (E) compared to their respective 0 h samples and caspofungin (CAS) standard antimicrobial controls after 6, 12, 30, 36 and 48 h of treatment (mean \pm SD, $n = 6$ independent experiments each with three technical replicates).

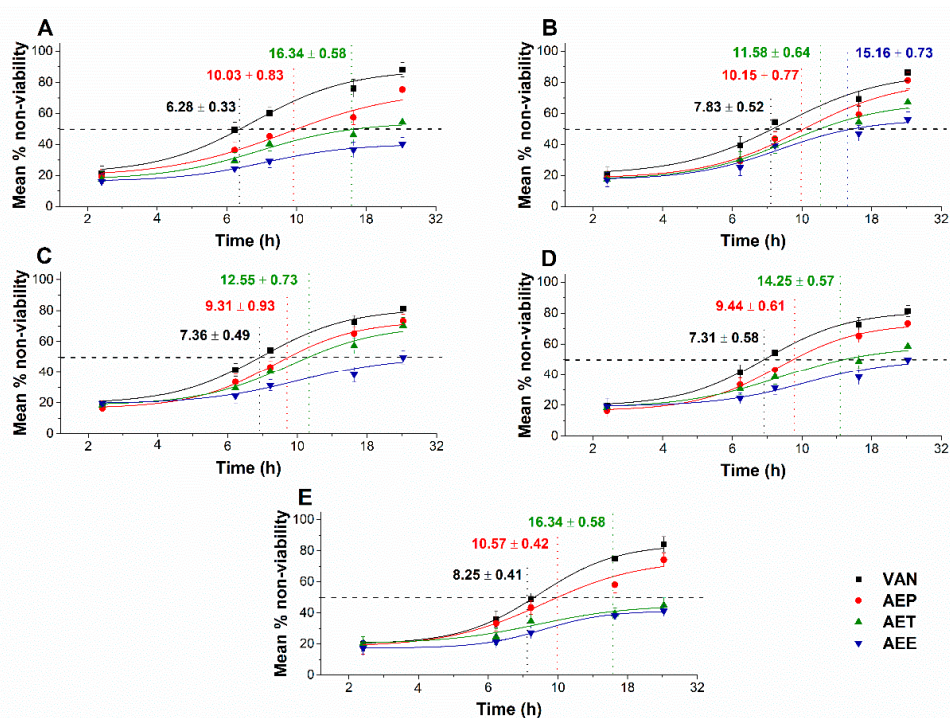


Figure 13. Mean percentage non-viability of AEP, AET and AEE at their MEC₁₀ concentrations on the metabolic activities of the planktonic *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E) compared to their respective 0 h samples and vancomycin (VAN) standard antimicrobial controls after 2, 6, 8, 16 and 24 h of treatment (mean ± SD, $n = 6$ independent experiments each with three technical replicates).

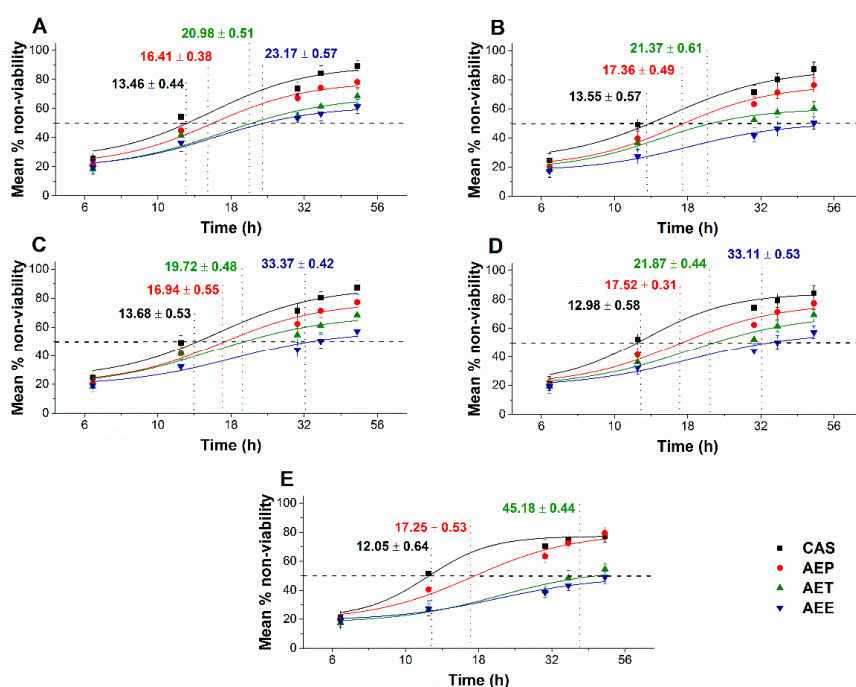


Figure 14. Mean percentage non-viability of AEP, AET, and AEE at their MEC₁₀ concentrations on the metabolic activities of the planktonic *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), *C. tropicalis* (C), *C. dubliniensis* (D) and *C. krusei* (E) compared to their respective 0 h samples prior and caspofungin (CAS) standard antimicrobial controls after 6, 12, 30, 36 and 48 h of treatment (mean ± SD, $n = 6$ independent experiments each with three technical replicates).

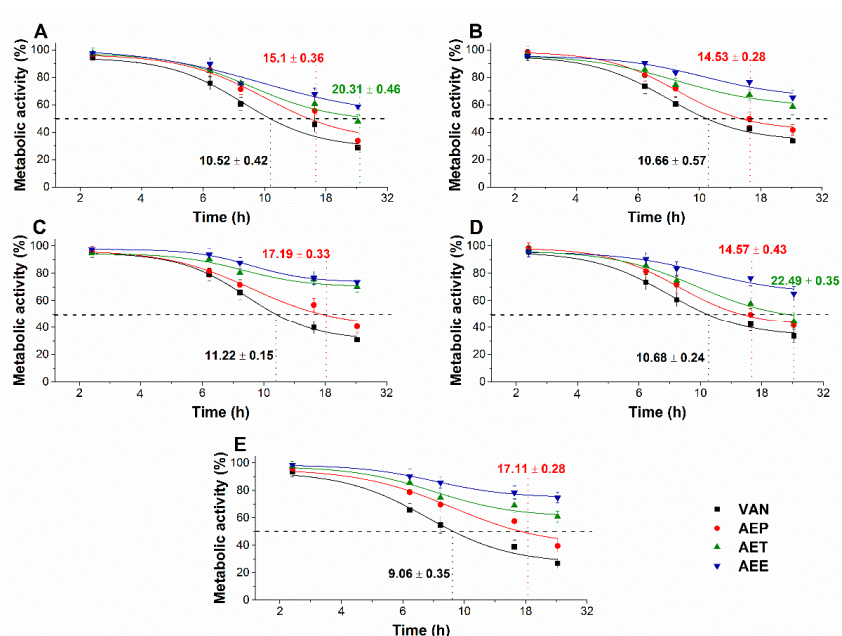


Figure 15. Effects of AEP, AET and AEE at their MEC_{10} concentrations on the metabolic activities of the planktonic *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *B. subtilis* (C), *P. aeruginosa* (D), and *S. pyogenes* (E) compared to their respective 0 h samples and vancomycin (VAN) standard antimicrobial controls after 2, 6, 8, 16 and 24 h of treatment (mean \pm SD, $n = 6$ independent experiments each with three technical replicates).

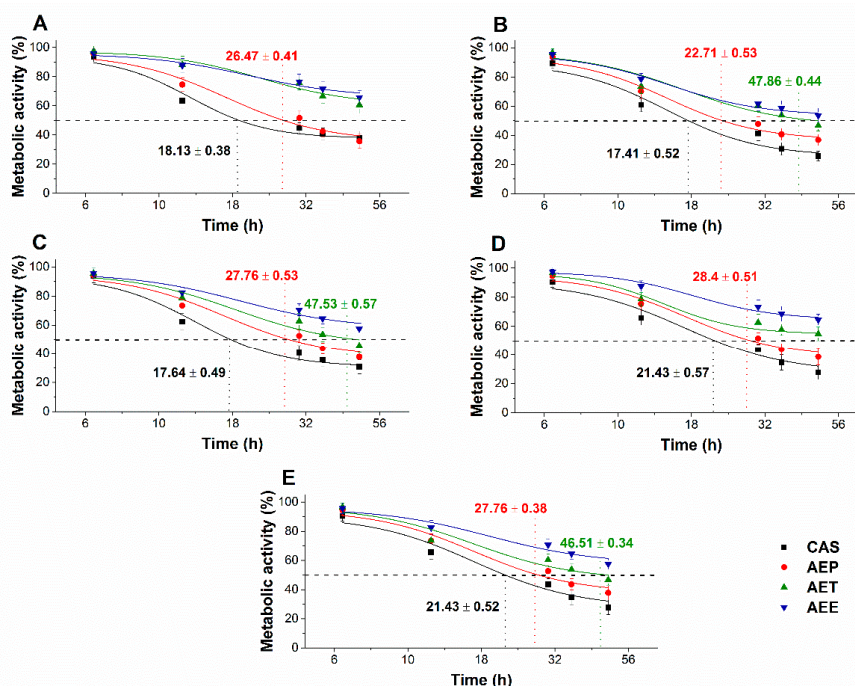


Figure 16. Effects of AEP, AET and AEE at their MEC_{10} concentrations on the metabolic activities of the planktonic *S. pombe* (A), *C. albicans* (B), *C. tropicalis* (C), *C. dubliniensis* (D) and *C. krusei* (E) compared to their respective 0 h samples and caspofungin (CAS) standard antimicrobial controls after 6, 12, 30, 36 and 48 h of treatment (mean \pm SD, $n = 6$ independent experiments, each with three technical replicates).

2.9. Effects on Mature *Candida* Spp. Biofilms

The changes in the metabolic activity, fungal cell viability, total biofilm biomass, total protein content (TP) of the biofilm-attached *Candida* cells, and their ATP content in terms of ATP/TP ratio are

shown in Figures 17 and 18. Variable response to the AEP, AET, and AEE treatments at their respective MEC₁₀ concentrations was observed when compared to the growth control (GC). Although no changes were found in the total biofilm biomass, a significant 40% reduction in the metabolic activity of the AEP treated mature biofilm-attached *Candida* species after 24 h was observed compared to GC. Whereas, AET and AEE treated samples have shown an average of 20% to 30% metabolic activity reduction compared to the AEP treatment ($P < 0.01$). The reduction of the 50% viable biofilm-attached *Candida* cells was also observed compared to the GC after 24 h of the treatment. The killing activity of the AEE treatments was found to be the lowest compared to the AEP treatments ($P < 0.01$). Total protein (reflecting the number of cells, TP) did not change significantly during the treatments, but a significant 60% reduction of the ATP/TP ratio was found in the case of the AEP treated mature biofilm-attached *Candida* samples when compared to the GC ($P < 0.01$). An average of $28.57 \pm 5.26\%$ and $15.34 \pm 4.64\%$ reduction in the ATP/TP ratio for the AET and AEE were recorded, resulting in the AEE treatments to be the least effective among the treatment groups.

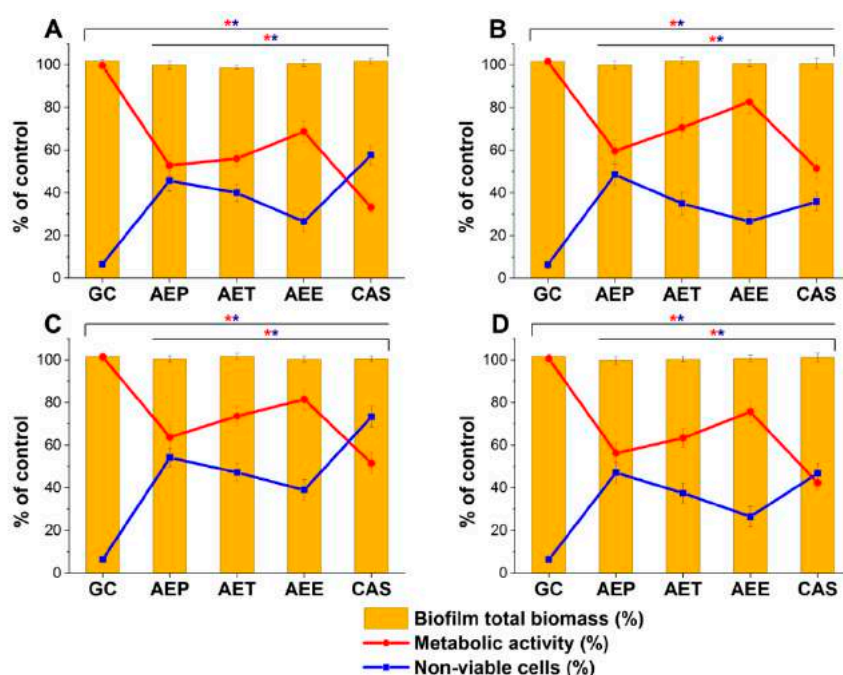


Figure 17. Effects of AEP, AET and AEE after 24 h of treatments at their respective MEC₁₀ concentrations on the metabolic activity, amount of biofilm biomass, and viability of *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B), *C. dubliniensis* (C) and *C. krusei* (D) cell populations (mean \pm SD, $n = 6$ independent experiments each with three technical replicates, data were compared with untreated controls (GC) and with caspofungin (CAS)-treated positive controls. The red (*) and blue (*) asterisks represent a significance value of $P < 0.01$ for the metabolic activity and viability measurements, respectively.

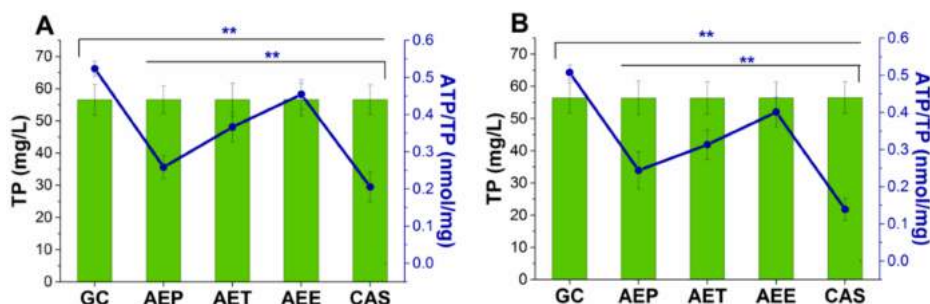


Figure 18. Cont.

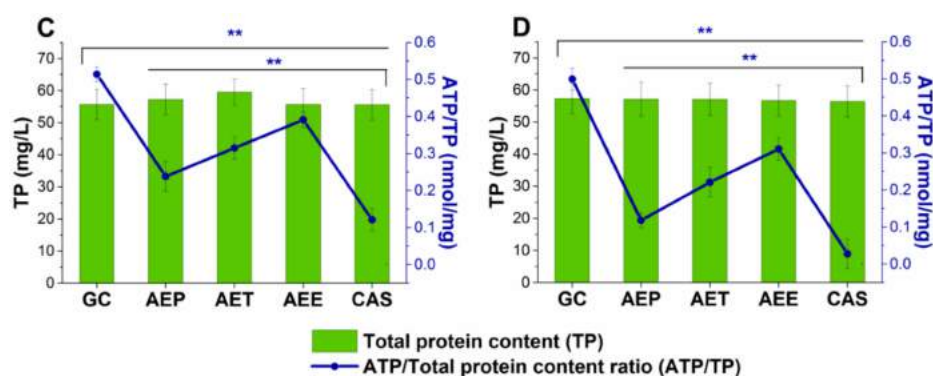


Figure 18. Effects of AEP, AET and AEE after 24 h of treatments at their respective MEC₁₀ concentrations on the ATP and the total protein content (TP) of *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B), *C. dubliniensis* (C) and *C. krusei* (D) cell populations in the mature biofilms (mean \pm SD, $n = 6$ independent experiments each with three technical replicates, data were compared with untreated controls (GC) and with casposungin (CAS)-treated positive controls. The blue double asterisks (**) represent a significance value of $P < 0.01$ for the intracellular ATP/Total protein content (ATP/TP), respectively.

3. Discussion

The effects of three different formulations of *Artemisia annua* EO on mature *Candida* biofilms and antimicrobial activity have been studied. We succeeded in formulating stable Pickering nanoemulsions using surface-modified silica nanoparticles, and the formulation with desired droplet size (160 nm) was examined for its antimicrobial properties. *Artemisia annua* EO Pickering nanoemulsions (AEP) were stable for three months, with a higher effectiveness when compared to AET and AEE.

Based on our analyses, AEP has shown stronger antimicrobial activity at lower concentrations (MICs) compared to that of AET and AEE. Several experiments have been conducted previously; however, the mechanism of action at the sub-inhibitory concentrations has not been studied at all [6,12,13]. Our data suggest an effective microbial killing activity of AEP on selected bacteria and fungi. Previous studies believe that the killing action of the essential oils happens due to the leakage in the cells' cytoplasmic membrane and induction of oxidative stress [38–41]. We have introduced several staining methods to visualize and to understand the mechanism of action of the AEP, AET and AEE. The AEP was able to induce higher oxidative stress compared to AET and AEE followed by metabolic interference, cell wall disruption, ATP depletion and finally cell death in the case of planktonic bacterial and fungal cells as well as in mature biofilm-attached *Candida* cells at their respective sub-inhibitory concentrations.

The results obtained from model experiments have highlighted that the Pickering nanoemulsion of the AE oil is the most effective form for the intracellular delivery and for the transport of EO through biofilms when compared to AET and AEE. On the basis of our observations, it can be postulated that the difference in the antibacterial and antifungal activity against microbial cell may be explained by the different adsorption properties of the essential oil formulations [20,34]. Data for unilamellar liposomes as a cellular model support the phenomenon of adsorption of the Pickering emulsion droplets on the cell membrane that has been reported earlier [33]. It might happen that either the passive diffusion occurs due to higher local concentration gradient of the essential oil or fusion of the AEP droplets with the microbial cells allowing the intracellular delivery of the active components from the AEP. The static Franz diffusion experiments on agar gel membrane as a biofilm model showed that AEP has the best ability to deliver the EO through porous structure. The enhanced transportability of AEP must be related to the difference of the surface properties of AEP and AET since experiments were performed with droplets of similar sizes. Overall, our observations demonstrated that the AEP facilitates the *Artemisia* essential oil in penetrating through the biofilm and the cells, inducing oxidative

stress and disruption of the cell membrane integrity due to the high adsorption efficacy of Pickering nanoemulsion droplets.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Collection and Extraction of *Artemisia* Essential Oil

The plant samples were collected in 2017 from Békés county, Orosháza-Nagyszénás, Hungary, from a local farm in the autumn and were dried in the dark, under moisture-free conditions for two months. The plant parts were ground to farinose form and were sieved down. The powdered form of the plant was stored in airtight containers for future use.

The extraction of the *Artemisia annua* L. (*A. annua*) essential oil was done by steam distillation method as described earlier [42]. Briefly, 500 mL of distilled water was added to 50 g dried powder of *A. annua*. The steam distillation was done for 30 min, and the reading in the graduated tube was recorded for the essential oil yield. The yield value was converted to the percentage (%) *w/w* of 1 g of the powdered plant's part.

4.2. GC-MS and GC-FID Studies

The *Artemisia* essential oil was diluted 1:100 in *n*-heptane and injected on the GC-MS and GC-FID systems. The separation and identification of volatile compounds was carried out by using GCMS-QP2020 instrument (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with a split-splitless injector and an AOC-20i autosampler. For a satisfactory characterization of compounds, two different capillary columns were used. One was a low-polarity column, namely SLB-5ms 30 m × 0.25 mm *id* × 0.25 μm *d_f* (Merck Life Science, Rome, Italy), while the other with a medium polarity was a Supelcowax-10 30 m × 0.25 mm *id* × 0.25 μm *d_f* (Merck Life Science). Both columns operated under a programmed temperature: 50 °C to 280 °C at 3.0 °C/min. Injection volume was of 0.5 μL with a split ratio of 1:10. Helium was used as gas carrier at a constant linear velocity of 30 cm/s and an inlet pressure of 26.7 kPa. MS parameters were as follows: the mass range was 40–650 amu, the ion source temperature was 220 °C and the interface temperature was 250 °C. The GCMSsolution software (version 4.50 Shimadzu, Kyoto, Japan) was used for data collection and handling. Peak identification was carried out by using a double parameter: MS spectra similarity (over 85%) and a LRIs ±5 and ±10 linear retention index (LRI) tolerance window for the SLB-5ms and Supelcowax-10 column, respectively. In this respect, a homologous series C7-C30 *n*-alkanes (Merck Life Science) standard mixture in hexane (1000 g/mL) was used for LRIs calculation on SLB-5ms column, while a C4-C24 even carbon saturated FAMES (Merck Life Science, Rome, Italy) standard solution in hexane (1000 g/mL) on Supelcowax-10 column. For mass spectral identification, *FFNSC 3.01* (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) was mainly used.

The quantification of volatile compounds was carried out by using a GC-2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped a split-splitless injector (280 °C), an AOC-20i autosampler and an FID detector. The GC columns, temperature program, and carrier gas were the same as described for the GC-MS system, except the initial inlet pressure (99.5 kPa) (the average linear velocity was 30 cm/s). The FID temperature was set at 280 °C (sampling rate: 40 ms), while the gas flows were 40 mL/min for hydrogen, 30 mL/min for the make-up gas (nitrogen) and 400 mL/min for air. Data were collected and processed through the LabSolution software (version 5.92, Shimadzu).

4.3. Preparation and Characterization of Pickering Nanoemulsion

We synthesized surface-modified spherical silica nanoparticles (*d* = 20 nm) using the Stöber method [43] and used them as a stabilizing agent of Pickering nanoemulsions. For the stabilization of Pickering nanoemulsions, silica nanoparticles were synthesized as described previously [20]. The surface of hydrophilic silica nanoparticles was modified with propyltriethoxysilane (PTES Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA, pur. 99%) with a theoretical surface coverage of 20%. The size distribution of nanoparticles was determined by dynamic light scattering measurements (DLS, Malvern Zetasizer

Nano S, Malvern Panalytical Ltd., Worcester, UK), the particles were suspended in ethanol or water. The following data and settings were used in DLS measurements: temperature 25 °C; disposable polycarbonate cuvette; autocorrelation function; count rate between 200–500 kcps; refractive index and absorption of silica of 1.57 and 0.001, respectively; refractive index of ethanol and water of 1.367 and 1.436, respectively; duration 60 s. Morphology was examined with transmission electron microscopy (TEM, JEM-1400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). The drop of the sample suspension (~1 µL) was drop cast onto 200 mesh copper grid coated with carbon film (EMR Carbon support grids, Micro to Nano Ltd., Haarlem, The Netherlands) and dried overnight in vacuum desiccators. The TEM images of surface modified silica nanoparticles can be seen in Supplementary Material (Figure S7).

For the Pickering emulsions (AEP), the concentration of nanoparticles was kept constant (1 mg/mL) and concentration of *Artemisia* essential oil (AE) was varied between 200 µg/mL and 3.5 mg/mL. The emulsification process was carried out in two steps. In the first step, the mixture was sonicated for 2 min (Bandelin Sonorex RK 52H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin Germany). The second step was high shear emulsification, which was performed with an UltraTurrax (IKA Werke T-25 basic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany) high shear homogenizer for 2 min at 13,500 rpm. Conventional emulsions, stabilized by Tween 80 surfactant (AET) (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and ethanolic solution (AEE) were also prepared to compare stability parameters, droplet sizes and microbiological properties with those of AEP. The concentration of Tween 80 surfactant was the same as nanoparticles, 1 mg/mL. The stability of emulsions was studied based on periodical droplet size determination using DLS measurements (Malvern Zetasizer Nano S, Malvern Panalytical Ltd., Worcester, UK). The emulsions were stored in airtight vials, covered with aluminum foil at room temperature (25 °C). We considered the emulsion to be stable when the droplet size did not change in time, creaming, phase separation, or sedimentation and aggregation of nanoparticles could not be observed.

4.4. In Vitro Diffusion Studies—Static Franz Diffusion Cell Method

We carried out the diffusion study with the same parameters as in the in vitro cellular experiments—30 °C/24 h for fungi and 37 °C/24 h for bacteria—to obtain data that could be used to compare with the antimicrobial activities. The examination of diffusion properties was performed in static vertical Franz diffusion cells (Hanson Microette Plus, Hanson Research 60-301-106, Hanson Research Corporation, Chatsworth CA, USA). All experiments were performed in triplicate. As a biofilm model membrane, we have used 2.1 mm thick 2 w/w% agar gel membranes with effective penetration area of 2.54 cm², with a pore size of 1.5–3 µm, as its tortuous pore structure can model the biofilm matrix [44,45]. The agar membrane was prepared as described previously [34]. The volume of the receiver chamber was 7 mL; the receiver solution was phosphate buffered saline (PBS). For PBS preparation the following salts were used: NaCl (high purity, VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary), KCl (purity 99%–100.5%, VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary), Na₂HPO₄·2H₂O (AnalaR NORMAPUR®, purity ≥99.0%, VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary) and KH₂PO₄ (purity ≥99.0%, VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary). The volume of emulsion or solution sample was placed in the donor chamber (600 µL), and the diffusion was examined for 24 h, the samples were collected at 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h and 24 h. The volume of the taken sample was replaced with fresh PBS buffer. The (AE) content was determined with UV-Vis spectroscopy (Jasco V-670 UV/VIS Spectrophotometer, ABL&E-JASCO Ltd., Budapest, Hungary). The absorption wavelength of *Artemisia* essential oil was 248 nm.

4.5. Interaction Study between the Cellular Model (Unilamellar Liposomes) and Different Formulations of AE

Unilamellar liposomes (ULs) were prepared from phosphatidylcholine (Phospholipon 90G, Phospholipid GmbH, Berlin, Germany) as described previously [20,46]. A 5 mL suspension of ULs was mixed with 3 mL Pickering nanoemulsion, conventional emulsion, or ethanolic solution, and the *Artemisia* essential concentration was 200 µg/mL for all examined formulations. In the first set

of experiments, the mixture was stirred at 600 rpm for 24 h at 37 °C, and 1 mL aliquots were taken after 1, 6, and 24 h. In the second set of experiments, the mixture was stirred at 600 rpm for 48 h at 30 °C, and 1 mL aliquots were taken after 1, 6, 24, 30 and 48 h. The samples were centrifuged at 3000 rpm and 20 °C for 5 min, and the ULs were collected and dissolved in absolute ethanol. The *Artemisia* EO content of samples was determined with UV/Vis Spectroscopy at 248 nm (Jasco V-550 UV/VIS Spectrophotometer; ABL&E-JASCO Ltd., Budapest, Hungary). For UV/Vis measurements, we prepared samples without *Artemisia* essential oil, i.e., ULs with silica nanoparticle suspension, Tween 80 solution, or ethanol were also mixed and centrifuged and were used as blanks.

4.6. Materials and Microorganisms Used for the Biological Experiments

Promega BacTiter-Glo microbial cell viability assay kit (Bio-Science, Budapest, Hungary), glass beads (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, reference number: G-8772), sterile petri-dishes (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria), sterile petri-dishes for the biofilm assays (Sarstedt AG & Co. KG, Numbrecht, Germany, reference number: 83.3900.500), 0.22 µm vacuum filters (Millipore, France), cell scraper (Sarstedt AG & Co. KG, Numbrecht, Germany), sterile microplates (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria), sterile microplates for the biofilm assays (Sarstedt AG & Co. KG, Numbrecht, Germany, catalog number: 83.3924.500), 96-well optiplates (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), bovine serum albumin (BSA; Biosera, Nuaille, France), potassium phosphate monobasic, ethanol 96% (Et), methanol, peptone, yeast extract, agar-agar and Mueller-Hinton agar (for the maintenance of the tested bacteria's health, used throughout the experiments) (Reanal Labor, Budapest, Hungary), modified RPMI 1640 (contains 3.4 w/v% MOPS, 1.8 w/v% glucose and 0.002 w/v% adenine), menadione (ME) (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary), disodium phosphate, dimethyl-sulfoxide (DMSO) from Chemolab Ltd. (Budapest, Hungary), sodium chloride (VWR International Ltd., Debrecen, Hungary), potassium chloride (Scharlau Chemie S.A, Barcelona, Spain), 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), Caspofungin (CAS) from Merck Sharp & Dohme Ltd., Netherlands, vancomycin (VAN) from Fresenius Kabi Ltd., (Budapest, Hungary), SYBR green I 10,000×, propidium iodide, dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and dihydroethidine (DHE) were purchased from Sigma Aldrich (Budapest, Hungary) and from the above-mentioned sources. All other chemicals applied for the study were of analytical or spectroscopic grade. For fungi, we used an in-house nutrient medium containing 1 w/v% yeast extract, 2 w/v% peptone, 2 w/v% glucose and 2 w/v% agar-agar (for the colony-forming unit assay in the petri-dishes) [47], while phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) was obtained from Life Technologies Ltd., Budapest, Hungary. Highly purified water (<1.0 µS) was applied throughout the studies.

Escherichia coli (*E. coli*) PMC 201, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) PMC 103, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) SZMC 0209, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) SZMC 0119, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) ATCC 38366, *Candida albicans* (*C. albicans*) SZMC 1372, *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) SZMC 1368, *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*) SZMC 1470 and *Candida krusei* (*C. krusei*) SZMC 0779 were obtained from Szeged Microbial Collection, Department of Microbiology, University of Szeged, Hungary (SZMC) and Department of General and Environmental Microbiology, Institute of Biology, University of Pecs, Hungary (PMC).

4.7. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC₉₀)

We used a previously published protocol [4,20] for measuring the antibacterial activity separately on *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, and *S. pyogenes* and antifungal activity against *S. pombe*, and *Candida* species. In brief, for the antibacterial activity determination, a bacterial population of ~10⁵ CFU/mL was inoculated in modified RPMI 1640 medium followed by incubation for 16 h at 35 ± 2 °C Thermo Scientific Heraeus B12 microbiological incubator (Auro-Science Consulting Kft., Budapest, Hungary) with AEP, AET, AEE and VAN over a wide range of concentrations

(26.2–0.01 $\mu\text{g/mL}$). The absorbance was measured by a Thermo Scientific Multiskan EX 355 microplate reader (InterLabSystems, Budapest, Hungary) at 600 nm.

The antifungal activity against *S. pombe* and *Candida* species were also performed according to our previously published method [20]. Briefly, $\sim 10^3$ cells/mL were incubated with AEP, AEE, AET and CAS at a wide concentration range (26.2–0.01 $\mu\text{g/mL}$) in modified RPMI 1640 medium for 48 h at 30 °C (Sanyo MIR-154 microbiological incubator, Auro-Science Consulting Kft., Budapest, Hungary). The absorbance values obtained by the microplate reader at 595 nm were converted to percentages and were compared to the growth control (100%). The data were fitted by a non-linear dose–response curve fitting method to estimate the dose producing $\geq 90\%$ growth inhibition (MIC_{90}). All measurements were performed by applying three technical replicates in six independent experiments. VAN and CAS were used as the standard antibacterial and antifungal drug controls, respectively throughout the experiments.

4.8. Determination of Minimum Effective Concentration (MEC_{10})

The MEC_{10} concentration was obtained according to our previously published protocol [4]. In brief, a wide concentration range (105–0.2 $\mu\text{g/mL}$) of AEP, AET and AEE was used to treat mid-log phased $\sim 10^5$ cells/mL in modified RPMI 1640 medium for an hour, incubated at 35 ± 2 °C and 30 °C for the bacteria and for the fungi, respectively, in an orbital incubator (Sanyo MIR-220RU orbital incubator, Auro-Science Consulting Kft., Budapest, Hungary). Inoculated growth medium without any treatment was considered as growth control. For the colony-forming unit (CFU/mL) quantification, 1 mL of the treated and untreated samples were pipetted out and 10^5 times dilutions were prepared followed by spreading 50 μL of the test samples onto 20 mL respective nutrient-rich agar media containing petri-dishes and were incubated for 24 h at 35 ± 2 °C and 30 °C in the case of bacteria and fungi, respectively. The colony formation data (CFU/mL) were converted to percentages and the data were fitted using a non-linear dose–response curve fitting method to evaluate the drug concentrations producing approximately 90% microbial cell population growth (MEC_{10}) when compared to the untreated microbial cell populations after one hour of treatment. Three technical replicates in six independent experiments were performed in all the measurements. VAN and CAS were used as the standard antibacterial and antifungal drug controls throughout the experiments, respectively.

4.9. Quantification of Microbial Oxidative Stress Production in the Planktonic Cells

4.9.1. Combined ROS Generation Measurement

For the quantification of the combined (not specified separately) reactive oxygen species (ROS) generation, we have followed our previous protocol [4,20]. In brief, for the ROS measurements, mid-log phased $\sim 10^5$ cells/mL were collected and centrifuged at 1500 g (Hettich Rotina 420R bench-top centrifuge, Auro-Science Consulting Ltd., Budapest, Hungary) for 5 min and were re-suspended in PBS. The staining of the cells was done with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) stock solution (20 mM in DMSO) with a final concentration of 25 μM in each well, followed by incubation at 35 ± 2 °C for the bacteria and 30 °C for the fungi in the dark with mild rotation in a test tube rotator (Cole-Parmer Roto-Torque Variable Speed Rotator, InterLabSystems, Budapest, Hungary) for 30 min. The cells were re-suspended in modified RPMI 1640 medium after centrifugation followed by treatment with AEP, AET and AEE at their respective MEC_{10} concentrations for one hour. The fluorescence data were recorded by a fluorescence spectrophotometer/microplate reader (Hitachi F-7000 fluorescent spectrophotometer, Auro-Science Consulting Ltd., Budapest, Hungary) at $\text{Ex/Em} = 485/535$ nm in 96-well optiplates. VAN and CAS were used as the standard antimicrobial controls in the case of bacteria and fungi. ME treated samples were considered as the positive controls. The percentage increase (%) in the ROS generation was measured by comparing the signals obtained from the growth controls (GC). Six independent experiments with three technical replicates in each treatment were performed.

4.9.2. Detection of Peroxide (O_2^{2-}) and Superoxide Anion ($O_2^{\bullet-}$) Generation

Our previously described protocol was adapted for the peroxide and the superoxide anion radicals' measurements [20,47]. AEP, AET and AEE at their respective MEC_{10} concentrations were used to treat the mid-log phased ($\sim 10^5$ cells/mL) microbial cell suspensions followed by incubation in an orbital incubator at 35 ± 2 °C and 30 °C for the bacteria and fungi in modified RPMI 1640 medium for an hour, respectively. VAN and CAS were used as the standard antimicrobial controls in the case of bacteria and fungi. Menadione (ME) (0.5 mmol/L, end concentration) was used as the positive control throughout the experiments. The cells were centrifuged at 1500 g for 5 min at room temperature and were re-suspended in PBS at the original volume of the samples. DHR 123 (10 μ mol/L end concentration) and DHE (15 μ mol/L) were used to stain the microbial cell samples for the peroxide and superoxide determination and were further incubated at 35 ± 2 °C for the bacteria and 30 °C for the fungi in the dark with mild shaking. The samples were centrifuged again and were re-suspended in PBS, followed by even sample distribution into the 96-well microplates. For the peroxide measurements, the fluorescence was measured at Ex/Em: 500/521 nm, whereas, Ex/Em: 473/521 nm was used to detect the superoxide generation by a fluorescence spectrophotometer/microplate reader in 96-well optiplates. The percentage increase (%) in the oxidative stress was measured by comparing the signals obtained from the growth controls (GC). Six independent experiments were performed with three technical replicates for each treatment.

4.10. Microbial Cytotoxicity and Viability Kinetic Assays of Planktonics

The cytotoxicity and the viability of the microbial cells were performed with our previously published method [4,20]. Briefly, AEP, AET, AEE, VAN (bacteria) and CAS (fungi) at their respective MEC_{10} concentrations were used to treat the mid-log phased microbial cell populations ($\sim 10^5$ cells/mL) in modified RPMI 1640 medium followed by incubation in an orbital shaker-incubator at 35 ± 2 °C and 30 °C for the bacteria and fungi in modified RPMI 1640 medium. After that, the multi-parametric cytotoxicity and viability kinetic studies were performed (Sections 4.10.1–4.10.4.).

4.10.1. Determination of the Colony-Forming Unit (CFU/mL)

We followed our previously published protocol for determining the changes in the colony formation (CFU/mL) [4]. Briefly, 1 mL of the treated and the untreated samples were pipetted at the 0, 2, 6, 8, 16 and 24 h for the bacteria, and 0, 6, 12, 30, 36 and 48 h for the fungi, and were diluted 10^5 times followed by spreading 50 μ L onto 20 mL nutrient agar media with a cell spreader and incubation at 35 ± 2 °C (bacteria) and 30 °C (fungi) for 24 h. VAN and CAS were used as the reference controls for the bacteria and fungi. Controls prior to the treatment at 0 h were considered to be 100% and sigmoidal time interval vs. % CFU decrease was established for each test samples. Three technical replicates for each treatment in six independent experiments were performed.

4.10.2. Quantification of the Planktonics' Intracellular ATP and Total Protein Contents

The instructions provided by the manufacturer was followed for the intracellular ATP measurement of the microbial planktonics. In brief, 1 mL of both treated and untreated aliquots were sampled at time intervals of 0, 2, 6, 8, 16 and 24 h (for bacteria), and 0, 6, 12, 30, 36 and 48 h (for fungi) and were centrifuged at 1000 g for 5 min. The pellets were washed and were re-suspended in 1 mL PBS. Equal volume of the freshly prepared BacTiter-Glo reagent was pipetted to 100 μ L of PBS containing the planktonic cells in 96-well optiplates. The microplates were shaken in the dark at 4 °C for 15 min on an orbital shaker and the luminescence was measured using a Perkin Elmer EnSpire Multimode plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). All the measurements were calculated in terms of nmol/L from an ATP standard calibration curve and were converted to intracellular ATP over total protein content ratio (nmol/mg) followed by comparison with the controls prior to the treatment at 0 h. The PBS, VAN (for bacteria) and CAS (for fungi) were considered as the blank and standard

antimicrobial controls throughout the experiments. Three technical replicates were performed for each treatment in six independent experiments [48].

For the total protein content of the planktonics, we adapted the Bradford protein assay method [49]. One mL of AEP, AET and AEE treated samples were collected at time intervals of 0, 2, 6, 8, 16 and 24 h (for bacteria), and 0, 6, 12, 30, 36 and 48 h (for fungi) and were centrifuged at 1000 g for 5 min. The pellets were washed and were re-suspended in 1 mL NaOH (1 M) containing 100 mg of glass beads (425–600 μm) [50,51]. The collected samples were stabilized on ice for 5 min followed by 5 min vortexing with a mechanical cell disruptor (Scientific Industries SI analog cell disruptor (InterLabsystems, Budapest, Hungary), consecutively. The cycle was repeated three times and then the samples were centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C (Heraeus Multifuge 3 S-R bench-top centrifuge, Kendo Laboratory products, Osterode, Germany). The supernatants' microbial cell lysates were collected in separate 1.5 mL centrifuge tubes. Two hundred microliters of the freshly prepared Bradford reagent was added to a new 96-well general microplate containing 20 μL of the test samples lysates. The absorbance was measured at 595 nm by a multimode plate reader. NaOH, VAN and CAS treated samples were used as the blank, standard antibacterial and antifungal controls, respectively. Three technical replicates for each treatment in six independent experiments were performed. All the measurements were calculated in terms of mg/L from a BSA standard calibration curve and were compared to the 0 h samples [48].

4.10.3. Quantification of the Planktonics' Metabolic Activity

For the metabolic activity measurements, AEP, AET and AEE treated samples were pipetted at time intervals of 0, 2, 6, 8, 16 and 24 h (for bacteria), and 0, 6, 12, 30, 36 and 48 h (for fungi) and were centrifuged at 1000 g for 5 min. The pellets were washed and were re-suspended in 200 μL PBS containing resazurin (12.5 $\mu\text{mol/L}$) followed by 40 min of incubation at 30 °C. The fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer/microplate reader in 96-well optiplates at an Ex/Em: 560/590 nm wavelengths. The percentage (%) metabolic activity was estimated based on the fluorescence intensities of samples prior to the application of the treatment at 0 h which were considered to be 100%. A sigmoidal time interval vs % metabolic activity was established for each test samples. The PBS, VAN (for bacteria) and CAS (for fungi) were considered as the blank and standard antimicrobial controls throughout the experiments. Three technical replicates for each treatment in six independent experiments were performed [4].

4.10.4. Live/Dead Discrimination of the Planktonic Microbial Cells

Briefly, both untreated, AEP, AET and AEE treated samples were taken at 0, 2, 6, 8, 16 and 24 h (for bacteria), and 0, 6, 12, 30, 36 and 48 h (for fungi) following centrifugation at 1000 g for 5 min, washed and re-suspended in PBS (100 $\mu\text{L/mL}$). Freshly prepared 100 μL of the SYBR Green I/PI working solutions [4] were added to the samples. For 15 min, the plates were incubated in the dark with mild shaking at room temperature. Fluorescence intensities of the SYBR Green I and PI were measured in 96-well optiplates at an Ex/Em: 490/525 nm and 530/620 nm wavelengths, respectively, by a fluorescence spectrophotometer/microplate reader. The green to red fluorescence ratio for each sample and each dose was established and the % of the dead (non-viable) microbial cells with the response to the applied dose was plotted against the applied test compounds using our previous formula [20]. The VAN and CAS were considered as the standard antimicrobial controls, whereas, PBS was used as the blank. All the treatments were done in triplicates and six independent experiments were performed.

4.11. Determination of the Effects on Preformed Mature *Candida* Biofilms

The effects (Sections 4.10.1–4.10.4) on the mature *Candida* species biofilms and the treatment conditions were adapted from our previously published work [4]. Briefly, 200 μL of 24 h-old late-log phased ($\sim 10^6$ cells/mL) *C. albicans* and non-*albicans* species in modified RPMI 1640 medium were used to culture biofilms in the microplates prior to the treatments for 24 h at 30 °C. The microplates were washed in PBS followed by re-incubation in 200 μL modified RPMI 1640 medium containing AEP, AET

and AEE at MEC₁₀ concentrations (µg/mL) for further 24 h at 30 °C. Modified RPMI 1640 medium, untreated growth sample and CAS treated samples were considered as the blank, growth control (GC) and standard antimicrobial control (CAS), respectively. The biofilm degradation percentage (%) was measured based on the comparison of the values with those of the GC. All the treatments were performed in three technical replicates in six independent experiments.

4.11.1. Evaluation of the Total Fungal Biomass

The change in the biofilm biomass was determined by our previously published crystal violet assay [4]. After 24 h of incubation, the supernatant containing the test samples was pipetted out and the wells were washed with PBS. Two hundred microliters of methanol was added to each well in order to fix the biofilms. The supernatant was removed and 200 µL of 0.1% crystal violet in absolute ethanol was pipetted into each well. The crystal violet solution was pipetted out and 200 µL of acetic acid (33% v/v in double distilled water working stock) was pipetted to the crystal violet pre-stained biofilms to release the bound stains. Subsequently, 20 min later, the acetic acid-dissolved dye from the stained biofilms was pipetted into the wells of general microplates. The absorbance was measured at 590 nm by a multimode plate reader. The CAS was considered as the standard antifungal control. The change in the percentage (%) biofilm biomass was evaluated from the growth control (GC) values which were taken as 100% fungal biofilm biomass. Three technical replicates in each treatment for six independent experiments were considered.

4.11.2. Metabolic Activity in the Biofilms

A resazurin-derived fluorescent technique was adapted from our previously published protocol to determine the metabolic activity in the fungal biofilms [4]. Briefly, after 24 h of the treatment with AEP, AET and AEE at their respective MEC₁₀ concentrations, all of the supernatants were removed followed by rinsing the wells with the PBS. Two hundred microliters of sterile PBS containing resazurin (12.5 µmol/mL) was pipetted into the wells and was incubated at 30 °C for 40 min. The fluorescence intensities were recorded at an Ex/Em: 560/590 nm wavelengths, respectively, by a fluorescent spectrophotometer/microplate reader. The percentage (%) metabolic activity measurements were evaluated based on the fluorescence values recorded by the growth control (GC), which was considered as 100%. The PBS was taken as the blank throughout the measurements. Six independent experiments were performed with three technical replicates for each treatment.

4.11.3. Viability Assay of the Biofilms

For the discrimination of the live/dead fungal cells in the biofilms, we have followed a method previously published [4,17]. After 24 h of treatment with AEP, AET and AEE, at their respective MEC₁₀ concentrations in modified RPMI 1640 medium, the planktonic cells were pipetted out, followed by rinsing and filling of the biofilm-attached wells with 100 µL PBS. One hundred microliters of SYBR Green I/PI working solutions [17] were pipetted into the wells of the microplate. The plates were incubated at room temperature for 15 min in the dark with mild shaking. A fluorescence spectrophotometer/microplate reader was used to measure the fluorescent intensities at an Ex/Em: 490/525 nm and 530/620 nm for SYBR Green I and PI, respectively, into 96-well optiplates. The green to red fluorescence ratio for each sample and each dose was established, and the % of the dead microbial cells with the response to the applied dose was plotted against the applied test compounds using our previous formula [17]. All treatments were done using three technical replicates in six independent experiments.

4.11.4. Determination of the *Candida* Biofilms' Intracellular ATP and Total Protein Contents

The instructions provided by the company was followed for the intracellular ATP measurement of the *Candida* mature biofilms. In brief, after 24 h of the treatment with AEP, AET and AEE, the planktonic cells were pipetted out, followed by rinsing the biofilm and pipetting 100 µL of PBS into every well

of the microplate. An equal volume of the freshly prepared BacTiter-Glo reagent was pipetted into the wells containing the biofilms submerged in the PBS. The microplates were shaken in the dark at 4 °C for 15 min on an orbital shaker. The content of the microplates was transferred to 96-well optiplates and the luminescence was measured using a multimode plate reader. All measurements were quantified by using an ATP standard calibration curve and were converted to intracellular ATP over total protein content ratio (nmol/mg) followed by comparison with the growth control (GC). The PBS and CAS were used as the blank and the standard antifungal controls, respectively. Three technical replicates for each treatment in six independent experiments were performed [49].

For the measurement of the total protein content in the biofilms, parallel to the microplate cultures the biofilms were produced and treated in 35 mm diameter sterile petri dishes with identical surface properties to those of the microplates. We have adapted the Bradford protein assay method [49]. Briefly, after 24-hour treatment of the mature biofilms with AEP, AET and AEE, the planktonic cells were pipetted out and biofilms were rinsed with PBS. The biofilms were scraped out from the petri dishes using a cell scraper into sterile 1.5 mL centrifuge tubes containing 1 mL NaOH (1 M) and 100 mg of glass beads (425–600 µm). The collected samples were stabilized on ice for 5 min, followed by 5 min vortexing, consecutively. The cycle was repeated three times and then the samples were centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C. The supernatants' fungal cell lysates were pipetted out and were diluted in NaOH (1 M) up to the initial volume used for the biofilm growth. Two hundred microliters of the homemade freshly prepared Bradford reagent were added to a new 96-well general microplate containing 20 µL of the test sample lysates. The absorbance was measured at 595 nm by a multimode plate reader. All the measurements were calculated in terms of mg/L from a BSA standard calibration curve. Total protein contents were referred to the surface area of the microplates in order to obtain the valid ATP/TP values. The NaOH and CAS treated samples were used as the blank and the standard antifungal controls, respectively. Three technical replicates for each treatment in six independent experiments were performed. All the measurements were calculated in terms of mg/L from a BSA standard calibration curve and were compared to the growth control (GC).

4.12. Stastical Analyses

All data are given as mean ± SD. Graphs and statistical analyses were conducted using OriginPro 2016 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA). All experiments were performed independently six times in triplicates and data were analyzed by one-way ANOVA test. *P*-values of <0.05 were considered statistically significant. The minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) and the minimum effective concentration (MEC₁₀) were calculated using a non-linear dose–response curve function as follows:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(LOG_x 0 - x)p}} \quad (1)$$

where A_1 , A_2 , $LOG_x 0$, and p are the bottom asymptote, top asymptote, center, and hill slope of the curve have been considered.

Supplementary Materials: The following are available online, Composition of the *Artemisia annua* L. essential oil analyzed by GC-MS and GC-FID instruments (Supplementary Table S1 and Figures S1–S6). TEM images of surface-modified silica nanoparticles (SNPs), results can be seen in Supplementary Figure S7.

Author Contributions: Conceptualization T.K., and A.S.; methodology S.D., B.V.-H., T.B., G.H., T.K. and A.S.; G.C. analysis G.M., L.M.; software, S.D.; formal analysis, S.D. and B.V.-H.; investigation, S.D. and B.V.-H.; resources, A.S.; data curation, S.D., B.V.-H.; writing—original draft preparation, S.D. and B.V.-H.; writing—review and editing, T.K. and A.S.; visualization, S.D. and B.V.-H.; supervision, T.K., and A.S.; funding acquisition A.S. and T.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The present work was funded by the University of Pécs, Medical School grant (KA-2018-17), and was also supported by EFOP 3.6.1-16-2016-00004 project (Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies), University of Pécs. Transmission electron microscopy study was performed using JEOL-1400 TEM electron microscope that was funded by the grant GINOP-2.3.3-15-2016-0002 (New generation electron microscope: 3D ultrastructure).

Acknowledgments: We express our gratitude and many thanks to Mr. Bálint Fekete for his kind supply of *Artemisia annua* L. cultivated at his local farm in Békés county, Orosháza-Nagyszénás, Hungary. The authors gratefully acknowledge Shimadzu Corporation and Merck Life Science for their continuous support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bilia, A.R.; Santomauro, F.; Sacco, C.; Bergonzi, M.C.; Donato, R. Essential Oil of *Artemisia annua* L.: An Extraordinary Component with Numerous Antimicrobial Properties. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**, *2014*, 1–7.
2. Čavar, S.; Maksimović, M.; Vidic, D.; Parić, A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *37*, 479–485. [[CrossRef](#)]
3. Dib, I.; Angenot, L.; Mihamou, A.; Ziyat, A.; Tits, M. *Artemisia campestris* L.: Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological review. *J. Herb. Med.* **2017**, *7*, 1–10. [[CrossRef](#)]
4. Das, S.; Czuni, L.; Báló, V.; Papp, G.; Gazdag, Z.; Papp, N.; Kőszegi, T. Cytotoxic Action of Artemisinin and Scopoletin on Planktonic Forms and on Biofilms of *Candida* Species. *Molecules* **2020**, *25*, 476. [[CrossRef](#)]
5. Galal, A.M.; Ross, S.A.; Jacob, M.; ElSohly, M.A. Antifungal Activity of Artemisinin Derivatives. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1274–1276. [[CrossRef](#)]
6. Efferth, T. From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *46*, 65–83. [[CrossRef](#)]
7. Gnonlonfin, G.J.B.; Sanni, A.; Brimer, L. Review Scopoletin—A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2012**, *31*, 47–56. [[CrossRef](#)]
8. De Cremer, K.; Lanckacker, E.; Cools, T.L.; Bax, M.; De Brucker, K.; Cos, P.; Cammue, B.P.A.; Thevissen, K. Artemisinins, New Miconazole Potentiators Resulting in Increased Activity against *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 421–426. [[CrossRef](#)]
9. Ham, J.R.; Lee, H.-I.; Choi, R.-Y.; Sim, M.-O.; Choi, M.-S.; Kwon, E.-Y.; Yun, K.W.; Kim, M.-J.; Lee, M.-K. Anti-obesity and anti-hepatosteatosis effects of dietary scopoletin in high-fat diet fed mice. *J. Funct. Foods* **2016**, *25*, 433–446. [[CrossRef](#)]
10. Loewenberg, J.R. Observations on scopoletin and scopolin metabolism. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 361–366. [[CrossRef](#)]
11. Héthelyi, E.B.; Cseko, I.B.; Grósz, M.; Márk, G.; Palinkás, J.J. Chemical Composition of the *Artemisia annua* Essential Oils from Hungary. *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 45–48. [[CrossRef](#)]
12. Ho, W.E.; Peh, H.Y.; Chan, T.K.; Wong, W.S.F. Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacol. Ther.* **2014**, *142*, 126–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Radulović, N.S.; Randjelović, P.J.; Stojanović, N.M.; Blagojević, P.D.; Stojanović-Radić, Z.Z.; Ilić, I.R.; Djordjević, V.B. Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *58*, 37–49. [[CrossRef](#)]
14. Wan, X.L.; Niu, Y.; Zheng, X.C.; Huang, Q.; Su, W.P.; Zhang, J.F.; Zhang, L.L.; Wang, T. Antioxidant capacities of *Artemisia annua* L. leaves and enzymatically treated *Artemisia annua* L. in vitro and in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2016**, *221*, 27–34. [[CrossRef](#)]
15. Bouyahya, A.; Abrini, J.; Dakka, N.; Bakri, Y. Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. *J. Pharm. Anal.* **2019**, *9*, 301–311. [[CrossRef](#)]
16. Donsì, F.; Ferrari, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J. Biotechnol.* **2016**, *233*, 106–120. [[CrossRef](#)]
17. Das, S.; Gazdag, Z.; Szente, L.; Meggyes, M.; Horváth, G.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Kuzma, M.; Kőszegi, T. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin—captured essential oils. *Food Chem.* **2019**, *278*, 305–313. [[CrossRef](#)]
18. Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N.; Mnif, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* **2016**, *3*, 25. [[CrossRef](#)]
19. Donato, R.; Santomauro, F.; Bilia, A.R.; Flamini, G.; Sacco, C. Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 1251–1254. [[CrossRef](#)]

20. Das, S.; Horváth, B.; Šafranko, S.; Jokić, S.; Széchenyi, A.; Kőszegi, T. Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations. *Molecules* **2019**, *24*, 4321. [[CrossRef](#)]
21. Pina-Barrera, A.M.; Alvarez-Roman, R.; Baez-Gonzalez, J.G.; Amaya-Guerra, C.A.; Rivas-Morales, C.; Gallardo-Rivera, C.T.; Galindo-Rodriguez, S.A. Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). *IEEE Trans. NanoBioscience* **2019**, *18*, 549–557. [[CrossRef](#)]
22. Manion, C.R.; Widder, R.M. Essentials of essential oils. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* **2017**, *74*, e153–e162. [[CrossRef](#)]
23. Omonijo, F.A.; Ni, L.; Gong, J.; Wang, Q.; Lahaye, L.; Yang, C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim. Nutr.* **2018**, *4*, 126–136. [[CrossRef](#)]
24. Abarca, R.L.; Rodríguez, F.J.; Guarda, A.; Galotto, M.J.; Bruna, J.E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chem.* **2016**, *196*, 968–975. [[CrossRef](#)]
25. Wang, T.; Li, B.; Si, H.; Lin, L.; Chen, L. Release characteristics and antibacterial activity of solid state eugenol/ β -cyclodextrin inclusion complex. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, *71*, 207–213. [[CrossRef](#)]
26. Alizadeh Behbahani, B.; Tabatabaei Yazdi, F.; Vasiee, A.; Mortazavi, S.A. *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microb. Pathog.* **2018**, *114*, 449–452. [[CrossRef](#)]
27. Tang, X.; Shao, Y.-L.; Tang, Y.-J.; Zhou, W.-W. Antifungal Activity of Essential Oil Compounds (Geraniol and Citral) and Inhibitory Mechanisms on Grain Pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2018**, *23*, 2108. [[CrossRef](#)]
28. Alastruey-Izquierdo, A.; Gomez-Lopez, A.; Arendrup, M.C.; Lass-Flörl, C.; Hope, W.W.; Perlin, D.S.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M. Comparison of Dimethyl Sulfoxide and Water as Solvents for Echinocandin Susceptibility Testing by the EUCAST Methodology. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2509–2512. [[CrossRef](#)]
29. Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Uchida, K.; Yamaguchi, H. Effect of Sealing and Tween 80 on the Antifungal Susceptibility Testing of Essential Oils. *Microbiol. Immunol.* **2001**, *45*, 201–208. [[CrossRef](#)]
30. Memar, M.Y.; Ghotaslou, R.; Samiei, M.; Adibkia, K. Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: Current insights. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *11*, 567–576. [[CrossRef](#)]
31. Dohare, S.; Dubey, S.D.; Kalia, M.; Verma, P.; Pandey, H.; Singh, K.; Agarwal, V. Anti-biofilm activity of *Eucalyptus globulus* oil encapsulated silica nanoparticles against *E. coli* biofilm. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2014**, *5*, 5013–5018.
32. Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J.C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1631–1640. [[CrossRef](#)]
33. Zhou, Y.; Sun, S.; Bei, W.; Zahi, M.R.; Yuan, Q.; Liang, H. Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *112*, 7–13. [[CrossRef](#)]
34. Horváth, B.; Balázs, V.L.; Horváth, G.; Széchenyi, A. Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles for *Streptococcus mutans* biofilm inhibition. *Flavour Frag. J.* **2018**, *33*, 385–396. [[CrossRef](#)]
35. Bankier, C.; Cheong, Y.; Mahalingam, S.; Edirisinghe, M.; Ren, G.; Cloutman-Green, E.; Ciric, L. A comparison of methods to assess the antimicrobial activity of nanoparticle combinations on bacterial cells. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192093. [[CrossRef](#)]
36. Pape, W.J.; Pfannenbecker, U.; Hoppe, U. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol. Toxicol.* **1987**, *1*, 525–536.
37. Aveyard, R.; Binks, B.P.; Clint, J.H. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100–102*, 503–546. [[CrossRef](#)]
38. Drobna, E.; Gazdag, Z.; Culakova, H.; Dzugasova, V.; Gbelska, Y.; Pesti, M.; Subik, J. Overexpression of the *YAP1*, *PDE2*, and *STB3* genes enhances the tolerance of yeast to oxidative stress induced by 7-chlorotetrazolo[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine. *FEMS Yeast Res.* **2012**, *12*, 958–968. [[CrossRef](#)]
39. Fujs, Š.; Gazdag, Z.; Poljšak, B.; Stibilj, V.; Milacic, R.; Pesti, M.; Raspor, P.; Batic, M. The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. *J. Basic Microbiol.* **2005**, *45*, 125–135. [[CrossRef](#)]

40. Eruslanov, E.; Kusmartsev, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*; Armstrong, D., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2010; Volume 594, pp. 57–72. ISBN 978-1-60761-410-4.
41. Orosz, E.; Antal, K.; Gazdag, Z.; Szabó, Z.; Han, K.-H.; Yu, J.-H.; Pócsi, I.; Emri, T. Transcriptome-Based Modeling Reveals that Oxidative Stress Induces Modulation of the AtfA-Dependent Signaling Networks in *Aspergillus nidulans*. *Int. J. Genomics* **2017**, *2017*, 1–14. [[CrossRef](#)]
42. Ács, K.; Bencsik, T.; Böszörményi, A.; Kocsis, B.; Horváth, G. Essential Oils and Their Vapors as Potential Antibacterial Agents against Respiratory Tract Pathogens. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1702–1712. [[CrossRef](#)]
43. Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69. [[CrossRef](#)]
44. Sanders, E.R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *J. Vis. Exp. JoVE* **2012**, *63*, 3064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pernodet, N.; Maaloum, M.; Tinland, B. Pore size of agarose gels by atomic force microscopy. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 55–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Moscho, A.; Orwar, O.; Chiu, D.T.; Modi, B.P.; Zare, R.N. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 11443–11447. [[CrossRef](#)]
47. Stromájer-Rácz, T.; Gazdag, Z.; Belágyi, J.; Vágvölgyi, C.; Zhao, R.Y.; Pesti, M. Oxidative stress induced by HIV-1 F34IVpr in *Schizosaccharomyces pombe* is one of its multiple functions. *Exp. Mol. Pathol.* **2010**, *88*, 38–44. [[CrossRef](#)]
48. Sali, N.; Nagy, S.; Poór, M.; Kőszegi, T. Multiparametric luminescent cell viability assay in toxicology models: A critical evaluation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2016**, *79*, 45–54. [[CrossRef](#)]
49. Kőszegi, T.; Sali, N.; Raknić, M.; Horváth-Szalai, Z.; Csepregi, R.; Končić, M.Z.; Papp, N.; Poór, M. A novel luminol-based enhanced chemiluminescence antioxidant capacity microplate assay for use in different biological matrices. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2017**, *88*, 153–159. [[CrossRef](#)]
50. Dobson, A.J.; Boulton-McDonald, R.; Houchou, L.; Svermova, T.; Ren, Z.; Subrini, J.; Vazquez-Prada, M.; Hoti, M.; Rodriguez-Lopez, M.; Ibrahim, R.; et al. Longevity is determined by ETS transcription factors in multiple tissues and diverse species. *PLoS Genet.* **2019**, *15*, e1008212. [[CrossRef](#)]
51. Yu, T.; Zhou, Y.J.; Huang, M.; Liu, Q.; Pereira, R.; David, F.; Nielsen, J. Reprogramming Yeast Metabolism from Alcoholic Fermentation to Lipogenesis. *Cell* **2018**, *174*, 1549–1558.e14. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of AEP, AET and AEE are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Formulation of Tioconazole and *Melaleuca alternifolia* Essential Oil Pickering Emulsions for Onychomycosis Topical Treatment

Barbara Vörös-Horváth ¹, Sourav Das ^{2,3}, Ala' Salem ¹, Sándor Nagy ¹, Andrea Böszörményi ⁴, Tamás Kőszegi ^{2,3}, Szilárd Pál ^{1,*} and Aleksandar Széchenyi ^{1,*}

¹ Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; barbara.horvath@aok.pte.hu (B.V.-H.); ala.salem@aok.pte.hu (A.S.); sandor.nagy@aok.pte.hu (S.N.)

² Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; pharma.souravdas@gmail.com (S.D.); kozzegi.tamas@pte.hu (T.K.)

³ János Szentágothai Research Center, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary

⁴ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Semmelweis University, H-1085 Budapest, Hungary; aboszormenyi@gmail.com

* Correspondence: szilard.pal@aok.pte.hu (S.P.); szechenyi.aleksandar@gytk.pte.hu (A.S.); Tel.: +36-72-501-500 (ext. 23554) (S.P.); +36-72-501-500 (ext. 28801) (A.S.)

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editors: Marina A. Dobrovolskaia and Francesca Mancianti

Received: 13 October 2020; Accepted: 23 November 2020; Published: 26 November 2020



Abstract: Onychomycosis is a disease that affects many adults, whose treatment includes both oral and topical therapies with low cure rates. The topical therapy is less effective but causes fewer side effects. This is why the development of an effective, easy to apply formulation for topical treatment is of high importance. We have used a nanotechnological approach to formulate Pickering emulsions (PEs) with well-defined properties to achieve site-specific delivery for antifungal drug combination of tioconazole and *Melaleuca alternifolia* essential oil. Silica nanoparticles with tailored size and partially hydrophobic surface have been synthesized and used for the stabilization of PEs. In vitro diffusion studies have been performed to evaluate the drug delivery properties of PEs. Ethanolic solution (ES) and conventional emulsions (CE) have been used as reference drug formulations. The examination of the antifungal effect of PEs has been performed on *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum* as main pathogens. In vitro microbiological experimental results suggest that PEs are better candidates for onychomycosis topical treatment than CE or ES of the examined drugs. The used drugs have shown a significant synergistic effect, and the combination with an effective drug delivery system can result in a promising drug form for the topical treatment of onychomycosis.

Keywords: pickering emulsions; onychomycosis topical treatment; tioconazole; tea tree essential oil; antifungal activity

1. Introduction

Onychomycosis is a fungal infection of nails and nail bed and occurs on both finger and toenails. This fungal infection affects about 11.4% [1] of the adult population and is responsible for more than 50% of nail diseases [2]. For the treatment of onychomycosis, oral, topical, mechanical, and chemical therapies or a combination of these methods are used in practice [3]. The therapy is a long process (10–12 months) and has a poor cure rate [4]. Oral therapy is the most effective, but in the case of prolonged use, orally administered drugs can cause severe side effects because of their high toxicity [5].

Drug interactions can also occur, which is the main reason for the contraindication of oral therapy. In such cases, topical therapy is recommended, and it is a more attractive alternative for patients. Unfortunately, the topical treatment of onychomycosis is limited because the nail plate acts as a barrier to drug diffusion. Its hydrophilic nature and keratinized structure reduce the diffusion of high molecular weight or lipophilic antifungal drugs [6]. In order to enhance the penetration of drugs, diffusion enhancers (e.g., mechanical pretreatment [7], phosphoric acid [8], keratolytes [9]) or an appropriate formulation should be used [3].

The azole antifungal agents have been used since 1980 for topical and oral therapy of fungal infections, among others for onychomycosis; in clinical treatment, they are used for superficial and systemic fungal infections with safety [10]. The water solubility of generally applied antifungal azole derivatives in the treatment of fungal nail infections is very low (<0.01 mg/mL) [10]; therefore, their formulation contains organic solvents in most cases. Commercially available nail lacquers contain organic solvents to increase the solubility of antifungal drugs, but these solvents act unfavorably to the drug permeability [11]. Their restricted drug delivery ability is caused by the rapid evaporation of organic solvents, so some drugs remain on the surface of the nail [12]. Several researches have proved that drugs with aqueous-based formulations have higher nail permeability than non-aqueous ones [13,14]. Another problem with azole derivatives is that fungi can become resistant to the drug in a long-lasting treatment [15]. A combination of azoles with antifungal essential oil (EO) could solve this problem because fungi cannot easily acquire resistance to multiple antifungal components of EOs [16]. Moreover, the azole derivatives could show synergistic antifungal activity with some essential oils (EOs) [17], presumably because of their different mode of action. The azole derivatives inhibit the action of cytochrome P-450 enzyme, lanosterol demethylase of fungi [18], thereby preventing the synthesis of ergosterol, while the EOs damage the cell membranes and organelles of fungi [19]. Because of the lipophilic character of azole derivatives [10], it is likely that it can be dissolved in lipophilic EO, and their solution can be used for drug formulation.

The oil in water type emulsions as water-based drug formulations can provide a possible way to overcome the water solubility problems. Conventionally, the emulsions are stabilized with surfactants. In a long-lasting topical treatment, the use of surfactants should be avoided because they can cause irritation and side effects, or in some cases, they can get into the blood circulation [20]. Using particle-stabilized emulsions, i.e., Pickering emulsions (PEs) [21] instead of a conventional emulsion, has several advantages. The solid particles spontaneously adsorb on the oil-water interface and form a shell-like structure on the PE droplet surface [22]. This adsorption can be considered as irreversible adsorption because the solid particles have higher adsorption energy than surfactants on oil-water interfaces [23], so the stability of PEs can be the same or better than conventional emulsions. Another important parameter for emulsion-based drug formulation and therapy is the size of emulsion droplets. The droplet size of PE can be influenced by several parameters, such as emulsification time and energy, oil to solid particle volume ratio, and concentration of oil phase [24]. The fungal hypha damages the nail structure, creating pores in μm size range [25], with porosity in the 5–20% range depending on pretreatment of the nail [26]. An emulsion droplet with the appropriate size could penetrate into the porous nail structure and retain the antifungal drug on the nail bed for a longer period, which is the main site of reinfection [27], and thereby a targeted drug delivery can be achieved. Inert and biocompatible particles should be chosen as stabilizing particles in PEs drug formulation.

Silica nanoparticles (SNPs) are widespread in pharmaceutical technology in topical treatments because of their favorable chemical and surface properties, thermal stability, mechanical resistance, and biocompatibility [28,29]. The effects of topically applied SNPs have been examined in detail [30], and it has been found that they have no toxic effect even after prolonged usage. Because of the above-mentioned advantageous properties of SNPs, they can be suitable for PEs stabilization. The PEs are most stable when the partial wetting conditions of stabilizing particles are the same for the oil and water phase [31]. The native SNPs are hydrophilic because of the high number of free silanol groups at

their surface [32], which has to be modified with organic ligands to achieve appropriate wettability and strong stabilizing effect.

In the present study, our aim was to formulate PE of an azole derivative and antifungal essential oil as an alternative formulation for onychomycosis topical treatment. Tioconazole (TIO) has a broad antifungal activity for common dermatophytes, which has proved to be efficient for the topical treatment of fungal infections [33]. Nenoff et al. determined that *Melaleuca alternifolia* (MA) EO (tea tree EO) inhibited the growth of several clinical fungal isolates, so they suggested its use in the topical treatment of fungal infections [34]. For PE formulation, we used the solution of TIO in MA EO. Synthesis and surface modification of SNPs with different sizes were performed, and they were used as stabilizing agents of PEs. We characterized the stability, droplet size, and emulsion type of PEs. In vitro diffusion studies were also performed through artificial membranes. The aim of the in vitro diffusion test was to compare drug delivery characteristics of different formulations in the membranes that have similar porous structure and surface properties as the nail plate and nail bed. The antifungal activity against *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum*—the species mainly responsible for fungal nail infections—has been investigated [3].

2. Results and Discussion

2.1. Characterization and In Vitro Diffusion Study of PEs

2.1.1. Characterization of SNPs

The size distribution and PDI values for synthesized and surface-modified SNPs were determined by DLS and TEM. Data for mean diameter and PDI values are presented in Table 1. The TEM images showed that SNPs were monodispersed, spherical, and had a smooth surface. It can be clearly seen that the size and morphology did not change significantly during the surface modification (Table 1 and Figure 1). The surface modification of SNPs was confirmed by FTIR spectroscopy; the results were previously published [35].

Table 1. Properties of SNPs. HS: hydrophilic particle. ET: with ethyl functional group modified particle. Size represented as mean \pm SD of three parallel syntheses. The numbers refer to the particle sizes.

Samples	d_{DLS} (nm)	PDI_{DLS}	d_{TEM} (nm)	PDI_{TEM}
20HS	20.1 \pm 0.2	0.008	20.0	0.011
50HS	52.7 \pm 0.9	0.017	53.0	0.037
100HS	105.2 \pm 3.6	0.021	103.0	0.083
20ET	20.1 \pm 0.8	0.158	22.0	0.210
50ET	54.2 \pm 2.7	0.178	55.0	0.337
100ET	110.7 \pm 4.1	0.231	112.0	0.349

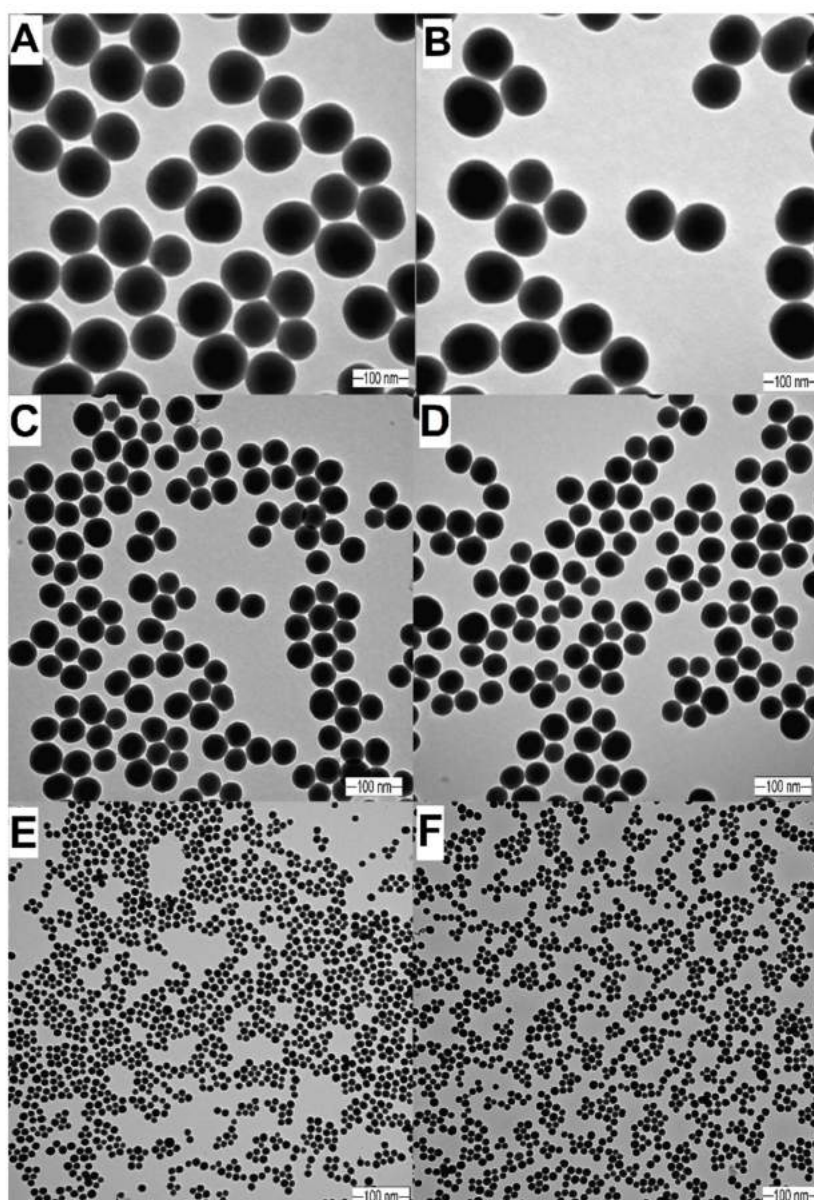


Figure 1. TEM images of silica nanoparticles (SNPs). (A): HS100, $d = 103.0$ nm. (B): ET100, $d = 110.7$ nm. (C): HS50, $d = 53.0$ nm. (D): ET50, $d = 55.0$ nm. (E): HS20, $d = 20.0$ nm. (F): ET20, $d = 20.0$ nm.

2.1.2. GC Analysis of *Melaleuca Alternifolia* EO

The composition of MA was determined by gas chromatography. The components were identified by comparing their retention times and relative retention factors with standards and oils of known composition. Two parallel measurements were performed. The main compounds were *p*-cymene 35.2% and terpinene-4-ol 32.5%. A detailed composition is presented in Table 2.

Table 2. Composition of *Melaleuca alternifolia* EO. The results of GC analysis showed the average of the two parallel measurements in the percentage of volatile compounds. The main components of MA have been highlighted.

Compounds	Retention Time t_R (min)	Percentage Ratio of Compounds (%)
α -thujene	5	1.7
α -pinene	5.2	4.6
β -phellandrene	5.2	0.6
β -pinene	6.2	1.2
β -mycrene	6.4	0.8
α -terpinene	7.0	1.4
<i>p</i>-cymene	7.3	35.2
terpinyl-acetate	7.3	2.1
cineole	7.4	5.8
γ -terpinene	8	7.6
terpinolene	8.6	1.7
terpinene-4-ol	10.7	32.5
α -terpineol	11	2.6
aromadendrene	15.5	0.7
epiglobulol	16.4	1.2

2.1.3. Characterization of PEs

Properties of PEs are influenced by many parameters, like the interfacial surface tension of the phases, size, wettability, and concentration of stabilizing particles, o/w phase ratio, and emulsification energy. In this study, we examined the influence of the o/w phase ratio and size of the stabilizing SNPs on the droplet size and stability of formulated PEs, while other parameters were kept constant.

The results can be seen in Table 3, including data for composition, droplet size, and appearance of PEs. For the microbiological experiments and in vitro diffusion studies, we used emulsions that were stable for at least one week, which means that their droplet size did not change within this period, and creaming, phase separation, aggregation, or sedimentation of SNPs did not occur.

As shown by Binks and Horozov [31], the size of stabilizing particles influences the emulsion droplet size at the same o/w phase ratio. We found that the increment of oil phase concentration caused an increment of emulsion droplet size at all examined oil phase concentrations. When 20 nm SNPs were used, the droplet size increased until reaching a droplet size of 1.8 μm . Further increment of oil phase concentration did not cause significant droplet size increment, and the stability of emulsions was much higher in the 11.16–16.12 mg/mL concentration range (for oil phase) (see Table 3). We observed a similar effect when 50 nm SNPs were used in the 4.48–11.19 mg/mL concentration range and 1.6 μm droplet size (Table 3). We could not observe such behavior for PE 100ET. In this case, the droplet size continuously increased as the oil phase concentration increased, and the stability of emulsions was much lower (less than one week).

The stability of PE was also influenced by the size of the stabilizing SNPs. We found that with the increasing SNPs size, the stability of PE decreased, at the same o/w ratio. The PE stability was 20 weeks using 20ET, 8 weeks for 50ET, and 1 week for 100ET SNPs, at 11.19 mg/mL oil phase concentration. The zeta potential values of PEs could also provide their colloidal stability, whose values did not differ significantly from the SNPs suspensions. The zeta potential of 20ET, 50ET, and 100ET SNPs was -28.3 , -25.2 , and -25.0 mV, while the values of PE 20ET, PE 50ET, and PE100Et in the 0.90–17.91 mg/mL oil concentration range were from -28.0 to -19.3 mV, -24.9 to -19.0 mV, and -24.3 to -17.6 mV, respectively.

The type of emulsions was determined by conductivity measurements. The conductivity values of stabilizing SNPs suspended in distilled water were 215.0, 211.4, and 268.3 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ for 20ET, 50ET, and 100ET, respectively, while conductivity for the oil phase was 0.058 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. The conductivity values of PEs were in the 157.33–257.50 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ range, which means that all the PEs were o/w type emulsions.

Table 3. Parameters of Pickering emulsions of *Melaleuca alternifolia* EO and tioconazole stabilized with 20ET, 50ET, and 100ET SNPs. * These emulsions were creaming, but after 30 s shaking, their droplet size recovered to the original value, and they retained again their stability for 1 week.

PE 20ET			PE 50ET		PE 100ET	
Coil Phase (mg/mL)	Droplet Size (nm)	Stability	Droplet Size (nm)	Stability	Droplet Size (nm)	Stability
0.90	4306 ± 39.6	10 min	1280 ± 62.8	1 day	1070 ± 438.5	30 min
1.79	615 ± 22.2	30 min	1320 ± 95.9	1 day	1350 ± 531.8	30 min
2.69	890 ± 103.3	30 min	1440 ± 83.5	1 day	1630 ± 464.5	30 min
3.58	1250 ± 94.5	1 day	1650 ± 51.5	2 day	1730 ± 514.5	10 min
4.48	1320 ± 32.5	8 weeks	1670 ± 216.8	2 day	1850 ± 107.9	10 min
5.37	1440 ± 100.2	8 weeks	1620 ± 79.7	8 weeks	1890 ± 333.8	10 min
6.27	1470 ± 35.2	8 weeks	1610 ± 34.4	8 weeks	1950 ± 95.0	10 min
7.16	1470 ± 62.5	8 weeks	1670 ± 62.8	8 weeks	1940 ± 20.1	1 week *
8.96	1660 ± 56.7	8 weeks	1690 ± 70.4	8 weeks	2070 ± 51.2	1 week *
11.19	1890 ± 41.2	20 weeks	2200 ± 188.9	8 weeks	2200 ± 59.5	1 week *
13.43	1840 ± 141.0	20 weeks	2250 ± 170.8	2 weeks *	2800.0 ± 85.7	1 week
16.12	1820.0 ± 99.6	20 weeks	2080 ± 160.1	2 weeks *	2850 ± 184.3	1 week
17.91	1850 ± 496.6	8 weeks	2380 ± 157.0	2 weeks *	3090 ± 116.6	1 week
Coil Phase (mg/mL)	Appearance PET 20ET	Appearance PET 50ET	Appearance PET 100ET			
0.90	creaming	sedimentation	creaming			
1.79	creaming	sedimentation	creaming			
2.69	creaming	sedimentation	creaming			
3.58	opalescent	opalescent	creaming			
4.48	opalescent	opalescent	creaming			
5.37	opalescent	milky	creaming			
6.27	opalescent	milky	creaming			
7.16	opalescent	milky	milky			
8.96	opalescent	milky	milky			
11.19	milky	milky	milky			
13.43	milky	milky	aggregation, sedimentation			
16.12	milky	milky	aggregation, sedimentation			
17.91	opalescent	milky	aggregation, sedimentation			

2.1.4. In Vitro Diffusion Studies through Artificial Membranes

Our goal was to formulate an emulsion that is capable of delivering the antifungal drugs through the nail plate and retain the drugs in the site of the infection (nail bed) for a prolonged time to provide a sustained drug release. The diffusion studies of PEs on the artificial membranes were performed in Franz diffusion vertical cells in order to examine the drug delivery ability of the formulated PEs. For diffusion studies, we applied PEs, CE, and ES of the same concentration, 17.91 mg/mL, as an antifungal drug combination. Because of the droplet size similarity between the CE and PEs, we can assume that only the dosage form determined the diffusion properties of the drug.

We found that PEs possessed better drug delivery properties through agar gel membrane compared to CE and ES (Table 4 and Figure 2). We examined the diffusion properties of PEs with different droplet sizes and found that the PEs with smaller droplet size (1.85 µm) could deliver as much as 89.9% of TIO through the agar membrane. In the experiment where the composite membrane was used, we found that the ES had diffused through the composite membrane structure, and only a small portion (2.4%) of the drug remained in the composite membrane (Table 4 and Figure 3). The PE 20ET delivered 89.9% of TIO through the agar gel membrane, and only 5.7% had diffused through composite membranes, suggesting that 84.2% of the applied drug remained in the targeted area. This amount was 61.1% at PE 50ET and 45.13% at PE 100ET. These in vitro experimental results suggested that PEs had better on-site drug delivery properties.

Table 4. Results of in vitro diffusion studies. ES: ethanolic solution, CE: conventional emulsion, PE: Pickering emulsion, CA: cumulative TIO amount after 2 h. The concentration of TIO was 3.58 mg/mL in each formulation.

Samples	Stabilizing Agent	Droplet Size (nm)	CA Agar Gel (%)	CA Agar Gel (mg/cm ²)	CA Composite Membrane (%)	CA Composite Membrane (mg/cm ²)
ES	-	-	18.33	0.26	15.90	0.22
CE	Tween80	2470.0 ± 89.1	35.02	0.49	11.01	0.15
PE 20ET	20ET SNPs	1850 ± 496.6	89.88	1.26	5.70	0.08
PE 50ET	50ET SNPs	2380 ± 157.0	67.18	0.95	6.06	0.05
PE 100ET	100ET SNPs	3090 ± 116.6	45.22	0.63	0.09	0.001

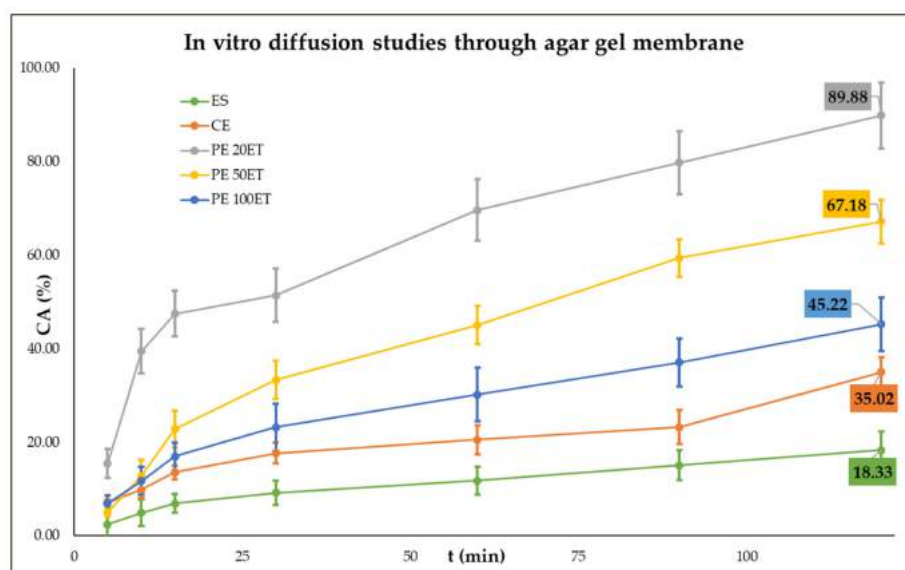


Figure 2. In vitro diffusion studies through agar gel membrane. ES: ethanolic solution, CE: conventional emulsion, PE: Pickering emulsion, CA: cumulative TIO amount after 2 h. $C_{TIO} = 3.58$ mg/mL.

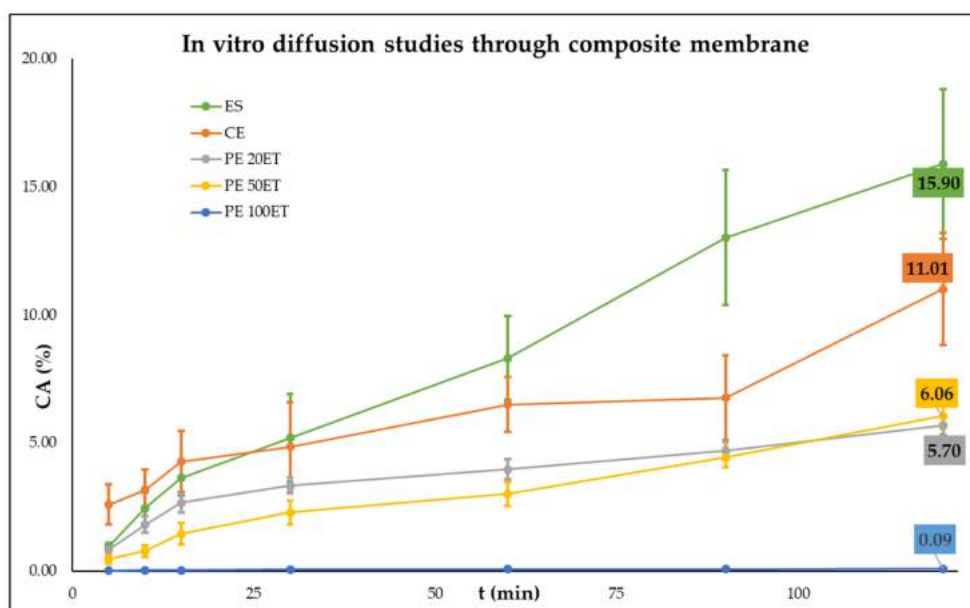


Figure 3. In vitro diffusion studies through the composite membrane. ES: ethanolic solution, CE: conventional emulsion, PE: Pickering emulsion, CA: cumulative TIO amount after 2 h. $C_{TIO} = 3.58$ mg/mL.

2.2. Microbiological Tests Using *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum*

Data obtained for the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) on *T. rubrum* and on *C. albicans* are shown in Table 5 and Figures 4 and 5 for the ethanolic solution of TIO (ES-TIO) and ethanolic solution of MA (ES-MA) and their combinations. The TIO and MA combination showed a significant synergistic effect. When *T. rubrum* and *C. albicans* were treated with the combination of TIO and MA, both the MIC and MFC values decreased significantly compared to the separately used drugs.

Analyzing the antimicrobial data of the different formulations of TIO and MA clearly showed that the PEs were more effective than CE or ES against the two pathogens. The PE 100ET showed the most effective growth inhibition against both *T. rubrum* and *C. albicans*, and this formulation had the highest fungicidal activity.

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the test samples in combinations on *T. rubrum* and on *C. albicans*.

Sample	<i>T. rubrum</i>		<i>C. albicans</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MFC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MFC ($\mu\text{g/mL}$)
ES-TIO	4.68	37.5	18.75	74.88
ES-MA	74.88	149.92	74.88	149.92
ES-TIO-MA	10.43	83.47	11.24	89.95
CE	5.21	83.47	11.24	89.95
PE 20ET	5.21	41.73	5.61	22.48
PE 50ET	2.6	20.86	2.8	11.24
PE 100ET	1.29	10.43	2.8	11.24

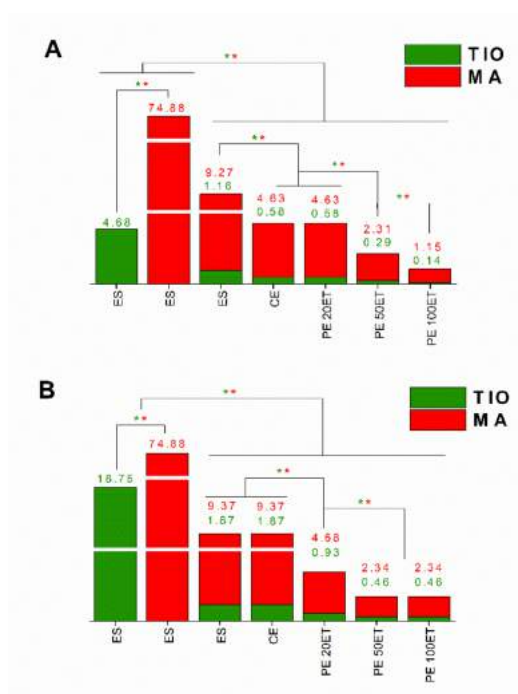


Figure 4. Minimum inhibitory concentration (MIC_{90}) of ES-TIO, ES-MA, ES-TIO-MA, CE-TIO-MA, PE 20ET-TIO-MA, PE 50ET-TIO-MA, and PE 100ET-TIO-MA in $\mu\text{g/mL}$ on *T. rubrum* (A) and *C. albicans* (B). Six independent experiments with three technical replicates were performed. The green (*) and red (*) asterisks represent a significance value of $p < 0.01$ for the MIC_{90} , respectively.

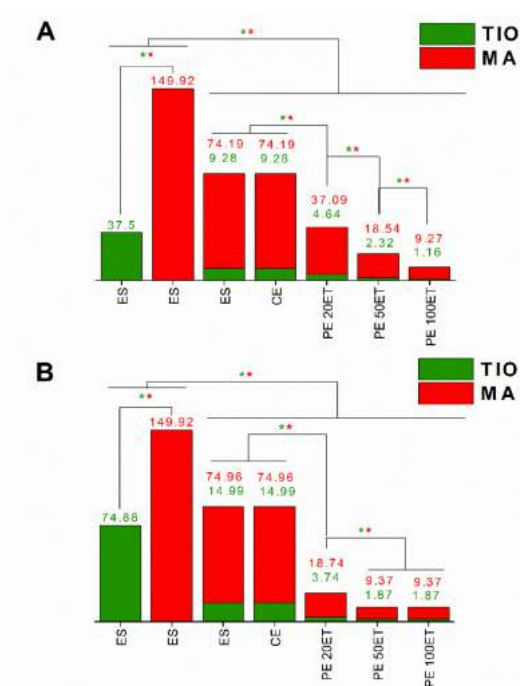


Figure 5. Minimum fungicidal concentration (MFC) of ES-TIO, ES-MA, ES-TIO-MA, CE-TIO-MA, PE 20ET-TIO-MA, PE 50ET-TIO-MA, and PE 100ET-TIO-MA in µg/mL on *T. rubrum* (A) and *C. albicans* (B). Six independent experiments with three technical replicates were performed. The green (*) and red (**) asterisks represent a significance value of $p < 0.01$ for the MFC, respectively.

3. Materials and Methods

3.1. Preparation and Characterization of Silica Nanoparticle-Stabilized Pickering Emulsions

3.1.1. Synthesis, Surface Modification, and Characterization of Silica Nanoparticles

Synthesis of hydrophilic SNPs (HS) was performed based on the work of Stöber et al. [36]. Size-selective synthesis parameters were set based on our previous work [37], as well as the reaction circumstances for surface modification. The synthesis route and details can be found in the Supplementary Materials. We previously reported that SNPs that have theoretical surface coverage of 20% with ethyl groups could stabilize the MA droplets to give a stable PE [24]. For the synthesis and surface modification of silica nanoparticles, the following chemicals were used: tetraethoxysilane ([TEOS] (Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe Germany, purity 98%), ethyltriethoxysilane ([ETES] Alfa Aesar Karlsruhe Germany, purity 96%), absolute ethanol (VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary, AnalaR NORMAPUR® ≥99.8%), and 28 m/m% ammonium solution (VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary, AnalaR NORMAPUR®, analytical reagent).

The size distribution was determined by dynamic light scattering (DLS) (Malvern Zetasizer Nano S, Malvern Panalytical Ltd., Great Malvern, Worcestershire, UK). The size distribution was confirmed, and the morphology of silica nanoparticles was studied by transmission electron microscopy (TEM) (JEOL-1400 electron microscopy, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). For TEM experiments, 400 mesh copper grids coated with carbon were used (Micro to Nano Ltd., Haarlem, Netherlands).

3.1.2. Gas Chromatography Analysis of *Melaleuca Alternifolia* Essential Oil

Solid-Phase Microextraction (SPME) Conditions

Samples were loaded into vials (20 mL headspace) sealed with a silicon/PTFE septum prior to SPME-GC/MS analysis. Sample preparation using the static headspace solid-phase microextraction

(SHS-SPME) technique was carried out with a CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) automatic multipurpose sampler using a 65 μM StableFlex polydimethyl siloxane/carboxene/divinyl benzene (CAR/PDMS/DVB) SPME fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA). After an incubation period of 5 min at 100 $^{\circ}\text{C}$, extraction was performed by exposing the fiber to the headspace of a 20 mL vial containing the sample for 10 min at 100 $^{\circ}\text{C}$. The fiber was then immediately transferred to the injector port of the GC/MS and desorbed for 1 min at 250 $^{\circ}\text{C}$, in split mode, and the split ratio was 1:90. The SPME fiber was cleaned and conditioned in a Fiber Bakeout Station in a pure nitrogen atmosphere at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min.

GC-MS Conditions

The analyses were carried out with an Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) system equipped with Supelco (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Hungary) SLB-5MS capillary column (30 m \times 250 μm \times 0.25 μm). The GC oven temperature was programmed to increase from 60 $^{\circ}\text{C}$ (3 min isothermal) to 250 $^{\circ}\text{C}$ at 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (1 min isothermal). High purity helium (6.0) was used as carrier gas at 1.0 mL/min (37 cm/s) in constant flow mode. The mass selective detector (MSD) was equipped with a quadrupole mass analyzer and was operated in electron ionization mode at 70 eV in full scan mode (41–500 amu at 3.2 scan/s). The data were evaluated using MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The identification of the compounds was carried out by comparing retention data and the recorded spectra with the data of the NIST 2.0 library. The percentage evaluation was carried out by area normalization.

3.1.3. Determination of Solubility of Tioconazole in *Melaleuca Alternifolia* Essential Oil

Solubility Calculations by Hansen Solubility Parameters (HSPs)

As a preliminary study, the calculations of solubility parameters were performed using the Hansen Solubility Parameters in Practice (HSPiP) software version 5.0.11 using the simplified molecular-input line-entry system (SMILES), obtained from PubChem. HSPs (Equation (1)) use group contribution to split the total cohesion energy of a solvent into contributions from atomic dispersion (δ_d), polar interactions (δ_p), and hydrogen bonding (δ_h) [38].

$$\delta = \left(\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \right)^{0.5} \quad (1)$$

Differences in solubility parameters were calculated with the HSP difference (Equation (2)). A value below that of the reported cut-off value 7 $\text{Mpa}^{0.5}$ indicates miscibility [39].

$$\Delta\delta = |\delta_{\text{solvent}} - \delta_{\text{tioconazole}}| \quad (2)$$

For the calculation, the three main components of MA were used (*p*-cymene, terpinene-4-ol, γ -terpinene), and it could be established that TIO can be dissolved in the EO. The results of the calculation can be found in Supplementary Materials Tables S2–S4. In order to determine the exact solubility of TIO in MA, the solvent addition method was performed (Section 3.1.3 Determination of Kinetic Solubility).

Determination of Kinetic Solubility

The kinetic solubility of TIO (tioconazole, purity $\geq 98\%$, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) in water-saturated MA (*Melaleuca alternifolia* essential oil, Tebamol[®], BIO-DIÄT-BERLIN GmbH, Berlin, Germany) was determined by the solvent addition method [40]. The examination was performed at ambient temperature (25 $^{\circ}\text{C}$). The initial suspension was prepared by weighing the exact amount of 1.0 mg TIO and the addition of 500 μL of MA. The volume of MA was increased until the suspension turned into a clear solution. The light scattering of suspension was determined visually and with

instrumental measurement of scattered light intensity (DLS, Malvern Zetasizer Nano S). The kinetic solubility of TIO in MA was found to be 0.213 mg/mL (23.8 *m/m%*). The concentration of TIO in MA was set to 20 *m/m%* for the PE preparations.

3.1.4. Preparation and Characterization of Pickering Emulsions

The concentration of emulsifiers in the water phase was set to 1 mg/mL and was kept constant for all experiments. Three different sizes of SNPs were used for PE formulation (20ET, 50ET, 100ET) and Tween80[®] surfactant (Tw80) (Polysorbate80 Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for conventional emulsions (CE). The concentration of oil phase varied between 0.90 and 17.91 mg/mL, and the ratio of TIO and MA was always constant (20 *m/m%*).

The emulsification was performed in two steps. The coarse emulsions were prepared by sonication for 2 min (Bandelin Sonorex RK 52H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany). The final emulsification was performed with UltraTurrax (IKA Werke T-25 basic, IKA Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Germany) for 2 min at 13,500 rpm. The emulsions' droplet size was determined with DLS using a Malvern Zetasizer Nano S instrument (Malvern Panalytical Ltd., Great Malvern, Worcestershire, UK). The stability of the emulsions was determined from periodical droplet size determination. The emulsions were stored at room temperature (25 °C).

The type of emulsions was determined with conductivity test using Mettler Toledo Seven2Go S3 conductivity meter (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Germany) and InLab[®] 738-ISM sensor (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Germany).

All experiments, measurements, and standard deviation calculations were performed from 3 parallel sample preparations.

3.1.5. In Vitro Diffusion Studies—Static Franz Diffusion Cell Method

Accepted models for testing drugs and their formulations for onychomycosis treatments include penetration tests through cadaver nails [41], nail clippings, bovine hoof slices, or keratin films [42] made from human keratin source. The non-uniformity of natural membranes causes huge inhomogeneity in the results [43–45], which makes the comparison of different formulations impossible. The aim of our study was to examine the diffusion properties of applied drugs in complex colloidal systems; therefore, in our opinion, the similarity in hydrophilicity and surface charge between the nail plate or nail bed and artificial membranes was of the highest importance for testing and comparison of the formulations. The nail plate acts as a negatively charged aqueous hydrogel, as it is described in the literature [46], and it has properties similar to that of the agar gel [47]. Based on the literature data obtained from independent researches, we compared the diffusion coefficient and flux of well-studied antibiotic chloramphenicol (5 mg/mL in phosphate-buffered saline) with different membranes, namely agar gel [48], bovine hoof slice, and cadaver nail plate [49]. We found that the diffusion coefficients and flux values were very similar for agar gel and bovine hoof slice membranes. Flux for bovine hoof was $4.07 \pm 1.18 \cdot 10^{-6}$ mg/cm²·s, for agar gel $1.96 \pm 0.47 \cdot 10^{-6}$ mg/cm²·s, and $8.21 \pm 2.11 \cdot 10^{-7}$ mg/cm²·s for the cadaver nail plate. The flux values for agar gel were closer to the value for the cadaver nail plate, which might suggest that agar gel is a good model membrane for water-based formulations.

The agar gel membrane was used to model the nail plate. The composite membrane, consisting of the agar gel layer on top of the cellulose acetate membrane, was used to simulate the complex structure of nail plate and nail bed since nail bed has similar properties as skin [50,51], and the cellulose membrane has been commonly used as a model for skin permeability [52]. The main aim of the study on two types of membranes was to examine whether the examined formulations could deliver the applied lipophilic drugs through agar gel as a model for nail plate, and the composite membrane was used to examine if the formulation could retain the drugs on the main site of the infection, namely nail bed. The amount of the drug transported through the membrane was calculated based on the amount introduced to the membrane. In the case of agar membrane, the goal was to prepare the drug delivery system that could deliver the highest drug amount through that membrane. The composite membrane

was used to test the on-site retention of drugs in different formulations. The amount of retained drug was calculated as a difference between the drug amount passed through the agar gel membrane and the amount passed through the composite membrane

For in vitro testing, the 2.1 mm thick 6 m/m% agar gel membrane (Agar powder, purity >95%, VWR Chemicals Ltd., Debrecen, Hungary) and the same agar gel membrane combined with 0.8 mm thick cellulose acetate with effective penetration area of 2.54 cm² (Membranfilter Porafil, Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Düren, Germany, pore size 0.2 µm) were used. Before each measurement, the agar gel was always freshly prepared. The agar powder was dispersed in demineralized water, and the mixture was boiled in a closed vial for 3 min until all agar was completely dissolved. Exactly 10 mL of agar gel was poured into a plastic vessel (i.d. 70.8 mm), then left to cool (25 °C) and gelate. After the gelation, the agar gel was soaked in PBS buffer for 12 h. Finally, the agar membrane was cut out with a sharp home-made tool and placed on the Franz cell. The cellulose acetate membranes were also freshly soaked in PBS buffer before the experiments.

The examination of diffusion properties was performed at 32 °C in static vertical Franz diffusion cells (Hanson Microette Plus, Hanson Research 60-301-106, Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, USA); six parallel cells with effective penetration area 2.54 cm² were used, and each experiment was made in triplicates. The volume of the receiver chamber was 7 mL; the receiver solution was PBS buffer. For PBS preparation, the following salts were used: NaCl (high purity, VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary), KCl (purity 99–100.5%, VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary), Na₂HPO₄·2H₂O (AnalaR NORMAPUR[®], purity ≥99.0%, VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary), and KH₂PO₄ (purity ≥99.0%, VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary). The 600 µL volume of emulsion or solution sample was placed into the donor chamber, and the diffusion was examined for 2 h; the stirring rate was 700 min⁻¹, and the samples were collected after 5, 10, 15, 30, 60, 90, and 120 min. The withdrawn sample volume was replaced with a fresh PBS buffer.

The TIO content was determined with HPLC measurements using UV-Vis detector (SPD 10-A, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany); the method is based on Bagary et al. [53]. Separations were carried out using a monolithic silica type column (ODS-AM302, S-5µm, 120A, YMC Co., Kyoto, Japan). The mobile phase consisted of methanol/0.02 M K₂HPO₄ = 85/15 V/V% and 0.2 V/V% trimethylamine (methanol dehydrated, ultrapure ≥99.8%, VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary; trimethylamine: HiPerSolv CHROMANORM[®], VWR Chemicals Ltd., Debrecen Hungary), pH = 7.0. The mobile phase was freshly filtered through Millipore Nylon membrane (pore size: 0.2 µm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) before the analysis. Isocratic elution was programmed with a 1.5 mL/min flow rate; the temperature of measurement was 32 °C. The detection wavelength of tioconazole was 254 nm, and its retention time was 3.5 min.

3.2. Microbiological Tests against *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum*

3.2.1. Instruments Used in the Microbiological Experiments

UV-Vis spectrophotometer (Hitachi U-3900, Hitachi High-Tech Corporation, Japan), microbiological incubator (Thermo Scientific Heraeus B12, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), Bürker cell counting chamber (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co., Germany), Multiskan EX 355 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) spectrophotometer were used throughout the experiments.

3.2.2. Materials Used in the Microbiological Experiments

For the microbiological experiments, the following materials were used: sterile 96-well microtiter plates (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria), potato dextrose agar (PDA) (BioLab, Budapest, Hungary), sterile filter inserts (pore size 10 µm) from PluriSelect (pluriSelect Life Science, Leipzig, Germany), dextrose, adenine, bacteriological peptone and agar-agar (Reanal Labor, Budapest, Hungary), sterile centrifuge tubes (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland),

homemade Sabouraud dextrose agar or SDA (containing 4% dextrose, 1% bacteriological peptone, and 1.5% agar-agar in double-distilled water), yeast extract peptone dextrose agar (containing 2% bacteriological peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, and 1.5% agar-agar in double-distilled water), 3-(*N*-Morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS) from Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany), and RPMI 1640 medium (containing 3.4% MOPS, 1.8% dextrose, and 0.002% adenine) from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Highly purified water (<1.0 μ S) was applied throughout the experiments.

3.2.3. Fungal Cultures and Inoculum Preparation

Trichophyton rubrum (*T. rubrum*) DSM 21146 and *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 001 were obtained from Leibniz Institute DSMZ GmbH (Braunschweig, Germany) and from Department of General and Environmental Microbiology (Institute of Biology, University of Pécs, Hungary), respectively.

We followed the methods described previously [54–57] for *T. rubrum* and *C. albicans* culture preparation. In brief, *T. rubrum* stock inoculum suspensions were prepared from 7-day old cultures grown on PDA at 28 °C for sporulation. Ten days later, the observed fungal colonies were flooded with 10 mL distilled water, followed by scraping the surface using a sterile loop. Conidia and hyphal mixed suspensions were withdrawn and were transferred to a sterile centrifuge tube through sterile filter inserts (10 μ m, pluriSelect) to remove hyphae, leaving a filtered inoculum containing spores only. The inoculum cell population was adjusted to 0.5 to 5×10^6 spores/mL visually using a Bürker cell counting chamber, followed by further turbidity calibration with a UV-Vis spectrophotometer (Hitachi U-3900) at 520 nm. The spores were further diluted to the desired population according to the experimental requirements.

C. albicans stock inoculum was prepared from 48 h old culture grown on YEPD agar plates at 30 °C. After 18 h of incubation at 30 °C in a microbiological incubator, on YEPD agar slant, the cells were looped out, diluted with 0.9% sterile saline, and were counted by a Bürker cell counting chamber, followed by turbidity calibration with a UV-Vis spectrophotometer (Hitachi U-3900) at 595 nm. The fungal cell population was set to $\sim 1 \times 10^6$ cells/mL and was diluted later according to the experimental designs.

3.2.4. Determination of Antifungal Activities

For the evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) of *T. rubrum* and *C. albicans*, we followed previously published methods [56–59]. The ethanolic solutions of TIO and MA in a wide concentration range (0.5–300 μ g/mL) were used for the assay. CE and PEs formulations were also tested; an initial concentration of the oil phase was 160 μ g/mL for *T. rubrum*, whereas 180 μ g/mL for *C. albicans* treatment was applied. The treating mixtures were further diluted up to 256 times in a serial half-dilution format.

One hundred microliters of fungal cell suspensions (see Sections 3.2.5 and 3.2.6) with equal fungal contents were applied thereafter to the microplate wells containing 100 μ L of the different samples. Detailed information on the assay conditions can be found in Sections 3.2.5 and 3.2.6. As a blank, suspensions of 20ET, 50ET, 100ET SNPs, pure ethanol, Tw80 solution were used.

3.2.5. Determination of Minimum Inhibitory Concentration of *T. rubrum*

The *T. rubrum*, inoculum size of $\sim 2.5 \times 10^4$ spores/mL, containing the test drugs in half-dilution format, was incubated in RPMI media for 7 days in a microbiological incubator at 28 °C. The microplates containing *T. rubrum* incubated for 7 days with the test drugs were evaluated following the protocol as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2. The untreated cell samples and the medium without cells were considered as the growth control and blank, respectively. The endpoint determination readings for the minimum inhibitory concentrations (MIC) were performed visually based on the comparison of the growth in the wells containing the test drugs with that of the growth control [60]. All evaluations were performed in triplicates in six independent experiments.

3.2.6. Determination of Minimum Inhibitory Concentration of *C. albicans*

A population size of $\sim 2 \times 10^3$ CFU/mL was incubated in RPMI media with the above-mentioned test drug concentration range at 30 °C for 48 h in the case of *C. albicans*. A Multiskan EX 355 spectrophotometer was used to measure the absorbance (at 595 nm) of the samples in the microtiter plate in the case of *C. albicans*. The absorbance values of the respective treatments were converted to a percentage and were compared to growth control (100%). The untreated fungal samples and the medium without cells were considered as the growth control and blank, respectively. All evaluations were performed in triplicates in six independent experiments.

3.2.7. Determination of the Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

Determination of MFC was performed using the methods as described earlier with modifications [56]. After performing the MIC, 10 µL of the content from each well (not visibly turbid) was inoculated onto sterile SDA plates. The plates were incubated at 30 °C for 48 h. MFC was evaluated as the lowest drug concentration, resulting in no growth ($\geq 99.9\%$ growth inhibition). Measurements were performed by applying three technical replicates in six independent experiments.

3.2.8. Statistical Analyses

The statistical analyses were conducted using a one-way ANOVA test (Origin 2016, OriginLab Corp., Northampton, MA, USA), and the significance was set at $p \leq 0.05$.

4. Conclusions

The choice of drugs used in this research was based on careful consideration. The TIO was chosen as a drug with high antifungal activity but low water solubility and permeability through the nail plate. MA EO was selected because of the antifungal activity and because it is a liquid and can be used as a solvent for TIO. The combination of the drugs applied in this study showed a significant synergistic effect. The solution of TIO in MA EO was successfully formulated into stable Pickering emulsions. In vitro studies have demonstrated that PEs are effective drug formulations that can provide site-specific and effective drug delivery through artificial membranes. 20ET PE achieved the highest drug delivery efficiency as it could deliver 40% of the drug introduced to the artificial membrane within 10 min. The amount delivered at this time was 572 µg of TIO through the agar model membrane, while the MFC of the TIO in this formulation was 4.69 µg/mL. To prove the real applicability of the suggested drug combination and PE formulation, we have to perform experiments on the natural nail model. Still, from the presented data, we can conclude that the application of both site-specific drug delivery and synergistic antifungal drug combinations is a promising route for the development of effective onychomycosis topical treatment formulation.

Supplementary Materials: The following are available online: Table S1. Parameters of hydrophilic and surface-modified silica nanoparticle synthesis. Table S2. HSPs of tioconazole and the three main components of *Melaleuca alternifolia* essential oil. Table S3. Calculated solubility parameters of tioconazole compared to the three main components of *Melaleuca alternifolia* essential oil. Table S4. Calculated solubility parameters.

Author Contributions: Conceptualization A.S. (Aleksandar Széchenyi), B.V.-H., S.P.; methodology B.V.-H., S.N., S.D., T.K.; formal analysis, B.V.-H.; investigation, B.V.-H., S.D., S.N., A.S. (Ala' Salem), A.B.; resources A.S. (Ala' Salem), T.K.; data curation A.S. (Ala' Salem); writing—original draft preparation, B.V.-H., A.S. (Aleksandar Széchenyi); writing—review and editing A.S. (Aleksandar Széchenyi); visualization, B.V.-H.; supervision, A.S. (Ala' Salem); funding acquisition A.S. (Ala' Salem), S.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The project has been supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund grant No. EFOP-3.6.1.-16-2016-00004 (Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs). Transmission electron microscopy studies were performed using the JEOL-1400 TEM electron microscope, which was funded by the grant GINOP-2.3.3-15-2016-0002 (New generation electron microscope: 3D ultrastructure). The work was also funded by the grant KA-2018-17, University of Pécs, Medical School.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sigurgeirsson, B.; Baran, R. The prevalence of onychomycosis in the global population—A literature study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2013**, *28*, 1480–1491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Scher, R. Onychomycosis is more than a cosmetic problem. *Br. J. Dermatol.* **1994**, *130*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Gupta, A.K.; Tu, L.Q. Therapies for Onychomycosis: A Review. *Dermatol. Clin.* **2006**, *24*, 375–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ameen, M.; Lear, J.T.; Madan, V.; Mohd, M.F.; Richardson, M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* **2014**, *171*, 937–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Gauwerky, K.; Borelli, C.; Korting, H.C. Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 214–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Stuttgen, G.; Bauer, E. Bioavailability, skin- and nail-penetration of topically applied antimycotics. *Mykosen* **1982**, *25*, 74–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Di Chiacchio, N.; Kaduc, B.V.; De Almeida, A.R.T.; Madeira, C.L. Nail abrasion. *J. Cosmet. Dermatol.* **2003**, *2*, 150–152. [[CrossRef](#)]
8. Repka, M.A.; Mididoddi, P.K.; Stodghill, S.P. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. *Int. J. Pharm.* **2004**, *282*, 95–106. [[CrossRef](#)]
9. Mohorčič, M.; Torkar, A.; Friedrich, J.; Kristl, J.; Murdan, S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2007**, *332*, 196–201. [[CrossRef](#)]
10. Fromtling, R.A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**, *1*, 187–217. [[CrossRef](#)]
11. Smith, K.A.; Hao, J.; Li, S.K. Effects of Organic Solvents on the Barrier Properties of Human Nail. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 4244–4257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bohn, M.; Kraemer, K.T. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2000**, *43*, S57–S69. [[CrossRef](#)]
13. Walters, K.A.; Flynn, G.L.; Marvel, J.R. Physicochemical characterization of the human nail: Permeation pattern for water and the homologous alcohols and differences with respect to the stratum corneum*. *J. Pharm. Pharmacol.* **1983**, *35*, 28–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Monti, D.; Tampucci, S.; Chetoni, P.; Burgalassi, S.; Mailland, F. Ciclopirox vs amorolfine: In vitro penetration into and permeation through human healthy nails of commercial nail lacquers. *J. Drugs Dermatol.* **2014**, *13*, 143–147. [[PubMed](#)]
15. Canuto, M.M.; Gutiérrez, F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 550–563. [[CrossRef](#)]
16. Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Coppola, R.; De Feo, V. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* **2017**, *10*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rosato, A.; Vitali, C.; Piarulli, M.; Mazzotta, E.; Argentieri, M.P.; Mallamaci, R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 972–975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Yang, W.; Wiederhold, N.P.; O Williams, R. Drug delivery strategies for improved azole antifungal action. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 1199–1216. [[CrossRef](#)]
19. Yu, D.; Wang, J.; Shao, X.; Xu, F.; Wang, H. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *119*, 1253–1262. [[CrossRef](#)]
20. Pape, W.J.; Pfannenbecker, U.; Hoppe, U. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol. Toxicol.* **1987**, *1*, 525–536.
21. Yang, Y.; Fang, Z.; Chen, X.; Zhang, W.; Xie, Y.; Chen, Y.; Liu, Z.G.; Yuan, W. An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chevalier, Y.; Bolzinger, M.-A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *439*, 23–34. [[CrossRef](#)]

23. Binks, B.P. Particles as surfactants—similarities and differences. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* **2002**, *7*, 21–41. [[CrossRef](#)]
24. Horváth, B.; Pál, S.; Széchenyi, A. Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles. *Flavour Fragr. J.* **2018**, *33*, 385–396. [[CrossRef](#)]
25. Scherer, W.P.; Scherer, M.D. Scanning Electron Microscope Imaging of Onychomycosis. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **2004**, *94*, 356–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Baraldi, A.; Jones, S.A.; Guesné, S.; Traynor, M.J.; McAuley, W.J.; Brown, M.B.; Murdan, S. Human Nail Plate Modifications Induced by Onychomycosis: Implications for Topical Therapy. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 1626–1633. [[CrossRef](#)]
27. Elewski, B.E. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 415–429. [[CrossRef](#)]
28. Arriagada, F.; Nonell, S.; Morales, J. Silica-based nanosystems for therapeutic applications in the skin. *Nanomedicine* **2019**, *14*, 2243–2267. [[CrossRef](#)]
29. Frelichowska, J.; Bolzinger, M.-A.; Pelletier, J.; Valour, J.-P.; Chevalier, Y. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. *Int. J. Pharm.* **2009**, *371*, 56–63. [[CrossRef](#)]
30. An, S.S.A.; Ryu, H.J.; Seong, N.-W.; So, B.J.; Seo, H.-S.; Kim, J.-H.; Hong, J.-S.; Park, M.-K.; Kim, M.-S.; Kim, Y.-R.; et al. Evaluation of silica nanoparticle toxicity after topical exposure for 90 days. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 127–136. [[CrossRef](#)]
31. Aveyard, R.; Binks, B.P.; Clint, J.H. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100*, 503–546. [[CrossRef](#)]
32. Leung, K.; Nielsen, I.M.B.; Criscenti, L.J. Elucidating the Bimodal Acid–Base Behavior of the Water–Silica Interface from First Principles. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18358–18365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jevons, S.; Gymer, G.E.; Brammer, K.W.; Cox, D.A.; Leeming, M.R.G. Antifungal Activity of Tioconazole (UK-20,349), a New Imidazole Derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 597–602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nenoff, P.; Hausteiner, U.-F.; Brandt, W. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) against Pathogenic Fungi in vitro. *Ski. Pharmacol. Physiol.* **1996**, *9*, 388–394. [[CrossRef](#)]
35. Horváth, B.; Balázs, V.L.; Varga, A.; Böszörményi, A.; Kocsis, B.; Horváth, G.; Széchenyi, A. Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16611.
36. Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69. [[CrossRef](#)]
37. Horváth, B.; Salem, A.; Šafarik, T.; Pál, S.; Széchenyi, A. Systematic study of reaction conditions for size controlled synthesis of silica nanoparticles. In Proceedings of the 6th Nano Today Conference, Lisbon, Portugal, 16–20 June 2019; p. 4.12.
38. Hansen, C.M. *The Three Dimensional Solubility Parameter and Solvent Diffusion Coefficient*; Danish Technical Press: Copenhagen, Denmark, 1967.
39. Mohammad, M.A.; Alhalaweh, A.; Velaga, S. Hansen solubility parameter as a tool to predict cocrystal formation. *Int. J. Pharm.* **2011**, *407*, 63–71. [[CrossRef](#)]
40. Reus, M.A.; Van Der Heijden, A.E.D.M.; Ter Horst, J.H. Solubility Determination from Clear Points upon Solvent Addition. *Org. Process. Res. Dev.* **2015**, *19*, 1004–1011. [[CrossRef](#)]
41. Shivakumar, H.N.; Juluri, A.; Desai, B.G.; Murthy, S.N. Ungual and Transungual drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2011**, *38*, 901–911. [[CrossRef](#)]
42. Lusiana; Reichl, S.; Müller-Goymann, C.C. Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *78*, 432–440. [[CrossRef](#)]
43. Van Hoogdalem, E.; Hoven, W.V.D.; Terpstra, I.; Van Zijtveld, J.; Verschoor, J.; Visser, J. Nail penetration of the antifungal agent oxiconazole after repeated topical application in healthy volunteers, and the effect of acetylcysteine. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1997**, *5*, 119–127. [[CrossRef](#)]
44. Hui, X.; Baker, S.J.; Wester, R.C.; Barbadillo, S.; Cashmore, A.K.; Sanders, V.; Hold, K.M.; Akama, T.; Zhang, Y.; Plattner, J.J.; et al. In Vitro Penetration of a Novel Oxaborole Antifungal (AN2690) Into the Human Nail Plate. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2622–2631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tiwary, A.K.; Sapra, B. High failure rate of transungual drug delivery: Need for new strategies. *Ther. Deliv.* **2017**, *8*, 239–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Mercer, D.; Stewart, C.S.; Miller, L.; Robertson, J.; Duncan, V.M.S.; O'Neil, D. Improved Methods for Assessing Therapeutic Potential of Antifungal Agents against Dermatophytes and Their Application in the Development of NP213, a Novel Onychomycosis Therapy Candidate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e02117-18. [[CrossRef](#)]
47. Lahaye, M.; Rochas, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia* **1991**, *221*, 137–148. [[CrossRef](#)]
48. Meulemans, A.; Paycha, F.; Hannoun, P.; Vulpillat, M. Measurement and clinical and pharmacokinetic implications of diffusion coefficients of antibiotics in tissues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1286–1290. [[CrossRef](#)]
49. Mertin, D.; Lippold, B.C. In-vitro Permeability of the Human Nail and of a Keratin Membrane from Bovine Hooves: Penetration of Chloramphenicol from Lipophilic Vehicles and a Nail Lacquer. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 241–245. [[CrossRef](#)]
50. Baran, R. *Agache's Measuring the Skin*; Springer: Cham, Switzerland, 2017.
51. Berker, D. Nail Anatomy. *Clin. Dermatol.* **2013**, *31*, 509–515. [[CrossRef](#)]
52. Haigh, J.M.; Smith, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1994**, *2*, 311–330. [[CrossRef](#)]
53. Bagary, R.I.E.; Elkady, E.F.; Tammam, M.H.; El-maaty, A.A. Simultaneous HPLC and derivative spectrophotometry determination of tioconazole and benzyl alcohol in bulk and cream with tioconazole forced degradation study. *Anal. Chem. Ind. J.* **2014**, *14*, 462–473.
54. Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. Antifungal effects of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 1081–1085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Barros, L.; Calhelha, R.C.; Vaz, J.A.; Ferreira, I.; Baptista, P.; Estevinho, L.M. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *225*, 151–156. [[CrossRef](#)]
56. Araújo, C.R.; Miranda, K.C.; Fernandes, O.D.F.L.; Soares, A.J.; Silva, M.D.R.R. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **2009**, *51*, 9–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Cantón, E.; Pemán, J.; Viudes, A.; Quindós, G.; Gobernado, M.; Espinel-Ingroff, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *45*, 203–206. [[CrossRef](#)]
58. Das, S.; Czuni, L.; Báló, V.; Papp, G.; Gazdag, Z.; Papp, N.; Kőszegi, T. Papp Cytotoxic Action of Artemisinin and Scopoletin on Planktonic Forms and on Biofilms of *Candida* Species. *Molecules* **2020**, *25*, 476. [[CrossRef](#)]
59. Santos, D.; Hamdan, J.S. In vitro activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. *Mycoses* **2007**, *50*, 286–289. [[CrossRef](#)]
60. Majoros, L.; Kardos, G.; Feiszt, P.; Szabó, B. Efficacy of amphotericin B and flucytosine against fluconazole-resistant *Candida inconspicua* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, 253–254. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the Pickering emulsions are available from the authors.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).