

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Јелена З. Јанићијевић

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПРИРОДНИХ И
МОДИФИКОВАНИХ ДИЈАТОМИТА КАО
ПОТЕНЦИЈАЛНИХ ФУНКЦИОНАЛНИХ
МАТЕРИЈАЛА/ЕКСЦИПИЈЕНАСА ЗА
ФАРМАЦЕУТСКУ ПРИМЕНУ

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Jelena Z. Janićijević

THE CHARACTERIZATION OF NATURAL
AND MODIFIED DIATOMITES AS
POTENTIAL FUNCTIONAL
MATERIALS/EXCIPIENTS FOR
PHARMACEUTICAL APPLICATION

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2016.

Докторска дисертација урађена је на Катедри за фармацеутску технологију и козметологију Универзитета у Београду - Фармацеутски факултет.

МЕНТОР

Др Јела Милић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

МЕНТОР

Др Данина Крајишник, доцент,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. _____
Др Александра Даковић, научни саветник,
Институт за технологију нуклеарних и других минералних сировина, Београд

2. _____
Др Радица Степановић-Петровић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

3. _____
Др Бојан Чалија, доцент,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Датум одбране _____

Карактеризација природних и модификованих дијатомита као потенцијалних функционалних материјала/ексципијенаса за фармацеутску примену

САЖЕТАК

Увод Ексципијенси су супстанце које нису активне, а које помажу у фармацеутском обликовању лека, штите, потпомажу или повећавају стабилност, биолошку расположивост или прихватљивост лека и помажу при идентификацији лека. Међу ексципијенсима минералног порекла посебан значај имају глине, које се захваљујући погодним физичко-хемијским особинама традиционално користе као фармацеутски ексципијенси широког распона функција, а у новије време и као носачи за испоруку лековитих супстанци. Поред слојевитих материјала, у које спадају глине, и порозни материјали се, због могућности инклузије и ослобађања лековитих супстанци на репродуктиван и предвидљив начин, испитују као потенцијални носачи. Дијатомејска земља/дијатомит је мека, трошна, ситнозрна, силикатна седиментна стена настала таложењем ћелијских зидова (фрустула) једноћелијских алги - дијатомеја на дну морских и језерских басена и очвршћавањем талога уз истискивање воде. Због биокомпатибилности, високог порозитета и адсорпционог капацитета, велике специфичне површине, хемијске инертности и могућности модификације површине, дијатомит је препознат и као потенцијални носач лековитих супстанци. До сада описани поступци модификације дијатомита имају одређене недостатке (сложеност и дуготрајност поступка, посебни услови одвијања реакција, употреба органских растварача) који могу ограничити њихову практичну примену, због чега се отвара могућност истраживања нових поступака модификације који би били прихватљивији са економског и еколошког становишта.

Циљ истраживања Циљ експерименталног рада је испитивање могућности добијања функционализованих дијатомита побољшаних физичко-хемијских особина, модификацијом помоћу делимично неутралисаног алуминијум-сулфата, као и њихова фармацеутско-технолошка и биофармацеутска карактеризација (у поређењу са познатим алумосиликатним материјалом фармакопејског квалитета)

са аспекта потенцијалне примене као фармацеутског ексципијенса за модификовано ослобађање лековитих супстанци.

Метод Комерцијално доступни дијатомит за прехранбenu употребу и пречишћен колубарски дијатомит коришћени су као полазни материјали. Извршена је њихова физичко-хемијска карактеризација и испитана је интеракција са модел лековитим супстанцама диклофенак-натријумом и ибупрофеном одређивањем и анализом адсорпционих изотерми. У погледу адсорпционе способности полазни материјали поређени су са аустралијским дијатомитом и бентонитом фармакопејског квалитета. У циљу повећања капацитета везивања диклофенак-натријума и ибупрофена за испитиване носаче изведена је модификација полазних материјала делимично неутралисаним алуминијум-сулфатом. Поступак модификације спроведен је таложењем производа делимичне неутрализације алуминијум-сулфата у суспензији дијатомита, уз измену количине суспендованог дијатомита и константну количину насталог производа таложења. У циљу процене утицаја модификације на својства полазних материјала извршена је физичко-хемијска карактеризација модификованих дијатомита применом: скенирајуће електронске микроскопије у спрези са енергетско-дисперзивном рендгенском спектрометријом (SEM-EDS), инфрацрвене спектроскопије (FTIR), термалне анализе (TG/DTG/DTA), одређивањем расподеле величина честица методом дифракције ласерске светлости, мерењем електрокинетичког (зета) потенцијала честица и одређивањем специфичне површине методом адсорпције-десорпције азота на температури течног азота (BET метод). Фармацеутско-технолошка карактеризација полазних и модификованих дијатомита обухватила је одређивање насипне и тапкане густине и испитивање њихове проточности. Стабилност модификованих дијатомита/спирање алуминијума (јона) испитана је у медијумима различитих рН вредности. Интеракција модификованих дијатомита различитог порекла са модел лековитим супстанцама у раствору, испитана је праћењем и анализом кинетика адсорпције, као и одређивањем и анализом адсорпционих изотерми. У циљу процене природе интеракција између модификованих дијатомита и модел лековитих супстанци извршена је физичко-хемијска карактеризација модификованих дијатомита након адсорпције лековитих супстанци применом метода: SEM-EDS, FTIR и TG/DTG/DTA. Испитивања *in vitro* брзине растварања модел лековите супстанце

из компримата композита (који садрже модел супстанцу адсорбовану на модификовани дијатомит) и компримата физичке смеше истог садржаја модел супстанце и модификованог дијатомита изведена су у циљу *in vitro* биофармацеутске карактеризације, а добијени профили брзине ослобађања лековите супстанце анализирани су применом математичких модела у циљу процене механизма ослобађања. Извођење *in vivo* биолошких тестова имало је за циљ процену нешкодљивости добијених модификованих дијатомита, као и процене интензитета и дужине трајања антихипералгезијског/антиедематозног дејства модел супстанце из композита и физичких смеша модификовани дијатомит-лековита супстанца.

Резултати Методе физичко-хемијске карактеризације полазних материјала указале су на међусобне разлике у: морфологији, расподели величина и специфичној површини честица. Адсорпција ибупрофена на испитиване адсорбенте није примећена у условима испитивања. Капацитет адсорпције диклофенак-натријума на дијатомите кретао се до 52 mg/g. Модификација дијатомита довела је до: значајног повећања запреминског средњег пречника честица услед укрупњавања честица, значајне промене зета потенцијала честица услед површинских промена, смањења специфичне површине, повећања насипне и тапкане густине и побољшања проточности. Испитивањем стабилности модификованих дијатомита утврђено је да се једино значајније спирање алуминијума одвијало у киселој средини (до 14,4% у 0,1 М HCl), док је спирање у фосфатним пуферима било занемарљиво (мање од 2% алуминијума растворено је у рН 6,8, а мање од 0,25% у рН 7,4). Адсорпцију диклофенак-натријума, као и ибупрофена, на модификоване дијатомите боље описује *Langmuir*-ов него *Freundlich*-ов модел. Израчунате вредности максималног капацитета адсорпције модификованих дијатомита код монослојне покривености (Q_{max}) диклофенак-натријумом износиле су до 395 mg/g. Израчунате вредности Q_{max} модификованих дијатомита за ибупрофен биле су око 207 mg/g. Компримати композита, као и компримати физичке смеше лековите супстанце са носачем, показали су успорено и продужено ослобађање испитиваних лековитих супстанци. Моделовањем профила брзине растварања лековитих супстанци из компримата утврђено је да је не-Фикова дифузија (неправилни транспорт) механизам ослобађања модел

супстанци. Испитивање акутне токсичности/нешкодљивости није показало знаке токсичне реакције нити угинућа животиња након пероралне примене модификованих дијатомита. Композит и физичка смеша ибупрофена са модификованим колубарским дијатомитом, остварили су већу ефикасност у односу на еквивалентне дозе чистог ибупрофена у супримирању бола као манифестације запаљења у пацова. Антиедематозно дејство поменутих композита и физичке смеше било је поредбено ефектима ибупрофена. Модификовани дијатомит, као потенцијални носач за лековите супстанце, као и начин припреме носача са лековитом супстанцом (композит или физичка смеша), нису утицали значајно на продужење дејства ибупрофена иако је у *in vitro* условима показано продужено ослобађање активне супстанце.

Закључак Описаним поступком модификације дијатомита, који је једноставан, једноступен и краткотрајан, постигнуто је значајно повећање капацитета адсорпције за диклофенак-натријум и ибупрофен уз очување изворне структуре дијатомита. Утврђено је да током адсорпције на модификоване дијатомите долази до преласка растворених лековитих супстанци из облика соли у кисели облик. Додатно, показано је да ибупрофен гради и комплекс са алуминијумом из састава модификованих дијатомита. Компримати композита и физичких смеша продужено су ослобађали лековите супстанце у *in vitro* условима. Резултати испитивања акутне токсичности/нешкодљивости указали су на безбедност примене модификованих дијатомита у својству потенцијалних носача лековитих супстанци. У моделу инфламаторног бола у пацова уочена је занимљива појава потенцирања антихипералгезијског дејства ибупрофена из композита и физичких смеша, али није показано продужење аналгетичког/антиедематозног дејства ове супстанце примењене на/са испитиваним носачем.

Кључне речи: ексципијенси, функционалне карактеристике ексципијенаса, дијатомејска земља, адсорпција, диклофенак-натријум, ибупрофен, испитивање брзине растварања лековите супстанце, продужено ослобађање, акутна токсичност, антихипералгезијско дејство

Научна област: Фармација

Ужа научна област: Фармацеутска технологија

УДК број: 615.011:[552/553:615.275(043.3)]

The characterization of natural and modified diatomites as potential functional materials/excipients for pharmaceutical application

ABSTRACT

Introduction Excipients are any substances other than active pharmaceutical ingredients which aid in formulation/manufacture of finished dosage forms, protect, support or enhance stability, bioavailability or patient acceptability of the drug, or assist in product identification. Particularly important amongst the excipients of mineral origin are clays, which, given their advantageous physicochemical properties, have been traditionally used as excipients with wide range of functions, but recently also as drug carriers. Apart from clays and other layered materials, porous materials are also examined as potential drug carriers, due to their ability of drug inclusion, as well as reproducible and predictable drug release. Diatomaceous earth/diatomite is a soft, friable, fine-grained, siliceous sedimentary rock formed by accumulation of cell walls (frustules) from unicellular algae (diatoms) on the ocean or fresh water floors, and sediment dewatering and compaction. Diatomite has been accepted as a potential drug carrier, due to its biocompatibility, high porosity, large surface area, high absorption capacity, chemical inertness and possibility for surface modification. However, current diatomite modification procedures have certain disadvantages, e.g. treatments are complex and time-consuming, special conditions are required for a reaction to take place, organic solvents are used, all of which limits their practical application. Therefore, the possibility for developing new modification procedure emerges, which would result in more economically and ecologically acceptable method.

Aim The aim of this experimental work was to examine the possibility of obtaining functionalized diatomites with improved physicochemical properties, through modification with partially neutralized aluminum sulfate, and to perform their pharmaceutical technical and biopharmaceutical characterization (compared with well-known aluminosilicate material of pharmacopoeial quality) from the point of potential application as pharmaceutical excipients for modified drug release.

Methods Commercial food grade diatomite and purified diatomite from Kolubara coal basin were used as starting materials. Physicochemical characterization of those

materials was performed and their interaction with model drugs (diclofenac sodium and ibuprofen) was studied through mapping out/determination and analysis of adsorption isotherms. Starting materials adsorption capacity was then compared with the adsorption capacity of Australian diatomite and bentonite. Modification of the starting materials was performed in order to increase the adsorption capacity for diclofenac sodium and ibuprofen. The modification procedure was conducted by precipitation of aluminum sulfate partial neutralization product in diatomite suspension. The amount of suspended diatomite was varied, while the amount of precipitation product remained constant. In order to assess the influence of modification procedure on the starting materials' properties, the following methods were employed: scanning electron microscopy in conjunction with energy dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermal analysis (TG/DTG/DTA), determination of particle size distribution using laser light diffraction technique, zeta potential measurements and specific surface area determination by nitrogen adsorption-desorption method (BET method). Pharmaceutical technical characterization comprised determination of bulk density, tapped density and flowability. Modified diatomites stability/dissolution of aluminum (ion) was investigated in media with different pH values. The interaction of modified diatomites with dissolved model drugs was examined by determination and analysis of adsorption kinetics and adsorption isotherms. In order to explain the nature of interaction between modified diatomites and model drugs, physicochemical characterization of the modified diatomites after the adsorption of model drugs was conducted, using the following methods: SEM-EDS, FTIR and TG/DTG/DTA. Dissolution tests were performed with comprimates containing drug adsorbed on modified diatomite (composites) and comprimates containing physical mixture of the drug with the carrier as a part of biopharmaceutical characterization. Obtained drug release profiles were analyzed employing mathematical modeling in order to assess drug release mechanism. *In vivo* biological tests were performed in order to examine acute toxicity of modified diatomites and evaluate intensity and duration of antihyperalgesic and antiedematous effect of the drug from composites and physical mixtures.

Results Physicochemical characterization of the starting materials pointed out the differences in particle morphology, particle size distribution and specific surface area.

No adsorption of ibuprofen on examined adsorbents was noticed. Adsorption capacity of diatomites for diclofenac sodium was up to 52 mg/g. Modification procedure resulted in: significant increase of volume mean diameter due to particle enlargement, significant zeta potential change due to surface property changes, specific surface area decrease, as well as bulk and tapped density increase and flowability improvement. Modified diatomites stability tests showed that significant aluminum dissolution took place only in acidic environment (up to 14.4% in 0.1 M HCl), while aluminum dissolution in phosphate buffers was negligible (less than 2% aluminum dissolved in pH 6.8 and less than 0.25% in pH 7.4). The adsorption of diclofenac sodium and ibuprofen on the modified diatomites was better described by Langmuir than Freundlich isotherm model. Calculated values of maximum monolayer coverage capacity (Q_{max}) for the adsorption of diclofenac sodium on modified diatomites were up to 395 mg/g. Calculated values of Q_{max} for the adsorption of ibuprofen on modified diatomites were around 207 mg/g. Comprimates made of composites, as well as comprimates containing physical mixture of drug with modified diatomite, showed sustained drug release. Drug release profile modeling revealed that the mechanism of drug release was non-Fickian diffusion (anomalous transport). Acute toxicity testing showed neither death nor any signs of toxicological reaction after per oral application of modified diatomites. Composites and physical mixtures of ibuprofen with modified Kolubara's diatomite were more effective than equivalent doses of ibuprofen in suppressing pain as inflammation manifestation in rats. Antiedematous effect of the composites and physical mixtures was comparable to ibuprofen effect. Modified diatomite (potential drug carrier) and the preparation procedure of ibuprofen with the potential carrier have not significantly affected the duration of ibuprofen effect, although dissolution tests showed extended drug release.

Conclusion Simple, one-pot, non time-consuming diatomite modification procedure, described herein, led to significant increase in adsorption capacity for diclofenac sodium and ibuprofen, while preserving the original diatomite structure. It has been shown that during the adsorption on modified diatomites dissolved drug substances transferred from the salt into the acidic form. In addition to that, it was also revealed that ibuprofen formed a complex with aluminum from the modified diatomite. Comprimates containing composites and physical mixtures of drugs with modified diatomites showed prolonged drug release *in vitro*. Results of acute toxicity testing were in favor of

modified diatomites safety when applied as potential drug carriers. An interesting phenomenon was observed within the model of inflammatory pain in rats regarding enhanced antihyperalgesic effect of ibuprofen from composites and physical mixtures, although no extending of analgesic and antiedematous effect was noted.

Keywords: excipients, functionality-related characteristics of excipients, diatomaceous earth, adsorption, diclofenac sodium, ibuprofen, dissolution test, extended drug release, acute toxicity, antihyperalgesic effect

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical Technology

UDC: 615.011:[552/553:615.275(043.3)

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. ЕКСЦИПИЈЕНСИ МИНЕРАЛНОГ ПОРЕКЛА - ВРСТЕ, ФУНКЦИОНАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПРИМЕНА.....	7
1.1.1. Екципијенси минералног порекла - традиционалне и савремене функције.....	7
1.1.2. Карактеризација ексципијенаса минералног порекла.....	12
1.2. ДИЈАТОМЕЈСКА ЗЕМЉА/ДИЈАТОМИТ КАО ПОТЕНЦИЈАЛНИ ЕКСЦИПИЈЕНС.....	15
1.2.1. Дијатомејска земља/дијатомит - добијање и примена.....	15
1.2.2. Особине и састав дијатомита.....	17
1.2.3. Дијатомит - прописи за квалитет у појединим применама.....	19
1.2.4. Карактеризација дијатомита.....	21
1.2.5. Нова поља могуће примене дијатомита - примена у фармацеутским облицима и системима за испоруку лековитих супстанци.....	24
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	32
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	35
3.1. МАТЕРИЈАЛИ.....	35
3.2. МЕТОДЕ.....	37
3.2.1. Модификација дијатомита.....	37
3.2.2. Скенирајућа електронска микроскопија у спрези са енергетско- дисперзивном рендгенском спектрометријом (SEM-EDS анализа).....	37
3.2.3. Одређивање расподеле величина честица методом дифракције ласерске светлости.....	38
3.2.4. Одређивање специфичне површине методом адсорпције-десорпције азота на температури течног азота (ВЕТ метод).....	38
3.2.5. Мерење електрокинетичког (зета) потенцијала.....	38
3.2.6. Инфрацрвена спектрографија са Fourier-овом трансформацијом (FTIR спектроскопска анализа).....	39

3.2.7. Термогравиметријска, деривативна термогравиметријска и диференцијална термална анализа (TG/DTG/DTA).....	39
3.2.8. Одређивање насипне и тапкане густине и испитивање проточности.....	39
3.2.9. Испитивање стабилности модификованих дијатомита/спирање алуминијума (јона).....	39
3.2.10. Испитивање интеракције адсорбената са модел лековитим супстанцама.....	40
3.2.11. Анализа адсорпционе кинетике.....	42
3.2.12. Анализа адсорпционих изотерми.....	44
3.2.13. <i>In vitro</i> испитивање брзине растварања лековите супстанце из компримата.....	45
3.2.14. Одређивање диклофенак-натријума HPLC методом.....	46
3.2.15. Одређивање ибупрофена HPLC методом.....	47
3.2.16. Анализа профила брзине растварања лековите супстанце из компримата.....	48
3.2.17. Фармаколошко-токсиколошко испитивање акутне токсичности/нешкодљивости.....	49
3.2.18. Испитивање аналгетичке/антиедематозне активности композита и физичких смеша лековита супстанца-модификовани дијатомит.....	50
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	57
4.1. РЕЗУЛТАТИ I ФАЗЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА.....	57
4.1.1. Скенирајућа електронска микроскопија у спрези са енергетско-дисперзивном рендгенском спектрометријом (SEM-EDS анализа).....	57
4.1.2. Одређивање расподеле величина честица методом дифракције ласерске светлости.....	60
4.1.3. Одређивање специфичне површине методом адсорпције-десорпције азота на температури течног азота.....	63
4.1.4. Мерење електрокинетичког (зета) потенцијала.....	63
4.1.5. Инфрацрвена спектрографија са Fourier-овом трансформацијом (FTIR спектроскопска анализа).....	65

4.1.6. Термогравиметријска, деривативна термогравиметријска и диференцијална термална анализа (TG/DTG/DTA).....	67
4.1.7. Одређивање насипне и тапкане густине и испитивање проточности.....	71
4.1.8. Испитивање стабилности модификованих дијатомида/спирање алуминијума (јона).....	72
4.1.9. Испитивање интеракције адсорбената са модел лековитим супстанцама.....	73
4.2. РЕЗУЛТАТИ II ФАЗЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА.....	77
4.2.1. Испитивање интеракције модификованих дијатомида са модел лековитим супстанцама – анализа кинетике адсорпције.....	77
4.2.2. Испитивање интеракције модификованих дијатомида са модел лековитим супстанцама – анализа адсорпционе изотерме.....	82
4.2.3. Скенирајућа електронска микроскопија у спрези са енергетско-дисперзивном рендгенском спектрометријом (SEM-EDS анализа).....	86
4.2.4. Инфрацрвена спектрографија са Fourier-овом трансформацијом (FTIR спектрографска анализа).....	87
4.2.5. Термогравиметријска, деривативна термогравиметријска и диференцијална термална анализа (TG/DTG/DTA).....	92
4.2.6. <i>In vitro</i> испитивање брзине растварања лековите супстанце из лековита супстанца-модификовани дијатомит компримата.....	97
4.3. РЕЗУЛТАТИ III ФАЗЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА.....	112
4.3.1. Фармаколошко-токсиколошко испитивање акутне токсичности/нешкодљивости.....	112
4.3.2. Испитивање аналгетичке/антиедематозне активности композита и физичких смеша лековита супстанца-модификовани дијатомит.....	113
4.3.2.1. Антихипералгезијско и антиедематозно дејство композита и физичких смеша ибупрофен-модификовани колубарски дијатомит.....	113
4.3.2.2. Утицај носача на интензитет и дужину трајања антихипералгезијског/антиедематозног дејства ибупрофена.....	117

5. ЗАКЉУЧАК.....	124
6. ЛИТЕРАТУРА.....	130
7. ПРИЛОЗИ.....	148
7.1. Публиковани и саопштени радови који чине део докторске дисертације.....	148
7.2. Биографија аутора.....	150
7.3. Изјава о ауторству.....	151
7.4. Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације.....	152
7.5. Изјава о коришћењу.....	153

1. УВОД

Европска фармакопеја (Ph. Eur. 8.0) даје једноставну дефиницију ексципијенаса: „Ексципијенс је сваки конституент лековитог/медицинског производа који није активна супстанца.“ Дефиниција ексципијенаса према Америчкој фармакопеји (USP 39 - NF 34) укључује и разлоге за њихову примену: „Ексципијенси су супстанце које нису активне, чија је безбедност процењена на одговарајући начин и које улазе у састав лекова са циљем да: 1) олакшају извођење појединих фаза у процесу производње лека 2) пруже заштиту, повећају стабилност, биолошку расположивост или прихватљивост лека за пацијента 3) помогну у идентификацији лека 4) побољшају било коју карактеристику лека која се односи на његову безбедност, ефикасност или примену/испоруку током чувања и употребе.“

Уобичајено, ексципијенси се могу поделити према пореклу на ексципијенсе: минералног, биљног, животињског или синтетског порекла и производе биотехнологије. Према улози/функцији у фармацеутском облику ексципијенси се деле на: раствараче, солубилизаторе, емулгаторе, средства за квашење, повећање вискозитета, гелирање, изотонизацију, допуњавање, везивање, распадање, клизање, облагање, корекцију укуса и мириса, бојење, антиоксидансе, конзервансе, лубрикансе, антиадхезиве, антистатике и адсорбенте (Bhattacharya и сар., 2006; Allen, 2012; Allen и Ansel, 2013, Bouwman-Boer и сар., 2015).

Према препорукама Међународне организације произвођача ексципијенаса (енгл. *International Pharmaceutical Excipients Council - IPEC*) произвођач ексципијенса треба да установи *састав* (енгл. *composition profile*) ексципијенса под чиме се подразумева састав типичне шарже ексципијенса произведеног дефинисаним поступком (*The IPEC Excipient Composition Guide*, 2009). Када је то потребно и изводљиво, утврђивање састава треба да обухвати идентификацију, класификацију и квантификацију сваког састојка ексципијенса. Међутим, за неке ексципијенсе није могуће, а за многе традиционално коришћене ексципијенсе није ни потребно идентификовати и квантификовати све састојке у циљу процене безбедности примене. Састав ексципијенса IPEC разматра на један свеобухватан начин. Главни (номинални) састојци су они који у највећем броју случајева омогућавају да ексципијенс, у леку у чији састав улази, оствари намеравану улогу.

Поред номиналних, у састав ексципијенса улазе: пратећи састојци (енгл. *concomitant components*, они могу бити неопходни за пуно испољавање функције ексципијенса), адитиви (супстанце додате у циљу побољшања физичко-хемијских особина ексципијенса) и средства која потпомажу обраду материјала током поступка производње ексципијенса. Такође, неизреаговани полазни материјали у производњи ексципијенса, резидуални растварачи, резидуе катализатора и металних реагенаса и споредни продукти реакција могу се наћи у саставу ексципијенса у зависности од примењеног поступка производње.

IPEC препоручује произвођачима/добављачима ексципијенаса израду Пакета информација о ексципијенсу (енгл. *Excipient Information Package - EIP*) као стандардизованог, званичног документа компаније који би поједноставио и убрзао размену података између произвођача/добављача и корисника ексципијенаса. EIP образац доступан је на званичном сајту као и у одговарајућим смерницама IPEC-а (*The IPEC Excipient Information Package (EIP): Template and User Guide*, 2009). Пакет информација о ексципијенсу чине три главна дела: Регулаторни лист производа, Преглед квалитета производног погона и Преглед безбедности производног погона и ланца испоруке, а сваки од ових делова обухвата неколико одељака. Регулаторни лист производа треба да предочи кориснику ексципијенса значајне физичко-хемијске, производне и регулаторне информације о одређеном ексципијенсу. У оквиру поменутог дела, Одељак 4 - Регулаторне информације треба да садржи податке о: усаглашености са захтевима званичних стандарда као што су Америчка (USP - NF), Европска (Ph. Eur.), Британска (BP) и Јапанска (JP) фармакопеја, Кодекс састојака намирница (енгл. *Food Chemicals Codex - FCC*), Јапанске спецификације и стандарди за прехранбене адитиве (енгл. *Japan's Specifications and Standards for Food Additives - JSFA*) и друге регулаторне статусе (нпр. *Generally Recognized As Safe - GRAS* статус), затим податке о алергенима, резидуалним растварачима, резидуама металних катализатора и металних реагенаса, итд. Преглед квалитета производног погона треба укратко да представи системе квалитета и добру произвођачку праксу (енгл. *Good Manufacturing Practice - GMP*) примењене у производњи датог ексципијенса. У овом делу, Одељак 2 - Докази о усаглашености, произвођач треба да пружи доказе о испуњености захтева одређених стандарда који се односе на производни погон

као што су сертификати ISO 9001, ISO 14001, OHSAS 18001, резултати инспекције надлежних органа о спровођењу GMP-а, а детаље усаглашености са IPEC-PQG смерницама GMP за фармацеутске ексципијенсе треба приложити у Одељку 3 истог дела. Преглед безбедности производног погона и ланца испоруке треба да предочи план произвођача којим се осигурава заштита производа и континуитет испоруке.

Смернице IPEC-а за квалификацију фармацеутских ексципијенаса (*Qualification of Excipients for Use in Pharmaceuticals*, 2008) намењене произвођачима и корисницима ексципијенаса имају за циљ да установе потребне информације за пласирање материјала на тржиште у својству фармацеутског ексципијенса као и да укажу на кораке које фармацеутска компанија треба да предузме да би установила захтеве за употребу одређеног ексципијенса. Оригинални произвођач започиње понуду супстанце фармацеутском тржишту као оне која је погодна за употребу у лековима у својству ексципијенса. Могући пут примене потенцијалног ексципијенса треба предвидети како би се утврдили одговарајући регулаторни и GMP захтеви за дати ексципијенс и производни погон. Такође, произвођач треба да процени одређена питања безбедности у склопу одлуке о пласирању материјала - потенцијалног ексципијенса на фармацеутско тржиште. Прво треба утврдити да ли постоји претходна примена датог материјала у лековима или слична примена као прехранбеног адитива или састојка контактеног паковања хране. Ако се може показати претходна употреба код људи, могуће је да је безбедност датог материјала прихватљива за примену у улози фармацеутског ексципијенса. Претраживањем Базе помоћних супстанци (енгл. *Inactive Ingredient Database - IID*) на званичном сајту Америчке агенције за храну и лекове (енгл. *U.S. Food and Drug Administration - FDA*) може се утврдити претходна примена материјала који се намерава пласирати као фармацеутски ексципијенс (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>). У Европској унији не постоји слична свеобухватна база података ексципијенаса, па се претходна примена може утврдити једино претраживањем електронских база података и регистара као што су „*The Electronic Medicines Compendium*” (Велика Британија), „*Die Rote Liste*” (Немачка) или „*Dictionnaire Vidal*” (Француска). Међутим, уколико не постоји претходна примена, тачније ако се ексципијенс по

први пут користи у готовом леку или се користи за нови пут примене, класификује се као *нови ексципијенс* и тада мора да задовољи бројне захтеве које постављају америчка или европска регулаторна тела како би био одобрен за употребу. Токсиколошка процена новог ексципијенса треба да покаже његову безбедност за наведену фармацеутску примену при назначеном нивоу употребе. FDA смернице за индустрију: Неклиничка испитивања за процену безбедности фармацеутских ексципијенаса (*Guidance for Industry Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients*, 2005), као и опште поглавље Америчке фармакопеје (USP 39 - NF 34) под називом Смернице за процену биолошке безбедности ексципијенса (<1074> *Excipient Biological Safety Evaluation Guidelines*) могу послужити произвођачу новог ексципијенса као водич за спровођење испитивања безбедности његовог производа.

Да би се материјал пласирао на тржиште као фармацеутски ексципијенс (па и употребио у готовом леку као ексципијенс), не постоји регулаторни захтев да он мора имати монографију у фармакопеји, али ако монографија за дати ексципијенс постоји, онда он мора одговарати захтевима монографије, као и применљивим захтевима Општих напомена и Општих поглавља фармакопеје. У одређеним случајевима, могу се користити и други прописи којима се дефинише одговарајући квалитет за употребу нпр. амерички Кодекс састојака намирница (FCC). Када за материјал не постоји фармакопејска монографија или други пропис који се може применити у смислу захтева за квалитет, произвођач може да установи сопствену спецификацију на основу сличне фармакопејске монографије, свог искуства, физичко-хемијских особина и намераване примене материјала.

Разлике у карактеристикама ексципијенаса, зависно од порекла, поступка производње/пречишћавања, па чак и између различитих серија истог произвођача, могу имати велики утицај на квалитет и безбедност лека у чији састав улазе. Зато је за постизање конзистентне производње фармацеутског препарата циљаног профила квалитета неопходно применити строго дефинисане производне процесе и користити ексципијенсе јасно дефинисаних физичких и хемијских карактеристика које су од значаја за њихову намењену улогу (Милић и сар., 2016).

Према наводима Европске фармакопеје (Ph. Eur. 8.0) улога ексципијенса је да обезбеди неопходна физичко-хемијска и биофармацеутска својства

фармацеутског производа/препарата. Начин на који ће, и степен у коме ће ексципијенс остваривати намењену улогу у формулацији дефинише се као функционалност ексципијенса (енгл. *excipient functionality*). На функционалност ексципијенса утичу његова физичка и хемијска својства, а у одређеним случајевима и адитиви и споредни продукти који улазе у његов састав. Додатно, сам производни процес фармацеутског препарата, односно услови којима се ексципијенс излаже током производње лека, могу утицати на његову функционалност (Милић и сар., 2016). Стога, функционалност ексципијенса се може проценити искључиво у оквирима одређене формулације фармацеутског препарата који се добија одређеним производним поступком.

Функционалност ексципијенса се може довести у везу са неким његовим карактеристикама које се могу контролисати и квантификовати, а такве карактеристике ексципијенса се називају функционалне карактеристике. Европска фармакопеја (Ph. Eur. 8.0) дефинише *функционалне карактеристике ексципијенаса* као физичка или хемијска својства ексципијенса за која је показано да утичу на његову функционалност и која се могу контролисати.

У Европској фармакопеји (Ph. Eur. 8.0), поглавље 5.15. *Функционалне карактеристике ексципијенаса*, наводе се примери одређених физичких карактеристика које треба размотрити приликом развоја чврстих фармацеутских облика, а то су: расподела величина честица, специфична површина, насипна густина, проточност, способност квашења и везивања воде, полиморфизам, псеудополиморфизам и кристалинитет. Као примери хемијских карактеристика, чији утицај на квалитет фармацеутског препарата треба размотрити, наводе се: хемијски састав ексципијенаса који представљају смеше више састојака, структура хомополимера, кополимера, степен полимеризације, степен супституције и врста супституената полимерних материјала.

Монографије одређених ексципијенаса имају одељак под називом *Функционалне карактеристике* и он пружа информације о оним карактеристикама које су препознате као значајне за поједине улоге тих ексципијенаса. У овом одељку могу бити наведене и препоручене методе за одређивање/испитивање функционалних карактеристика, као и уобичајене вредности датих функционалних карактеристика.

Иако поглавље 5.15. *Функционалне карактеристике ексципијенаса* и одељци монографија ексципијенаса који се односе на њихове функционалне карактеристике нису обавезујући, према регулаторним смерницама као што је ICH Q8 (R2), захтев за издавање дозволе за стављање лека у промет треба да образложи избор фармацеутског облика, његов квалитативни и квантитативни састав, производни процес, критична својства квалитета појединих састојака лека и самог лека, као и критичне процесне параметре (*ICH Q8 (R2) Pharmaceutical Development*, 2009). Дизајнирање квалитета производа (енгл. *Quality by Design*), као концепт развоја лека који дефинише поменута смерница, захтева разумевање физичких и хемијских карактеристика састојака лека, начина на који те карактеристике интерагују у финалној формулацији и утичу на производни процес. Током фармацеутског развоја утврђују се оне функционалне карактеристике ексципијенаса које су критичне за производни поступак и квалитет готовог производа. Након идентификације критичних својстава ексципијенаса, треба извршити процену њиховог утицаја и обезбедити њихову контролу током животног циклуса лека.

1.1. ЕКСЦИПИЈЕНСИ МИНЕРАЛНОГ ПОРЕКЛА - ВРСТЕ, ФУНКЦИОНАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПРИМЕНА

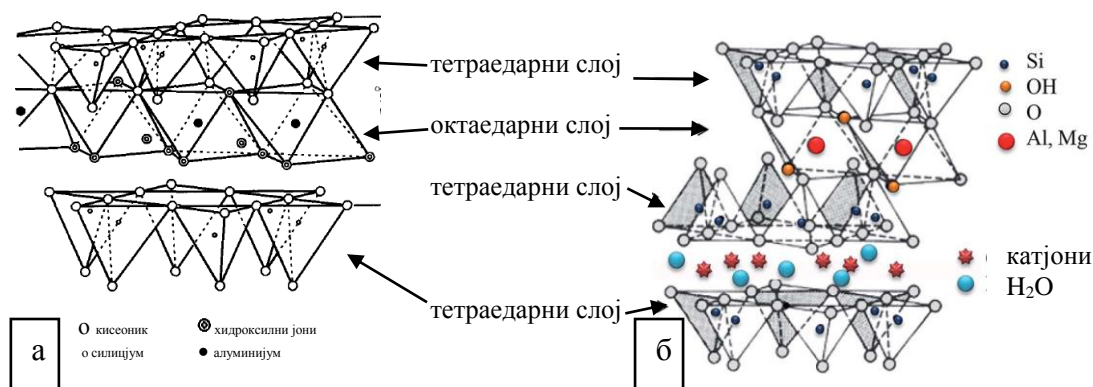
1.1.1. Експципијенси минералног порекла - традиционалне и савремене функције

Према Комисији за нове минерале и имена минерала Међународног минералошког удружења (*IMA Commission on New Minerals and Mineral Names*), минерал је елемент или хемијско једињење које је обично кристално и које је настало као резултат геолошких процеса (Nickel, 1995). Минерали су према хемијском саставу (нарочито у односу на доминантни анјон или анјонску групу) подељени у следећих 8 класа: I самородни елементи, II сулфида, III оксиди и хидроксида, IV халиди, V карбонати, нитрати и борати, VI сулфати, селенати и хромати, VII фосфати, арсенати и ванадати, VIII силикати. Силикатни минерали су даље разврстани у следеће подкласе: незосиликати, соросиликати, циклосиликати, иносиликати, филосиликати и тектосиликати према начину повезивања основне јединице грађе $[\text{SiO}_4]^{4-}$ тетраедра (Karathanasis, 2009).

Минерали који се користе за добијање фармацеутских експципијенаса спадају у: оксиде, хидроксида, халиде, карбонате, борате, сулфате, фосфате и филосиликате.

Посебан значај међу експципијенсима минералног порекла имају глине. Минерали глине припадају фамилији филосиликата и садрже непрекидне дводимензионе тетраедарне слојеве састава T_2O_5 ($\text{T} = \text{Si}, \text{Al}, \text{Be}$) чији међусобно повезани тетраедри деле по три темена, а четврто теме сваког је усмерено у било ком правцу. Тетраедарни слојеви се у јединичној структури повезују са октаедарним слојевима, групама координисаних катјона или са појединачним катјонима (Bailey, 1980). Прецизније, SiO_4 тетраедри се повезују образујући хексагонални структурни шаблон, а апикални кисеоници четвртог темена тетраедара постају део придруженог октаедарног слоја у којем су октаедри водоравно повезани заједничким ивицама (слика 1.1). Координишући катјони октаедара су обично Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} и Fe^{2+} и када су они двовалентни, сва

расположива места за катјоне у октаедарном слоју су заузета и таква конфигурација се назива триоктаедарна. Када су координишући катјони тровалентни, две трећине расположивих места у октаедарном слоју је заузето и таква конфигурација је диоктаедарна. Повезивањем једног тетраедарног и једног октаедарног слоја настаје ламела типа 1:1 (слика 1.1 а), а повезивањем једног октаедарног са два тетраедарна слоја тако да се октаедарни слој налази између њих настаје ламела типа 2:1 (слика 1.1 б). Појединачне ламеле су раздвојене међуслојним простором у којем се могу наћи вода, хидратисани и нехидратисани катјони па и тзв. хидроксидни слојеви. Изоморфном супституцијом тј. поступком замене структурних катјона другим катјонима сличне величине (јонског радијуса) настаје стално наелектрисање минерала глина које је компензовано измењивим јонима супротног наелектрисања међуслојног простора. Најчешће су замене Si^{4+} са Al^{3+} у тетраедарном слоју или Al^{3+} и Mg^{2+} са $\text{Fe}^{2+/3+}$ и Zn^{2+} у октаедарном слоју (Barton и Karathanasis, 2002; Ghadiri и сар., 2015).



Слика 1.1. Шематски приказ тетраедарних и октаедарних слојева и начина њиховог повезивања у ламелу типа 1:1 код каолинита (а) (Murray, 1999) и ламелу типа 2:1 код смектита (б) (Ghadiri и сар., 2015)

Минерали глина су према типу ламеле и величини нето наелектрисања ламеле (x) по формулској јединици подељени у 7 група: каолинит-серпентин, пирофилит-талк, смектити, вермикулити, прави микашисти, крти микашисти и хлорити (Bailey, 1980). Каолинит (тип ламеле 1:1, $x \sim 0$, диоктаедарна конфигурација) се одликује занемарљивом изоморфном супституцијом услед чега има нешто нижи капацитет измене катјона (2-15 cmol/kg). Смектити (тип ламеле

2:1, $x \sim 0,2-0,6$) показују варијабилност у изоморфној супституцији, имају висок потенцијал експанзије међуслоја и знатно виши капацитет измене катјона (80-150 cmol/kg) (Barton и Karathanasis, 2002). Сепиолит и палигорскит, по саставу хидратисани магнезијум-силикати, укључени су у фамилију филосиликата јер у структури имају непрекидне тетраедарне слојеве. Међутим, ови минерали се разликују од осталих филосиликата по томе што им октаедарни слојеви нису непрекидни, тако да се код сепиолита и палигорскита јавља тракаста структура (Karathanasis, 2009; Yang и сар., 2016).

Као резултат особеног састава, грађе, као и услова настанка, минерали глине поседују бројне пожељне физичко-хемијске особине. Веома ситне честице (мање од 2 μm), велика специфична површина, висок потенцијал измене катјона, велики адсорпциони капацитет, пластичност након сорпције одређене количине воде, способност бубрења, колоидна и погодна реолошка својства дисперзија и реактивност у киселој средини (Carratero и Pozo, 2009) су својства која омогућавају традиционалну примену глина и минерала глина као фармацеутских ексципијенаса широког распона функција (табела 1.1), а у новије време и примену у својству носача за испоруку лековитих супстанци (Chrzanowski и сар., 2013; Rodrigues и сар., 2013; Jafarbeglou и сар., 2016; Yang и сар., 2016). Актуелна су и испитивања нанохибрида глина са лековитим супстанцама (енгл. *drug-clay nanohybrids*) у циљу побољшања растворљивости, стабилности, обезбеђивања модификованог ослобађања или циљане испоруке лековите супстанце.

Нанохибриди глина са лековитим супстанцама се обично добијају реакцијом интеркалације (реверзибилна инклузија молекула лековите супстанце у ламинарну/слојевиту структуру минерала глина) и одликује их инертност и нетоксичност (Yang и сар., 2016), што су важне особине са становишта потенцијалне биомедицинске примене. С обзиром на чињеницу да су испитиване могућности примене глина/минерала глина као носача за различите лековите супстанце, у табели 1.2 је издвојен преглед глина као потенцијалних носача за нестероидне антиинфламаторне лекове. У већини издвојених истраживања спроведена је модификација спољашње површине глина/минерала глина у циљу добијања материјла нових површинских својстава и већег капацитета везивања лековите супстанце (Крајишник и сар., *in press*).

Табела 1.1. Традиционалне функције глина и минерала глина у фармацеутским облицима (прилагођено из Rowe и сар., 2009)

Назив	Екципијенс Функције/улоге у формулацији лекова	Главни минерал глине у саставу
Каолин, тешки	Средство за допуњавање, повећање вискозитета, адсорпционо средство	Каолинит $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
Талк	Средство за клизање, лубрикант, средство за допуњавање и против згрудвавања	Талк $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
Бентонит	Средство за повећање вискозитета, гелирање, емулгатор, адсорпционо средство	Монтморилонит $(\text{Na},\text{Ca})_{0,3}(\text{Al},\text{Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ $\times n\text{H}_2\text{O}$
Хекторит	Средство за повећање вискозитета, емулгатор, адсорпционо средство	Хекторит $\text{Na}_{0,3}(\text{Mg},\text{Li})_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{F},\text{OH})_2$
Сапонит	Средство за повећање вискозитета, емулгатор, адсорпционо средство	Сапонит $(\text{Ca}_{0,5}\text{Na})_{0,3}(\text{Mg},\text{Fe})_3(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}$ $(\text{OH})_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
Атапулгит	Адсорпционо средство	Палигорскит $(\text{Mg},\text{Al})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH}) \times 4\text{H}_2\text{O}$
Магнезијум-трисиликат	Средство за клизање и против згрудвавања	Сепиолит $\text{Mg}_4\text{Si}_6\text{O}_{15}(\text{OH})_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

Табела 1.2. Глине као потенцијални носачи за нестероидне антиинфламаторне лекове (прилагођено из Крајишник и сар., *in press*)

Референца	Минерал глине/глина	Модификација	Лековита супстанца
Zheng и сар., 2007		Нема	
Salahuddin и сар., 2012	ММТ*	Полипропиленамин	
Deran и сар., 2009		Хитозан- <i>g</i> -млечна киселина	Ибупрофен
Campbell и сар., 2014	ММТ-модификован кватернерним амонијум једињењем	РЕG	
Yang и сар., 2013	ММТ	Аминопропил графтован	Флурбипрофен
Kaur и Datta, 2014		Нема	
Datta и Kaur, 2014	ММТ	Полоксамер 188	Диклофенак-натријум
Kaur и Datta, 2013		PLGA	
Aguzzi и сар., 2010	ММТ	Хитозан	5-аминосалицилна киселина
Kong и сар., 2014	Палигорскит	Полипирол	Ацетилсалицилна киселина
Tabak и сар., 2011	Бентонит	Нема	Напроксен

*ММТ-монтморилонит

1.1.2. Карактеризација ексципијенаса минералног порекла

Основне инструменталне методе које се користе у идентификацији и квантификацији минерала су рендгенска дифракциона анализа, термална анализа, анализа елементарног састава и оптичка односно електронска микроскопија (Karathanasis, 2009).

Рендгенска дифракциона анализа (XRD): Када се снап монохроматских рендгенских зрака таласне дужине λ усмери на кристал, део зрака пролази кроз кристал (трансмисија), а део бива расејан на електронским облацима атома кристалне решетке односно одбија се од паралелних кристалних равни на којима су распоређени атоми, а које су на једнаком међусобном растојању d . Кохерентно расејани зраци тј. зраци одбијени са узастопних кристалних равни међусобно интерферирају и када је задовољен *Bragg*-ов закон (једначина 1.1) долази до конструктивне интерференције (појачања интензитета) и појаве дифракционог максимума.

$$n \lambda = 2 d \sin \theta \quad (1.1)$$

n - цео број/ред дифракције, λ - таласна дужина упадног рендгенског зрачења, d - растојање између суседних кристалних равни на којима се одвија дифракција, θ - дифракциони угао између правца упадног зрачења и кристалне равни при коме се остварује дифракциони максимум

Свака кристална фаза производи јединствен дифрактограм, а пошто дифрактограм мултифазне смеше представља збир дифрактограма појединачних фаза, могуће је извршити идентификацију фаза поређењем експерименталних вредности за међуслојна растојања (израчуната на основу положаја дифракционих максимума) и релативне интензитета дифракционих максимума са референтним дифрактограмима одређених база података. Квантитативна анализа се заснива на пропорционалности између интензитета дифракционих максимума одређене фазе и њене концентрације у мултифазној смеси.

Термална анализа истражује однос између својства узорка и његове температуре током контролисаног загревања или хлађења узорка. Одговарајућа техника термалне анализе постоји за свако својство или физичку величину која се мери зависно од температуре. Као функција температуре у термогравиметријској

анализи (TG) мери се маса (промена масе), у диференцијалној термалној анализи (DTA) мери се температурна разлика узорка и референтног материјала, а у диференцијалној скенирајућој калориметрији (DSC) мери се разлика топлотног флукса/протока ка узорку и референтном материјалу (Lever и сар., 2014).

Код TG анализе, температурни интервал реакција декомпозиције (дехидратација, дехидроксијација и термална дисоцијација) и пратећи губитак масе су најпогоднији за идентификацију и квантитативно одређивање минерала. Међутим, опрез је неопходан при тумачењу TG криве јер температурни интервал у коме се јавља реакција декомпозиције зависи од својства узорка и услова анализе (Földvári, 2011). Идентификација минерала код DTA и DSC техника заснива се на положају пикова DTA односно DSC криве, а за квантитативно одређивање минерала користи се површина пикова DTA односно DSC криве, јер је површина пика директно сразмерна промени енталпије одговарајуће реакције и количини реагујуће супстанце. Међутим, и при тумачењу резултата DTA и DSC техника треба имати у виду утицај својства узорка и услова анализе на изглед DTA и DSC кривих.

За квалитативну и квантитативну анализу елементарног састава материјала могу да се користе различите физичке и хемијске методе међу којима су: атомска апсорпциона спектроскопија, атомска емисиона спектроскопија, рендгенска флуоресцентна спектроскопија, масена спектроскопија, неутронска активациона анализа, јонска хроматографија и јон-селективне електроде.

Оптичка и електронска микроскопија су од великог значаја за карактеризацију морфолошке структуре материјала. Пошто је таласна дужина убрзаних електрона знатно мања од таласне дужине видљиве светлости, електронски микроскопи имају знатно већу раздвојну моћ/резолуцију (најмање растојање између две тачке на којем се оне виде као одвојени ентитети) од оптичких/светлосних микроскопа. Резолуција оптичких микроскопа је реда величине 10^2 nm, а високонапонски уређаји за трансмисиону електронску микроскопију остварују резолуцију од 0,2 nm (Раковић и Драмићанин, 2010).

Од претходно набројаних метода карактеризације минерала у фармакопејским (BP 2008, Ph. Eur. 8.0) монографијама глина (атапулгит, бентонит, тешки каолин и талк) заступљене су: атомска апсорпциона

спектроскопија (за одређивање садржаја алуминијума, калцијума, гвожђа, олова и магнезијума у талку), рендгенска дифракциона анализа и оптичка микроскопија (како би се потврдило да у талку није присутан азбест). Одговорност произвођача овог ексципијенса је да одговарајућим испитивањима на присуство појединих амфибола и/или серпентина потврди одсуство азбеста у талку. Наиме, ако се рендгенском дифракционом анализом узорка талка, на основу карактеристичних дифракционих максимума, потврди присуство минералне групе амфибола и/или серпентина, онда се применом оптичке микроскопије на основу морфолошких критеријума утврђује могуће присуство минерала тремолита и/или хризотила (влакнасти облици силикатних минерала из групе амфибола и серпентина који спадају у азбест).

Монографије глина (ВР 2008, Ph. Eur. 8.0) укључују поједина физичко-хемијска својства глина у идентификацију и испитивања ових ексципијенаса. Испитивање моћи бубрења са водом једна је од метода идентификације бентонита. У оквиру испитивања тешког каолина спроводе се и испитивања моћи адсорпције и моћи бубрења, а за атапулгит се, поред осталог, испитује и адсорпциони капацитет (адсорпција влаге).

Препознате су и поједине функционалне карактеристике глина важне за испуњење одређених улога ових ексципијенаса у формулацији лекова. Према наводима монографије (Ph. Eur. 8.0), запремина таложења и моћ бубрења са водом су функционалне карактеристике бентонита значајне за употребу овог ексципијенса као средства за повећање вискозитета или средства за суспендовање. Када се талк употребљава као средство против слепљивања или средство за клизање у таблетама и капсулама или као антиадхезив у обложеним и филм таблетама, као функционалне карактеристике талка наведене су: расподела величина честица и специфична површина (Ph. Eur. 8.0).

1.2. ДИЈАТОМЕЈСКА ЗЕМЉА/ДИЈАТОМИТ КАО ПОТЕНЦИЈАЛНИ ЕКСЦИПИЈЕНС

1.2.1. Дијатомејска земља/дијатомит - добијање и примена

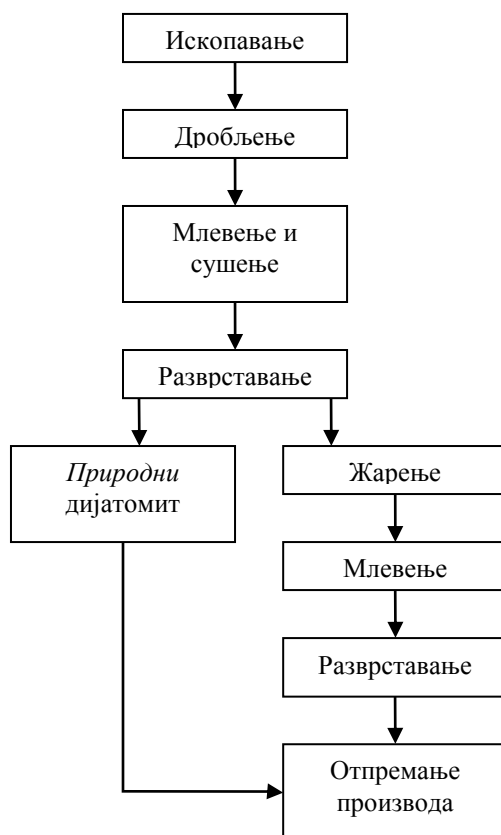
Дијатомејска земља/дијатомит је мека, трошна, ситнозрна, силикатна седиментна стена настала таложењем ћелијских зидова (фрустула) једноћелијских алги - дијатомеја на дну морских и језерских басена и очвршћавањем талога уз истискивање воде. Фрустуле дијатомеја се у основи састоје из два дела који налажу један на други као две половине Петри шоље и представљају веома порозан, али и довољно крут скелет од аморфног хидратисаног силицијум-диоксида (U.S. Geological Survey, 1997).

Дијатомит налази широку примену у индустрији због својстава као што су: висок порозитет, мала густина, велика специфична површина, висок адсорпциони капацитет, мала топлотна проводљивост и хемијска инертност. Највише се користи као филтрациони медијум, цементни адитив, пунилац и адсорбент (U.S. Geological Survey, 2014).

Експлоатација дијатомита обавља се често са површинских копова уколико су сама налазишта на или близу површине. Поступак обраде дијатомита обухвата низ радњи дробљења, млевења, сушења, разврставања и жарења (слика 1.2). Сиров дијатомит може да садржи и до 65% влаге. Првобитно дробљење сировине до честичних агрегата обично се обавља у млину са чекићима, за чим следи истовремено сушење и млевење материјала када се честице дијатомита суспендују у носећој струји топлих гасова. Ротационе и блиц сушаре омогућавају сушење до прашкастог материјала са приближно 15% влаге, а суспендоване честице материјала које излазе из сушаре надаље пролазе кроз низ уређаја за струјање ваздуха, циклона и сепаратора до врећастог филтера. Поменути низ радњи обезбеђује раздвајање прашкастог материјала на фракције различитих величина честица и уклањање нечистоћа и адсорбоване воде. Овако обрађен - сушен, самлевен прашкасти материјал одређене величине честица се пакује и продаје као *природни* дијатомит и обично је намењен за употребу као пунилац (за пластичне масе, гуму, боје, заштитне премазе). За употребу у својству филтрационог

медијума (па и пуниоца у извесној мери) добијени *природни* дијатомит се жари у ротационим пећима са или без додатка флукса (натријум-карбонат) на температурама 650-1200 °С, након чега се опет меље и разврстава на одговарајуће фракције величина честица. Производ жарења дијатомита без флукса (*жарени* дијатомит) је ружичасте боје услед оксидације гвожђа, док је производ жарења са додатком флукса (*флукс-жарени* дијатомит) беле боје за коју се верује да потиче од превођења гвожђа у натријум-алуминијум-гвожђе-силикате (U.S. Environmental Protection Agency, 1995).

Жарењем дијатомита се повећава средња величина честица, смањује специфична површина, повећава тврдоћа са 4,5-5,0 на 5,5-6,0 степени Мосове скале, али се и повећава садржај α -кристобалита (кристални полиморф силицијум-диоксида) услед делимичне трансформације аморфног хидратисаног силицијум-диоксида. Основна сврха жарења дијатомита је повећање брзине протицања током филтрације и побољшање абразивних својстава (Inglethorpe, 1993).



Слика 1.2. Дијаграм тока обраде дијатомита (U.S. Environmental Protection Agency, 1995)

1.2.2. Особине и састав дијатомита

Депозити дијатомита могу бити морски или континентални (у том случају најчешће су језерски). Уопштено говорећи, морски депозити дијатомита су дебљи и простиру се на већим површинама у односу на континентално-језерске депозите, али збирно посматрано, највећа количина комерцијално доступног дијатомита је језерског порекла. Са становишта примене дијатомита као филтрационог медијума, морски депозити се сматрају квалитетнијим због веће разноврсности у погледу величина, облика и образаца порозитета фрустула које их сачињавају. Упоредни приказ физичко-хемијских особина морских и континентално-језерских депозита дијатомита дат је у табели 1.3, а подробан преглед разлика одређених својстава би могао бити предмет даљих истраживања будући да су она значајна за индустријску примену дијатомита (Moyle и Dolley, 2003).

Осушени блокови сировог дијатомита обично садрже 80-90% силицијум-диоксида, 2-4% алуминијум-оксида (пореклом највише из минерала глина) и 0,5-2% хематита. Сирова руда садржи од 10% до 65% воде. Привидна густина сировог дијатомита се креће у распону 0,32-0,64 g/cm³, а осушене спрашене сировине је 0,08-0,25 g/cm³. Тачка топљења дијатомита је између 1400-1750 °C (U.S. Geological Survey, 1997).

Дијатомејски силицијум-диоксид је главни минерал седиментне стене дијатомита. Овај минерал органског порекла се најближе може описати као аморфни хидратисани силицијум-диоксид који садржи мале количине придружених неорганских састојака – пре свега алуминијум-оксид, а затим у мањој мери и гвожђе, алкалне и земноалкалне метале. Саставни део дијатомита поред дијатомејског силицијум-диоксида чине и: песак, минерали глина, карбонатни минерали, вулкански пепео, оксиди и оксихидроксиди гвожђа, хидротермални минерали, органска материја и растворљиве соли (Kennedy, 1990).

Табела 1.3. Поређење физичко-хемијских особина морских и континентално-језерских депозита дијатомита (Moyle и Dolley, 2003)*

Физичко-хемијске особине	Морски депозити	Континентално-језерски депозити
Садржај SiO ₂ у дијатомиту (масени %)	70-97	70-90
Садржај H ₂ O у фрустулама (масени %)	Релативно нижи, и до 1,9 у одређеним морским врстама	Релативно виши, и до 9,6 у одређеним језерским врстама
Садржај H ₂ O у дијатомиту (масени %)		10-60
Контаминанти	Кремен, фосфати (вивијанит), радиоларије, силикофлагелате, остракоде, спикуле сунђера	Кварц, микашист, фелдспати, тресет, лапорац, фосилизовано лишће, кости риба и гмизаваца
	Глине, гипс, калцит, пирит, сумпор - заједнички контаминанти	
Физичке особине фрустула	Величина: 0,75-1000 μm Поре: 10-30% запремине Релативна густина: 1,9-2,35 Тврдоћа: 4,5-6,0 степени Мосове скале	
Насипна густина руде (g/cm ³)	0,32-0,64	
Насипна густина (суви прашак) (g/cm ³)	0,08-0,256	
Насипна густина (влажни прашак) (g/cm ³)	0,16-0,48	
Тврдоћа (степен Мосове скале)	~1,5	
Термална својства	тачка топљења 1400-1750 °C, ниска топлотна проводљивост	

* за она својства где разлике нису утврђене приказан је обједињен податак за обе врсте депозита

1.2.3. Дијатомит - прописи за квалитет у појединим применама

Комерцијално доступни дијатомит обично садржи најмање 85% силицијум-диоксида и уколико је намењен за примену као филтрациони медијум мора имати и низак садржај калцијума ($< 1\% \text{ CaO}$), гвожђа ($< 1,5\% \text{ Fe}_2\text{O}_3$) и растворљивих соли ($< 500 \text{ ppm}$), а треба и да показује добру пермеабилност. Дијатомит који се користи као пунилац мора имати низак садржај гвожђа, високу белину и висок капацитет апсорпције уља. Тржишно доступни дијатомит/дијатомит високе чистоће је веома ситан прах (уобичајена величина честица $2\text{-}63 \mu\text{m}$), високо порозан ($> 80\%$), ниске релативне густине ($2,0\text{-}2,1$) као и ниске привидне густине ($0,2\text{-}0,4 \text{ g/cm}^3$) (Inglethorpe, 1993).

Када се користи као филтер у поступцима обраде хране дијатомејска земља има GRAS статус, односно, сматра се безбедном у условима намераване употребе (<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/>).

У Кодексу састојака намирница (FCC), који издаје Америчко удружење за фармакопеју (енгл. *U.S. Pharmacopeial Convention*), налази се монографија дијатомејске земље и она обухвата следеће делове: опис, употреба у намирницама, поступци испитивања, границе прихватљивости, паковање и чување. Поменута монографија се односи на све три врсте дијатомејске земље (природни, жарени и флукс-жарени дијатомит) које се употребљавају као филтри у поступцима обраде хране; идентификација се врши светлосном микроскопијом, а спроводе се испитивања садржаја арсена (захтев: не више од 10 ppm), олова (захтев: не више од 10 ppm), несиликатних супстанци (захтев: не више од 25% масе), рН вредности дисперзије, као и губитка сушењем и жарењем. Дијатомит који одговара захтевима монографије обележава се као *Food Chemical Codex grade* или једноставније *food grade*.

Национални формулар NF 34 (додатак Америчкој фармакопеји USP 39) садржи монографију пречишћене силикатне земље. За разлику од FCC монографије дијатомејске земље, NF монографија се односи само на дијатомит пречишћен жарењем, а поред испитивања садржаја арсена (лимит $0,001\%$), олова (лимит $0,001\%$), несиликатних супстанци (захтев: не више од 25% масе), губитка сушењем и жарењем, прописана су и испитивања супстанци растворних у

киселини (захтев: не више од 2% масе) и растворних у води (захтев: не више од 0,2% масе).

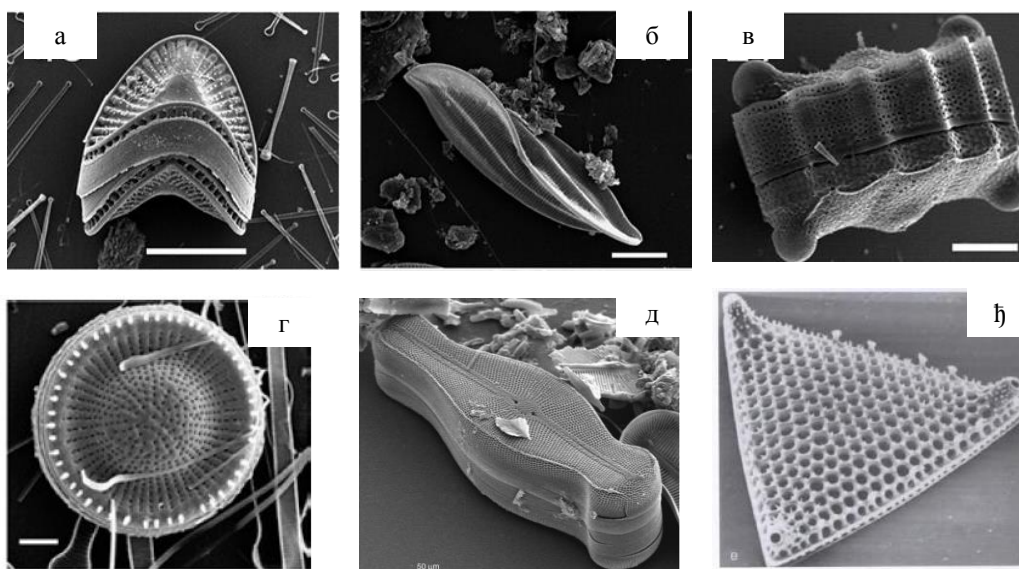
У Европској фармакопеји (Ph. Eur. 8.0), опште поглавље 4. Реагенси, наводи се дијатомејска земља, дијатомејска земља за гасну хроматографију и силанизована дијатомејска земља за гасну хроматографију.

Претраживањем Базе помоћних супстанци (IID) на званичном сајту Америчке агенције за храну и лекове (FDA) пронађено је да се дијатомејска земља налази као ексципијенс у саставу појединих лекова (конкретно појединих таблета и капсула за оралну употребу) који имају дозволу за стављање у промет на тржишту САД (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm>). На основу поменутог налаза, дијатомејска земља намењена за пероралну примену не сматра се новим ексципијенсом.

1.2.4. Карактеризација дијатомита

Присуство фрустула у дијатомиту може се утврдити светлосном микроскопијом или чешће скенирајућом електронском микроскопијом ради детаљније анализе морфологије. Рендгенском спектроскопијом се може доказати дијатомејски силицијум-диоксид који на дифрактограму даје препознатљиву широку рефлексију око $4,05 \text{ \AA}$ (Inglethorpe, 1993).

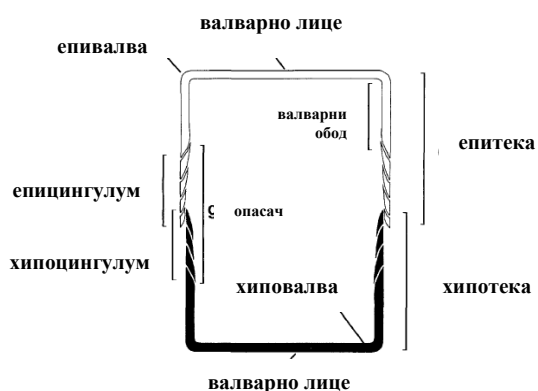
Величина фрустула дијатомеја се креће од 1 \mu m до 1 mm , али је обично $10\text{-}200 \text{ \mu m}$. Фрустуле се јављају у различитим облицима украшеним уређеним перфорацијама (слика 1.3 а–ђ), али се, као што је већ речено, састоје из два дела: горњег нешто већег дела (епитека) који належе на нешто мањи доњи део (хипотека) као поклопац на основу кутије (слика 1.4).



Слика 1.3. Микрографије фрустула дијатомеја: *Campylodiscus* sp. (а), *Entomoneis* aff. *pulchra* (б), *Biddulphia biddulphiana* (в), *Stephanodiscus hantzschii* (г) (Gordon и Tiffany, 2011), *Didymosphenia geminata* (д) (Gordon и сар., 2009) и *Triceratium* sp. (ђ) (Round и сар., 2007)

Епитеку сачињавају епивалва и епицингулум и на исти начин се код хипотеке разликују хиповалва и хипоцингулум. Епи- односно хиповалва обухвата валварно лице (горња/доња површ) и валварни обод/огртач (део валве савијен под углом у односу на валварно лице). Епи- односно хипоцингулум представља обруч

(обично више затворених или отворених појаса/трака) који спаја епи- и хиповалву тако што се хипоцингулум подвлачи под епицингулум обезбеђујући у крајњем преклапање хипотеке епитеком у целовиту фрустулу (Ross и сар., 1979; Bellinger и Sigeo, 2011).



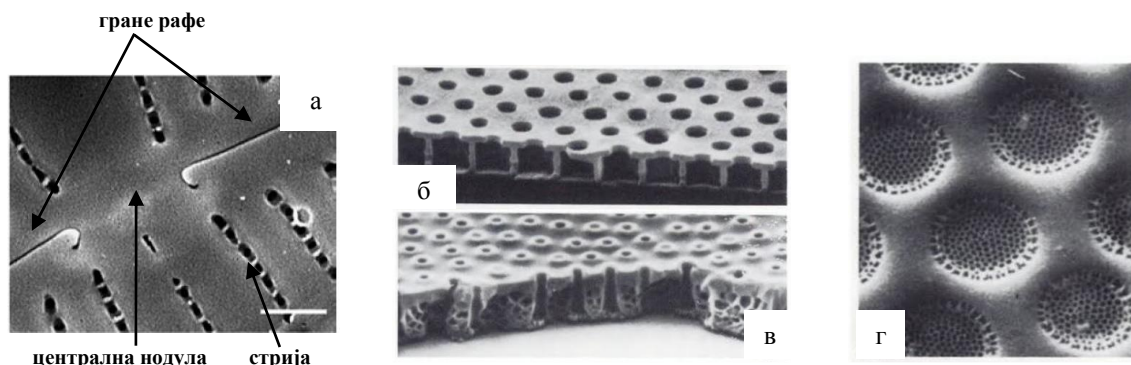
Слика 1.4. Шематски приказ делова фрустуле (Mann, 2002)

Дијатомеје се разврставају у две основне групе/реда на основу симетрије валве: *Centrales* (радијално симетричне) и *Pennales* (билатерално симетричне). Валве радијално симетричних дијатомеја су обично кружне, овалне до угласте, док су валве билатерално симетричних дијатомеја обично биполарне и издужене (линеарног, копљастог, ромбоидног до сигмоидног облика).

Пенатне дијатомеје могу имати и рафу - пукотина у валви која може бити постављена централно (дуж апикалне осе), латерално (често код дијатомеја са дорзовентралном асиметријом), или чак циркумференцијално (дуж скоро целог обода/обима валве) и која омогућава кретање преко лучења слузи.

Рафа је обично дводелна пукотина чија два дела (тзв. гране рафе) раздваја *централна нодула* (простор између проксималних крајева грана, обично задебљао) (слика 1.5 а), али може бити и издигнута изнад површине валве у структуру налик бродској кобилици. Ареоле - поре/перфорације у валви (и цингулуму) могу бити тачкасте (пункте), издужене у апикалном правцу (линеоле) или изграђене у виду коморе чији један отвор прекрива *велум*, а други отвор се не сужава приметно (пороидне ареоле) или се сужава у *форамен* (локулатне ареоле - слика 1.5 б, в). Разликују се три врсте велума: *крибрум* (танак перфориран слој силицијум-диоксида налик мрежици чије су перфорације обично не мање од 30 nm) (слика 1.5 г), *рота* (котур прикачен зупцима за зид ареоле) и *вола* (силицијум-диоксидни израштаји са зида ареоле слични закрилцима). Структура слична крибруму која прекрива отвор ареола многих пенатних дијатомеја са рафом је *химен* - веома

танка перфорирана опница силицијум-диоксида чије су кружне или издужене перфорације величине 5-10 nm. Један или више обједињених редова ареола чини стрију (слика 1.5 а). Стрије центричних дијатомеја су обично радијалне тј. зракасто се пружају од средишта ка ивици валве, а стрије пенатних дијатомеја су обично паралелне и усмерене управно на апикалну осу (Ross и сар., 1979; Round и сар., 2007; Seckbach и Kociolek, 2011).



Слика 1.5. Микрографије: дела дијатомеје *Gomphonema parvulum* (а) (Gordon и Tiffany, 2011), локулатних ареола дијатомеја *Pleurosigma* sp. (б) и *Actinocyclus* sp. (в) и крибрума дијатомеје *Coscinodiscus* sp. (г) (Round и сар., 2007)

На фрустулама могу бити присутни и различити израштаји: бодље, римопортуле или фултопортуле. И *римопортула* и *фултопортула* представљају цевасте структуре које пролазе кроз валву, али је фултопортула нешто сложеније грађе. Римопортула се везује за лучење слузи што дијатомејама које је поседују обезбеђује пријањање и ограничену покретљивост. Сматра се да су фултопортуле (особене само за *Thalassiosirales*) укључене у излучивање влакана β -хитина (Seckbach и Kociolek, 2011). Такође, силикатне творевине као што су „везујуће“ бодље или шупљи продужци цевастих структура римопортула и фултопортула могу обезбедити међусобно повезивање ћелија у колоније. Приликом образовања колонија повезивање може бити посредовано и слузним творевинама: међусобним повезивањем ћелија преко „уложака“ од слузи настају звездасте, цик-цак или праволинијске колоније зависно од тога који полови ћелија су били укључени у лучење слузи, а могуће је и образовање колонија без непосредног међусобног повезивања ћелија и то заједничким везивањем за подлогу преко „подметача“ или „притки“ од излучене слузи (Round и сар., 2007).

1.2.5. Нова поља могуће примене дијатомита - примена у фармацеутским облицима и системима за испоруку лековитих супстанци

Хијерархијски уређена порозна структура фрустула подстакла је истраживања нових могућности за њихову примену у областима као што су: оптика (Butcher и сар., 2005), фотоника (Fuhrmann и сар., 2004), микрохидродинамика (Losic и сар., 2009), хемо- и биосенсинг (Setaro и сар., 2007; De Stefano и сар., 2009), микро- и нанофабрикација (Losic и сар., 2007).

Због повољних физичко-хемијских особина (наведене у одељку 1.2.1), могућности модификације површине, биокомпатибилности и нетоксичности, дијатомит је препознат и као потенцијални носач лековитих супстанци. Преглед испитивања могуће употребе дијатомита за испоруку лековитих супстанци дат је у табели 1.4, а поступак и резултати неких од наведених испитивања (углавном оних која се односе на испоруку нестероидних антиинфламаторних лекова) биће укратко представљени у даљем тексту.

Одређена истраживања указала су на могућност коришћења немодификованог дијатомита за испоруку лековитих супстанци. Aw и сар. (2011) су применили поступак влажне импрегнације како би за носач - пречишћен аустралијски дијатомит везали лековите супстанце различите растворљивости - индометацин и гентамицин-сулфат. Примећено продужено ослобађање индометацина са/из носача током две недеље одвијало се у две фазе: након почетног наглог ослобађања у првих 6 h, што је приписано ослобађању лековите супстанце са спољашње површине фрустула, уследило је споро ослобађање супстанце које је вероватно последица ослобађања из пора и са унутрашњих структура фрустула. Профил ослобађања гентамицина са/из дијатомита, слично као и код ослобађања индометацина са/из дијатомита, обухватао је почетно нагло ослобађање кинетиком првог реда и потом споро ослобађање кинетиком нултог реда.

Zhang и сар. (2013) су користећи поступак имерзије засебно везали месалазин и преднизон за пречишћен, тржишно доступан дијатомит.

Табела 1.4. Преглед испитивања примене дијатомита у својству носача лековитих супстанци

Референца	Модификација дијатомита	Лековита супстанца	Потенцијална примена
Aw и сар., 2011	Нема	Индометацин Гентамицин-сулфат	Перорална испорука и имплантација
Zhang и сар., 2013	Нема	Месалазин Преднизон	Перорална испорука
Variana и сар., 2013	Органосилани (APTES, mPEG-silan, OTS, GPTMS) Фосфонске киселине (2 СЕРА, 16 РНА)	Индометацин Гентамицин-сулфат	Перорална испорука и имплантација
Vasani и сар., 2015	Олиго(етилен гликол) метакрилат кополимери	Левифлоксацин	Топотно-зависна испорука
Rea и сар., 2014	APTES + Sulfo-GMBS [+ поли(D-аргинин)]	Мале интерферирајуће РНК	Испорука РНК
Terracciano и сар., 2015	APTES + HOOC-PEG-NH ₂ + CPP	Сорафениб	Циљана испорука
Kumeria и сар., 2013	APTES + графен-оксид	Индометацин	pH-зависна испорука
Milović и сар., 2014	Каприлокапроил макрогол-8 глицериди + лецитин и пропилен гликол + каприлно/капрински триглицериди	Карбамазепин	Перорална испорука
Losic и сар., 2010	Допамином модификоване Fe ₃ O ₄ наночестице	Индометацин	Магнетно навођена испорука
Todd и сар., 2014	Допамином и хуманим серумским албумином модификоване наночестице гвожђе-оксида	Нема (флуоресцентна боја опонаша лековиту супстанцу)	Магнетно навођена испорука

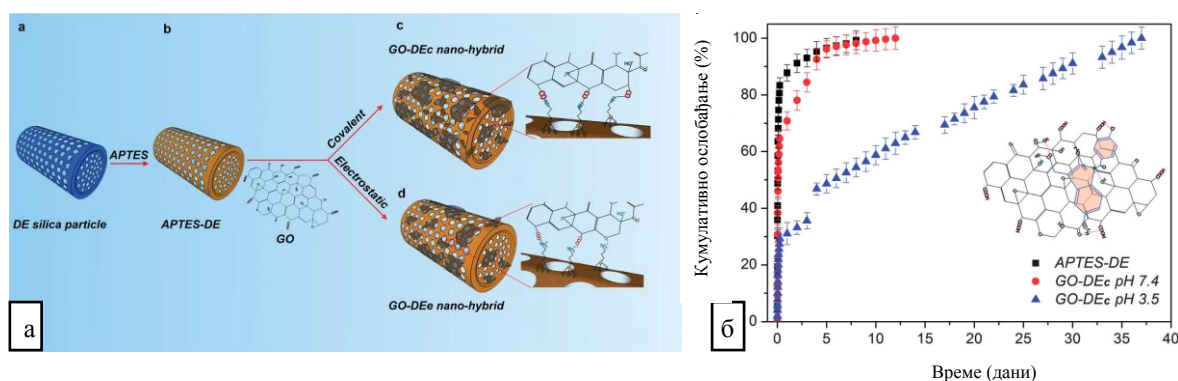
За обе лековите супстанце је показано продужено ослобађање са носача у условима који одговарају проласку кроз гастроинтестинални тракт (измена медијума: 1 h вештачки желудачни сок, 3 h вештачки сок танког црева и 16 h вештачки сок дебелог црева). Испитивање цитотоксичности на ћелијским линијама канцера колона Сасо-2, НТ-29 и НСТ-116 показало је изузетно малу токсичност дијатомита у концентрацијама до 1000 µg/ml. Надаље, пермеација и месалазина и преднизона кроз Сасо-2/НТ-29 кокултивисане ћелијске монослојеве повећава се у случају примене супстанци на дијатомејском носачу. Претпоставља се да је повећана пермеација последица утицаја дијатомита на отварање тесних међућелијских спојница што последично повећава парацелуларни транспорт испитиваних супстанци.

Међутим, да би добили материјал одговарајуће функционалности тј. носач за испоруку лековите супстанце који има одговарајући капацитет везивања супстанце и који омогућава ослобађање терапијске дозе супстанце погодном брзином (чак и на предвиђеном месту дејства), треба размотрити могућност модификације дијатомита органским или неорганским једињењима.

Variana и сар. (2013) су извршили модификацију површине пречишћеног аустралијског дијатомита ковалентним везивањем одабраних органосилана и фосфонских киселина. Модел лековите супстанце индометацин односно гентамицин-сулфат везане су за модификовани дијатомит поступком влажне импрегнације. У зависности од функционалних група присутних на површини модификованих дијатомита примећене су разлике у капацитету везивања лековите супстанце (14–24%) и времену продуженог ослобађања (13–26 дана). Утврђено је да хидрофилне површине (богате аминок, карбоксилним или епоксидним функционалним групама) омогућавају продужење времена ослобађања индометацина, а хидрофобне површине (дуг угљоводонични низ у грађи супстанце којом се врши модификација) обезбеђују ослобађање гентамицин-сулфата у дужем временском периоду.

Испитана је и могућност употребе графен-оксида за модификацију површине микрочестица дијатомита (Kumeria и сар., 2013). На пречишћеном аустралијском дијатомиту прво је извршена силанизација са (3-аминопропил)триетоксисиланом (APTES), а потом су за APTES-модификован

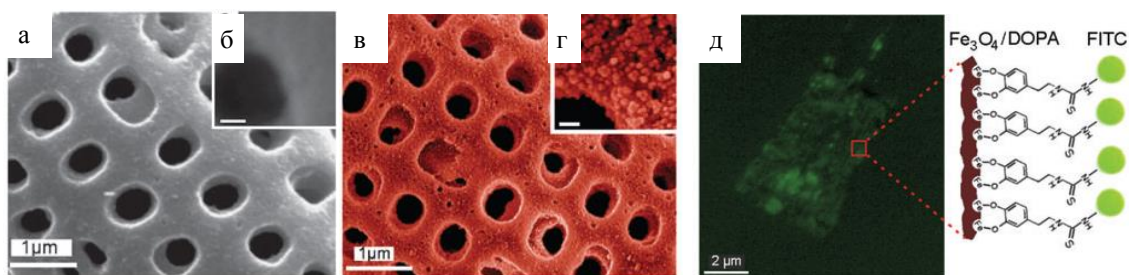
дијатомит ковалентно везани листови графен-оксида (GO) кроз стварање амидне везе између примарних амино група АPTES-модификованог дијатомита и карбоксилних група GO листића (слика 1.6 а). Ковалентно повезивање је било 1-етил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) и N-хидроксисукцинимид (NHS) потпомогнуто: EDC спаја NHS са карбоксилним групама GO листића образујући NHS естар који потом реагује са примарним амино групама АPTES-модификованог дијатомита стварајући стабилну амидну везу уз отпуштање NHS. Облагање модификованих фрустула са GO листићима било је непотпуно, неуједначено и по принципу случајне расподеле. Као носачи за модел лековиту супстанцу индометацин употребљени су и АPTES-модификовани дијатомит обложен листовима GO као и сам АPTES-модификовани дијатомит ради поређења. Значајно повећање везивања лековите супстанце (28,5%) и ефикасности инкапсулације (95%) добијено је након облагања модификованог дијатомита листовима GO. Приликом испитивања брзине растварања у фосфатном пуферу рН 7,4, ослобађање индометацина, које је са АPTES-модификованог дијатомита било продужено до 8 дана, додатно је повећано на 12 дана коришћењем GO обложеног модификованог дијатомита. У пуферу рН 3,5 забележен је још дужи временски период ослобађања индометацина са GO обложеног модификованог дијатомита - 37 дана (слика 1.6 б).



Слика 1.6. Шема израде микрочестица дијатомита обложених GO кроз ковалентно везивање или електростатичко привлачење (а); *In vitro* ослобађање индометацина са АPTES-модификованог дијатомита (АPTES-DE) и АPTES-модификованог дијатомита обложеног GO (GO-DE) у рН 7,4 и рН 3,5 (б) (Kumeria и сар., 2013)

Kumeria и сар. (2013) су спровели и облагање модификованог дијатомита графен-оксидом кроз електростатичко привлачење карбоксилних група листова GO и амино група APTES-модификованог дијатомита (слика 1.6 а), али тај материјал, иако окарактерисан, није испитиван као носач за лековите супстанце.

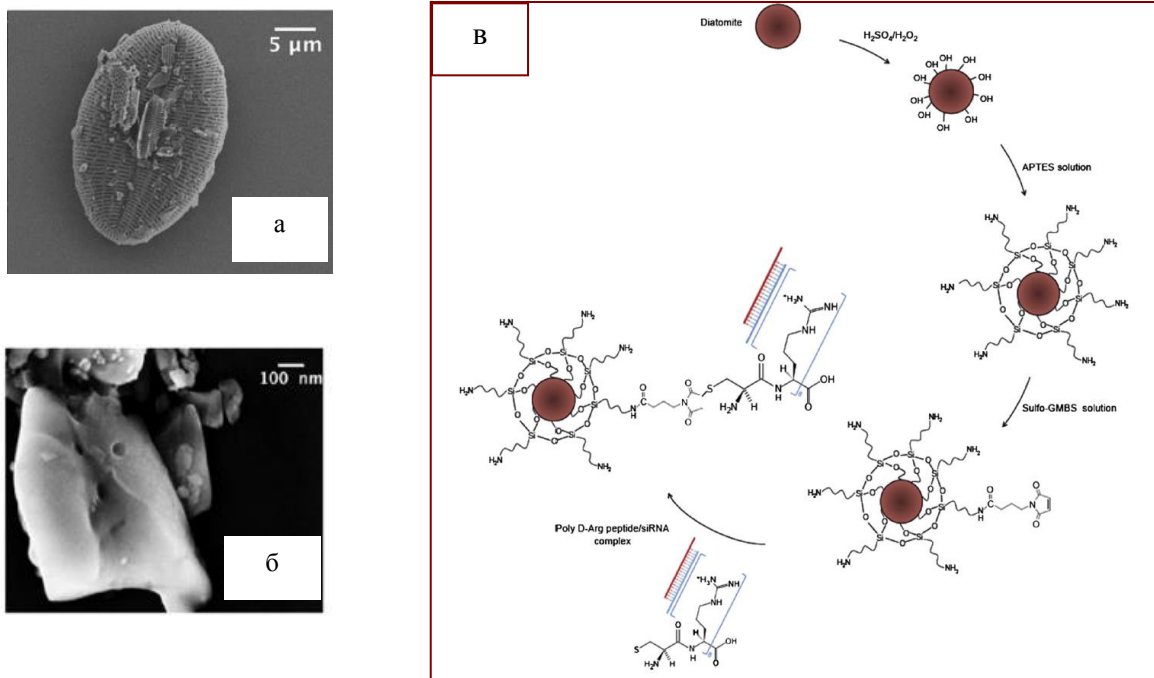
И неорганске наночестице су испитиване као једна од могућности за модификацију површине дијатомита. Пречишћени аустралијски дијатомит је функционализован наночестицама магнетита модификованим допамином кроз електростатичко самоуређивање, а SEM микрографије (слика 1.7 в, г) су потврдиле присуство густог, изузетно танког слоја наночестица на површини фрустула (Losic и сар., 2010). Магнетна својства овако функционализованог дијатомита потврђена су снажним одговором суспендованих функционализованих честица дијатомита на дејство спољашњег магнетног поља. Припремљени материјал је употребљен као носач за модел лековиту супстанцу индометацин и примећено је продужено ослобађање индометацина са носача током две недеље. Надаље, успешно обележавање флуоресцеин изотиоцијанатом амино група допамина којим су модификоване наночестице везане за површину фрустула показано је конфокалном флуоресцентном микроскопијом (слика 1.7 д) што указује да су амино групе функционализованог дијатомита доступне за ковалентно везивање биомолекула.



Слика 1.7. SEM микрографије фрустула пре (а, б) и после функционализације наночестицама магнетита модификованим допамином ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{DOPA}$) (в, г) и 3Д конфокални снимак функционализованог дијатомита обележеног флуоресцеин изотиоцијанатом (FITC) (д) (Losic и сар., 2010)

Rea и сар. (2014) су припремили микрочестице дијатомита (слика 1.8 а) дробљењем, сонификацијом, филтрацијом и пречишћавањем комерцијалног дијатомита, а из припремљеног микрочестичног узорка су издвојене наночестице дијатомита (слика 1.8 б) додатном обрадом и филтрацијом. Обе фракције су органски модификоване и потом коњуговане са малим интерферирајућим РНК ($siRNA$). Модификација површине и биокоњугација спроведене су у неколико корака који обухватају: 1) силанизацију са (3-аминопропил)триетоксисиланом, 2) увођење хетеробифункционалне спојнице N-(γ -малеимидобутирилокси) сулфосукцинимидни естар (Sulfo-GMBS) чија N-хидрокисулфосукцинимидна (sulfo-NHS) естарска група реагује са аминок групама функционализоване површине фрустула образујући амидну везу уз ослобађање sulfo-NHS и на крају, 3) ковалентно везивање комплекса $siRNA$ и пептида поли(D-аргинина) стварањем тиоетарске везе између цистеинског остатка пептида и малеимидне групе Sulfo-GMBS остатка (слика 1.8 в). Флуоресцентном микроскопијом је показано да микрочестице дијатомита, функционализоване и коњуговане са $siRNA$ која је претходно обележена флуоресцентном бојом Dy547, бивају ефикасно преузете у ћелије само ако комплекс са обележеном $siRNA$ образује поли(D-аргинин) уместо контролног пептида. Ослобађање обележене $siRNA$ која је коњугована са функционализованим микрочестицама дијатомита било је продужено током 72 h испитивања и одиграло се у две фазе: почетно нагло ослобађање у првих 12 h настављено је спорим (али непотпуним) ослобађањем до краја временског периода испитивања. Конфокална флуоресцентна микроскопија ћелија канцера плућа H1355 које су инкубиране са наночестицама дијатомита функционализованим и коњугованим са обележеном $siRNA$, показала је ефикасно преузимање у ћелије и накупљање у цитоплазми поменутих нановектора. Испитивање цитотоксичности на ћелијској линији H1355 указало је на веома ниску токсичност наночестица дијатомита у концентрацији до 300 $\mu g/ml$. Способност $siRNA$ везаних за функционализоване наночестице дијатомита да *утишају* циљну $mRNA$ тј. да интерферирају са експресијом одређених гена истражена је на моделу $siRNA$ против глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназе (GAPDH) у H1355 ћелијама канцера. Након инкубације ћелија са функционализованим наночестицама дијатомита које носе модел $siRNA$, ниво

експресије протеина GAPDH смањен је за око 22%. Овај утицај на утишавање гена сличан је оном који производи комерцијално доступни трансфекциони агенс Lipofectamine[®] 2000.



Слика 1.8. SEM микрографије микрочестица дијатомита (а), наночестица дијатомита (б) и шематски приказ модификације и биокоњугације честица дијатомита (в) (Rea et al., 2014)

На основу претходно изнетих података може се констатовати да се дијатомити све више истражују, а нарочито последњих 5 година, као потенцијални носачи за модификовано ослобађање лековитих супстанци, те да је модификацијом могуће побољшати њихове функционалне карактеристике. Поступци модификације дијатомита који су описани у литератури имају одређене недостатке који могу ограничити њихову практичну примену. Модификација површине дијатомита ковалентним везивањем одабраних органосилана спроведена поступком силанизације (Variana и сар., 2013) укључује употребу органских растварача (толуен), посебне услове одвијања реакције (у атмосфери азота) и дуготрајна је (најмање 6 h што зависи од врсте реагенса). Поступак модификације површине дијатомита графен-оксидом (Kumeria и сар., 2013) је

сложен и обухвата неколико фаза: синтеза листова GO модификованом *Hummer*-овом методом, силанизација дијатомита и ковалентно или електростатичко везивање листова GO са силанизованим честицама дијатомита. У фазама силанизације дијатомита и електростатичког везивања листова GO са силанизованим честицама дијатомита коришћени су органски растварачи (толуен и диметилформаид), а за фазу силанизације потребни су и посебни услови одвијања реакције (атмосфера азота). За спровођење целокупног описаног поступка модификације дијатомита потребан је знатан временски период (најмање два дана за синтезу листова GO, 6 h за силанизацију дијатомита и 6 h за ковалентно, односно 24 h за електростатичко везивање листова GO са силанизованим честицама дијатомита).

Функционализација дијатомита наночестицама магнетита модификованим допамином (Losic и сар., 2010) такође је вишестепени поступак који укључује: синтезу наночестица магнетита поступком термалне декомпозиције гвожђе(III)-ацетилацетоната у бензил алкохолу, модификацију наночестица магнетита допамином кроз измену лиганда и инкубацију дијатомита са допамином модификованим наночестицама магнетита. Овакав поступак функционализације дијатомита одликује се значајном потрошњом енергије и дугим временским периодом извођења - поступак термалне декомпозиције одвија се на 175 °C током 48 h, а за инкубацију дијатомита са модификованим наночестицама магнетита потребно је 24-40 h. Дијатомит који би био употребљен у својству наноносача за испоруку *siRNA* у ћелије канцера припремили су Rea и сар. (2014) сложеним, вишестепеним поступком модификације површине и биокоњугације. За највећи број фаза поменутог поступка потребни су посебни услови одвијања реакција (у тами).

Имајући у виду претходно наведене недостатке описаних поступака модификације дијатомита постоји потреба за испитивањем нових поступака модификације који би били прихватљивији са економског и еколошког становишта.

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ експерименталног рада је испитивање могућности добијања функционализованих дијатомиа побољшаних физичко-хемијских особина, модификацијом помоћу делимично неутрализованог алуминијум-сулфата, као и њихова фармацеутско-технолошка и биофармацеутска карактеризација (у поређењу са познатим алумосиликатним материјалом фармакопејског квалитета) са аспекта потенцијалне примене као фармацеутског ексципијенса за модификовано ослобађање лековитих супстанци. Постављени циљ реализован је у три фазе.

- У првој фази рада извршена је физичко-хемијска карактеризација порозних силикатних материјала који до сада нису описивани у литератури са становишта фармацеутске примене: перуанског дијатомиа *food grade* степена чистоће и пречишћеног дијатомиа из домаћих извора (порекло - рудно јаловиште колубарског басена угља). Поменути материјали су поређени са аустралијским дијатомитом и са традиционално коришћеним фармацеутским ексципијенсом - бентонитом, за које постоје литературни подаци о испитивањима у својству потенцијалних носача за лековите супстанце. Поређење је остварено на основу испитивања интеракција са модел лековитим супстанцама диклофенак-натријумом и ибупрофеном. Интеракција модел супстанци са дијатомитима или бентонитом (способност адсорпције) испитана је одређивањем адсорпционих изотерми (у растворима растућих концентрација модел лековитих супстанци при сталној количини адсорбента - дијатомиа или бентонита), а добијене адсорпционе изотерме су потом анализирани применом одабраних математичких модела. У циљу повећања капацитета везивања диклофенак-натријума и ибупрофена за испитиване носаче урађена је модификација перуанског и пречишћеног колубарског дијатомиа делимично неутралисаним алуминијум-сулфатом. Поступак модификације спроведен је таложењем производа делимичне неутрализације алуминијум-сулфата у суспензији дијатомиа, при чему је количина суспендованог дијатомиа мењана на три нивоа, док је количина насталог производа таложења била

стална. У циљу процене утицаја модификације на својства полазних материјала извршена је и физичко-хемијска карактеризација модификованих дијатомита. Физичко-хемијска карактеризација полазних (перуанског и пречишћеног колубарског) и модификованих дијатомита извршена је методама: скенирајуће електронске микроскопије у спреси са енергетско-дисперзивном рендгенском спектрометријом (SEM-EDS), инфрацрвене спектроскопије (FTIR), термалне анализе (TG/DTG/DTA), одређивањем расподеле величина честица методом дифракције ласерске светлости, мерењем електрокинетичког (зета) потенцијала честица и одређивањем специфичне површине методом адсорпције-десорпције азота на температури течног азота (BET метод). Поред наведеног, за полазне дијатомите испитан је садржај тешких метала и микробиолошки квалитет. Фармацеутско-технолошка карактеризација полазних и модификованих дијатомита спроведена је у складу са прописима Ph. Eug. 8.0 за поједина испитивања функционалних карактеристика прашкова (одређивање насипне и тапкане густине и испитивање проточности прашка). Стабилност модификованих дијатомита/спирање алуминијума (јона) испитана је у три различита медијума (0,1 М HCl, фосфатни пуфер рН 6,8 и фосфатни пуфер рН 7,4) одређивањем концентрације отпуштеног јона алуминијума након излагања/третмана модификованих дијатомита наведеним медијумима.

- У другој фази рада испитана је интеракција модификованих дијатомита различитог порекла са модел лековитим супстанцама диклофенак-натријумом и ибупрофеном у раствору, праћењем кинетика адсорпције и одређивањем адсорпционих изотерми. Кинетике адсорпције праћене су преко промене концентрације адсорбата (диклофенак-натријума или ибупрофена) током времена, а потом су и анализирани применом математичких модела ради процене механизма адсорпције, ступња адсорпције који одређује брзину целокупног процеса као и ради одређивања кинетичких параметара. Адсорпционе изотерме одређене су у растворима растућих концентрација модел лековитих супстанци при сталној количини адсорбената (модификованих дијатомита). Математичко

моделовање адсорпционих изотерми пружило је информације о равнотежним параметрима процеса и механизму адсорпције. У циљу процене природе интеракција између модификованих дијатомиа и модел супстанци извршена је физичко-хемијска карактеризација модификованих дијатомиа након адсорпције лековитих супстанци применом метода: SEM-EDS, FTIR и термалне анализе (TG/DTG/DTA). У сврхе *in vitro* биофармацеутске карактеризације изведена су испитивања брзине растварања модел лековите супстанце из компримата који садрже модел супстанцу адсорбовану на модификовани дијатомит или физичку смешу истог садржаја модел супстанце и модификованог дијатомиа. Добијени профили брзине растварања лековите супстанце из компримата анализирани су применом математичких модела у циљу процене механизма ослобађања.

- Трећа фаза рада обухватила је извођење *in vivo* биолошких тестова у циљу процене нешкодљивости добијених модификованих дијатомиа, као и процене интензитета и дужине трајања антихипералгезијског/ антиедематозног дејства модел супстанце из композита и физичких смеша модификовани дијатомит-лековита супстанца. Композити који садрже лековиту супстанцу адсорбовану на модификовани дијатомит, као и одговарајуће физичке смеше, који су у оквиру претходне фазе *in vitro* испитивања показали најповољнији профил ослобађања лековите супстанце, подвргнути су *in vivo* испитивању аналгетичке и антиедематозне активности.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. МАТЕРИЈАЛИ

Као полазни материјали у експериментима адсорпције коришћени су: перуански дијатомит *food grade* степена чистоће (добављач Medicina Ltd., Велика Британија), пречишћен колубарски дијатомит (порекло - рудно јаловиште колубарског басена угља), аустралијски дијатомит (произвођач Mount Sylvia Diatomite Pty. Ltd., Аустралија) и бентонит (Fagron Belgium NV, Белгија). Пречишћавање колубарског дијатомита је спроведено термичким поступком (жарење на 550 °C) и просејавањем (сито 125 µm) како би се уклониле органске и друге нечистоће.

Садржај тешких метала у узорцима перуанског и пречишћеног колубарског дијатомита одговарао је захтевима лимит теста А за тешке метале (Ph. Eur. 6.0; 2.4.8).

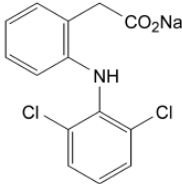
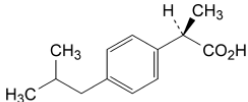
Микробиолошка чистоћа перуанског и пречишћеног колубарског дијатомита била је у складу са захтевима Ph. Eur. 6.0 (2.6.12 и 2.6.13).

У поступку модификације перуанског и пречишћеног колубарског дијатомита употребљени су алуминијум-сулфат хексадекахидрат ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 16\text{H}_2\text{O}$, Центрохем д.о.о., Србија) и натријум-хидроксид (Carlo Erba Reagenti, Италија).

У експериментима адсорпције као модел лековите супстанце коришћени су диклофенак-натријум (Ph. Eur. 8.0) и ибупрофен (Ph. Eur. 8.0). За припрему медијума за испитивање адсорпције и медијума за испитивање брзине растварања лековите супстанце из comprimата употребљени су: апсолутни етанол (Zorka-Pharma a.d., Србија), натријум-хидроксид (Carlo Erba Reagenti, Италија), калијум-дихидрогенфосфат (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Немачка) и хлороводонична киселина, puriss. p.a. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Немачка).

Основне физичко-хемијске особине модел лековитих супстанци дате су у табели 3.1.

Табела 3.1. Основне физичко-хемијске особине испитиваних лековитих супстанци

Лековита супстанца	Структурна формула	M _r	pK _a	Растворљивост у води
Диклофенак-натријум натријум-2-[(2,6- дихлорофенил)амино]фенил]ацетат		318,1	4,15	Умерено растворљив
Ибупрофен (2RS)-2-[4-(2- метилпропил)фенил]пропанска киселина		206,3	4,91	Готово нерастворан

Диклофенак-натријум је лако растворан у метанолу, растворан је у алкохолу (етанол 96% V/V) и тешко растворан у ацетону. Тачка топљења супстанце је око 280 °C (топи се уз декомпозицију) (Ph. Eur. 8.0). Растворљивост диклофенак-натријума у воденом медијуму зависи од састава, рН и јонске јачине тог медијума. У киселом медијуму диклофенак-натријум је врло тешко или готово нерастворан, а са порастом рН вредности медијума расте и растворљивост активне супстанце. Растворљивост диклофенак-натријума износи 0,0012 mg/ml у 0,1 М НСl, у фосфатном пуферу рН 6,8 је 0,67 mg/ml, а у фосфатном пуферу рН 7,4 износи 5,15 mg/ml (Kincl и сар., 2004).

Ибупрофен је лако растворан у ацетону, метанолу и дихлорометану. Тачка топљења ибупрофена је 75-78 °C (Ph. Eur. 8.0). Ибупрофен се раствара у разблаженим растворима алкалних хидроксида и карбоната. Растворљивост ибупрофена расте са порастом рН вредности воденог медијума, тако да је у 0,1 М НСl растворљивост супстанце 0,023 mg/ml, а у фосфатном пуферу рН 7,2 износи 4,6 mg/ml (Dugar и сар., 2016).

У експериментима испитивања утицаја носача на антихипералгезијско и антиедематозно дејство лековите супстанце, коришћени су: ибупрофен (Ph. Eur. 8.0), модификовани колубарски дијатомит (модификација је извршена на

пречишћеном колубарском дијатомиту пореклом са рудног јаловишта колубарског басена угља) и карагенан (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Немачка).

3.2. МЕТОДЕ

3.2.1. Модификација дијатомита

Перуански и пречишћен колубарски дијатомит модификовани су на следећи начин: одређена количина дијатомита суспендована је у 50 ml воденог раствора алуминијум-сулфата ($0,02 \text{ g/ml Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 16\text{H}_2\text{O}$) на магнетној мешалици (RH basic 2, IKA[®]-Werke GmbH, Немачка), а потом је у хомогену суспензију која се мешала додата база (60 ml 0,1 M NaOH) у танком млазу из ротирајућег резервоара тако да је постигнут моларни однос OH/Al био 1,9 (делимична неутрализација). Након додатка базе добијени талог модификованог дијатомита одвојен је филтрацијом, осушен и уситњен. При модификацији перуанског дијатомита количина суспендованог дијатомита мењана је на три нивоа (250, 500 и 750 mg) и у складу са тим припремљени узорци модификованих перуанских дијатомита обележени су MD250, MD500 и MD750. Модификација пречишћеног колубарског дијатомита је ради најприкладнијег поређења извршена само на средњем нивоу (што одговара количини суспендованог дијатомита од 500 mg) и добијени модификовани колубарски дијатомит обележен је MD.

Делимично неутралисани алуминијум-сулфат без присуства дијатомита (ознака узорка BAS), припремљен је засебно, на претходно описани начин, у сврхе физичко-хемијске карактеризације и поређења са носачима модификованим дијатомитима.

3.2.2. Скенирајућа електронска микроскопија у спрези са енергетско-дисперзивном рендгенском спектрометријом (SEM-EDS анализа)

SEM-EDS анализа узорака полазних и модификованих дијатомита, делимично неутрализованог алуминијум-сулфата и одабраних модификованих

дијатомита након адсорпције модел супстанци изведена је снимањем на SEM уређају JSM-6610LV (JEOL Ltd., Јапан) опремљеним EDS детектором X-Max Large Area Silicon Drift повезаним са INCA Energy 350 Microanalysis System. Узорци су нанети на алуминијумски носач преко кога је залепљена двоструко лепљива трака од угљеника и напарени танким слојем злата пре анализирања.

3.2.3. Одређивање расподеле величина честица методом дифракције ласерске светлости

Одређивање расподеле величина честица узорака полазних и модификованих дијатомита методом дифракције ласерске светлости извршено је на уређају Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Велика Британија). Припрема узорака подразумевала је припрему суспензија узорака одговарајуће концентрације у води.

3.2.4. Одређивање специфичне површине методом адсорпције-десорпције азота на температури течног азота (ВЕТ метод)

Одређивање специфичне површине узорака полазних и модификованих дијатомита методом адсорпције-десорпције азота на температури течног азота (ВЕТ метод) урађено је на апарату Sorptomatic 1990 (Thermo Electron Corporation, САД).

3.2.5. Мерење електрокинетичког (зета) потенцијала

Мерење електрокинетичког (зета) потенцијала узорака полазних и модификованих дијатомита спроведено је на уређају Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments Ltd., Велика Британија). Водене суспензије (0,1 mg/ml) испитиваних узорака припремљене су дисперговањем на ултразвучном купатилу непосредно пре мерења.

3.2.6. Инфрацрвена спектроскопија са Fourier-овом трансформацијом (FTIR спектроскопска анализа)

FTIR спектри узорака полазних и модификованих дијатомиа, делимично неутрализованог алуминијум-сулфата и одабраних модификованих дијатомиа након адсорпције модел супстанци снимљени су техником пригушене тоталне рефлексије (ATR) на уређају Nicolet 6700 FTIR spectrometer (Thermo Scientific, САД) опремљеним ATR модулом са дијамантским кристалом, у области $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ при резолуцији 2 cm^{-1} .

3.2.7. Термогравиметријска, деривативна термогравиметријска и диференцијална термална анализа (TG/DTG/DTA)

Термалне анализе TG, DTG и DTA узорака полазних и модификованих дијатомиа, делимично неутрализованог алуминијум-сулфата и одабраних модификованих дијатомиа након адсорпције модел супстанци урађене су на апарату Netzsch STA 409 EP (Selb, Немачка) загревањем узорака у атмосфери ваздуха од $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ до $1000 \text{ }^{\circ}\text{C}$, при брзини загревања $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

3.2.8. Одређивање насипне и тапкане густине и испитивање проточности

Одређивање насипне и тапкане густине прашкастих узорака полазних и модификованих дијатомиа изведено је у складу са прописом Ph. Eur. 8.0 (2.9.15). Испитивање проточности прашкастих узорака полазних и модификованих дијатомиа изведено је према пропису Ph. Eur. 8.0 (2.9.16).

3.2.9. Испитивање стабилности модификованих дијатомиа/спирање алуминијума (јона)

Стабилност модификованих дијатомиа/спирање алуминијума (јона) испитана је у три различита медијума ($0,1 \text{ M HCl}$, фосфатни пуфер рН 6,8 и фосфатни пуфер рН 7,4) одређивањем концентрације отпуштеног јона

алуминијума након излагања/третмана модификованих дијатомита наведеним медијумима. По 50 mg узорака модификованих дијатомита (односно по 100 mg узорака за испитивање у фосфатном пуферу рН 7,4) пренето је у ерленмајере, додата им је одговарајућа запремина медијума (по 80 ml 0,1 М НСl; по 150 ml фосфатног пуфера рН 6,8 или по 300 ml фосфатног пуфера рН 7,4) и третман је спроведен на ултразвучном купатилу током 10 минута. Након третмана модификованих дијатомита, дисперзије су филтриране и концентрација алуминијума у филтрату одређена је применом атомске апсорпционе спектроскопије (Analytic Jena Spekol 300, Perkin Elmer, САД).

3.2.10. Испитивање интеракције адсорбената са модел лековитим супстанцама

За испитивање интеракција са диклофенак-натријумом припремљен је основни раствор супстанце (4 mg/ml) у води уз додатак корастварача апсолутног етанола (10% v/v), док је за испитивање интеракција са ибупрофеном основни раствор (4 mg/ml) припремљен растварањем супстанце у разблаженом раствору натријум-хидроксида.

Код одређивања адсорпционе кинетике, по 1,2 g адсорбента пренето је у ерленмајере са навојем, додато им је по 160 ml (односно по 80 ml у случају адсорпције диклофенак-натријума на модификоване перуанске дијатомите) основног раствора лековите супстанце (4 mg/ml), дисперзије су затворене и мешане на лабораторијској мешалици (KS 260 basic, ИКА®-Werke GmbH, Немачка) при брзини 200 обртаја/минути. У одговарајућим временским интервалима вршено је узорковање сваке од дисперзија, узорци су центрифугирани (MPW 56, MPW Med. Instruments, Пољска) на 3000 обртаја/минути током 2 min и концентрација неадсорбоване супстанце одређена је из течне фазе спектрофотометријски (Evolution 300 spectrophotometer, Thermo Scientific, САД) на 275 nm у случају диклофенак-натријума, односно на 264 nm у случају ибупрофена.

Количина адсорбоване супстанце израчуната је према следећој једначини:

$$Q_t = \frac{(C_0 - C_t) \cdot V}{m} \quad (3.1)$$

Степен адсорпције супстанце (ефикасност уклањања супстанце из течне фазе адсорпцијом) израчунао је према следећој једначини:

$$\text{Степен адсорпције (\%)} = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \cdot 100 \quad (3.2)$$

где су: Q_t (mg/g) маса адсорбоване лековите супстанце по јединици масе адсорбента у времену t , C_0 (mg/ml) концентрација основног раствора лековите супстанце, C_t (mg/ml) концентрација лековите супстанце у течној фази у времену t , V (ml) је запремина течне фазе и m (g) је маса адсорбента.

За одређивање адсорпционих изотерми, основни раствор лековите супстанце је потом разблажен водом како би се добили раствори концентрација 1; 1,5; 2; 2,5; 3 и 3,5 mg/ml. По 0,6 g адсорбента (односно по 1,2 g у случају адсорпције диклофенак-натријума на модификован перуански дијатомит) пренето је у ерленмајере са навојем, додато им је по 80 ml израђених раствора лековите супстанце (1–4 mg/ml), дисперзије су затворене и мешане на лабораторијској мешалици (KS 260 basic, IKA®-Werke GmbH, Немачка) при брзини 200 обртаја/минути. Након постизања адсорпционе равнотеже, узорци сваке дисперзије су центрифугирани (MPW 56, MPW Med. Instruments, Пољска) на 3000 обртаја/минути током 2 min. Концентрација неадсорбоване супстанце одређена је из течне фазе спектрофотометријски (Evolution 300 spectrophotometer, Thermo Scientific, САД) на 275 nm у случају диклофенак-натријума, односно на 264 nm у случају ибупрофена.

Количина адсорбоване супстанце израчуната је према следећој једначини:

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{m} \quad (3.3)$$

где су: Q_e (mg/g) маса адсорбоване лековите супстанце по јединици масе адсорбента у стању равнотеже, C_0 (mg/ml) почетна концентрација раствора лековите супстанце, C_e (mg/ml) концентарција лековите супстанце у течној фази у стању равнотеже, V (ml) је запремина течне фазе и m (g) је маса адсорбента.

3.2.11. Анализа адсорпционе кинетике

Адсорпциона кинетика тј. временско напредовање адсорпције до постизања равнотеже, изражава се као промена концентрације супстанце у течной фази односно промена количине адсорбоване супстанце током времена. За описивање експерименталних података кинетике адсорпције врло често се користе модели кинетике псеудо-првог и псеудо-другог реда који спадају у реакционе кинетичке моделе и *Weber–Morris*-ов модел унутарчестичне дифузије који припада дифузионим кинетичким моделима.

Дифузиони модели полазе од становишта да се адсорпција одвија кроз 4 ступња:

- пренос адсорбата из главнине течне фазе до хидродинамичког граничног слоја који окружује честицу адсорбента,
- пренос кроз гранични слој до спољашње површине адсорбента (тзв. спољашња дифузија или дифузија кроз филм),
- пренос у унутрашњости честице адсорбента (тзв. унутрашња или унутарчестична дифузија) који се одвија кроз дифузију у течной фази која испуњава поре (дифузија у порама) и/или дифузију у адсорбованом стању преко унутрашње површине (површинска дифузија) и
- интеракција молекула адсорбата и адсорпционих места

Под претпоставком да се први и последњи ступањ адсорпције веома брзо одвијају, укупна брзина адсорпције је одређена брзином дифузије кроз филм и/или брзином унутарчестичне дифузије (Worch, 2012). За разлику од дифузионих, реакциони модели се заснивају на кинетици хемијских реакција и не разматрају адсорпцију кроз претходно поменуте ступњеве (Qiu и сар., 2009).

Модел кинетике псеудо-првог реда

Модел кинетике псеудо-првог реда математички је изражен једначином:

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_1(Q_e - Q_t) \quad (3.4)$$

где су: Q_t (mg/g) и Q_e (mg/g) редом маса адсорбоване супстанце по јединици масе адсорбента у времену t (min) и у стању равнотеже, а k_1 је константа брзине псеудо-првог реда (min^{-1}).

Након интеграције за граничне услове од $t = 0, Q = 0$ до $t = t, Q = Q_t$ добија се линеаризован облик једначине кинетике псеудо-првог реда:

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (3.5)$$

Када се кинетика адсорпције одвија по моделу псеудо-првог реда, зависност $\ln(Q_e - Q_t) = f(t)$ је линеарна функција са нагибом $-k_1$ и одсечком на у-оси $\ln Q_e$.

Модел кинетике псеудо-другог реда

Математички израз модела кинетике псеудо-другог реда је једначина:

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_2(Q_e - Q_t)^2 \quad (3.6)$$

где су: Q_t (mg/g) и Q_e (mg/g) редом маса адсорбоване супстанце по јединици масе адсорбента у времену t (min) и у стању равнотеже, а k_2 је константа брзине псеудо-другог реда ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Интеграљењем једначине за исте граничне услове као у случају једначине псеудо-првог реда, добија се линеаризован облик једначине кинетике псеудо-другог реда:

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t \quad (3.7)$$

Када се кинетика адсорпције одвија по моделу псеудо-другог реда, зависност $t/Q_t = f(t)$ је линеарна функција са нагибом $1/Q_e$ и одсечком на у-оси $1/(k_2 Q_e^2)$.

Weber–Morris-ов модел унутарчестичне дифузије

Weber–Morris-ов модел унутарчестичне дифузије математички је представљен једначином:

$$Q_t = k_{id} t^{1/2} \quad (3.8)$$

где су: Q_t (mg/g) маса адсорбоване супстанце по јединици масе адсорбента у времену t (min), а k_{id} ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$) је константа брзине унутарчестичне дифузије. Графички приказ зависности $Q_t = f(t^{1/2})$ је права линија која пролази кроз координатни почетак и чији је нагиб k_{id} .

3.2.12. Анализа адсорпционих изотерми

Једначина адсорпционе изотерме представља математички опис зависности равнотежне количине адсорбоване супстанце од равнотежне концентрације супстанце у течной фази на константној температури. За описивање експерименталних података о адсорпционој равнотежи у датом систему на константној температури врло често се користе *Langmuir*-ова и *Freundlich*-ова једначина адсорпционе изотерме.

Langmuir-ова једначина изотерме

Термодинамички заснован *Langmuir*-ов модел адсорпционе изотерме полази од следећих претпоставки: површина адсорбента је униформна са тачно дефинисаним бројем адсорпционих места, свако адсорпционо место може узети само један молекул адсорбата (монослојна покривеност), нема интеракције између адсорбованих молекула, вероватноћа да се молекул адсорбата веже за слободно место или га напусти не зависи од заузетости осталих места и топлота адсорпције је независна од броја запоседнутих места (Langmuir, 1918).

Математички израз *Langmuir*-овог модела адсорпционе изотерме је:

$$Q_e = \frac{Q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (3.9)$$

Преуређивањем добија се линеаризован облик *Langmuir*-ове једначине изотерме:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_{\max} K_L} + \frac{1}{Q_{\max}} C_e \quad (3.10)$$

где су: C_e (mg/ml) равнотежна концентрација супстанце у течной фази, Q_e (mg/g) је маса адсорбоване супстанце по јединици масе адсорбента у стању равнотеже, K_L (ml/mg) је *Langmuir*-ова константа повезана са енергијом адсорпције и Q_{\max} (mg/g) је максимална адсорбована количина супстанце (највећа маса адсорбоване супстанце по јединици масе адсорбента) која би се постигла у случају монослојне покривености.

Када се адсорпција одвија по *Langmuir*-овом моделу, графички приказ зависности $C_e/Q_e = f(C_e)$ је права линија чији је нагиб $1/Q_{max}$ и одсечак на у-оси $1/(Q_{max}K_L)$.

***Freundlich*-ова једначина изотерме**

Емпиријски изведена *Freundlich*-ова једначина адсорпционе изотерме добро описује вишеслојну адсорпцију и адсорпцију на хетерогеним површинама. *Freundlich*-ова једначина изотерме (Freundlich, 1906) је:

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (3.11)$$

Логаритмовањем добија се линеаризован облик *Freundlich*-ове једначине изотерме:

$$\log Q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (3.12)$$

где су: Q_e (mg/g) маса адсорбоване супстанце по јединици масе адсорбента у стању равнотеже, C_e (mg/ml) равнотежна концентрација супстанце у течной фази, K_F (mg/g)(mg/ml)ⁿ је *Freundlich*-ова константа повезана са адсорпционим капацитетом, а константа n је мера интензитета адсорпције и енергетске хетерогености површине адсорбента.

Када се адсорпција одвија по *Freundlich*-овом моделу, графички приказ зависности $\log Q_e = f(\log C_e)$ је права линија чији је нагиб $1/n$ и одсечак на у-оси $\log K_F$.

3.2.13. *In vitro* испитивање брзине растварања лековите супстанце из компримата

Испитивање брзине растварања модел лековитих супстанци из узорка компримата који садрже модел супстанцу адсорбовану на модификовани дијатомит или физичку смешу истог садржаја модел супстанце и модификованог дијатомита, изведено је коришћењем апаратуре са проточном хелијом CE 7smart (SOTAX AG, Швајцарска) при сталном протоку медијума од 8 ml/min на 37 °C.

Пре испитивања урађено је одређивање садржаја лековите супстанце у прашкастим узорцима који садрже модел супстанцу адсорбовану на

модификовани дијатомит HPLC методом, а затим и компримовање прашкастих узорака који садрже модел супстанцу адсорбовану на модификовани дијатомит или физичку смешу истог садржаја модел супстанце и модификованог дијатомита у компримате масе 300 mg (пречника 13 mm) на ексцентер таблет машини (ЕКО Korsch, Немачка). Израђени компримати су током испитивања били смештени у жичаним синкерима.

Испитивања су била спроведена у систему „затворене петље” у фосфатном пуферу рН 6,8 и фосфатном пуферу рН 7,5 за компримате са диклофенак-натријумом, односно у фосфатном пуферу рН 7,2 за компримате са ибупрофеном, као и у систему „отворене петље” при следећем протоколу измене медијума: 1 сат у 0,1 М НСl, 2 сата у фосфатном пуферу рН 6,8 и 5 сати у фосфатном пуферу рН 7,4. У одређеним временским интервалима узорковано је 4 ml медијума, а сваки узорак је надокнађен истом запремином свежег медијума. Узорци медијума са раствореном лековитом супстанцом су филтрирани пре одређивања концентрације супстанце спектрофотометријском (Evolution 300 spectrophotometer, Thermo Scientific, САД) или HPLC методом. Сва испитивања су рађена у трипликату и резултати су приказани као проценат ослобођене супстанце у зависности од времена.

3.2.14. Одређивање диклофенак-натријума HPLC методом

Одређивање садржаја и концентрације диклофенак-натријума применом RP-HPLC методе изведено је при следећим условима:

Течни хроматограф: Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Немачка), опремљен кватернерном пумпом, аутосемплером и DAD детектором

Софтвер: Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, Немачка)

Филтри: Nylon мембрански филтри, 0,45 μm (Lab Logistic Group, Немачка)

Систем за добијање воде HPLC квалитета: ТКА Gen pure (Немачка)

Метанол, HPLC квалитета (Sigma Aldrich, Немачка)

Концентрована ортофосфорна киселина р.а. (Merck, Немачка)

Хроматографски услови:

Колона: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μm

Мобилна фаза: метанол и вода (80:20 V/V), рН вредност мобилне фазе подешена је концентрованом ортофосфорном киселином на 2,5

Проток: 1 ml/min

Температура колоне: 30 °C

Таласна дужина детекције: 254 nm

Волумен инјектовања: 20 µl

Одређивање садржаја диклофенак-натријума у прашкастим узорцима који садрже лековиту супстанцу адсорбовану на модификовани дијатомит извршено је на следећи начин: одмери се она количина узорка која садржи 2 mg диклофенак-натријума и екстрахује мобилном фазом у одмерном суду од 10 ml (15 min, на ултразвучном купатилу). Одмерни суд се допуни мобилном фазом до ознаке и профилтрира. Потом се 0,25 ml филтрата разблажи мобилном фазом до 10 ml (очекивана концентрација диклофенак-натријума: 5 µg/ml). Раствор стандарда диклофенак-натријума припремљен је у мобилној фази у истој концентрацији (5 µg/ml). Садржај диклофенак-натријума изражен је у mg/g узорка.

За одређивање концентрације диклофенак-натријума у узорцима медијума прикупљеним током испитивања брзине растварања лековите супстанце из компримата припремљен је раствор стандарда диклофенак-натријума у истом медијуму, тако да концентрација раствора стандарда буде једнака очекиваној концентрацији у испитиваним узорцима.

3.2.15. Одређивање ибупрофена HPLC методом

Одређивање садржаја и концентрације ибупрофена применом RP-HPLC методе изведено је при следећим условима:

Течни хроматограф: Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Немачка), опремљен кватернерном пумпом, аутосемплером и DAD детектором

Софтвер: Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, Немачка)

Филтри: Nylon мембрански филтри, 0,45 µm (Lab Logistic Group, Немачка)

Систем за добијање воде HPLC квалитета: ТКА Gen pure (Немачка)

Ацетонитрил, HPLC квалитета (Sigma Aldrich, Немачка)

Мравља киселина р.а. (JT Baker, Велика Британија)

Хроматографски услови:

Колона: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μm

Мобилна фаза: ацетонитрил и 0,1% раствор мравље киселине (70:30 V/V)

Проток: 1 ml/min

Температура колоне: 30 °C

Таласна дужина детекције: 210 nm

Волумен инјектовања: 20 μl

Одређивање садржаја ибупрофена у прашкастим узорцима који садрже лековиту супстанцу адсорбовану на модификовани дијатомит извршено је на следећи начин: одмери се она количина узорка која садржи 2 mg ибупрофена и екстрахује у одмерном суду од 10 ml помоћу 0,02 M NaOH (15 min, на ултразвучном купатилу). Одмерни суд се допуни са 0,02 M NaOH до ознаке и профилира. Потом се 1,8 ml филтрата разблажи мобилном фазом до 10 ml (очекивана концентрација ибупрофена: 36 μg/ml). Раствор стандарда ибупрофена припремљен је у мобилној фази у истој концентрацији (36 μg/ml). Садржај ибупрофена изражен је у mg/g узорка.

За одређивање концентрације ибупрофена у узорцима медијума прикупљеним током испитивања брзине растварања лековите супстанце из компримата припремљен је раствор стандарда ибупрофена у истом медијуму, тако да концентрација раствора стандарда буде једнака очекиваној концентрацији у испитиваним узорцима.

3.2.16. Анализа профила брзине растварања лековите супстанце из компримата

У циљу процене механизма ослобађања модел супстанци из испитиваних узорака компримата примењени су модели кинетике нултог реда, првог реда, *Higuchi* модел, *Korsmeyer–Peppas* модел и *Hixson–Crowell* модел (Costa и Lobo, 2001). Преглед једначина поменутих модела приказан је у табели 3.2. Степен уклапања експерименталних података у одабране моделе процењен је поређењем вредности коефицијента детерминације (r^2).

Табела 3.2. Преглед математичких модела примењених за описивање профила ослобађања лековитих супстанци

Модел	Једначина
Кинетика нултог реда	$Q_t = Q_0 + k_0t$
Кинетика првог реда	$\ln(Q_{max} - Q_t) = \ln Q_{max} - k_1t$
<i>Higuchi</i>	$Q_t = k_h t^{1/2}$
<i>Korsmeyer–Peppas</i>	$Q_t = kt^n$
<i>Hixson–Crowell</i>	$Q_{max}^{1/3} - (Q_{max} - Q_t)^{1/3} = k_s t$

Q_t - проценат растворене лековите супстанце у времену t

Q_0 - проценат растворене лековите супстанце у почетном времену ($Q_0 = 0$)

Q_{max} - проценат нерастворене лековите супстанце у почетном времену ($Q_{max} = 100\%$)

k_0 и k_1 - константе ослобађања нултог и првог реда

k_h - константа ослобађања *Higuchi* модела

k - константа која укључује структурна и геометријска својства дозираниг облика

k_s - константа која укључује однос површина-запремина

n - експонент *Korsmeyer–Peppas* модела који указује на механизам ослобађања

3.2.17. Фармаколошко-токсиколошко испитивање акутне токсичности/нешкодљивости

Испитивање акутне токсичности/нешкодљивости изведено је у складу са препорукама FDA (CDER, 2005) и интерним протоколом за Испитивање нешкодљивости (Институт за истраживање и развој, Галеника а.д., Београд) са циљем процене безбедности примене добијених модификованих дијатомита. Поред узорак модификованих дијатомита, испитивање је спроведено и са узорцима полазних дијатомита.

За испитивање су коришћени мишеви соја NMRI HAN ($n = 5$), телесне масе 19-21 g. Животиње су чуване у макролонским кавезима по 5 у групи. Храна и вода

су животињама биле доступне *ad libitum*, изузев током припреме за орално давање када су им били одузети 4-6 h пре извођења експеримента. Апликација испитиваног узорка вршена је перорално у количини која је износила 2000 mg/kg телесне масе животиње. Испитивање је трајало 72 h у оквиру чега је посматрано испољавање знакова токсичне реакције или евентуално угинуће животиња.

Експерименти су спроведени у складу са принципима НИН Водича за чување и употребу лабораторијских животиња (National Research Council, 2011).

3.2.18. Испитивање аналгетичке/антиедематозне активности композита и физичких смеша лековита супстанца-модификовани дијатомит

Циљ ове фазе испитивања био је да се у *in vivo* условима испита:

- утицај носача, модификованог дијатомита, на интензитет и дужину трајања антихипералгезијског/антиедематозног дејства лековите супстанце у моделу инфламаторног бола у пацова
- утицај начина припреме материјала (композит и физичка смеша лековите супстанце са модификованим дијатомитом) на интензитет и дужину трајања антихипералгезијског/антиедематозног дејства у моделу инфламаторног бола у пацова

Лековита супстанца, модификовани дијатомит са адсорбованом лековитом супстанцом и физичка смеша лековите супстанце са модификованим дијатомитом суспендовани су у дестилованој води уз додатак 1 капи Tween-а 80 и хомогенизовани на Vortex мешалици у трајању од 15 min. Суспензије су примењиване пероралним путем (р.о.) помоћу интрагастричне сонде у финалној запремини од 2 ml/kg телесне масе пацова. Карагенан (1% m/v) је диспергован у физиолошком раствору 24 h пре планираног експеримента, а примењиван је интраплантарно (i.pl.) у запремини од 0,1 ml по шапи пацова, користећи шприц од 1 ml и иглу од 26 G (0,45 x 12 mm).

Чување експерименталних животиња

Експерименти су изведени на мужјацима пацова *Wistar* соја телесне масе 190-250 g. Животиње су чуване у виваријуму под стандардним лабораторијским условима: температура од 20-25 °C са природним циклусом дан и ноћ (12/12 h) и

релативна влажност ваздуха од 60%. Животиње су биле смештене у специјалним кавезима од плексигласа димензија 42,5 x 27 x 19 cm³ (4 по кавезу), са жичаном решетком постављеном одозго. Као подлога у кавезима коришћена је струготина од дрвета. Храна (специјални брикети за исхрану експерименталних животиња, Ветзагод, Суботица) и вода били су доступни 24 h дневно, осим током трајања експеримента. Како би се навикле на услове виваријума, све животиње су боравиле најмање 3 дана пре почетка експеримента у просторијама виваријума. На дан експеримента, животиње су из виваријума преносене у лабораторију најмање 1 h пре почетка експеримента. Сви експерименти су извођени увек у исто доба дана (од 8 до 17 h), како би се избегле циркадијалне варијације у бихејвиоралним тестовима.

Експерименталну групу чинило је 5-9 животиња. Контролна група животиња је добијала карагенан и одговарајућу запремину вехикулума за суспендовање лековите супстанце/композиата/физичке смеше лековите супстанце са модификованим дијатомитом као носачем и била је подвргнута истој експерименталној процедури. Поред контролне постојала је и поредбена група која је поред карагенана добијала модификован дијатомит у одговарајућој запремини вехикулума. Свака животиња је коришћена у експерименту само једном. Након извршеног тестирања, животиње су жртвоване високом концентрацијом угљен-диоксида.

Све експерименталне процедуре одобрене су Решењем о одобрењу спровођења огледа на животињама које је донело Министарство пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије (број 323-07-05821/2015-05/1). Приликом рада са експерименталним животињама и извођењу експеримента примењивани су етички принципи дефинисани Правилником за рад са експерименталним животињама Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, као и етички принципи НИН Водича за чување и употребу лабораторијских животиња (National Research Council, 2011).

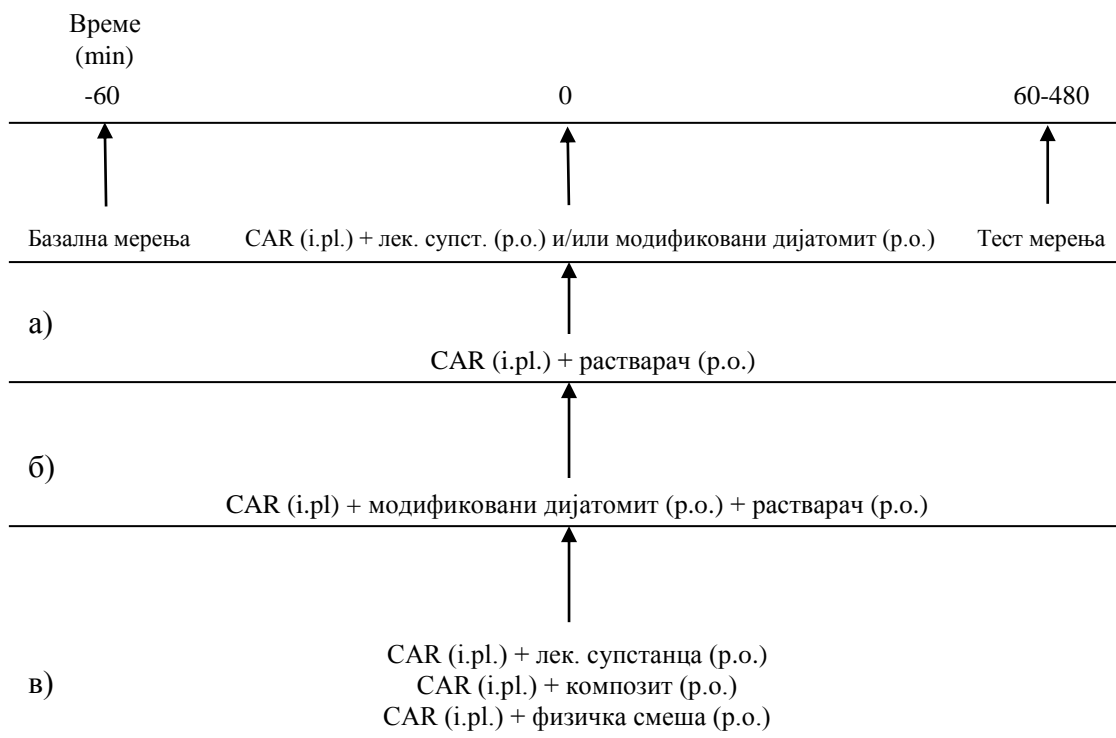
Модел инфламаторног бола

У циљу испитивања утицаја носача и начина припреме носача са лековитом супстанцом на интензитет и дужину трајања антихипералгезијског и

антиедематозног дејства лековите супстанце коришћен је модел акутне локализоване инфламације у пацова (Степановић-Петровић и сар., 2012).

Изазивање инфламације

Инфламација је изазивана i.pl. инјекцијом карагенана у задњу десну шапу пацова, што је праћено развојем болне преосетљивости (хипералгезије) и едема, те омогућава истовремено испитивање антихипералгезијског и антиедематозног дејства одређених третмана. Карагенанска инфламација је акутна, неимунска и високо репродуцибилна. Посредована је ослобађањем медијатора запаљења: иницијално хистамина и серотонина (5-хидрокситриптамина, 5-НТ), а потом тахикинина, брадикинина и простагландина (PGE₂), који активирају ноцицепторе и/или повећавају њихову осетљивост у инфламираном ткиву шапе (Morris, 2003).



Слика 3.1. Експериментални протокол за праћење развоја хипералгезије/едема изазване/ог инјекцијом карагенана (CAR) у задњу десну шапу пацова (а), утицаја модификованог дијатомита на развој хипералгезије/едема (б) и на антихипералгезијско/антиедематозно дејство лековите супстанце, композита (лековита супстанца адсорбована на носач) и физичке смеше лековите супстанце са носачем (в).

Експериментални протокол

За испитивање утицаја носача и начина припреме носача са лековитом супстанцом на интензитет и дужину трајања антихипералгезијског и антиедематозног дејства лековите супстанце, лек је примењиван (р.о.) непосредно пре индукције инфламације карагенаном (i.pl.) (слика 3.1 в). Контролна група животиња је уместо испитиване супстанце добила растварач (р.о.) у истој запремини и карагенан (i.pl.) (слика 3.1 а), а поредбена група модификовани дијатомит (р.о.), растварач (р.о.) у одговарајућој запремини и карагенан (i.pl.) (слика 3.1 б). Базална мерења вршена су пре индукције инфламације и примене лековите супстанце, а тест мерења 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 и 480 min након индукције инфламације и третмана.

Испитивање антихипералгезијског дејства

Хипералгезија и утицај различитих третмана на хипералгезију мерени су модификованим тестом притиска на задње шапе пацова (енгл. *paw pressure test*). Тест је изведен као модификација методе коју су представили Randall и Sellito (1957), при чему је коришћен апарат за мерење притисака (g), апликованих на задње шапе пацова у циљу одређивања разлика између леве (неинфламиране) и десне (инфламиране) шапе (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus D-79232, Немачка). Пацов се придржава тако да се задњим шапама ослони на две платформе које су преко трансдјусера повезане са кућиштем апарата. Благим покретом руке, пацов се гура на доле, све док се не достигне гранична вредност силе (енгл. *trigger level*) од 100 g на једној од шапа. У том тренутку чује се звучни сигнал, мерење се прекида, а на контролној плочи се очита вредност сила (притисака), са тачношћу од 0,1 g, апликованих на леву и десну шапу. Гранична вредност силе од 100 g одабрана је тако да представља благи ноцицептивни стимулус довољан да се детектује ноцицептивна хиперсензитивност (хипералгезија). Животиње штеде болну (инфламирану) шапу и пуном снагом се ослањају на здраву (неинфламирану) шапу. Апаратом се мере притисци ослањања на здраву и шапу са хипералгезијом, а потом се израчунава разлика у притисцима ослањања, df (g), као мера болне преосетљивости (хипералгезије) изазване инфламацијом (Томић и сар., 2004):

df (g) = притисак (g) апликован на здраву шапу – притисак (g) апликован на шапу
са хипералгезијом

Мерење се понавља 4 пута узастопно у свакој временској тачки, а средња вредност df (g) израчуната из 4 мерења за сваку животињу понаособ коришћена је у даљим израчунавањима. За супстанце које смањују разлику у притисцима ослањања између здраве шапе и шапе са хипералгезијом, у поређењу са контролном групом, може се рећи да имају антихипералгезијско дејство.

Процент антихипералгезијског дејства (%АН) лековите супстанце/ лековите супстанце са носачем рачунат је према следећој формули:

$$\% \text{АН} = \frac{\text{(средња вредност df контролне групе – df појединачне животиње у тест групи)}}{\text{средња вредност df контролне групе}} \times 100$$

Уколико је df појединачне животиње у тест групи веће од средње вредности df контролне групе, рачунато је да је ефекат 0%АН.

Испитивање антиедематозног дејства

Антиедематозна активност лековите супстанце/лековите супстанце са носачем испитивана је мерењем едема задње шапе пацова плетизмометром (Ugo Basile, Италија) на претходно описан начин (Степановић-Петровић и сар., 2012). Плетизмометар се састоји од два вертикална цилиндра међусобно повезана и напуњена раствором електролита и квасећег средства. У шири цилиндар ураћа се шапа пацова, а у ужи је урођен трансдјусер. Када се шапа пацова потопи до тибео-тарзалног зглоба, нивои течности у оба цилиндра се промене, а трансдјусер детектује запремину истиснуте течности која одговара запремини шапе. Запремина шапе (у милилитрима) се читава на дигиталном дисплеју. Базална мерења запремина шапа су читавана пре примене карагенана/лековите супстанце, а тест мерења 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 и 480 min након примене карагенана/третмана. У свакој временској тачки је касније рачуната разлика у запремини (dv) између третиране (инфламиране) и базалне запремене шапе према следећој формули:

$$dv = \text{запремина инфламиране шапе (ml)} - \text{базална запремина исте шапе (ml)}$$

Мерења су понављана два пута у свакој временској тачки и средња вредност dv је коришћена за даља израчунавања.

За супстанце које смањују вредности dv у поређењу са контролном групом, може се рећи да испољавају антиедематозно дејство.

Процент антиедематозног дејства (%АЕ) лековите супстанце/лековите супстанце са носачем рачунат је према следећој формули (Степановић-Петровић и сар., 2012):

$$\%AE = \frac{\text{(средња вредност } dv \text{ контролне групе} - dv \text{ појединачне животиње у тест групи)}}{\text{средња вредност } dv \text{ контролне групе}} \times 100$$

Уколико је dv појединачне животиње у тест групи веће од средње вредности dv контролне групе, рачунато је да је ефекат 0%АЕ.

Анализа дужине трајања дејства

За анализу дужине трајања антихипералгезијског/антиедематозног дејства лековите супстанце и лековите супстанце са носачем израчунаване су површине испод криве (РІК) на чијој апсциси је представљено време (min) након примене третмана, а на ординати је представљена разлика у притисцима ослањања између здраве шапе и шапе са хипералгезијом - df (g) или разлика у запремини између третиране (инфламиране) и базалне запремине шапе - dv , применом трапезоидног правила (Tallarida и Murray, 1986). Потом су формиране разлике у РІК између контролне (група која је добила вехикулум уместо лековите супстанце) и експерименталне групе (група која је добила одговарајући третман) ($RIK_{\text{kontrol}} - RIK_{\text{eksp}}$), које су директно пропорционалне интензитету антихипералгезијског/антиедематозног дејства. Разлика између RIK_{kontrol} и RIK_{eksp} (ΔRIK), изражена је у функцији процента антихипералгезијског дејства (%АН) односно антиедематозног дејства (%АЕ) одређеног третмана, постигнутог у тренутку максималног ефекта. Линеарна зависност између ова два параметра означава да је дужина трајања дејства примењене дозе лековите супстанце зависна од дозе (Yaksh и сар., 1986; Томић и сар., 2010).

Нагиби добијених регресионих крива ($\Delta RIK = a \times \%АН/\%АЕ + b$, где је a нагиб криве, а b одсечак на у-оси) су релативна мера дужине трајања дејства

лекова, тј. што је нагиб већи, трајање антихипералгезијског/антиедематозног дејства је дуже (Yaksh и сар., 1986; Томић и сар., 2010). Уколико се нагиби %АН-ΔРІК/%АЕ-ΔРІК регресионих крива за два третмана не разликују значајно, сматра се да имају приближно сличну дужину трајања дејства. Да ли су разлике између нагиба кривих испитиваних третмана статистички значајне, процењивано је тестом паралелизма (Tallarida и Murray, 1986).

Додатно, на бази израчунатих коефицијената корелације за %АН-ΔРІК и %АЕ-ΔРІК регресионе криве процењује се да ли је дужина трајања дејства одговарајућих третмана дозно зависна (Yaksh и сар., 1986; Томић и сар., 2010).

Статистичка обрада и приказ резултата

ED₅₀ вредност (доза лека која остварује 50%АН односно 50%АЕ) утврђена је регресионом анализом линеарног дела одговарајуће криве односа дозе и ефекта у време постизања максималног ефекта (Tallarida и Murray, 1986).

Резултати су приказани као средња вредност ± SEM (стандардна грешка) у групи од 5-9 животиња. При статистичкој обради резултата коришћени су следећи рачунарски програми: *Pharm PCS* (Pharmacological Calculation System) (Micro-Computer Specialists, Philadelphia, PA, USA), *SigmaPlot 11.0* и *Microsoft Excel*.

Pharm PCS програм коришћен је за израчунавање: ED₅₀ вредности са 95% интервалима поверења, површина испод кривих (трапезоидно правило) и тест паралелизма. Програмом *SigmaPlot* рађена је ANOVA у линеарној регресији уз *Bonferroni post hoc* тест.

При статистичкој обради резултата коришћени су следећи статистички тестови: двофакторска ANOVA, *Bonferroni* и *Student-ов t*-тест.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

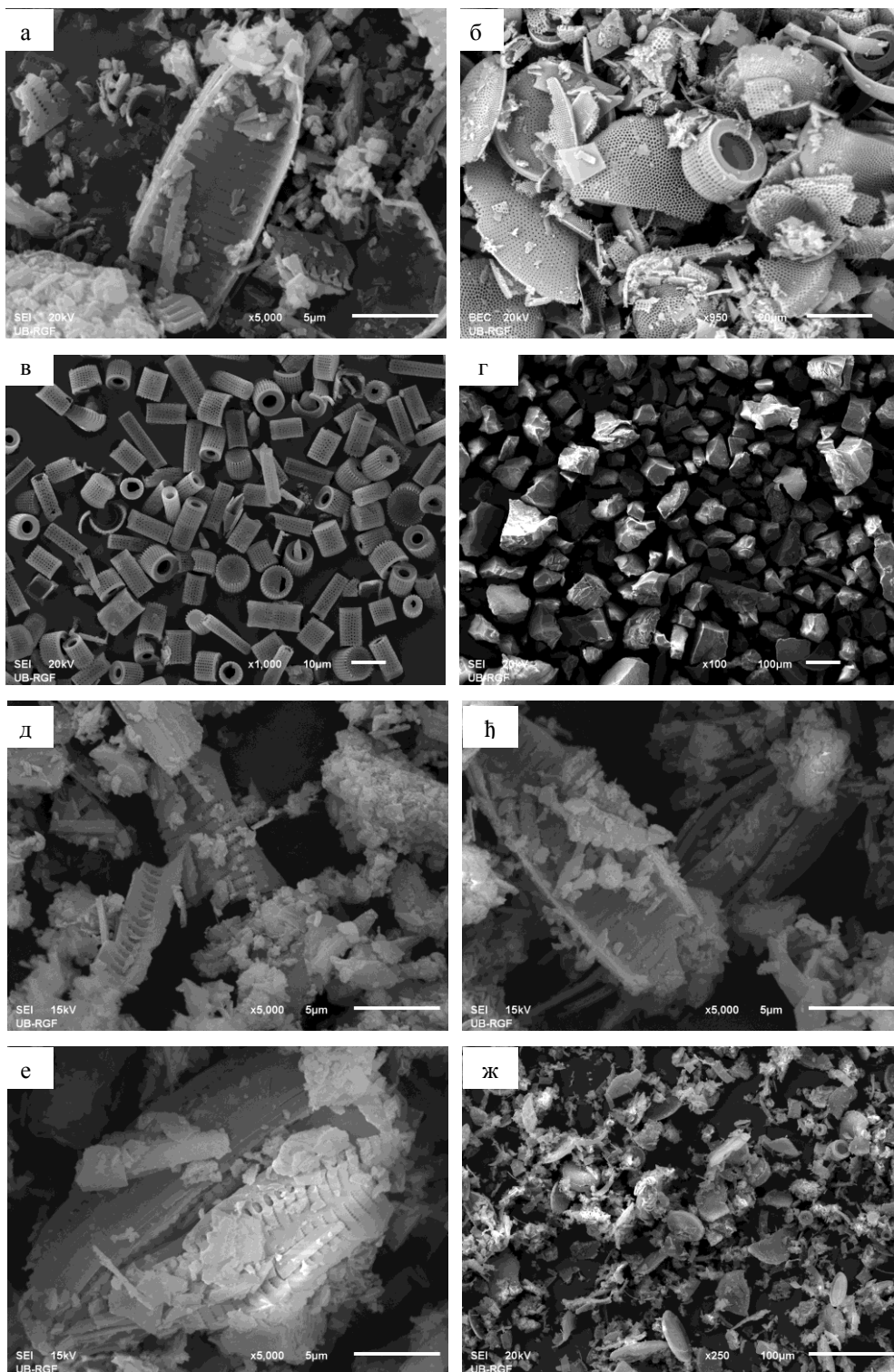
4.1. РЕЗУЛТАТИ I ФАЗЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

4.1.1. Скенирајућа електронска микроскопија у спреси са енергетско-дисперзивном рендгенском спектрометријом (SEM-EDS анализа)

SEM микрографије перуанског дијатомита (DP), пречишћеног колубарског дијатомита (DK), пречишћеног аустралијског дијатомита (DA), делимично неутралисаног алуминијум-сулфата (BAS), модификованих перуанских дијатомита MD250, MD500, MD750 и модификованог колубарског дијатомита MD приказане су на слици 4.1.

Честице перуанског дијатомита су биле неуједначене у погледу величина и облика и највећим делом су се састојале из сломљених делова фрустула (делова валви и цингулума). Довољно очуване валве су биле издужене, билатерално симетричне са уређеном порозном грађом (слика 4.1 а). Пречишћени колубарски дијатомит су највећим делом чиниле радијално симетричне фрустуле чији су се редови пора зракасто ширили од средишње тачке кружних валви (слика 4.1 б). Радијално симетричне фрустуле ваљкастог облика са паралелним редовима пора на валварном ободу су биле мање заступљене (слика 4.1 б). Према налазима аутора (Aw и сар., 2011; Variana и сар., 2013) који су у својим испитивањима користили пречишћен аустралијски дијатомит произвођача Mount Sylvia Diatomite Pty. Ltd. (Аустралија), у наведеном материјалу најзаступљеније су биле фрустуле дијатомеја рода *Aulacoseira*, ваљкастог облика, пречника 4-6 μm , дужине 10-20 μm са правилним редовима пора промера 400-500 nm. SEM микрографија узорка материјала истог порекла (слика 4.1 в) потврђује ове налазе.

Делимично неутралисан алуминијум-сулфат (BAS), припремљен засебно, имао је честице неправилног облика, оштрих ивица и различите величине (слика 4.1 г).



Слика 4.1. SEM микрографије узорака DP (а), DK (б), DA (в), BAS (г), MD250 (д), MD500 (ж), MD750 (е) и MD (ж)

Поступак модификације дијатомита (и перуанског и пречишћеног колубарског) кроз *in situ* образовање BAS-а и потоње сушење и уситњавање

добијеног материјала резултирао је честицама које садрже различите уделе/количине делова фрустула и супстанце за модификацију. Изворна грађа фрустула је очувана након модификације (Слика 4.1 д–ж).

Резултати EDS анализе полазних и модификованих дијатомита, као и самог делимично неутралисаног алуминијум-сулфата представљени су у табели 4.1.

Табела 4.1. Хемијски састав узорака полазних и модификованих дијатомита и самог делимично неутралисаног алуминијум-сулфата према EDS анализи

Узорак	Елемент (масени %)									
	Na	K	Mg	Ca	Al	Si	S	Ti	Fe	O
DP	0,0	0,39	0,43	0,46	2,34	43,1	0,0	0,15	1,02	52,12
DK	0,0	0,3	0,0	0,2	1,9	33,8	0,2	0,0	0,9	62,6
BAS	1,75	0,0	0,0	0,0	28,68	0,0	17,4	0,0	0,0	52,17
MD250	0,63	0,28	0,24	0,14	11,99	27,76	6,07	0,0	0,8	52,09
MD500	0,54	0,25	0,25	0,0	9,48	31,59	4,71	0,0	1,02	52,17
MD750	0,46	0,35	0,29	0,16	8,23	33,65	3,8	0,0	0,94	52,11
MD	0,6	0,3	0,0	0,0	7,2	25,0	3,4	0,0	0,8	62,7

Као што је и очекивано, силицијум и кисеоник су најзаступљенији елементи у узорцима дијатомита. Присуство алуминијума у полазним дијатомитима највероватније указује на онечишћења типа глина у саставу полазних узорака. За хемијски састав пречишћеног аустралијског дијатомита се у литератури (Losic и сар., 2010) наводи да је садржај силицијум-диоксида већи од 95% одређено рендгенском флуоресцентном спектрометријом.

Делимично неутралисан алуминијум-сулфат, припремљен засебно, садржао је 28,68% алуминијума, 17,4% сумпора и 52,17% кисеоника. Према налазима Hsu и Bates-а (1964), додатком базе (NaOH) кап по кап у раствор алуминијум-сулфата при OH/Al моларном односу једнаком или мањем од 2,75, образују се аморфни базни алуминијум-сулфати чији је састав у распону

моларних односа NaOH/Al од 0,3 до 2,1 константан и износи приближно $\text{Al}(\text{OH})_{2,2}(\text{SO}_4)_{0,4}$. Међутим, брзим додатком базе у раствор алуминијум-сулфата при моларном односу OH/Al од 1,9 и каснијим сушењем добијеног гела на $60\text{ }^\circ\text{C}$ припремљен је делимично неутралисани алуминијум-сулфат (супстанца за модификацију) чији се састав донекле разликовао од оног који је очекиван према испитивањима Hsu и Bates-a (1964) због разлика у поступку припреме.

Након модификације дијатомита, дошло је до пораста у садржају алуминијума и сумпора и пада у садржају силицијума услед присуства делимично неутрализованог алуминијум-сулфата. Поређењем модификованих перуанских дијатомита према следећем редоследу MD250:MD500:MD750, нађено је да долази до постепеног пада садржаја алуминијума и сумпора, као и постепеног пораста садржаја силицијума. Оваква правилност последица је поступка модификације где се растућа количина дијатомита модификује сталном количином BAS-a.

4.1.2. Одређивање расподеле величина честица методом дифракције ласерске светлости

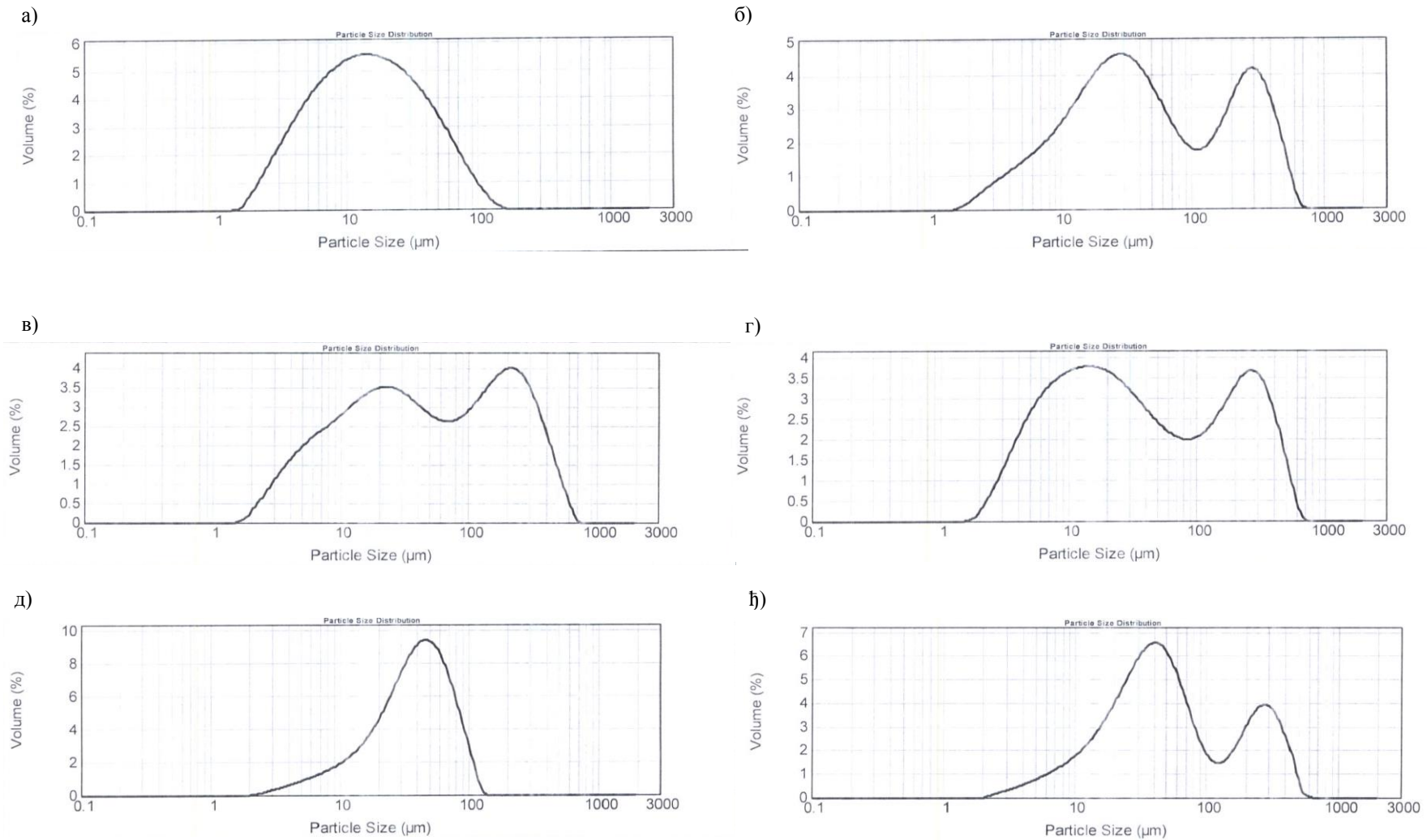
Резултати одређивања расподеле величина честица перуанског, пречишћеног колубарског дијатомита, модификованих перуанских дијатомита и модификованог колубарског дијатомита представљени су у табели 4.2 и на слици 4.2 а–ђ.

Расподела величина честица је унимодална и симетрична код перуанског дијатомита (слика 4.2 а), а код пречишћеног колубарског дијатомита расподела је унимодална и асиметрична (због просејавања) (слика 4.2 д). Запремински средњи пречник (средњи пречник масеног момента) $D[4,3]$ честица колубарског дијатомита ($42,35\text{ }\mu\text{m}$) је скоро двоструко већи него у честица перуанског дијатомита ($22,26\text{ }\mu\text{m}$), док је ширина расподеле (span) честица колубарског дијатомита (1,75) скоро двоструко мања него у честица перуанског дијатомита (3,32) (табела 4.2). За пречишћени аустралијски дијатомит се у литератури (Aw и сар., 2012) налази да је запреминска расподела величина честица готово симетрична са пиком на $10\text{ }\mu\text{m}$.

Табела 4.2. Вредности параметара расподеле величина честица узорак полазних и модификованих дијатомита

Узорак	d(0,1) (μm)	d(0,5) (μm)	d(0,9) (μm)	span	D[4,3] (μm)
DP	4,03	14,43	51,96	3,32	22,26
MD250	7,79	40,69	332,17	7,97	111,35
MD500	6,18	45,07	297,9	6,47	106,5
MD750	5,46	30,85	307,68	9,8	99,7
DK	11,62	38,38	78,74	1,75	42,35
MD	12,19	45,35	291,5	6,16	98,31

За разлику од полазних, сви модификовани дијатомити имали су бимодалну расподелу величина честица (слика 4.2 б–г, њ), где највероватније ситнију фракцију чине честице у чијем саставу преовлађују делови фрустула дијатомита, а крупнију фракцију сачињавају честице у којима преовлађује делимично неутралисани алуминијум-сулфат. У односу на одговарајуће полазне дијатомите, код модификованих дијатомита дошло је до значајног повећања запреминског средњег пречника честица, али и ширине расподеле величина честица. Са повећањем удела полазног дијатомита у саставу модификованих перуанских дијатомита, запремински средњи пречник је незнатно опао ($111,35 > 106,5 > 99,7 \mu\text{m}$) (табела 4.2). Модификовани колубарски дијатомит, иако припремљен од полазног узорка знатно већих честица, показао је сличну и чак нешто нижу вредност запреминског средњег пречника ($98,31 \mu\text{m}$) у односу на одговарајући модификовани перуански дијатомит MD500 ($106,5 \mu\text{m}$) (табела 4.2).



Слика 4.2. Запреминска расподела величина честица узорака DP (а), MD250 (б), MD500 (в), MD750 (г), DK (д) и MD (ж)

4.1.3. Одређивање специфичне површине методом адсорпције-десорпције азота на температури течног азота

Резултати одређивања специфичне површине и укупне запремине пора узорака перуанског, пречишћеног колубарског дијатомита, модификованих перуанских дијатомита и модификованог колубарског дијатомита наведени су у табели 4.3.

Табела 4.3. Специфична површина и укупна запремина пора узорака полазних и модификованих дијатомита

Узорак	DP	MD250	MD500	MD750	DK	MD
$S_{\text{ВЕТ}}$ (m^2/g)	13,3	5,5	9,8	8,3	47,6	12,7
V_{P}^* (cm^3/g)	0,043	0,047	0,049	0,058	0,064	0,049

* укупна запремина пора израчуната према *Gurvich*-евом правилу при релативном притиску $p/p_0=0,98$

Специфична површина ($S_{\text{ВЕТ}}$) пречишћеног колубарског дијатомита била је скоро 4 пута већа, а запремина пора (V_{P}) приближно 1,5 пута већа од перуанског дијатомита. У односу на специфичну површину и запремину пора пречишћеног аустралијског дијатомита ($S_{\text{ВЕТ}} = 30,9 \text{ m}^2/\text{g}$ $V_{\text{P}} = 0,052 \text{ cm}^3/\text{g}$, *Aw* и *cap.*, 2011) као и пречишћеног тржишно доступног дијатомита *Fossil Shell Flour*[®] ($S_{\text{ВЕТ}} = 30,6 \text{ m}^2/\text{g}$ $V_{\text{P}} = 0,077 \text{ cm}^3/\text{g}$, *Zhang* и *cap.*, 2013), вредности $S_{\text{ВЕТ}}$ и V_{P} перуанског дијатомита су биле ниже, а код пречишћеног колубарског дијатомита $S_{\text{ВЕТ}}$ је била виша, док је вредност V_{P} била између вредности датог параметра поменутих узорак. Након модификације дијатомита специфична површина је смањена и то смањење је било израженије код узорка модификованог колубарског дијатомита него код узорак модификованог перуанског дијатомита.

4.1.4. Мерење електрокинетичког (зета) потенцијала

Резултати мерења електрокинетичког (зета - ζ) потенцијала узорак перуанског, пречишћеног колубарског дијатомита, модификованих перуанских дијатомита и модификованог колубарског дијатомита приказани су у табели 4.4.

Табела 4.4. Електрокинетички (ζ) потенцијал узорака полазних и модификованих дијатомита

Узорак	DP	MD250	MD500	MD750	DK	MD
ζ потенцијал (mV)	-29,4±0,5	-7,3±1,3	-1,3±1,4	-5,1±2,2	-29±1,2	+8,5±0,4

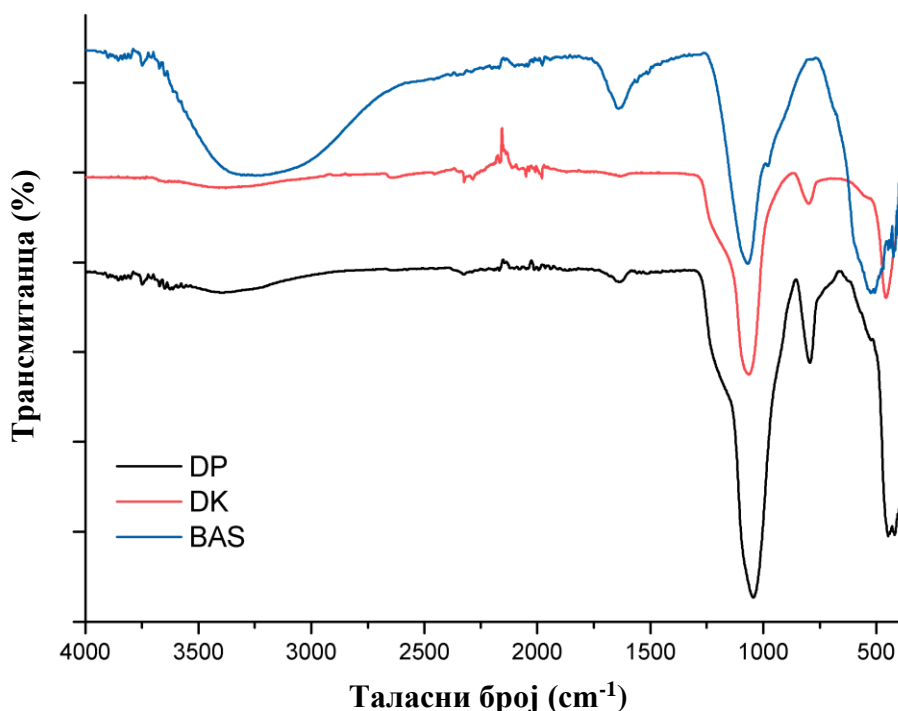
Вредности зета потенцијала перуанског и пречишћеног колубарског дијатомита сличне су вредностима зета потенцијала пречишћеног тржишно доступног дијатомита Fossil Shell Flour® ($\zeta = -35,6 \pm 0,4$ mV при pH 7,0; Zhang и сар., 2013).

Вредности зета потенцијала узорака полазних дијатомита значајно су измењене након модификације, постајући мање негативне код узорака модификованих перуанских дијатомита, односно позитивне код узорка модификованог колубарског дијатомита. Честице узорака модификованих перуанских дијатомита вероватно чине делови фрустула који нису потпуно прекривени или уметнути у делимично неутралисани алуминијум-сулфат, што је довело до смањења, али не и до конверзије негативног наелектрисања дијатомита. Честице модификованог колубарског дијатомита су боље покривене супстанцом за модификацију на шта упућује позитивна вредност зета потенцијала.

У прилог наведеним резултатима/закључцима могу се навести налази Zhang и сарадника (2011) који су тржишно доступан кинески дијатомит модификовали облагањем филмом алуминијум-оксида. На основу одређивања изоелектричне тачке утврђено је да су у неутралној воденој средини честице дијатомита електронегативне, а честице дијатомита обложене (потпуно прекривене) алуминијум-оксидом електропозитивне.

4.1.5. Инфрацрвена спектроскопија са Fourier-овом трансформацијом (FTIR спектроскопска анализа)

FTIR спектри перуанског дијатомита DP, пречишћеног колубарског дијатомита DK и делимично неутралисаног алуминијум-сулфата BAS представљени су на слици 4.3.



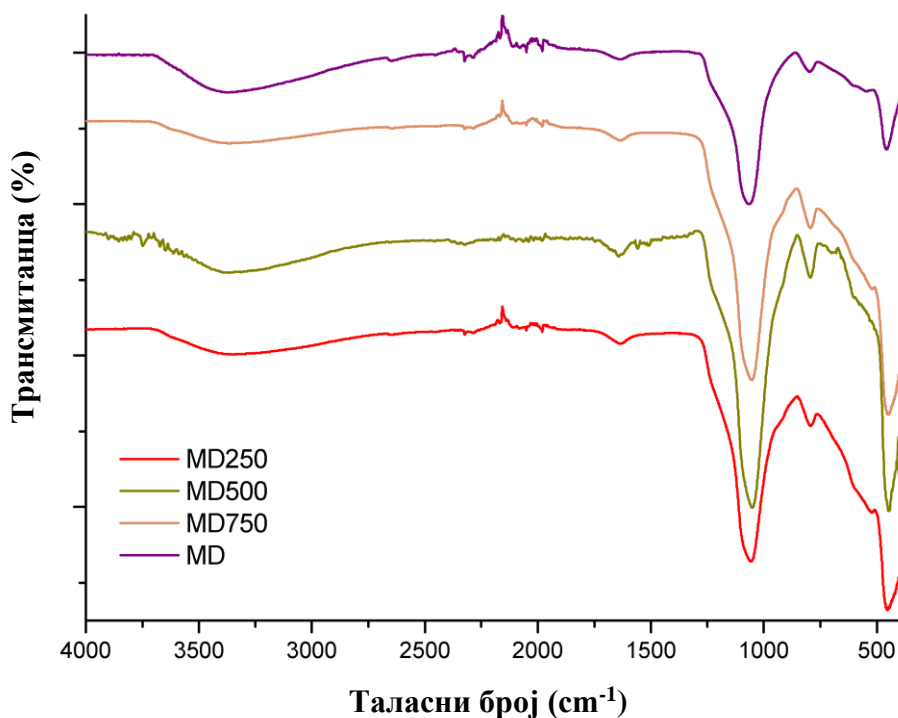
Слика 4.3. FTIR спектри узорака DP, DK и BAS

Траке својствене дијатомејском силицијум-диоксиду које се у FTIR спектру узорка DP јављају на 448 cm^{-1} , 794 cm^{-1} и 1044 cm^{-1} , а у FTIR спектру узорка DK на 456 cm^{-1} , 799 cm^{-1} и 1065 cm^{-1} , повезане су редом са Si–O–Si савијањем, симетричним и асиметричним Si–O–Si истезањем (Piia и сар., 2009; Gulturk и Guden, 2011). Мали пик на 524 cm^{-1} у FTIR спектру узорка DP вероватно потиче од Si–O–Al вибрација услед мале количине присутних онечишћења типа глина (Madeјова и Komadel, 2001; Piia и сар., 2009). Кварц и дехидроксилован илит, нечистоће присутне у пречишћеном колубарском дијатомиту (минерални састав узорка DK приказан је у раду Јанићијевић и сар., 2015), такође дају неке

својствене траке (Vaculíková и Plevová, 2005; Jiang и сар., 2008; Oumabady Alias Cannane и сар., 2013) у истом региону као и дијатомејски силицијум-диоксид. У FTIR спектрима узорака DP и DK појављује се на 1631 cm^{-1} слаба трака приписана Н–О–Н савијању, као и широка трака између 3200 cm^{-1} и 3550 cm^{-1} услед О–Н истецања.

Делимично неутралисан алуминијум-сулфат (BAS) показао је широку траку између 3060 cm^{-1} и 3360 cm^{-1} услед О–Н истецања, траку на 1640 cm^{-1} узроковану Н–О–Н савијањем, траку на 1070 cm^{-1} са раменом на 981 cm^{-1} повезану са истецањем сулфатног анјона и траку на 526 cm^{-1} приписану Al–O вибрацијама (García-Gonzales и сар., 2000; Bhattacharya и сар., 2004).

На слици 4.4 приказани су FTIR спектри модификованих перуанских дијатомита MD250, MD500, MD750 и модификованог колубарског дијатомита MD.



Слика 4.4. FTIR спектри узорака MD250, MD500, MD750 и MD

Траке које одговарају особеним вибрацијама дијатомејског силицијум-диоксида присутне су и у FTIR спектрима узорака модификованих перуанских и

модификованог колубарског дијатомита (452 cm^{-1} , 793 cm^{-1} , 1058 cm^{-1} за MD250; 444 cm^{-1} , 794 cm^{-1} , 1051 cm^{-1} за MD500; 448 cm^{-1} , 793 cm^{-1} , 1054 cm^{-1} за MD750; 456 cm^{-1} , 796 cm^{-1} и 1065 cm^{-1} за MD) што указује да током модификације не долази до промене структуре дијатомита.

Модификација дијатомита сличним неорганским једињењем (облагање филмом алуминијум-оксида) такође не доводи до промене структуре дијатомита (Zhang и сар., 2011).

4.1.6. Термогравиметријска, деривативна термогравиметријска и диференцијална термална анализа (TG/DTG/DTA)

Резултати TG, DTG и DTA анализе перуанског дијатомита DP, пречишћеног колубарског дијатомита DK и делимично неутрализованог алуминијум-сулфата BAS приказани су на слици 4.5 а–г, а резултати истих анализа модификованих перуанских дијатомита MD250, MD500, MD750 и модификованог колубарског дијатомита MD приказани су на слици 4.6 а–в.

Губитак масе загревањем узорка до приближно $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ износио је 5,5% за DP, 2,1% за DK и 29,9% за BAS. Узорци дијатомита испољили су израженији губитак масе загревањем до приближно $235\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DP) односно $165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DK), а даље загревање је било праћено мањим континуалним губитком масе. На DTG кривој узорка DP пикови на $76\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ се доводе у везу са губитком воде из дијатомејског силицијум-диоксида и онечишћења типа глина (Rowland, 1955; Pia и сар., 2009). Широки, интензивни ендотермни пикови на $108\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DP) и $114\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DK) код DTA кривих узорка дијатомита означавају дехидратацију (Pia и сар., 2009; Földvári, 2011). На DTA кривој узорка DP мањи ендотермни пикови на $490\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $643\text{ }^{\circ}\text{C}$ могу се повезати са дехидроксилацијом онечишћења типа глина, а ендотермни пик на $837\text{ }^{\circ}\text{C}$ за којим следи егзотермни пик на $912\text{ }^{\circ}\text{C}$ највероватније потичу од структурне декомпозиције и кристализације нових фаза из онечишћења типа глина (Rowland, 1955; Vaculíková и Plevová, 2005). Егзотермни пик на $955\text{ }^{\circ}\text{C}$ код DTA криве узорка DK указује на урушавање кристалне решетке и образовање спинела из илита (Földvári, 2011). Фазни прелаз дијатомејског силицијум-диоксида из неуређене opal-A структуре у уређени α -кристобалит може се

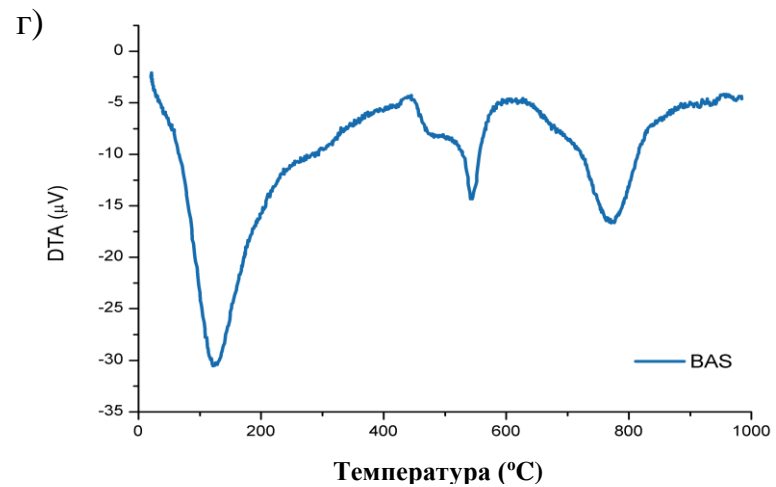
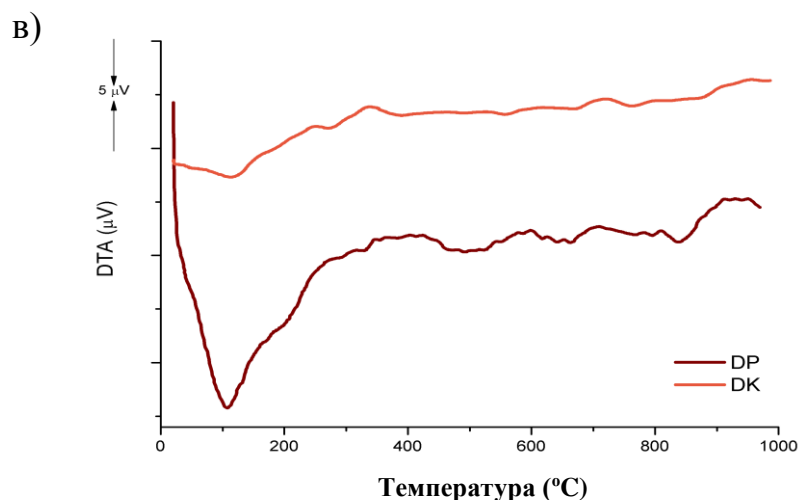
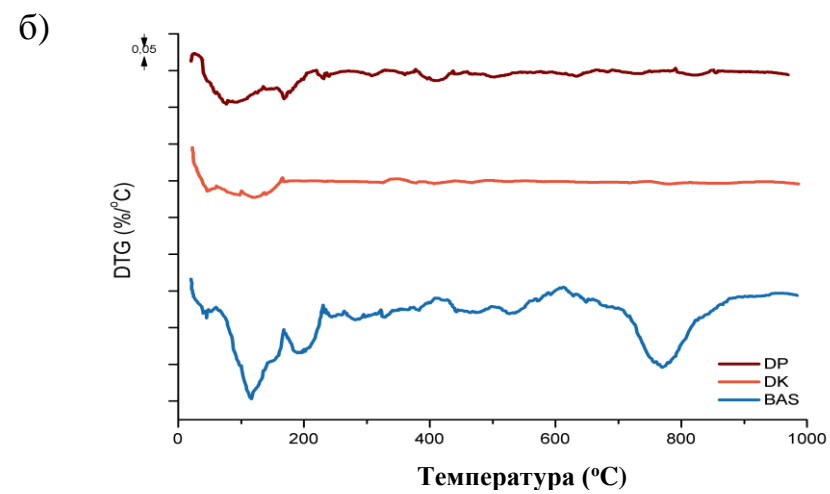
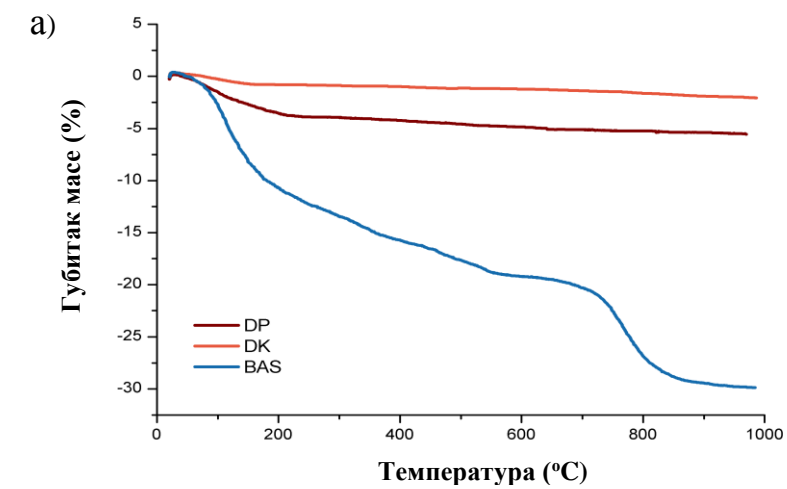
очекивати тек на температурама изнад 1000 °C, те стога није видљив на приказаним термограмима.

Три главна пика на DTG кривој узорка BAS, који се јављају на 111 °C, 198 °C и 773 °C, представљају редом дехидратацију, дехидроксијацију и десулфуризацију узорка (Brydon и Singh, 1969; Kloprogge и сар., 1992; Bhattacharya и сар., 2004).

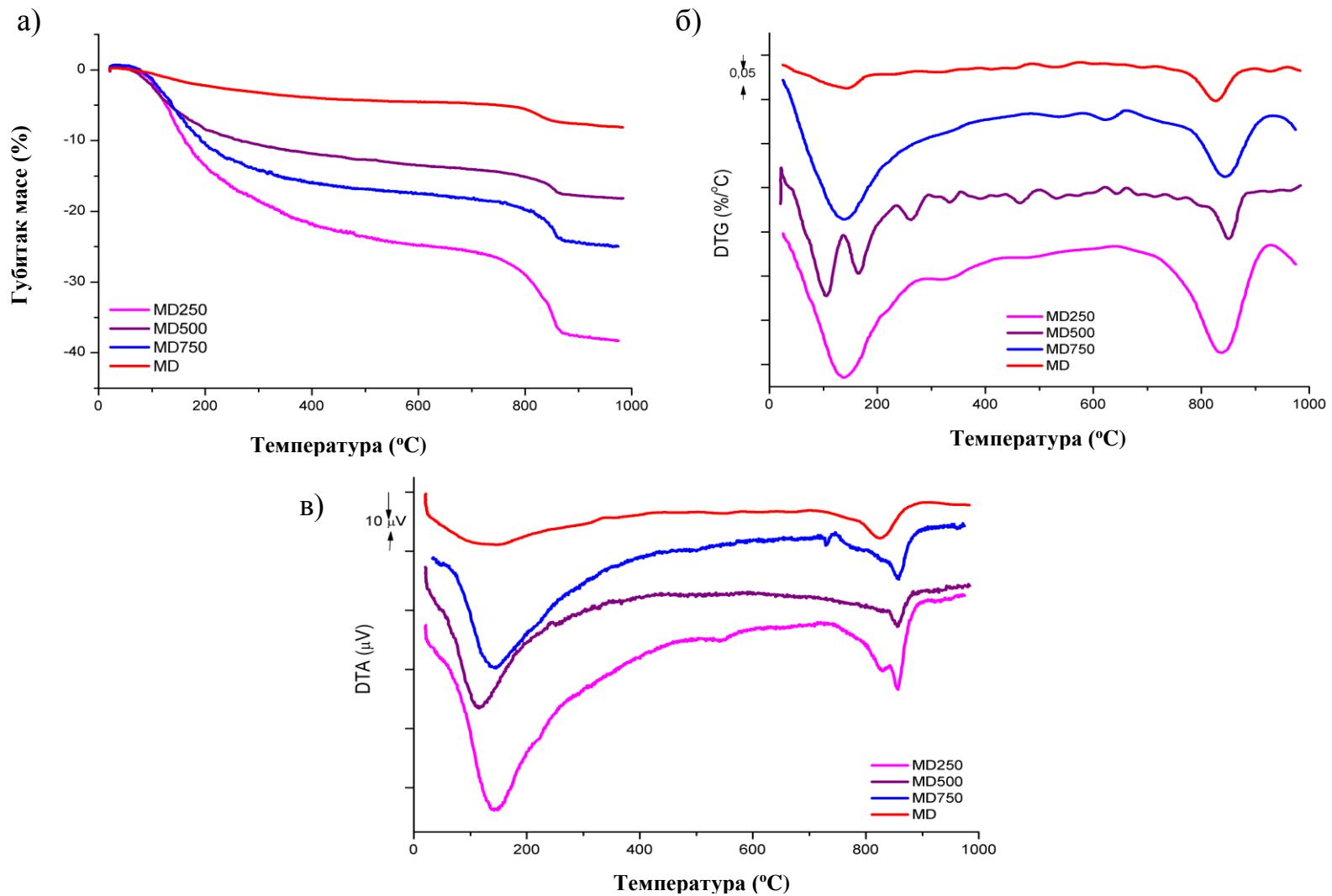
На DTA кривој узорка BAS ендотермни пикови на 122 °C и 771 °C, који представљају дехидратацију и десулфуризацију, у складу су са DTG налазима. Додатни ендотермни пик DTA криве на 545 °C, тумачен у склопу са TG налазима, приписан је дехидроксијацији на основу поређења са термалним понашањем једињења сличног хемијског састава - алуминита $\text{Al}_2(\text{SO}_4)(\text{OH})_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Földvári, 2011) и натроалунита $\text{NaAl}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6 \times n\text{H}_2\text{O}$ (Kashkai и Babaev, 1969; Jiménez-Veseril и сар., 2011).

Загревањем узорака модификованих дијатомита до приближно 1000 °C губитак масе износио је 38,3% за MD250, 18,2% за MD500, 24,9% за MD750 и 8,1% за MD. Модификовани дијатомити испољили су у два температурна региона приметан губитак масе загревањем. Широки пик на 138 °C DTG криве узорака MD250 и MD750, који је код узорка MD500 подељен на три пика на 103 °C, 168 °C и 260 °C, упућује на дехидратацију и дехидроксијацију BAS-а, а мањим делом и на дехидратацију дијатомита. Десулфуризацију BAS-а, који улази у састав модификованих дијатомита, означава пик DTG криве на 837 °C за MD250, 852 °C за MD500, односно 845 °C за MD750.

DTG налазе подржавају и резултати DTA узорака модификованих дијатомита. Широки ендотермни пик DTA криве на 143 °C за узорке MD250 и MD750, 116 °C за MD500, односно 147 °C за MD, последица су дехидратације узорака. Интензивни ендотермни пикови DTA криве на 856 °C узорака MD250, MD500, MD750, односно на 825 °C узорка MD, последица су десулфуризације BAS-а (који улази у састав модификованих дијатомита).



Слика 4.5. TG (а) и DTG (б) криве узорака DP, DK и BAS; DTA криве узорака DP, DK (в) и BAS (г)



Слика 4.6. TG (а), DTG (б) и DTA (в) криве узорака MD250, MD500, MD750 и MD

4.1.7. Одређивање насипне и тапкане густине и испитивање проточности

Резултати одређивања насипне и тапкане густине и испитивања проточности прашкастих узорака полазних и модификованих дијатомиа приказани су у табели 4.5. На основу мерења запремине коју заузима позната маса прашка пре и после слегања, израчунате су вредности насипне и тапкане густине.

Добијени резултати су показали да модификација дијатомиа доводи до повећања насипне и тапкане густине. *Carr*-ов индекс израчунат је на основу вредности насипне и тапкане густине и за перуански и пречишћен колубарски дијатомит износио је редом 32,6 и 40, а за модификоване дијатомите био је у распону 27,3-35,8 што указује на побољшање проточности као последицу модификације дијатомиа. Дакле, примењени поступак модификације доводи до побољшања одређених особина прашкова које су значајне у производном поступку различитих фармацеутских облика.

Табела 4.5. Резултати одређивања насипне и тапкане густине и испитивања проточности прашкастих узорака полазних и модификованих дијатомиа

Узорак	Насипна густина (g/ml)	Тапкана густина (g/ml)	Проточност (s)*
DP	0,29	0,43	116,1
MD250	0,56	0,77	66,6
MD500	0,43	0,67	87,7
MD750	0,42	0,59	94,1
DK	0,15	0,25	148,4
MD	0,26	0,36	102,7

* резултат изражен на 100 g узорка

Примећено је и да са порастом удела перуанског дијатомиа у саставу узорака MD250, MD500 и MD750, насипна и тапкана густина опадају и лакоћа протицања прашкова се смањује. Такође, како су насипна и тапкана густина пречишћеног колубарског дијатомиа знатно ниже, а његова проточност лошија

од перуанског дијатомита, тако су и код модификованог колубарског дијатомита MD насипна и тапкана густина знатно мање и проточност лошија у односу на одговарајући модификовани перуански дијатомит MD500.

4.1.8. Испитивање стабилности модификованих дијатомита/спирање алуминијума (јона)

Резултати одређивања садржаја алуминијума (изражено у масеним процентима алуминијум-оксида) у узорцима полазних и модификованих дијатомита представљени су у табели 4.6, а резултати одређивања количине укупног алуминијума раствореног након излагања модификованих дијатомита медијумима различитих рН вредности приказани су у табели 4.7.

Табела 4.6. Садржај алуминијум-оксида у узорцима полазних и модификованих дијатомита

Узорак	DP	MD500	DK	MD
Al ₂ O ₃ (%)	5,48	22,56	6,33	23,39

Табела 4.7. Количина укупног алуминијума раствореног након излагања модификованих дијатомита медијумима различитих рН вредности

Узорак	0,1 М НСI (рН 1,2)			рН 6,8			рН 7,4		
	C _{Al} [*] (mg/l)	m _{Al} ^{**} (mg)	Al ^{***} (%)	C _{Al} (mg/l)	m _{Al} (mg)	Al (%)	C _{Al} (mg/l)	m _{Al} (mg)	Al (%)
MD500	11,3	0,904	14,4	0,7	0,105	1,7	<0,1	<0,03	<0,24
MD	9,8	0,784	12,6	0,5	0,075	1,2	<0,1	<0,03	<0,23

* концентрација Al³⁺ у медијуму након третмана модификованих дијатомита

** маса Al у испитиваној запремини медијума након третмана модификованих дијатомита

*** проценат спирања Al тј. проценат укупног Al који је растворен након третмана модификованих дијатомита испитиваним медијумом

Наведени резултати указују да се једино значајније растварање алуминијума одвијало у киселој средини, док је растварање у фосфатним пуферима било занемарљиво (у фосфатном пуферу рН 6,8 растварало се мање од

2%, а у фосфатном пуферу рН 7,4 мање од 0,25% укупног алуминијума модификованих дијатомита). Процент укупног алуминијума који се раствара у киселој средини нешто је већи код модификованог перуанског (14,4%) него код модификованог колубарског дијатомита (12,6%).

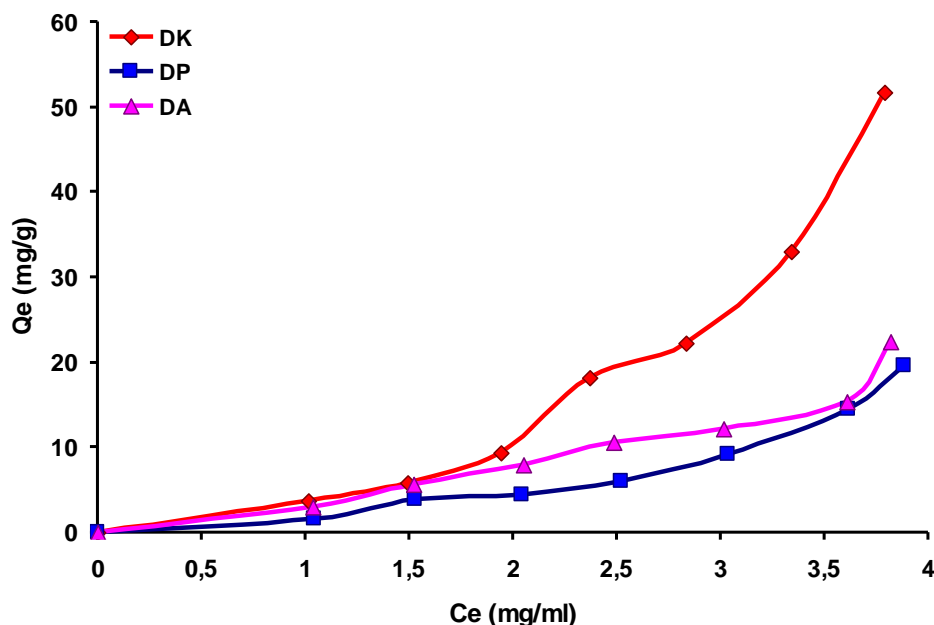
Чињеница да је стабилност модификованих дијатомита ограничена у киселој средини указује на потребу разматрања формулационих решења за унапређење безбедности примене (нпр. гастрорезистентних облика). Приликом разматрања такве формулације, резултате испитивања хемијске стабилности модификованих дијатомита треба сагледати заједно са подацима о очекиваном режиму дозирања, количини модификованог дијатомита у финалном производу и литературним вредностима за ниво изложености алуминијуму најмањег ризика по људско здравље (енгл. *Minimal Risk Level - MRL*). Израчуната вредност MRL за оралну изложеност алуминијуму интермедијерног (15-364 дана) као и хроничног трајања (365 дана и дуже) износи 1 mg Al/kg/дан (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008).

4.1.9. Испитивање интеракције адсорбената са модел лековитим супстанцама

Адсорпционе изотерме диклофенак-натријума из воденог раствора (корастварач: апсолутни етанол) на пречишћен колубарски (DK), перуански (DP) и аустралијски (DA) дијатомит представљене су на слици 4.7.

У испитиваном распону почетних концентрација диклофенак-натријума (1–4 mg/ml) у раствору, највећи капацитет адсорпције показао је пречишћен колубарски дијатомит (51,63 mg/g), док су адсорпциони капацитети аустралијског (22,33 mg/g) и перуанског дијатомита (19,54 mg/g) били блиски по вредности и нижи у односу на пречишћен колубарски дијатомит. Разлике у адсорпционим капацитетима дијатомита различитог порекла за диклофенак-натријум могу се једним делом објаснити разликама у специфичној површини испитиваних адсорбената. Наиме, обим везивања диклофенак-натријума за дијатомите различитог порекла (перуански < аустралијски < пречишћен колубарски) расте са порастом специфичне површине дијатомита (13,3 < 30,9 < 47,6 m²/g).

За анализу експерименталних података адсорпционих изотерми примењени су *Langmuir*-ов и *Freundlich*-ов модел/једначина изотерме, а степен уклапања експерименталних података у одабране моделе процењен је поређењем вредности коефицијента детерминације (r^2).



Слика 4.7. Адсорпционе изотерме диклофенак-натријума из воденог раствора (корастварач: апсолутни етанол) на различите дијатомите

Поређењем вредности коефицијената детерминације изабраних модела, показало се да *Freundlich*-ов модел ($r^2 > 0,958$) боље описује адсорпцију диклофенак-натријума на сва три дијатомита, што указује на вишеслојну адсорпцију супстанце или на енергетску хетерогеност површине дијатомита. На основу вредности параметра *Freundlich*-ове једначине изотерме $1/n$, која је за сва три испитивана дијатомита већа од 1, може се закључити да је адсорпција диклофенак-натријума на испитиване дијатомите отежана/непогодна (Aivalioti и сар., 2010; Kaur и Datta, 2014).

У постављеним условима испитивања није примећена адсорпција ибупрофена на испитиване дијатомите.

У литератури постоје подаци о испитивању дијатомита као адсорбента за одређене фармацеутски активне супстанце. Chaо и сар. (2014) су утврдили да је адсорпција тетрациклина на комерцијално доступни кинески дијатомит боље

описана *Langmuir*-овим него *Freundlich*-овим моделом изотерме. Према њиховим налазима, вредности максималног капацитета адсорпције тетрациклина у монослоју Q_{max} су износиле 303,03 mg/g, 33,56 mg/g и 19,49 mg/g при концентрацијама дијатомита у суспензији редом 1 g/l, 5 g/l и 20 g/l на температури 30 °C. Адсорпцију тетрациклина на лантаном модификовани комерцијално доступни кинески дијатомит (Li и сар., 2015) такође добро описује *Langmuir*-ов модел изотерме, а израчуната вредност параметра *Langmuir*-овог модела Q_{max} била је 469,7 mg/g при концентрацији дијатомита у суспензији 0,2 g/l на температури 25 °C. Вредности параметра Q_{max} за адсорпцију тетрациклина на дијатомит и лантаном модификовани дијатомит знатно су веће од оних добијених за адсорпцију диклофенак-натријума на пречишћен колубарски, аустралијски и перуански дијатомит. Разлог лежи у чињеници да је адсорпција на дијатомит и лантаном модификовани дијатомит испитивана из воденог раствора тетрациклина чија је рН вредност подешена на 7. При датој рН вредности медијума, тетрациклин се налази у облику цвитерјона (Li и сар., 2015; Pang и сар., 2015). Електростатичка интеракција цвитерјона тетрациклина са негативно наелектрисаним честицама дијатомита и лантаном модификованог дијатомита повољнија је него у случају диклофенак ањона и електронегативних честица дијатомита, па је и адсорпција тетрациклина на дијатомит/лантаном модификован дијатомит већа него адсорпција диклофенак-натријума на дијатомит.

Адсорпција диклофенак-натријума и ибупрофена на бентонит била је занемарљива у постављеним условима испитивања. Имајући у виду физичко-хемијске особине глина, овакав исход испитивања је донекле очекиван. Лековите супстанце које се у раствору присутне у ањонском облику (нпр. диклофенак-натријум, ибупрофен при рН $7 \pm 0,2$) или нејонизованом облику показују слабији афинитет ка монтморилониту у односу на супстанце које се у раствору присутне у катјонском облику (Park и сар., 2016). Међутим, Kaur и Datta (2014) су испитивали адсорпцију диклофенак-натријума на монтморилонит и добили високу вредност капацитета адсорпције лековите супстанце (497 mg/g), што је повезано са интеркалацијом супстанце у међуслојни простор монтморилонита и њеним преласком из ањонског облика у нејонизовани кисели облик услед протоновања у међуслојном простору. Такође, приликом интеркалације ибупрофена у

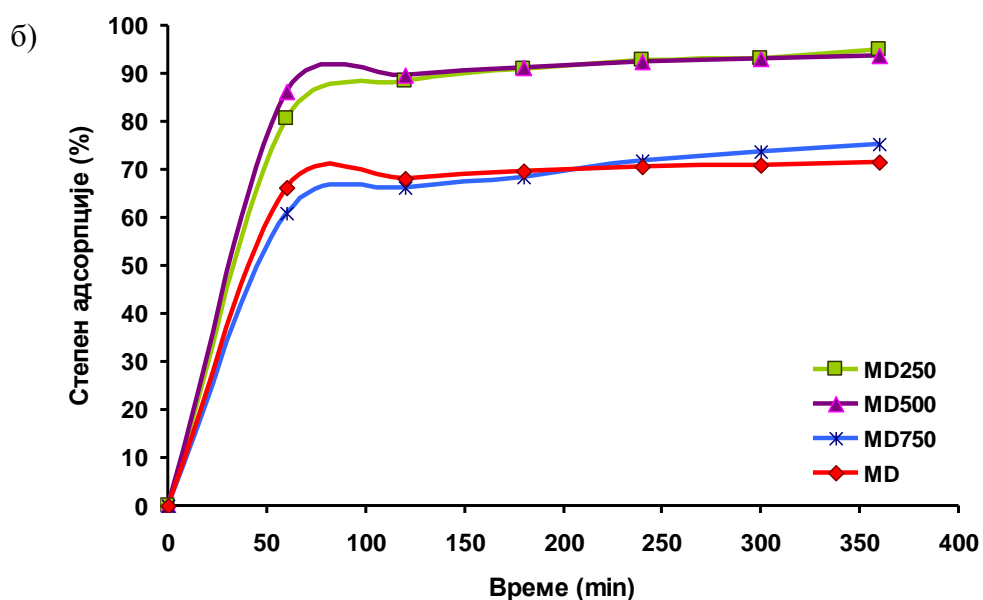
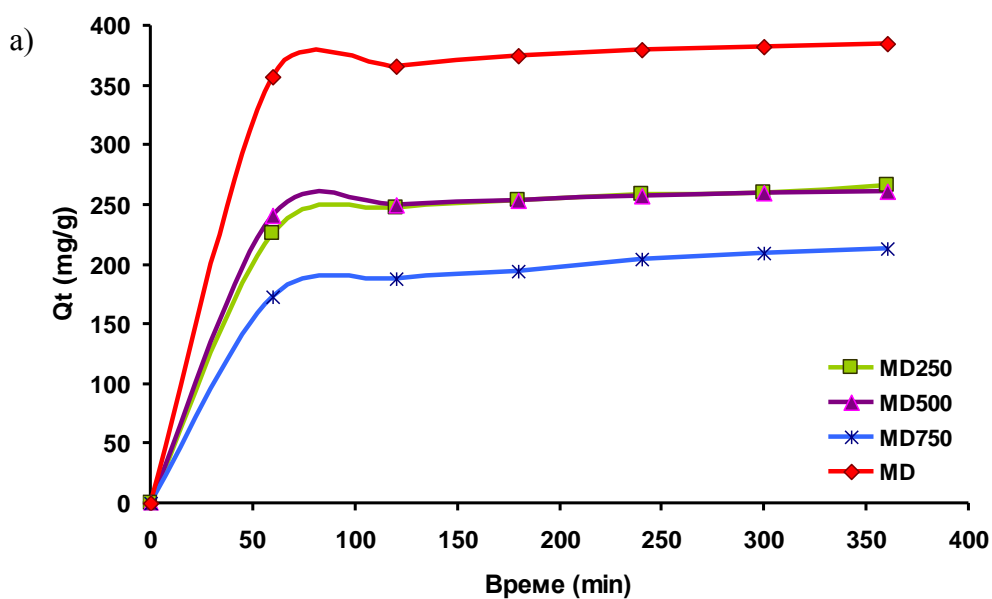
монтморилонит, коју су спровели Zheng и сар. (2007), добијена је висока вредност капацитета везивања лековите супстанце (227,3 mg/g), мада природа интеракције ибупрофена са минералом глине није објашњена. Поменути литературни налази нису репродуковани у условима испитивања адсорпције диклофенак-натријума и ибупрофена на бентонит фармакопејског квалитета у оквиру I фазе експерименталног рада.

4.2. РЕЗУЛТАТИ II ФАЗЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

4.2.1. Испитивање интеракције модификованих дијатомита са модел лековитим супстанцама – анализа кинетике адсорпције

Кинетика адсорпције диклофенак-натријума из воденог раствора (корастварач: апсолутни етанол) на модификоване перуанске дијатомите MD250, MD500, MD750 и на модификован колубарски дијатомит MD, представљена је на слици 4.8 а, а временска зависност степена адсорпције диклофенак-натријума/ ефикасности уклањања диклофенак-натријума из течне фазе адсорпцијом на модификоване дијатомите представљена је на слици 4.8 б.

Модификовани колубарски дијатомит MD показао је највећи равнотежни адсорпциони капацитет за диклофенак-натријум (384,48 mg/g); равнотежни адсорпциони капацитети модификованих перуанских дијатомита MD250 (265,71 mg/g) и MD500 (261,61 mg/g) су приметно нижи у односу на MD и веома слични међусобно, а најмању вредност равнотежног адсорпционог капацитета испољио је модификовани перуански дијатомит MD750 (213,7 mg/g). Међутим, непосредно поређење адсорпционих капацитета модификованих перуанских дијатомита са модификованим колубарским дијатомитом није оправдано јер су услови адсорпције на модификоване перуанске дијатомите били другачији. Због другачијег односа масе адсорбента према запремини течне фазе за адсорпцију, степен адсорпције диклофенак-натријума на модификоване дијатомите био је приближно 95% за MD250, 94% за MD500 и 75% за MD750 у стању равнотеже, али зато пун обим везивања диклофенак-натријума није показан у таквим условима. Услови адсорпције на модификовани колубарски дијатомит омогућавају испољавање пуног обима везивања диклофенак-натријума, али је степен адсорпције диклофенак-натријума од 71% био мањи у поређењу са одговарајућим модификованим перуанским дијатомитом MD500.



Слика 4.8. а) кинетика адсорпције диклофенак-натријума из воденог раствора (корастварач: апсолутни етанол) на модификоване дијатомите; б) степен адсорпције диклофенак-натријума на модификоване дијатомите

За анализу експерименталних података адсорпционе кинетике диклофенак-натријума примењени су модел кинетике псеудо-првог реда, кинетике псеудо-другог реда и *Weber–Morris*-ов модел унутарчестичне дифузије, а степен уклапања експерименталних података у одабране моделе процењен је поређењем

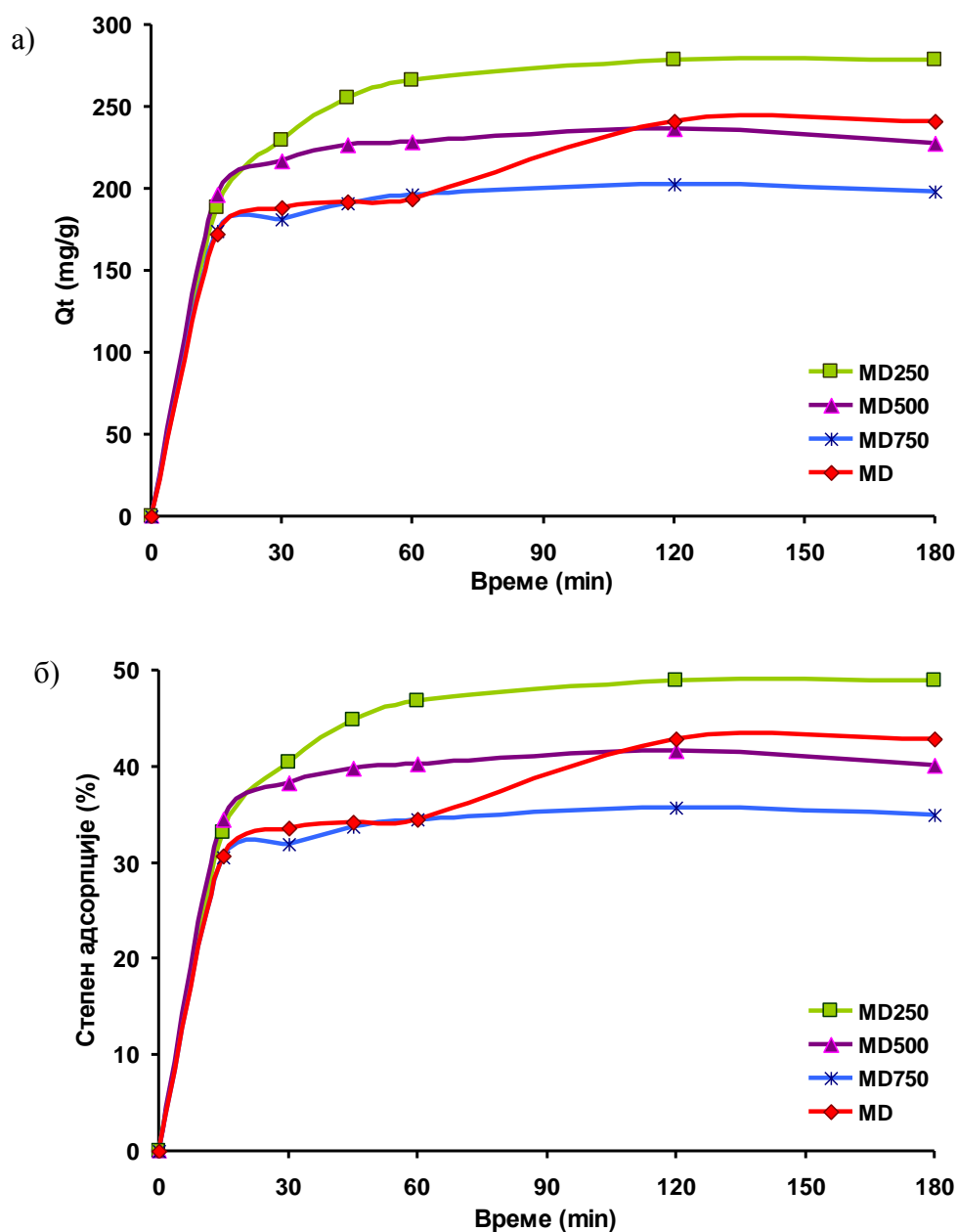
вредности коефицијента детерминације (r^2). Израчунате вредности параметара одабраних модела кинетике приказани су у табели 4.8.

Табела 4.8. Вредности параметара модела кинетике псеудо-првог реда, кинетике псеудо-другог реда и *Weber–Morris*-овог модела унутарчестичне дифузије за адсорпцију диклофенак-натријума на модификоване дијатомите

Модел кинетике	Параметри модела	Адсорбент			
		MD250	MD500	MD750	MD
Псеудо-првог реда	r^2	0,8854	0,873	0,9322	0,8782
	Q_e	128,2	102,99	131,42	151,2
	k_1	0,0121	0,0142	0,0113	0,0145
Псеудо-другог реда	r^2	0,9999	0,9999	0,9988	0,9999
	Q_e	271,15	264,9	221,04	389,56
	k_2	0,0003	0,0006	0,0002	0,0003
<i>Weber–Morris</i>	r^2	0,811	0,7675	0,8415	0,7644
	k_{id}	14,698	14,408	11,696	21,167

За све модификоване дијатомите коефицијент детерминације модела кинетике псеудо-другог реда већи је од коефицијената детерминације модела кинетике псеудо-првог реда и *Weber–Morris*-овог модела. Пошто кинетику адсорпције диклофенак-натријума на модификоване дијатомите најбоље описује модел кинетике псеудо-другог реда, могуће је да се у датом систему одвија хемисорпција (Al-Ghouti и сар., 2005; Al-Qodah и сар., 2007). Такође, експерименталне вредности равнотежне количине адсорбованог диклофенак-натријума знатно су ближе израчунатим вредностима параметра Q_e код модела кинетике псеудо-другог реда него код модела кинетике псеудо-првог реда, што потврђује да је модел кинетике псеудо-другог реда применљивији за описивање кинетике адсорпције диклофенак-натријума на модификоване дијатомите.

На слици 4.9 а) приказана је кинетика адсорпције ибупрофена из разблаженог воденог раствора натријум-хидроксида (рН $7 \pm 0,2$) на модификоване перуанске дијатомите MD250, MD500, MD750 и на модификован колубарски дијатомит MD, а на слици 4.9 б) представљена је временска зависност степена адсорпције ибупрофена/ефикасности уклањања ибупрофена из течне фазе адсорпцијом на модификоване дијатомите.



Слика 4.9. а) кинетика адсорпције ибупрофена из разблаженог раствора натријум-хидроксида на модификоване дијатомите; б) степен адсорпције ибупрофена на модификоване дијатомите

Време успостављања адсорпционе равнотеже износи око 2 h за модификоване перуанске дијатомите, односно око 3 h за модификовани колубарски дијатомит. Постигнути равнотежни адсорпциони капацитети за ибупрофен (278,39 > 241 > 236,48 > 202,99 mg/g) опадају према следећем редоследу адсорбената MD250 > MD > MD500 > MD750. У стању равнотеже

највећи степен адсорпције ибупрофена био је приближно 50% за адсорбент MD250; нешто нижи и готово истоветни равнотежни степен адсорпције лековите супстанце показали су адсорбенти MD (43%) и MD500 (42%), а најнижа вредност степена адсорпције ибупрофена била је око 36% за MD750.

Подобност одабраних модела адсорпционе кинетике (модел кинетике псеудо-првог реда, кинетике псеудо-другог реда и *Weber–Morris*-ов модел унутарчестичне дифузије) за описивање експерименталних података кинетике адсорпције ибупрофена на модификоване дијатомите процењена је линеарном регресионом анализом. Израчунате вредности параметара одабраних модела кинетике приказани су у табели 4.9.

Табела 4.9. Вредности параметара модела кинетике адсорпције псеудо-првог реда, псеудо-другог реда и *Weber–Morris*-овог модела унутарчестичне дифузије за адсорпцију ибупрофена на модификоване дијатомите

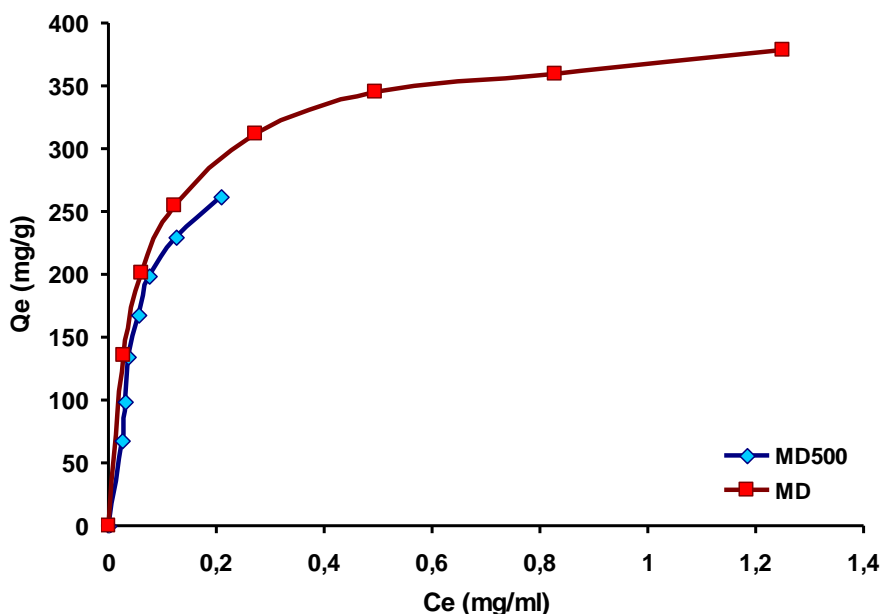
Модел кинетике	Параметри модела	Адсорбент			
		MD250	MD500	MD750	MD
Псеудо-првог реда	r^2	0,986	0,899	0,8912	0,8936
	Q_e	232,96	139,57	118,71	295,5
	k_1	0,0505	0,0547	0,052	0,0514
Псеудо-другог реда	r^2	0,9996	0,9999	0,9991	0,9843
	Q_e	309,98	242,54	206,36	258,33
	k_2	0,0003	0,0012	0,0014	0,0003
<i>Weber–Morris</i>	r^2	0,9488	0,8677	0,8539	0,8207
	k_{id}	35,124	30,133	25,498	20,495

Највеће вредности коефицијента детерминације одабраних модела кинетике добијене су за модел кинетике псеудо-другог реда код свих модификованих дијатомита. Пошто кинетику адсорпције ибупрофена на модификоване дијатомите најближе описује модел кинетике псеудо-другог реда могуће је да се у датом систему одвија хемисорпција. Такође, боље слагање израчунатих вредности параметра Q_e са експерименталним вредностима равнотежне количине адсорбованог ибупрофена показује модел псеудо-другог реда него модел псеудо-првог реда, што додатно упућује на већу применљивост модела кинетике псеудо-другог реда за описивање кинетике адсорпције ибупрофена на модификоване дијатомите.

4.2.2. Испитивање интеракције модификованих дијатомиа са модел лековитим супстанцама – анализа адсорпционе изотерме

Адсорпционе изотерме диклофенак-натријума из воденог раствора (корастварач: апсолутни етанол) на модификован перуански дијатомит MD500 и модификован колубарски дијатомит MD приказане су на слици 4.10.

Адсорпциони капацитет модификованог колубарског дијатомиа (378,54 mg/g) био је већи од адсорпционог капацитета модификованог перуанског дијатомиа (262 mg/g). Међутим непосредно поређење ове две вредности није оправдано јер су за одређивање адсорпционих изотерми на поменути адсорбентима били успостављени различити услови (различит однос масе адсорбента према запремини течне фазе за адсорпцију). У односу на одговарајуће полазне материјале, адсорпциони капацитет за диклофенак-натријум се увећао 7,3 пута након модификације пречишћеног колубарског дијатомиа, односно 13,4 пута након модификације перуанског дијатомиа. Уопштено се може закључити да неорганска модификација дијатомиа значајно повећава капацитет адсорпције ових материјала за диклофенак-натријум, што омогућава примену адсорпције као поступка везивања лековите супстанце на ове потенцијалне носаче.



Слика 4.10. Адсорпционе изотерме диклофенак-натријума из воденог раствора (корастварач: апсолутни етанол) на модификоване дијатомите

Као и у случају полазних материјала, за анализу експерименталних података адсорпционих изотерми диклофенак-натријума на модификоване дијатомите примењени су *Langmuir*-ов и *Freundlich*-ов модел/једначина изотерме и степен уклапања експерименталних података у одабране моделе процењен је поређењем вредности коефицијента детерминације (r^2). Израчунате вредности параметара одабраних модела изотерме приказани су у табели 4.10.

Табела 4.10. Вредности параметара *Langmuir*-овог и *Freundlich*-овог модела изотерме за адсорпцију диклофенак-натријума на модификоване дијатомите

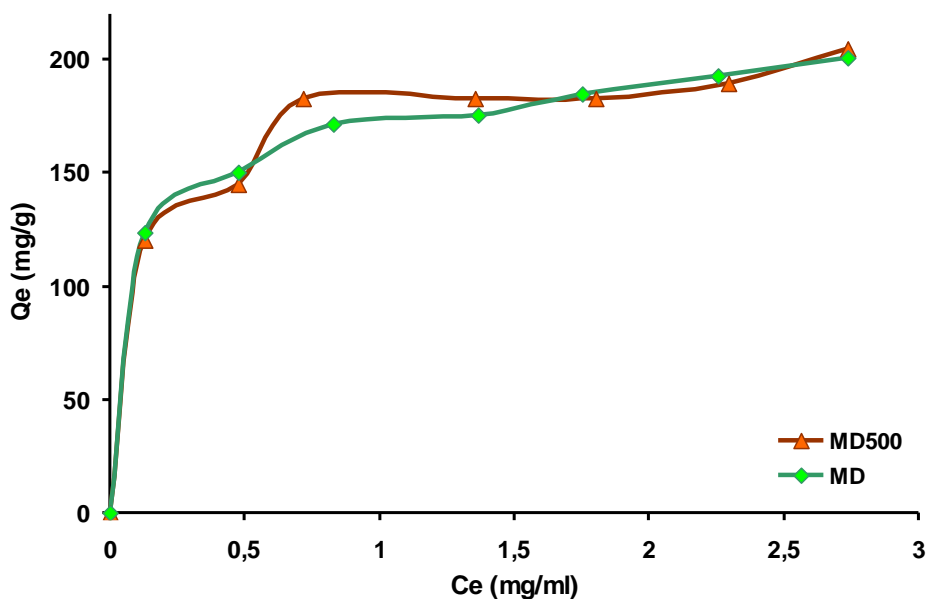
Модел изотерме	Параметри модела	Адсорбент	
		MD500	MD
<i>Langmuir</i>	r^2	0,9201	0,9995
	Q_{max} (mg/g)	378,36	394,17
	K_L (ml/mg)	11,959	15,564
<i>Freundlich</i>	r^2	0,8485	0,9271
	$1/n$	0,585	0,259
	K_F (mg/g)(mg/ml) ⁿ	775,56	395,76

Упоредивањем вредности коефицијената детерминације изабраних модела добијено је да *Langmuir*-ов модел боље описује адсорпцију диклофенак-натријума на модификоване дијатомите, па се претпоставља да се диклофенак-натријум адсорбује у монослоју на енергетски хомогену површину модификованих дијатомита (Foo и Nameed, 2010; Chao и сар., 2014). Израчуната вредност максималног капацитета адсорпције (Q_{max}) модификованог перуанског дијатомита (378,36 mg/g) знатно је већа од вредности адсорпционог капацитета одређеног у условима експеримента (262 mg/g). У случају адсорпције диклофенак-натријума на модификован перуански дијатомит услови/параметри поступка су били постављени тако да се истражи могућност високе ефикасности уклањања супстанце из течне фазе у релативно кратком временском периоду, што је довело до тога да се пун обим везивања супстанце не покаже у самом испитивању. Ипак, анализа експерименталних података о адсорпционој равнотежи у датом систему указала је на знатно већи адсорпциони капацитет модификованог перуанског дијатомита, што је потом и потврђено извођењем адсорпције под истим условима као за модификовани колубарски дијатомит (није приказано). Дакле, може се рећи

да су адсорпционе способности испитиваних модификованих дијатомиа према диклофенак-натријуму сличне.

Иако су вредности коефицијената детерминације *Freundlich*-овог модела релативно високе, поменути модел не описује адсорпцију диклофенак-натријума на модификоване дијатомиа тако добро као *Langmuir*-ов модел. Ипак, на основу вредности параметра *Freundlich*-ове једначине изотерме $1/n$, која је за оба модификована дијатомиа мања од 1, може се закључити да је адсорпција диклофенак-натријума на модификоване дијатомиа повољна/фаворизирана (Chao и сар., 2014), што је у складу са представљеним резултатима.

Адсорпционе изотерме ибупрофена из разблаженог раствора натријум-хидроксида на модификован перуански дијатомит MD500 и модификован колубарски дијатомит MD су приказане на слици 4.11.



Слика 4.11. Адсорпционе изотерме ибупрофена из разблаженог раствора натријум-хидроксида на модификоване дијатомиа

Капацитети адсорпције ибупрофена на модификован колубарски дијатомит (200,81 mg/g) и на модификован перуански дијатомит (204,63 mg/g) су били врло слични, односно није било значајне разлике у адсорпционим способностима модификованих дијатомиа према ибупрофену. Полазни материјали нису испољили способност адсорпције ибупрофена у датим условима, али је

неорганском модификацијом адсорпција модел супстанце омогућена и то уз постизање високих вредности адсорпционих капацитета.

Подобност одабраних модела изотерме (*Langmuir*-ов и *Freundlich*-ов модел) за описивање експерименталних података адсорпционих изотерми ибупрофена на модификоване дијатомите процењена је линеарном регресионом анализом. Израчунате вредности параметара одабраних модела изотерме приказани су у табели 4.11.

Табела 4.11. Вредности параметара *Langmuir*-овог и *Freundlich*-овог модела изотерме за адсорпцију ибупрофена на модификоване дијатомите

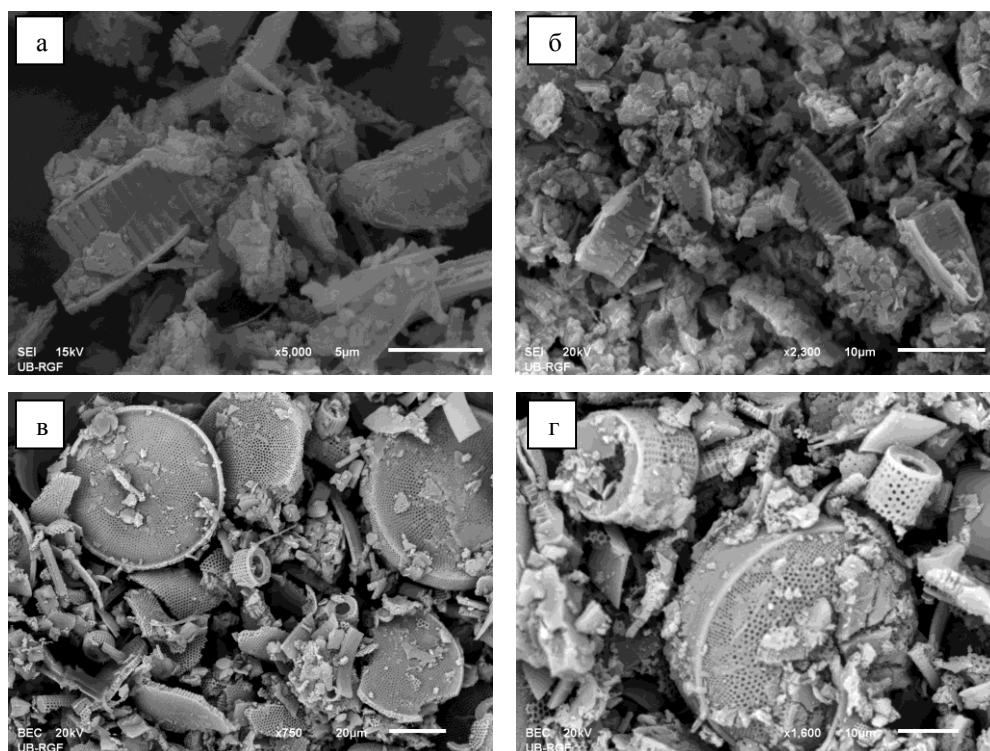
Модел изотерме	Параметри модела	Адсорбент	
		MD500	MD
<i>Langmuir</i>	r^2	0,9936	0,996
	Q_{max} (mg/g)	207,04	207,47
	K_L (ml/mg)	6,6074	5,9727
<i>Freundlich</i>	r^2	0,9057	0,9893
	$1/n$	0,163	0,1554
	K_F (mg/g)(mg/ml) ⁿ	171,75	170,37

Вредности коефицијената детерминације веће су за *Langmuir*-ов него за *Freundlich*-ов модел код оба модификована дијатомита и пошто *Langmuir*-ов модел боље описује адсорпцију ибупрофена на модификоване дијатомите, претпоставља се да се ибупрофен адсорбује у монослоју на енергетски хомогену површину модификованих дијатомита. Иако *Freundlich*-ов модел не описује адсорпциону равнотежу у датом систему тако добро као *Langmuir*-ов модел, на основу вредности параметра *Freundlich*-ове једначине изотерме $1/n$, која је за оба модификована дијатомита мања од 1, може се закључити да је адсорпција ибупрофена на модификоване дијатомите повољна/фаворизована, што је у складу са приказаним подацима.

На прашкастим узорцима композита, добијеним адсорпцијом диклофенак-натријума и ибупрофена на узорке MD500 и MD под условима који одговарају последњој тачки на одговарајућим адсорпционим изотермама, извршена је физичко-хемијска карактеризација, а са комприматима композита изведена су *in vitro* испитивања брзине растварања модел лековите супстанце.

4.2.3. Скенирајућа електронска микроскопија у спречи са енергетско-дисперзивном рендгенском спектрометријом (SEM-EDS анализа)

SEM микрографије модификованог перуанског дијатомиа MD500 након адсорпције диклофенак-натријума (DAMD) односно ибупрофена (MD5I) и модификованог колубарског дијатомиа MD након адсорпције диклофенак-натријума (MDD) односно ибупрофена (MDI) приказане су на слици 4.12.



Слика 4.12. SEM микрографије узорака DAMD (а), MD5I (б), MDD (в) и MDI (г)

Може се уочити да је изворна структура модификованих дијатомиа, а самим тим и полазних дијатомиа, очувана и након адсорпције лековитих супстанци на модификоване дијатомите.

Резултати EDS анализе модификованих дијатомиа након адсорпције диклофенак-натријума односно ибупрофена представљени су у табели 4.12.

Значајан масени проценат хлора и угљеника у саставу узорака DAMD и MDD указује на адсорбовани диклофенак-натријум, а висок проценат угљеника у саставу узорака MD5I и MDI потврђује адсорпцију ибупрофена.

Табела 4.12. Хемијски састав модификованих дијатомиа након адсорпције лековитих супстанци према EDS анализи*

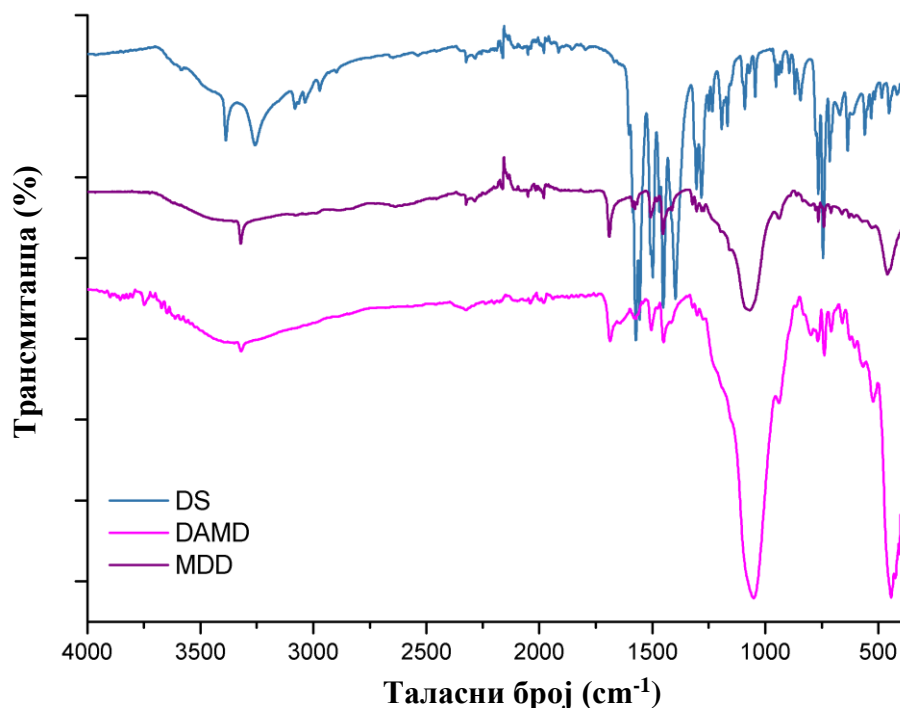
Узорак	Елемент (масени %)										
	Na	K	Mg	Ca	Al	Si	S	Cl	C	Fe	O
DAMD	0,22	0,15	0,0	0,0	6,81	15,14	1,69	4,96	20,45	0,45	49,79
MDD	0,0	0,28	0,0	0,0	4,91	14,93	0,84	5,3	25,01	0,45	47,97
MD5I	0,22	0,21	0,16	0,0	6,36	16,21	1,23	0,0	30,4	0,57	44,64
MDI	0,17	0,19	0,0	0,0	5,54	18,85	1,01	0,0	26,37	0,49	46,79

* у условима извођења анализе није било могуће да се у саставу композита DAMD и MDD детектује азот који потиче из адсорбованог диклофенак-натријума

4.2.4. Инфрацрвена спектроскопија са Fourier-овом трансформацијом (FTIR спектроскопска анализа)

FTIR спектри диклофенак-натријума (DS), модификованог перуанског дијатомиа MD500 након адсорпције диклофенак-натријума (DAMD) и модификованог колубарског дијатомиа MD након адсорпције диклофенак-натријума (MDD) представљени су на слици 4.13, а FTIR спектри ибупрофена (IBU), модификованог перуанског дијатомиа MD500 након адсорпције ибупрофена (MD5I) и модификованог колубарског дијатомиа MD након адсорпције ибупрофена (MDI) представљени су на слици 4.14.

Траке на 443 cm^{-1} , 798 cm^{-1} и 1052 cm^{-1} у FTIR спектру узорка DAMD, као и траке на 459 cm^{-1} , 799 cm^{-1} и 1070 cm^{-1} у FTIR спектру узорка MDD потичу од дијатомејског силицијум-диоксида, што указује да адсорпција диклофенак-натријума на модификоване дијатомите не мења структуру дијатомиа. Парови пикова на 1452 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} и 1498 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} у FTIR спектру узорка DS, приписани истезању ароматичног прстена диклофенак-натријума, присутни су и у FTIR спектрима узорка DAMD (1450 cm^{-1} и 1503 cm^{-1}) и MDD (1452 cm^{-1} и 1507 cm^{-1}) потврђујући присуство лековите супстанце у поменутом узорцима.



Слика 4.13. FTIR спектри узорака DS, DAMD и MDD

Трака N-H истегања диклофенак-натријума на 3387 cm^{-1} (Ghizdavu и Ghizdavu, 2007; Tabrizi и сар., 2015) померена је ка нижем таласном броју у FTIR спектрима узорака DAMD (3319 cm^{-1}) и MDD (3321 cm^{-1}), а трака диклофенак-натријума на 3257 cm^{-1} , која је повезана са N-H...O вибрацијама интрамолекуларног водоничног везивања (Ghizdavu и Ghizdavu, 2007; Tabrizi и сар., 2015), није присутна у FTIR спектрима узорака DAMD и MDD, што упућује на просторно преуређење молекула везано са секундарну amino групу током адсорпције диклофенак-натријума на модификоване дијатомите.

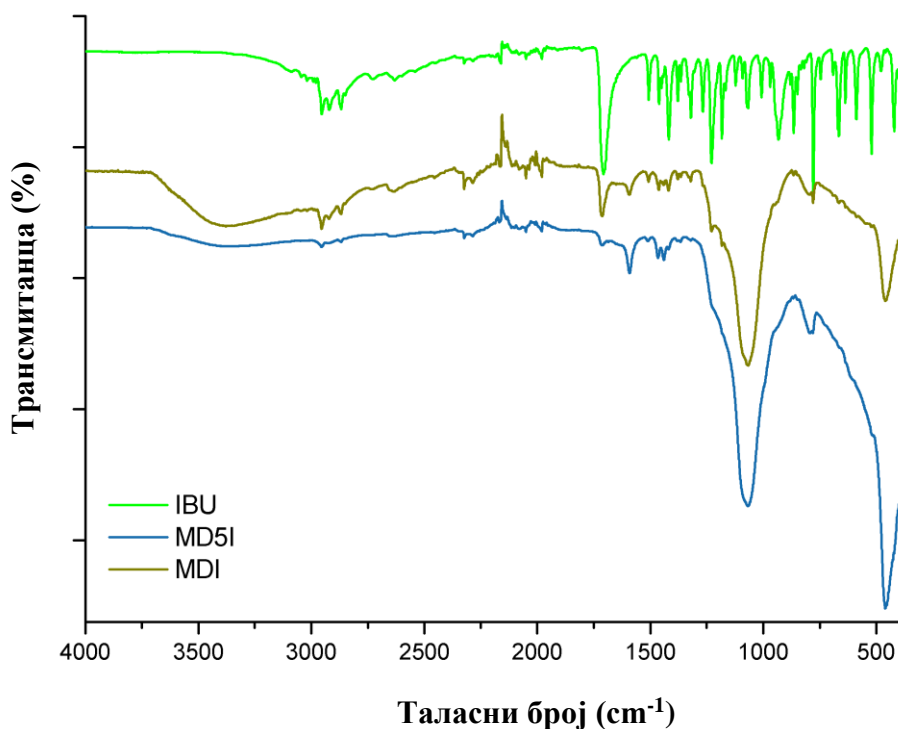
Траке FTIR спектра диклофенак-натријума на 1573 cm^{-1} и 1398 cm^{-1} последица су редом асиметричног и симетричног истегања карбоксилата (Kovalic-Demertzi и сар., 1998; Ghizdavu и Ghizdavu, 2007; El-Megharbel и сар., 2015). У поређењу са FTIR спектром лековите супстанце, траке приписане симетричном и асиметричном истегању карбоксилата померене су ка вишим таласним бројевима у FTIR спектрима узорака DAMD (1686 cm^{-1} и 1416 cm^{-1}) и MDD (1690 cm^{-1} и 1413 cm^{-1}).

Померања пикова карбоксилата потврђују његову укљученост у адсорпцију диклофенак-натријума на модификовани дијатомит. Наиме, диклофенак може да образује комплексе са различитим јонима метала (магнезијум, калцијум, стронцијум, баријум, манган, кобалт, никл, кадмијум, калај, платина) при чему је карбоксилатна група непосредно укључена у грађење комплекса (Kovala-Demertzi и сар., 1998; Ghizdavu и Ghizdavu, 2007; El-Megharbel и сар., 2015; Tabrizi и сар., 2015). На основу ових сазнања претпоставља се да током адсорпције диклофенак-натријума на модификовани дијатомит може доћи до координативног везивања карбоксилатне групе диклофенака за алуминијум јоне са површине честица модификованих дијатомита. Међутим, прегледом литературних података о FTIR спектрима различитих облика диклофенака (Palomo и сар., 1999; Ваена Aristizábal и сар., 2011) утврђено је слагање померених/нових пикова спектра узорка DAMD и MDD са онима својственим диклофенак киселини. Пикови на 3321 cm^{-1} , 1690 cm^{-1} и 938 cm^{-1} примећени у FTIR спектру узорка MDD, односно пикови на 3319 cm^{-1} , 1686 cm^{-1} и 939 cm^{-1} примећени у FTIR спектру узорка DAMD, одговарају N–H истецању секундарне амино групе, C=O истецању карбоксилне киселине и O–H савијању ван равни карбоксилне киселине.

На FTIR спектрима узорка MD5I и MDI присутне су траке својствене дијатомејском силицијум-диоксиду на 460 cm^{-1} , 799 cm^{-1} и 1066 cm^{-1} , што указује да основна структура дијатомита остаје непромењена и након адсорпције ибупрофена на модификовани дијатомит. Траке FTIR спектра оба узорка на 2954 cm^{-1} и 2869 cm^{-1} потичу од асиметричног и симетричног C–H истецања метил групе; траке FTIR спектра узорка MD5I на 1466 cm^{-1} и 1381 cm^{-1} , односно одговарајуће траке FTIR спектра узорка MDI на 1462 cm^{-1} и 1379 cm^{-1} , последица су асиметричног и симетричног савијања метил групе, а трака на 1511 cm^{-1} (MD5I), односно на 1508 cm^{-1} (MDI), приписује се C=C–C истецању ароматичног прстена ибупрофена (Vueba и сар., 2008; Vannach и сар., 2010).

Да је ибупрофен, из раствора у ком је био присутан у облику натријумове соли, адсорбован на модификоване дијатомите у киселом облику потврђује трака на 1711 cm^{-1} у FTIR спектру узорка MD5I, односно на 1712 cm^{-1} у FTIR спектру узорка MDI, која одговара C=O истецању карбоксилне киселине (Vueba и сар.,

2008; Vannach и сар., 2010). Међутим, нове траке на 1591 cm^{-1} и 1440 cm^{-1} у FTIR спектру узорка MD5I, односно на 1593 cm^{-1} и 1441 cm^{-1} у FTIR спектру узорка MDI, указују да кисели облик ибупрофена није једини присутан облик лековите супстанце након адсорпције на модификоване дијатомите.



Слика 4.14. FTIR спектри узорака IBU, MD5I и MDI

Ибупрофен, као и диклофенак, може да гради комплексе са јонима метала (сребра, олова, кобалта, кадмијума, лаким лантаноидима) тако да карбоксилатна група непосредно учествује у координативном везивању са металним јонима (Kafarska и сар., 2009; Palacios-Hernández и сар., 2013; Silva и сар., 2013; Gállico и сар., 2014). Постоји дакле могућност да током адсорпције ибупрофена на модификоване дијатомите дође до координативног везивања карбоксилатне групе лековите супстанце за алуминијум јоне са површине честица модификованих дијатомита и у том случају би нове траке на 1591 cm^{-1} и 1440 cm^{-1} (MD5I), односно на 1593 cm^{-1} и 1441 cm^{-1} (MDI), могле да се повежу са асиметричним и симетричним истезањем карбоксилата из површинског комплекса ибупрофена са алуминијум јонима.

Испитивањем интеракције приликом комлевења ибупрофена са алуминијум-хидроксидом, Mallick и сар. (2008) су нашли да се, са порастом удела алуминијум-хидроксида у комлевеној смеши, интензитет пика карбоксилне киселине на 1719 cm^{-1} постепено смањује до нестајања, а истовремено се појављује и постепено расте у интензитету пик карбоксилата у региону $1573\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$. Уочене промене у FTIR спектрима узорка ибупрофена комлевеног са алуминијум-хидроксидом приписане су кисело-базној интеракцији супстанци и настанку соли. Механохемијски третман ибупрофена комлевењем са фиксном количином алуминијум-хидроксида (Andini и сар., 2012) показује да се слична промена одвија у зависности од времена комлевења: интензитет пика карбоксилне киселине на 1721 cm^{-1} се поступно смањује до нестајања, а истовремено се појављује, благо растући у интензитету, пик карбоксилата на 1592 cm^{-1} . Кисело-базна интеракција ибупрофена са алуминијум-хидроксидом и настанак соли прва је фаза деградације ибупрофена при механохемијском третману и следе је оксидативна декарбоксилација до бензил радикала који у присуству кисеоника, а зависно од времена комлевења, даје различите крајње деградационе продукте.

Дакле, појава траке приписане истезању карбоксилата на 1592 cm^{-1} у FTIR спектрима композита добијеним након адсорпције ибупрофена на модификоване дијатомите, у складу је са налазима Mallick и сар. (2008) и Andini и сар. (2012) и потврђује интеракцију ибупрофена са делимично неутралисаним алуминијум-сулфатом из модификованих дијатомита. Иако поменути аутори за интеракцију ибупрофена са алуминијум-хидроксидом наводе да је кисело-базна реакција праћена настанком соли, због претходно описане могућности образовања координативне везе карбоксилатне групе ибупрофен анјона са металним јонима, интеракција ибупрофена са модификованим дијатомитима повезана је са настанком комплекса између ибупрофена и алуминијум јона са површине честица модификованих дијатомита.

4.2.5. Термогравиметријска, деривативна термогравиметријска и диференцијална термална анализа (TG/DTG/DTA)

Резултати TG и DTA анализе узорака модификованог перуанског MD500 и модификованог колубарског дијатомита MD након адсорпције диклофенак-натријума (DAMD и MDD редом) представљени су на слици 4.15 а–б, а резултати DTG анализе узорака DAMD и MDD представљени су на слици 4.15 в.

Губитак масе при загревању узорака до приближно 1000 °C износио је 22,7% за DAMD и 13,7% за MDD и одвијао се у три фазе код узорка DAMD, односно у четри фазе код узорка MDD. На DTG кривама пикови на 110 °C, 164 °C и 329 °C узорка DAMD као и они на 149 °C и 264 °C узорка MDD повезују се са дехидратацијом и дехидроксилацијом, пикови на 515 °C (DAMD) и 480 °C (MDD) означавају декомпозицију адсорбоване лековите супстанце, а пикови на 863 °C (DAMD) и 852 °C (MDD) упућују на десулфуризацију остатка модификованог дијатомита. У складу са DTG кривама су и резултати DTA анализа: широки ендотермни пикови на 110 °C (DAMD) и 113 °C (MDD) заједно са мањим ендотермним пиковима на 203 °C (DAMD) и 194 °C (MDD) указују на дехидратацију узорака, егзотермни пикови високог интензитета на 531 °C (DAMD) и 486 °C (MDD) повезани су са оксидативном декомпозицијом адсорбованог диклофенака, а мањи ендотермни пикови на 862 °C (DAMD) и 853 °C (MDD) последица су десулфуризације остатка модификованог дијатомита.

Према литературним подацима (Llinàs и сар., 2007), када се диклофенак-натријум загрева у динамичкој атмосфери азота, топи се у распону 283-285 °C, а непосредно након тога долази до декомпозиције. Међутим, загревање диклофенак-натријума у динамичкој атмосфери синтетичког ваздуха узрокује (делимичну) оксидацију/декомпозицију пре самог топљења (Tudja и сар., 2001). Диклофенак киселина такође показује разлике у термалном понашању у зависности од услова околине. Када се загрева у динамичкој атмосфери азота диклофенак киселина се топи на 180,5 °C (Llinàs и сар., 2007), али када се загревање одвија под динамичким протоком ваздуха, долази до деградације (интрамолекуларна циклизација и кондензација) пре топљења на 158 °C (Giordano и сар., 2003). Међутим, на основу главних егзотерми на DTA кривама узорака

DAMD (531 °C) и MDD (486 °C), које су приписане оксидативној декомпозицији адсорбоване лековите супстанце, закључује се да се термално понашање диклофенака на носачу (модификованом дијатомиту) прилично разликује од оног својственог чистом диклофенак-натријуму или диклофенак киселини, што указује на интеракцију лековите супстанце са носачем.

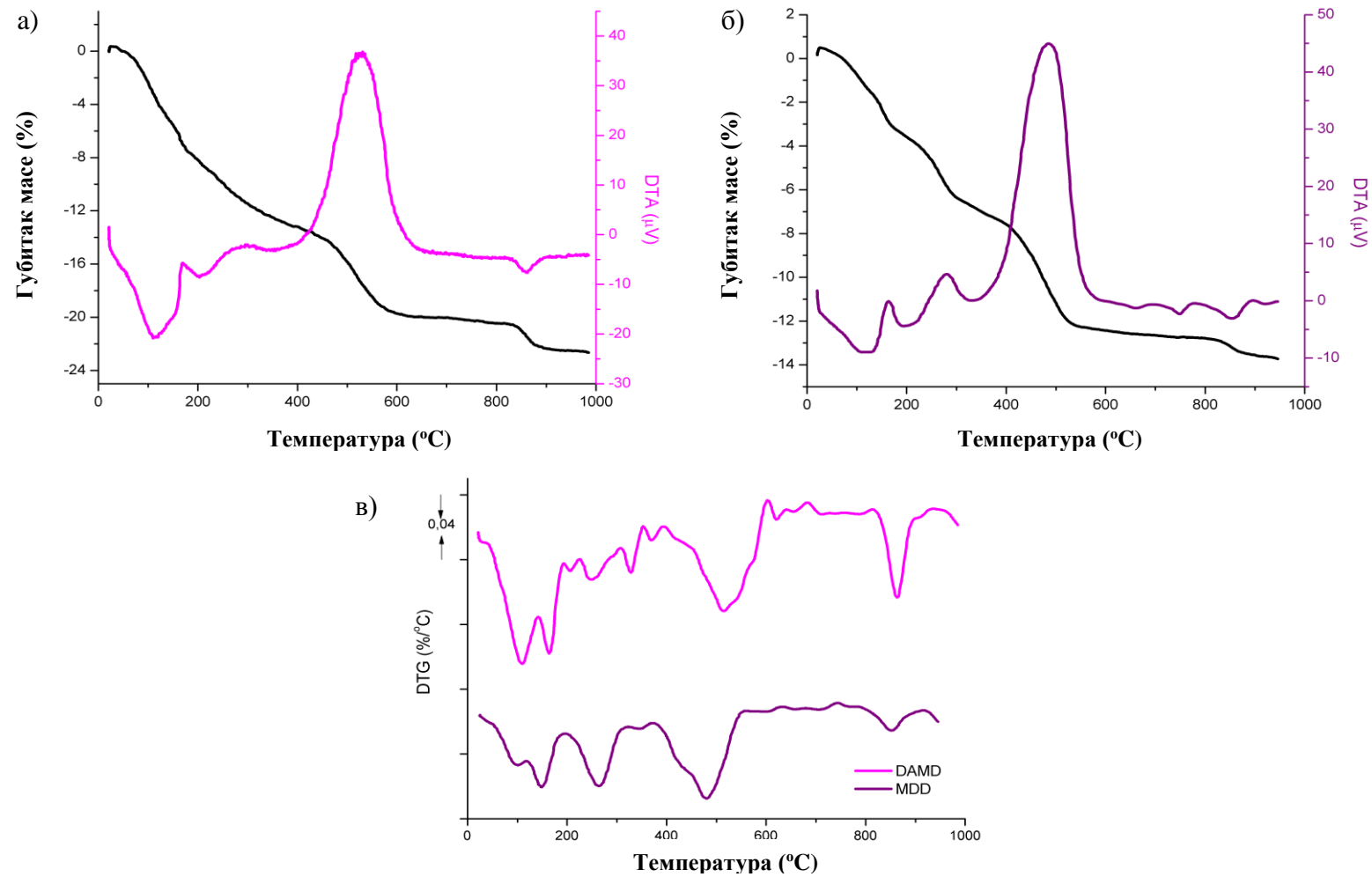
TG и DTA анализе узорак модификованог перуанског MD500 и модификованог колубарског дијатомита MD након адсорпције ибупрофена (MD5I и MDI редом) показане су на слици 4.16 а–б, а DTG анализе узорак MD5I и MDI представљене су на слици 4.16 в.

При загревању узорак до приближно 1000 °C губитак масе је износио 13,8% за MD5I и 11,5% за MDI и одвијао се кроз две фазе за узорак MD5I, односно кроз три фазе за узорак MDI. На DTG кривама пикови на 144 °C (MD5I) и на 199 °C (MDI) указују на дехидратацију/дехидроксилацију, широки пик око 457 °C узорка MD5I као и пар пикова на 407 °C и 485 °C узорка MDI означавају декомпозицију адсорбоване лековите супстанце, а пикови на 836 °C (MD5I) и 853 °C (MDI) последица су десулфуризације остатка модификованог дијатомита. Резултати DTA анализа у складу су са DTG налазима и указују на три термална догађаја: дехидратација узорак којој одговарају широки ендотермни пикови на 116 °C (MD5I) и 111 °C (MDI), оксидативна декомпозиција адсорбоване лековите супстанце са којом се повезују интензивни егзотермни пикови на 519 °C (са раменом на 427 °C – MD5I) и 486 °C (MDI) и коначно десулфуризација остатка модификованих дијатомита на коју упућују мали ендотермни пикови на 846 °C (MD5I) и 868 °C (MDI).

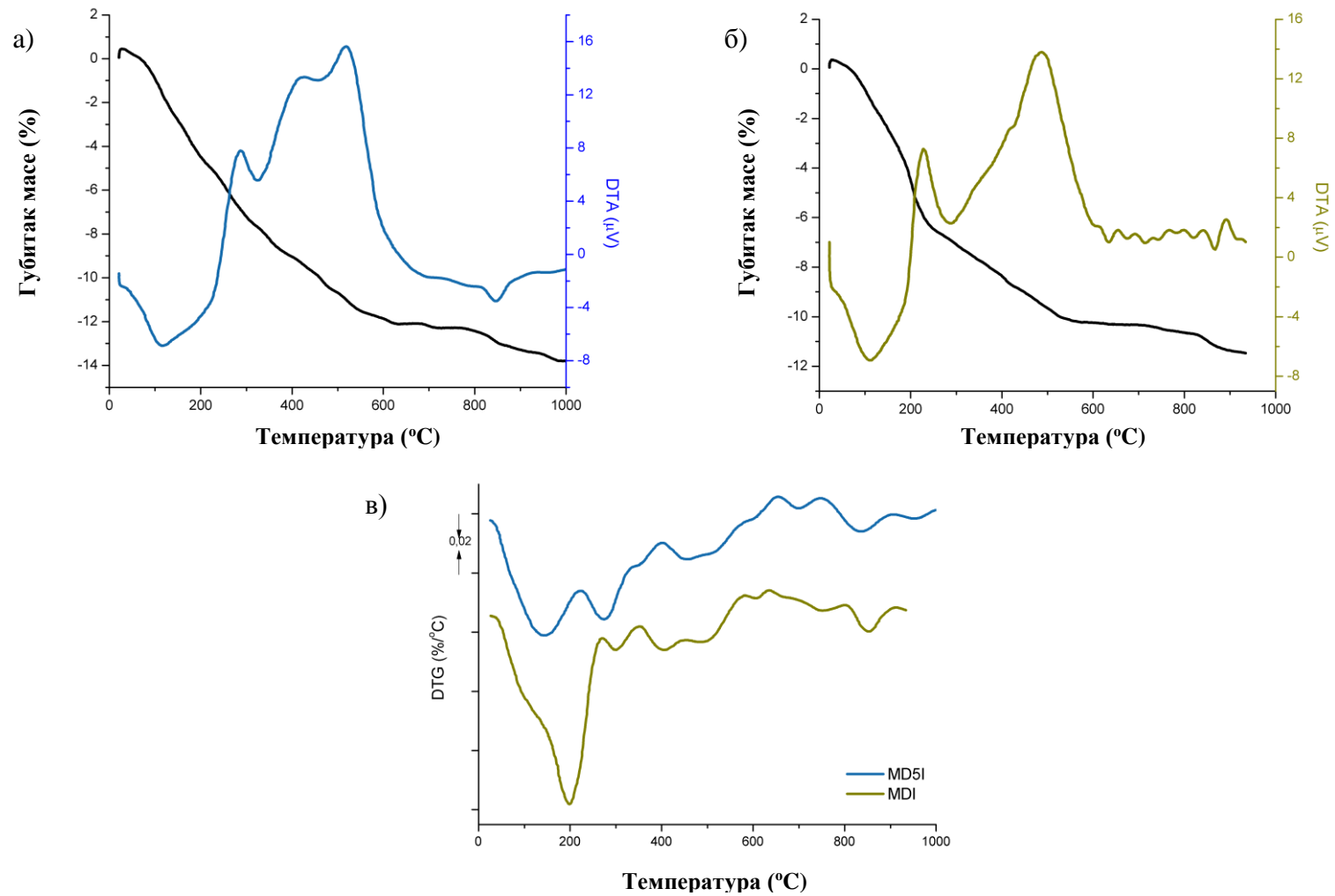
Према литературним подацима (Tita и сар., 2013), загревањем ибупрофена у динамичкој атмосфери азота до топљења супстанце долази на 78,5 °C, а у распону 175-300 °C (са пиком на 282,2 °C) одвија се губитак масе који одговара једностепеној декомпозицији супстанце. Загревањем у динамичкој атмосфери ваздуха ибупрофен се топи на 81 °C, а у распону 127-253 °C (са пиком на 239 °C) се одиграва термална декомпозиција супстанце (Bannach и сар., 2010). Ибупрофен-натријум се топи на 198 °C, а на 465 °C долази до ендотермне декомпозиције када се супстанца загрева у динамичкој атмосфери азота (Manek и сар., 2015). Слично термално понашање ибупрофен-натријум показује и током

загревања у динамичкој атмосфери хелијума: до топљења супстанце долази на 196 °C, а до ендотермне декомпозиције на 460 °C (Grochowicz и Kierys, 2015). Међутим, главне егзотерме на ДТА кривама узорака MD5I (519 °C) и MDI (486 °C), које су приписане оксидативној декомпозицији адсорбоване лековите супстанце, показују да се термално понашање ибупрофена на носачу (модификованом дијатомиту) значајно разликује од оног својственог чистом ибупрофену или ибупрофен-натријуму, што је последица интеракције лековите супстанце са носачем, а што је у складу са резултатима FTIR анализе.

Побољшање термалне стабилности ибупрофена везаног за носач описано је у литератури (Zheng и сар., 2007; Lu и сар., 2013). Наиме, температура декомпозиције ибупрофена повећала се након интеркалације у монтморилонит на 471 °C (Zheng и сар., 2007). Код нанохибрида слојевитих двојних хидроксида са ибупрофеном (енгл. *ibuprofen-layered double hydroxide nanohybrids*) егзотермна декомпозиција ибупрофена одиграла се на 230 °C, 347,5 °C и 513 °C (Lu и сар., 2013), што се такође значајно разликује од термалног понашања чисте супстанце и последица је интеркалације молекула супстанце у структуру носача, као и интеракције лековите супстанце са носачем.



Слика 4.15. TG и DTA криве узорака DAMD (а) и MDD (б); DTG криве узорака DAMD и MDD (в)



Слика 4.16. TG и DTA криве узорка MD5I (а) и MDI (б); DTG криве узорка MD5I и MDI (в)

4.2.6. *In vitro* испитивање брзине растварања лековите супстанце из лековита супстанца-модификовани дијатомит компримата

Као носачи модел лековитих супстанци у овим испитивањима употребљени су модификовани перуански дијатомит MD500 и модификовани колубарски дијатомит MD. У условима испитивања адсорпције диклофенак-натријума на носаче, адсорпциони капацитет узорка MD500 био је већи у односу на MD750, али и сличан са MD250. Пошто се висок степен адсорпције може постићи и са узорком добијеним при nižем нивоу модификације са делимично неутралисаним алуминијум-сулфатом, као носач за диклофенак-натријум одабран је узорак MD500 уместо MD250. У условима испитивања адсорпције ибупрофена на носаче, редослед адсорпционих капацитета узорака модификованих перуанских дијатомита био је следећи: MD250 > MD500 > MD750. Иако је капацитет адсорпције ибупрофена на узорак MD250 био већи него на узорак MD500, као носач за ибупрофен одабран је узорак MD500 како би се упоредила функционалност истог носача (MD500) за испоруку различитих лековитих супстанци (диклофенак-натријум и ибупрофен).

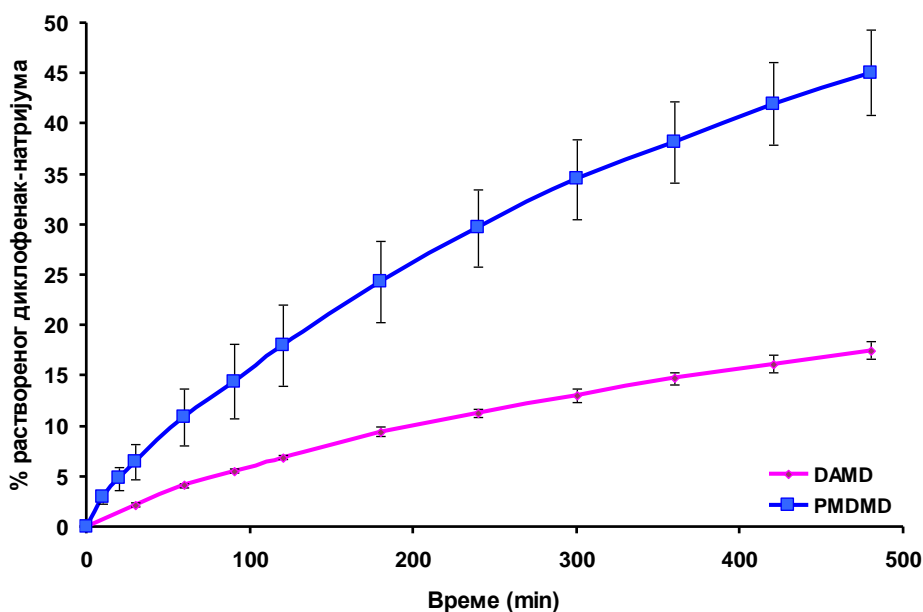
Резултати одређивања садржаја лековитих супстанци HPLC методом у прашкастим узорцима добијеним након адсорпције модел супстанци на модификоване дијатомите, показали су да се садржај супстанци кретао у границама од 90-110% за диклофенак-натријум, односно 88-106% за ибупрофен, у односу на вредност добијену спектроскопским одређивањем из течне фазе суспензија непосредно након адсорпције на модификоване дијатомите.

Резултати испитивања брзине растварања из компримата који садрже лековите супстанце адсорбоване на носаче (композити) и компримата физичке смеше лековитих супстанци са носачима истог састава приказани су на сликама 4.17–4.24.

Према захтевима USP 39, испитивање брзине растварања диклофенак-натријума из таблета са продуженим ослобађањем врши се у фосфатном пуферу pH 7,5, а испитивање брзине растварања диклофенак-натријума из таблета са одложеним ослобађањем спроводи се сукцесивно у 0,1 М HCl и фосфатном пуферу pH 6,8. У складу са наведеним захтевима, као и због провере могућег

утицаја фосфатних анјона на ослобађање диклофенак-натријума са носача (модификованих дијатомита), као медијуми за испитивање брзине растварања лековите супстанце из компримата одабрани су фосфатни пуфери рН 6,8 и рН 7,5.

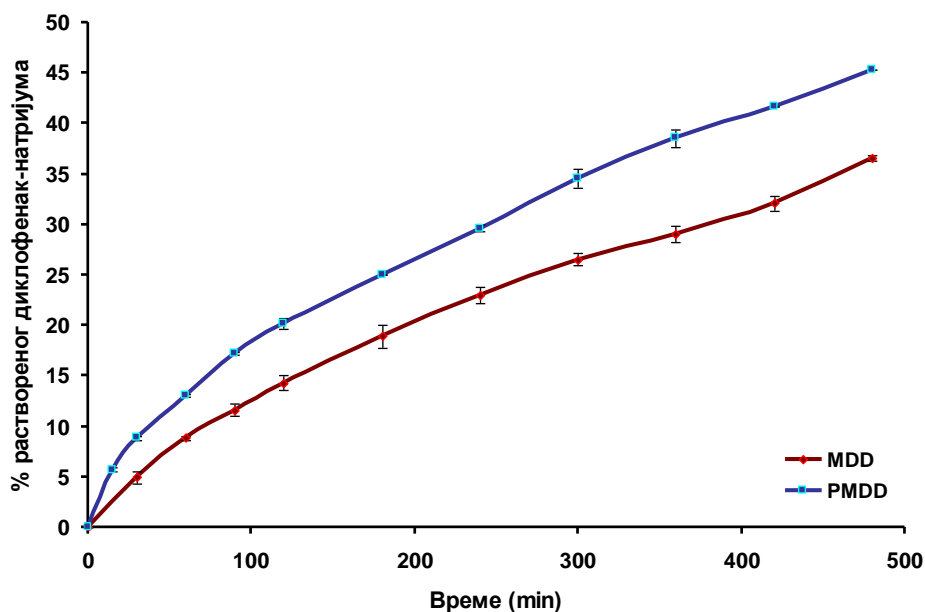
Током испитивања брзине растварања диклофенак-натријума из компримата са носачем модификованим перуанским дијатомитом MD500, спроведеном у фосфатном пуферу рН 6,8, примећено је успорено ослобађање лековите супстанце из компримата композита DAMD (диклофенак-натријум адсорбован на MD500), као и из компримата физичке смеше диклофенак-натријума са MD500 (PMDMD) истог садржаја лековите супстанце (слика 4.17). Такође, запажено је да током испитивања није дошло до промена у изгледу компримата композита DAMD, док је на површини компримата физичке смеше PMDMD запажен танак гел омотач. Процент ослобођене лековите супстанце из PMDMD компримата (45% након 8 h) био је 2,5 пута већи од оног који је остварен из DAMD компримата (~18% након 8 h) (Јанићијевић и сар., 2014).



Слика 4.17. Профили брзине растварања диклофенак-натријума из компримата композита лековита супстанца/MD500 и компримата физичке смеше лековите супстанце са MD500 у пуферу рН 6,8

Испитивање брзине растварања диклофенак-натријума из компримата са носачем модификованим колубарским дијатомитом MD, које је спроведено у

фосфатном пуферу рН 7,5, такође је показало да компримати композита (MDD – садрже диклофенак-натријум адсорбован на MD), као и компримати физичке смеше диклофенак-натријума са носачем MD истог садржаја лековите супстанце (PMDD), продужено ослобађају лековиту супстанцу (слика 4.18). Током овог испитивања није дошло до значајне промене у изгледу компримата. Након 8 h удео ослобођене лековите супстанце био је виши код PMDD (45%) него код MDD (37%) компримата (Јанићијевић и сар., 2015).



Слика 4.18. Профили брзине растварања диклофенак-натријума из компримата композита лековита супстанца/MD и компримата физичке смеше лековите супстанце са MD у пуферу рН 7,5

Дакле, независно од рН вредности медијума за испитивање као и врсте дијатомида који је коришћен за припрему носача, компримати који садрже диклофенак-натријум адсорбован на носач или њихову физичку смешу продужено ослобађају лековиту супстанцу. Међутим, за разлику од физичких смеша диклофенак-натријума са модификованим перуанским односно модификованим колубарским дијатомитом, које дају врло сличан проценат ослобађања лековите супстанце у медијумима различитих рН вредности, количина лековите супстанце ослобођене након 8 h из композита диклофенак-натријум/модификован колубарски дијатомит (~30 mg) скоро 3 пута је већа од оне

ослобођене из композита диклофенак-натријум/модификован перуански дијатомит (~10 mg).

Током ослобађања лековите супстанце из DAMD и MDD компримата долази до десорпције, док је ослобађање из PMDMD и PMDD компримата вероватно резултат равнотеже између растварања честица диклофенак-натријума и адсорпције раствореног диклофенак-натријума на носач. На основу литературних података претпоставља се да на поменуте феномене током ослобађања диклофенак-натријума са дијатомита модификованих делимично неутралисаним алуминијум-сулфатом могу утицати фосфатни анјони. Наиме, постоје подаци да фосфати показују јак афинитет ка алуминијум-оксиду (Hsu, 1989) и да се могу адсорбовати на алуминијум-(хидр)оксиде комбинацијом површинске комплексације и површинске преципитације, при чему релативан удео ових механизма у процесу адсорпције зависи од рН и концентрације фосфата/оптерећења фосфатима (Van Emmerick и сар., 2007; Del Nero и сар., 2010). Надаље, показано је да фосфати смањују адсорпцију одређених моно- и дикарбоксилних киселина на алуминијум-(оксо)-хидроксида (Guan и сар., 2006; Scheffe и сар., 2009), а потпомажу десорпцију природне органске материје (хуминских и фулвинских киселина - сложене и разнородне смеше једињења која садрже карбоксилне и фенолне функционалне групе) са аморфног алуминијум-хидроксида (Kaiser и Zech, 1999). На основу наведеног очекивало би се веће ослобађање лековите супстанце из DAMD на рН 6,8 него из MDD на рН 7,5, као и веће ослобађање диклофенак-натријума из PMDMD на рН 6,8 него из PMDD на рН 7,5 услед веће концентрације H_2PO_4^- јона на рН 6,8. Међутим, добијени су другачији резултати од очекиваних, тако да утицај фосфата на адсорпцију/десорпцију лековите супстанце вероватно није главни чинилац који одређује ослобађање диклофенака. Могуће је да други чиниоци као што су порозитет и брзина квашења компримата са различитим носачима играју значајну улогу у ослобађању диклофенак-натријума (Јанићијевић и сар., 2015).

У циљу процене механизма ослобађања диклофенак-натријума из компримата са носачима модификованим дијатомитима, добијени профили брзине растварања лековите супстанце из компримата су анализирани применом одабраних математичких модела. Израчунате вредности параметара

математичких модела примењених за описивање профила брзине растварања диклофенак-натријума из DAMD и PMDMD компримата (медијум: фосфатни пуфер рН 6,8) као и из MDD и PMDD компримата (медијум: фосфатни пуфер рН 7,5) приказане су у табели 4.13.

Табела 4.13. Вредности параметара добијених уклапањем профила ослобађања диклофенак-натријума у одабране математичке моделе

Модел	Параметри	Компримати			
		DAMD	PMDMD	MDD	PMDD
Кинетика нултог реда	r^2	0,9645	0,9701	0,9729	0,9613
	k_0	0,0346	0,0906	0,0707	0,0877
Кинетика првог реда	r^2	0,9747	0,9911	0,988	0,9857
	k_1	0,0004	0,0012	0,0009	0,0012
<i>Higuchi</i>	r^2	0,9829	0,9843	0,9834	0,9951
	k_h	0,8251	2,2010	1,7146	2,1208
<i>Korsmeyer–Peppas</i>	r^2	0,9979	0,9985	0,9972	0,9996
	n	0,6824	0,7046	0,7015	0,5951
	k	0,2647	0,6069	0,4822	1,1526
<i>Hixson–Crowell</i>	r^2	0,9715	0,9854	0,9839	0,979
	k_s	0,0006	0,0017	0,0013	0,0016

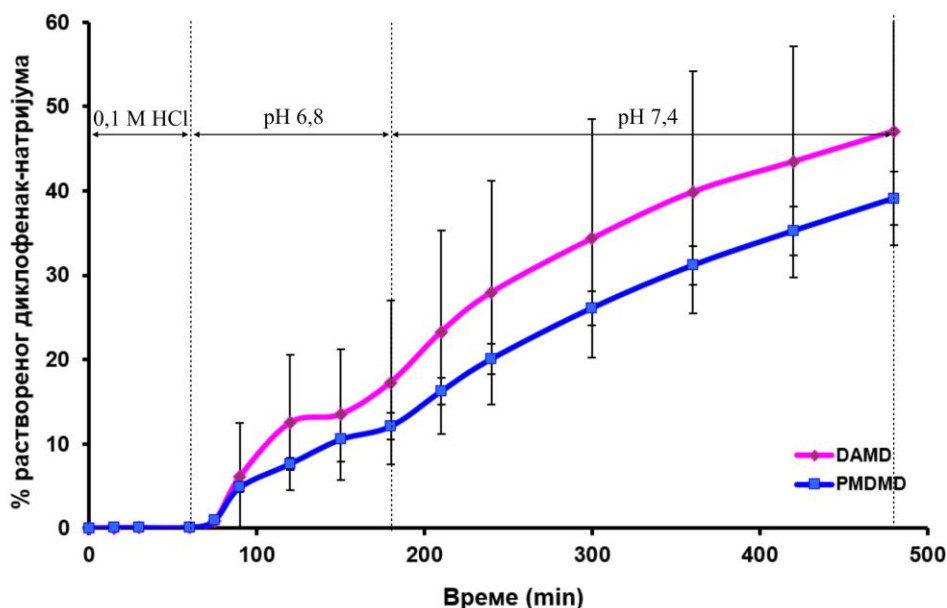
Због највеће вредности коефицијента детерминације *Korsmeyer–Peppas*-ов модел може се сматрати најпогоднијим за описивање ослобађања лековите супстанце из DAMD и MDD компримата. Експонент n *Korsmeyer–Peppas*-овог модела, чија је вредност у оба случаја између 0,5 и 1, указује да је не-Фикова дифузија (неправилни транспорт, енгл. *anomalous transport*) (Costa и Lobo, 2001) механизам ослобађања лековите супстанце из DAMD и MDD компримата. Врло високу корелацију ($r^2 > 0,99$) показују модел кинетике првог реда и *Korsmeyer–Peppas*-ов модел у случају PMDMD компримата, док је за ослобађање из PMDD компримата нађена врло висока корелација за *Higuchi*-јев и *Korsmeyer–Peppas*-ов модел. Међутим, због нешто веће вредности коефицијента детерминације

Korsmeyer–Peppas-ов модел је подобнији за описивање брзине растварања диклофенак-натријума и из PMDMD и PMDD компримата. Вредност експонента n *Korsmeyer–Peppas*-овог модела је и овде у оба случаја између 0,5 и 1, што упућује да је механизам ослобађања диклофенак-натријума из PMDMD и PMDD компримата не-Фикова дифузија.

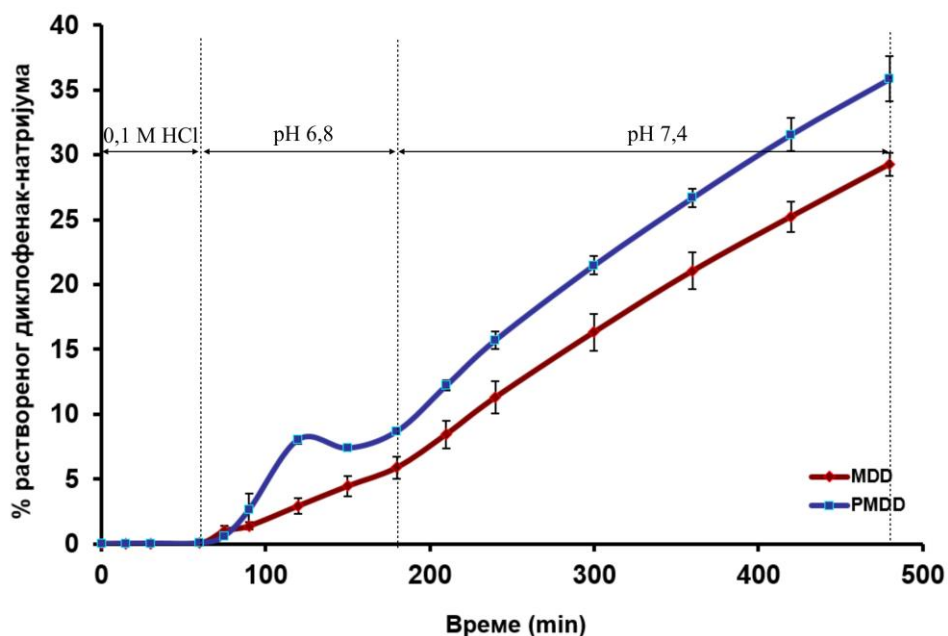
Поред испитивања у фосфатним пуферима рН 6,8 и рН 7,5, извршена су и испитивања брзине растварања диклофенак-натријума из компримата у систему „отворене петље“ уз измену медијума различитих рН вредности са циљем да опонашају *in vivo* пролазак лека кроз гастроинтестинални тракт.

Током испитивања брзине растварања диклофенак-натријума из компримата са носачима модификованим дијатомитима у условима измене медијума, готово да није примећено растварање лековите супстанце из компримата у киселој средини, односно до ослобађања диклофенака дошло је тек у фосфатним пуферима. Након излагања киселој средини и фосфатном пуферу рН 6,8 проценат ослобођене лековите супстанце из DAMD компримата композита (17%) био је већи (1,4 пута) него из PMDMD компримата физичке смеше (12%) и тај тренд је задржан до краја испитивања (након укупно 8 h испитивања у условима измене медијума из DAMD компримата ослобођено је 47%, а из PMDMD компримата 39% лековите супстанце) (слика 4.19). Испитивање на комприматима са модификованим колубарским дијатомитом као носачем показало је обрнут тренд у ослобађању: проценат ослобођене лековите супстанце из компримата композита (MDD) био је мањи него из компримата физичке смеше (PMDD) након излагања киселој средини и фосфатном пуферу рН 6,8 (6% из MDD и 9% из PMDD компримата), као и на крају испитивања (након укупно 8 h испитивања у условима измене медијума из MDD компримата ослобођено је 29%, а из PMDD компримата 36% лековите супстанце) (слика 4.20). Уопштено се може закључити да је ослобађање диклофенак-натријума из компримата са носачима (модификованим дијатомитима) у условима који опонашају *in vivo* пролазак лека кроз гастроинтестинални тракт одложено (не одвија се у киселој средини) и продужено (одвија се непрекидно и успорено у фосфатним пуферима). Изузетно ниска растворљивост диклофенак-натријума у 0,1 М HCl (видети одељак 3.1)

водећи је разлог због којег не долази до ослобађања лековите супстанце из компримата у киселој средини.



Слика 4.19. Профили брзине растварања диклофенак-натријума из компримата композита лековита супстанца/MD500 и компримата физичке смеше лековите супстанце са MD500 у условима измене медијума

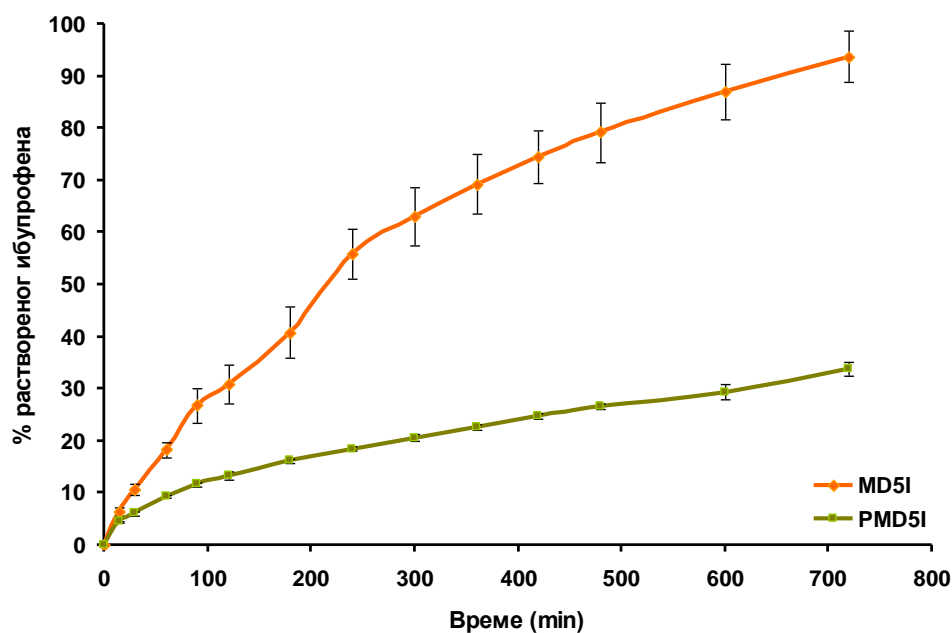


Слика 4.20. Профили брзине растварања диклофенак-натријума из компримата композита лековита супстанца/MD и компримата физичке смеше лековите супстанце са MD у условима измене медијума

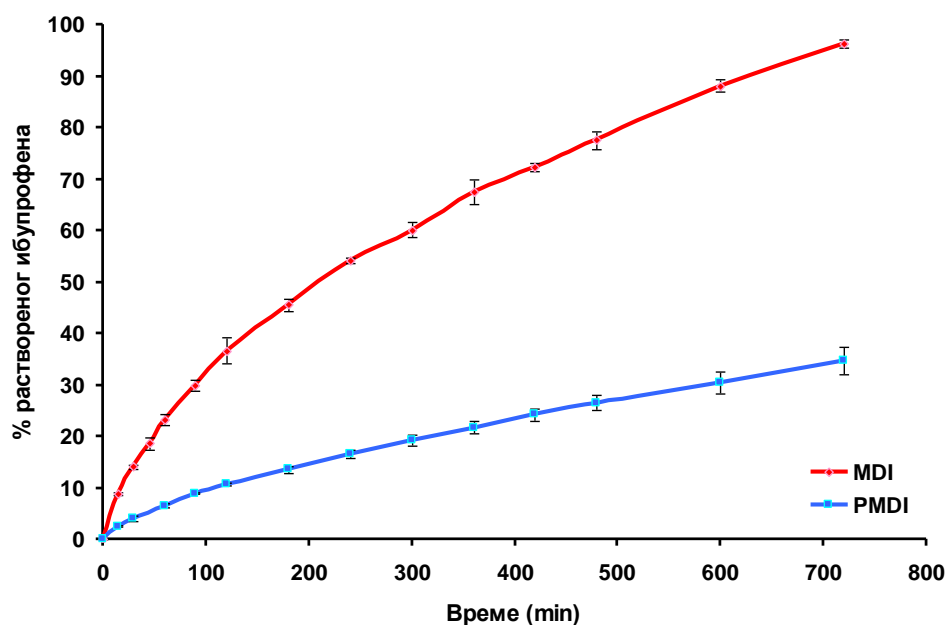
У фосфатном пуферу рН 7,2 (USP 39) уочено је успорено ослобађање лековите супстанце из компримата композита који садрже ибупрофен адсорбован на MD или MD500 (MDI и MD5I) као и из компримата физичке смеше ибупрофена са MD или MD500 истог садржаја супстанце (PMDI и PMD5I) (слике 4.21–4.22). Током испитивања запажено је да је целовитост компримата остала очувана са изузетком MD5I компримата који су напрасли. Након 12 h постигнуто је скоро потпуно ослобађање ибупрофена из MDI (96%) као и из MD5I (94%) компримата, док је за исто време ослобођено приближно 3 пута мање ибупрофена из PMDI (35%) и PMD5I (34%) компримата.

Током ослобађања ибупрофена из MDI и MD5I компримата долази до десорпције и вероватно је савладавање јаког афинитета носача (модификованог дијатомита) ка лековитој супстанци један од разлога продуженог/успореног ослобађања ибупрофена из компримата композита. Продужено ослобађање ибупрофена из PMDI и PMD5I компримата вероватно је делом последица равнотеже између растварања честица ибупрофена и адсорпције раствореног ибупрофена на носач. Такође, успорено квашење компримата медијумом (спорије продирање медијума у унутрашњост компримата) би могло допринети продуженом ослобађању ибупрофена из компримата композита и физичких смеша са модификованим дијатомитима. Разлике у брзини растварања ибупрофена из компримата композита у односу на компримате одговарајућих физичких смеша указују на интеракцију лековите супстанце са носачем, што је у складу са резултатима FTIR и термалних анализа.

У циљу процене механизма ослобађања ибупрофена из компримата са носачима модификованим дијатомитима, добијени профили брзине растварања лековите супстанце из компримата су анализирани применом одабраних математичких модела. Израчунате вредности параметара математичких модела примењених за описивање профила брзине растварања ибупрофена из MDI, PMDI, MD5I и PMD5I компримата (медијум: фосфатни пуфер рН 7,2) приказане су у табели 4.14.



Слика 4.21. Профили брзине растварања ибупрофена из компримата композита лековита супстанца/MD500 и компримата физичке смеше лековите супстанце са MD500 у пуферу pH 7,2



Слика 4.22. Профили брзине растварања ибупрофена из компримата композита лековита супстанца/MD и компримата физичке смеше лековите супстанце са MD у пуферу pH 7,2

Korsmeyer–Peppas-ов модел најближе описује ослобађање ибупрофена из PMDI компримата. Профили брзине растварања ибупрофена из MDI и PMD5I компримата се веома добро уклапају у *Korsmeyer–Peppas*-ов и *Higuchi*-јев модел ($r^2 > 0,99$), а профил брзине растварања ибупрофена из MD5I компримата је врло добро представљен *Korsmeyer–Peppas*-овим и *Hixson–Crowell*-овим моделом ($r^2 > 0,99$). Међутим, разматрањем вредности суме квадрата резидуала/грешке, које су ниже код *Korsmeyer–Peppas*-овог модела у односу на *Higuchi*-јев и *Hixson–Crowell*-ов модел, може се узети да је и ослобађање ибупрофена из MDI, MD5I и PMD5I компримата најбоље приказано *Korsmeyer–Peppas*-овим моделом. Вредност експонента n *Korsmeyer–Peppas*-овог модела је за све набројане компримате између 0,5 и 1, тако да се може претпоставити да је механизам ослобађања ибупрофена не-Фикова дифузија (неправилни транспорт).

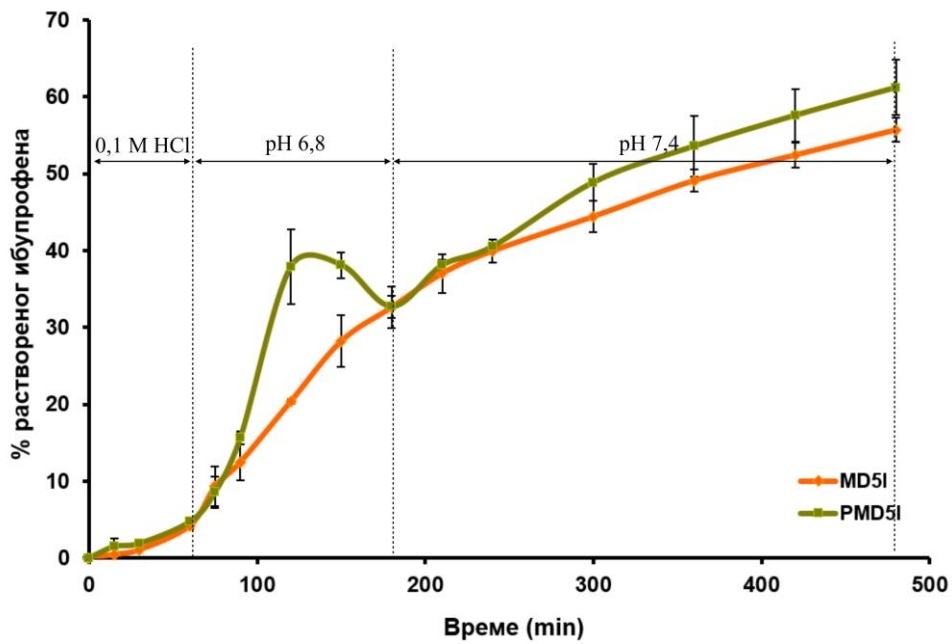
Табела 4.14. Вредности параметара добијене уклапањем профила ослобађања ибупрофена у одабране математичке моделе

Модел	Параметри	Компримати			
		MDI	PMDI	MD5I	PMD5I
Кинетика нултог реда	r^2	0,9434	0,9745	0,9314	0,9382
	k_0	0,1288	0,0465	0,1331	0,0421
Кинетика првог реда	r^2	0,9431	0,9893	0,9888	0,9624
	k_1	0,0038	0,0006	0,0036	0,0005
<i>Higuchi</i>	r^2	0,9973	0,987	0,9869	0,9984
	k_h	3,7577	1,3273	3,8831	1,2308
<i>Korsmeyer–Peppas</i>	r^2	0,9963	0,9996	0,9919	0,9986
	n	0,6142	0,6765	0,7142	0,5175
	k	1,7988	0,406	0,9861	1,0922
<i>Hixson–Crowell</i>	r^2	0,9897	0,9851	0,9959	0,955
	k_s	0,0039	0,0008	0,0038	0,0007

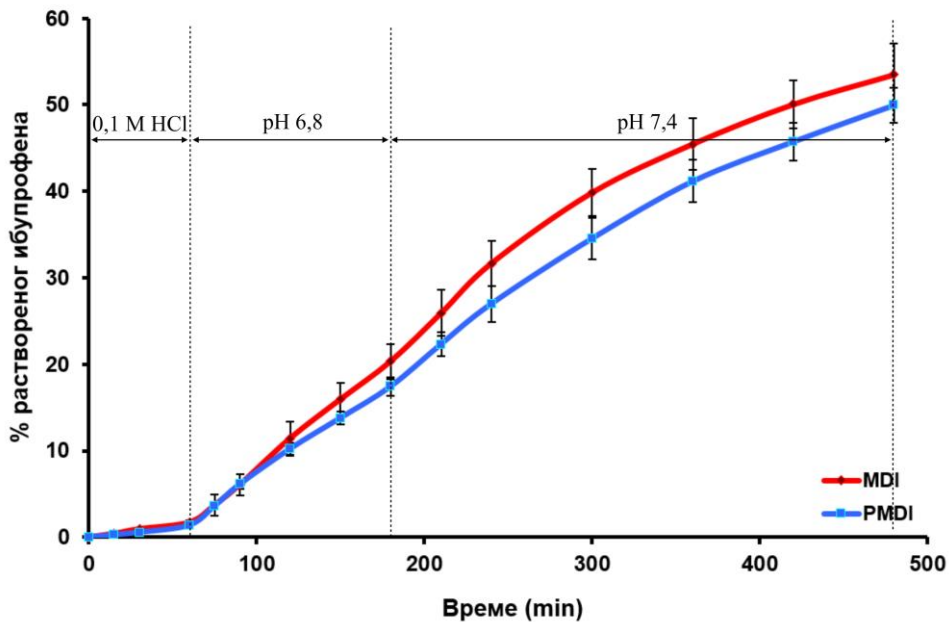
Поред испитивања у систему „затворене петље“ (фосфатни пуфер рН 7,2), извршена су и испитивања брзине растварања ибупрофена из компримата у систему „отворене петље“ уз измену медијума различитих рН вредности.

У условима измене медијума веома мали проценат ибупрофена ослобођен је у киселој средини (~4% из MD5I и ~5% из PMD5I) тако да се ослобађање највећим делом одвијало у фосфатним пуферима. Приближно иста количина ибупрофена ослобођена је након излагања киселој средини и фосфатном пуферу рН 6,8 из MD5I и PMD5I компримата (33%), али је на крају испитивања нешто већа количина ибупрофена ослобођена из PMD5I (61%) него из MD5I (56%) компримата (слика 4.23). Компримати MDI и PMDI су испољили слично понашање у условима који опонашају пролазак лека кроз гастроинтестинални тракт. У киселој средини ослобађање ибупрофена је било занемарљиво (мање од 2% из MDI и из PMDI) и тек у фосфатним пуферима се одвијало у значајном обиму. Количина ослобођеног ибупрофена после излагања киселој средини и фосфатном пуферу рН 6,8 била је нешто већа из MDI (20%) него из PMDI (17%) компримата. Процент ослобођеног ибупрофена након укупно 8 h испитивања у условима измене медијума такође је био нешто виши из MDI (53%) у односу на PMDI (50%) компримате (слика 4.24). Дакле, ослобађање ибупрофена из компримата са носачима (модификованим дијатомитима) продужено је и у условима који опонашају *in vivo* пролазак лека кроз гастроинтестинални тракт (ослобађање се одвија највећим делом у фосфатним пуферима и то на непрекидан и успорен начин). Због веома ниске растворљивости ибупрофена у 0,1 М HCl (видети особине супстанце у одељку 3.1) не долази до значајнијег ослобађања ибупрофена из компримата у киселој средини. Пораст растворљивости ибупрофена са порастом рН вредности воденог медијума доприноси већем обиму ослобађања лековите супстанце из компримата у фосфатним пуферима.

Ибупрофен је често коришћен као модел лековита супстанца за савремене носаче типа мезопорозног силицијум-диоксида због повољне величине молекула за инкорпорирање/везивање унутар пора ових носача (Charnay и сар., 2004; Qu и сар., 2006; Kamarudin и сар., 2013).



Слика 4.23. Профили брзине растварања ибупрофена из компримата композита лековита супстанца/MD500 и компримата физичке смеше лековите супстанце са MD500 у условима измене медијума



Слика 4.24. Профили брзине растварања ибупрофена из компримата композита лековита супстанца/MD и компримата физичке смеше лековите супстанце са MD у условима измене медијума

Испитивање ослобађања ибупрофена са носача типа МСМ-41 (мезопорозне честице силицијум-диоксида са хексагонално уређеним каналима/порама) у условима измене медијума (Charnay и сар., 2004), показало је да се 38% лековите супстанце ослобађа после 30 min испитивања у вештачком желудачном соку (pH 1,2), а укупно 91% ибупрофена ослободи се након наредних 45 min испитивања у вештачком цревном соку (pH 7,4). У поређењу са ослобађањем ибупрофена из композита са модификованим дијатомитима, ослобађање ибупрофена са носача типа МСМ-41 у сличним условима измене медијума је релативно брзо. Поред тога, капацитет адсорпције ибупрофена из етанолног раствора на носач типа МСМ-41 (184 mg/g) нижи је у односу на адсорпционе капацитете модификованих дијатомита за исту супстанцу.

Qu и сар. (2006) су испитивали утицај морфологије честица (лоптасте или издужене) и геометрије пора (хексагонална или кубична) мезопорозног силицијум-диоксида на обим везивања ибупрофена и ослобађање везане лековите супстанце. Испитивање ослобађања ибупрофена изведено је из компримата (садрже лековиту супстанцу везану за носач - мезопорозне честице силицијум-диоксида) у вештачком соку дуоденума (pH 6,8). Уочено је да брзина растварања ибупрофена из компримата опада са порастом величине честица носача исте геометрије пора (време потребно за ослобађање готово целокупне количине ибупрофена било је између 12-84 h зависно од величине честица носача типа МСМ-41). Такође је показано да разлика у геометрији пора носача истих величина честица утиче на брзину растварања ибупрофена из компримата (време за ослобађање готово целокупне количине ибупрофена било је краће (12 h) када је употребљен носач типа МСМ-48 кубичне геометрије пора него када је носач био типа МСМ-41 хексагоналне геометрије пора (24 h)). Дакле, променом физичких карактеристика мезопорозних честица силицијум-диоксида може се утицати на профил ослобађања лековите супстанце.

Kamarudin и сар. (2013) су припремили мезопорозне наночестице силицијум-диоксида (енгл. *mesoporous silica nanoparticles* - MSN) и потом извршили њихову модификацију помоћу (3-аминопропил)триетоксисилана (APTES). Капацитет адсорпције ибупрофена из етанолног раствора на MSN ($4,85 \times 10^{-4}$ mol/g) смањен је након модификације APTES-ом ($3,83 \times 10^{-4}$ mol/g).

Брзина растварања ибупрофена из прашкова композита (који садрже лековиту супстанцу адсорбовану на носач) испитана је у вештачкој телесној течности и показано је да се 50% ибупрофена ослобађа за 20 h са носача MSN, док се за исто време са модификованог носача (APTES-модификовани MSN) ослобађа 38% лековите супстанце. У поређењу са ослобађањем ибупрофена из компримата композита ибупрофен/модификовани дијатомит (које је спроведено у фосфатном пуферу рН 7,2), и немодификоване и APTES-модификоване мезопорозне наночестице силицијум-диоксида показују још спорије ослобађање ибупрофена. Међутим, капацитети адсорпције ибупрофена из етанолног раствора на носаче MSN (100 mg/g) и APTES-модификовани MSN (79 mg/g) нижи су у односу на адсорпционе капацитете модификованих дијатомита за исту супстанцу.

Начелно посматрано, предност модификованих дијатомита у односу на носаче типа мезопорозног силицијум-диоксида је економски аспект добијања (дијатомит је природни материјал ниске набавне цене и модификован је једноставним поступком уз мали утрошак енергије и времена).

Услед високе вредности адсорпционог капацитета модификованих дијатомита за диклофенак-натријум, количина лековите супстанце у комприматима који садрже диклофенак-натријум адсорбован на носач била је блиска дози диклофенак-натријума у регистрованим таблетама са продуженим ослобађањем (која износи 100 mg у лековима Diclofenac-retard и Diklofen® - <http://www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/pretrazivanje-humanih-lekova/>) и кретала се око 55 mg у 300 mg компримата са носачем MD500, односно око 85 mg у 300 mg компримата са носачем MD, што је пожељно својство са становишта потенцијалне терапијске примене ових носача у фармацеутским облицима.

Количина ибупрофена у комприматима који садрже ибупрофен адсорбован на носач била је, и поред великог адсорпционог капацитета модификованих дијатомита, знатно испод дозе ибупрофена у регистрованим таблетама са продуженим ослобађањем (која износи 800 mg у леку Brufen® retard - <http://www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/pretrazivanje-humanih-lekova/>) и кретала се око 54 mg у 300 mg компримата са носачем MD, односно око 58 mg у 300 mg компримата са носачем MD500.

Ипак, композити и физичке смеше ибупрофена са модификованим дијатомитом одабрани су за трећу фазу експерименталног рада јер одговарајући компримати обезбеђују продужено и скоро потпуно ослобађање лековите супстанце за време које одговара проласку лека кроз гастроинтестинални тракт. Наиме, време гастроинтестиналног транзита је између 8-24 h (Singh и Kim, 2007), а компримати композита ибупрофен/модификовани дијатомит ослобађају у просеку 95% лековите супстанце током 12 h испитивања у фосфатном пуферу рН 7,2. Модификовани колубарски дијатомит (MD) одабран је уместо модификованог перуанског дијатомита MD500 као носач за ибупрофен у трећој фази експерименталног рада како би се указало на нове могућности употребе сировина из локалног налазишта.

4.3. РЕЗУЛТАТИ III ФАЗЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ РАДА

4.3.1. Фармаколошко-токсиколошко испитивање акутне токсичности/нешкодљивости

Испитивање акутне токсичности није показало знаке токсичне реакције нити угинућа животиња након пероралне примене полазних и модификованих дијатомита, што указује на могућу безбедност примене ових потенцијалних носача лековитих супстанци у фармацеутским облицима.

Потенцијална безбедност дијатомита у биомедицинској примени поткрепљена је и резултатима *in vitro* испитивања цитотоксичности дијатомита на ћелијским линијама канцера колона Сасо-2, НТ-29 и НСТ-116, који показују да у високим концентрацијама до 1000 µg/ml дијатомит готово да не испољава цитотоксичност (Zhang и сар., 2013).

У корист безбедности примене дијатомита модификованих делимично неутралисаним алуминијум-сулфатом може се навести и чињеница да се: алуминијум-сулфат (Е 520), алуминијум-натријум-сулфат (Е 521), алуминијум-калијум-сулфат (Е 522) и алуминијум-амонијум-сулфат (Е 523) налазе на Листи адитива одобрених за употребу у храни (Службени гласник РС број 63/2013). Алуминијум-сулфати (Е 520-523), појединачно или у комбинацији, користе се у кандираном, кристализованом или глазираном воћу и поврћу, при чему максимално дозвољена количина ових адитива у наведеним условима употребе износи 200 mg/kg (изражено као алуминијум).

Познато је и да се алуминијум слабо апсорбује након оралне примене алуминијумових једињења (0,1-0,6% унетог алуминијума се апсорбује након оралне примене) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008), што такође говори о потенцијалној безбедности модификованих дијатомита у биомедицинској примени.

4.3.2. Испитивање аналгетичке/антиедематозне активности композита и физичких смеша лековита супстанца-модификовани дијатомит

У моделу инфламаторног бола у пацова сви испитивани третмани: ибупрофен (IBU), композит ибупрофен/модификовани колубарски дијатомит (лековита супстанца адсорбована на носач) - MDI и физичка смеша ибупрофена са модификованим колубарским дијатомитом - PMDI испољили су статистички значајно и дозно-зависно антихипералгезијско (слика 4.25) и антиедематозно (слика 4.26) дејство.

4.3.2.1. Антихипералгезијско и антиедематозно дејство композита и физичких смеша ибупрофен-модификовани колубарски дијатомит

IBU, MDI и PMDI (5-50 mg/kg; p.o.) су дозно-зависно смањили разлику у притисцима ослањања између здраве шапе и шапе са хипералгезијом, df (g), у модификованом тесту притиска на шапу пацова ($p < 0,05$; двофакторска ANOVA) (слика 4.25). Максимум антихипералгезијског дејства (%АН) ибупрофен (IBU) постиже 240-360 min након p.o. примене, а одговарајући %АН износе 29,93%, 42,57% и 52,53% за дозе ибупрофена од 5, 25 и 50 mg/kg, редом. MDI остварује максимално антихипералгезијско дејство 240-360 min након примене као и IBU, а %АН износе 52,40%, 58,73% и 65,71% за исти дозни опсег. Максимални %АН за PMDI износе: 41,19% (5 mg/kg; 300. min), 64,55% (25 mg/kg; 360. min) и 76,91% (50 mg/kg; 360. min). Криве односа log дозе и ефекта IBU/MDI/PMDI конструисане за вредности максималног %АН имају висок коефицијент корелације (није приказано). Средње ефективне дозе антихипералгезијског дејства ибупрофена, композита и физичке смеше у тренутку максималног ефекта приказане су у табели 4.15.

Резултати показују да су ибупрофен, композит ибупрофен/модификовани колубарски дијатомит и физичка смеша ибупрофена са модификованим колубарским дијатомитом статистички значајно на дозно-зависан начин смањили разлику у запремини између третиране (инфламиране) и базалне запремине шапе у поређењу са контролном групом, dv (ml), мерено плетизмометром ($p < 0,05$;

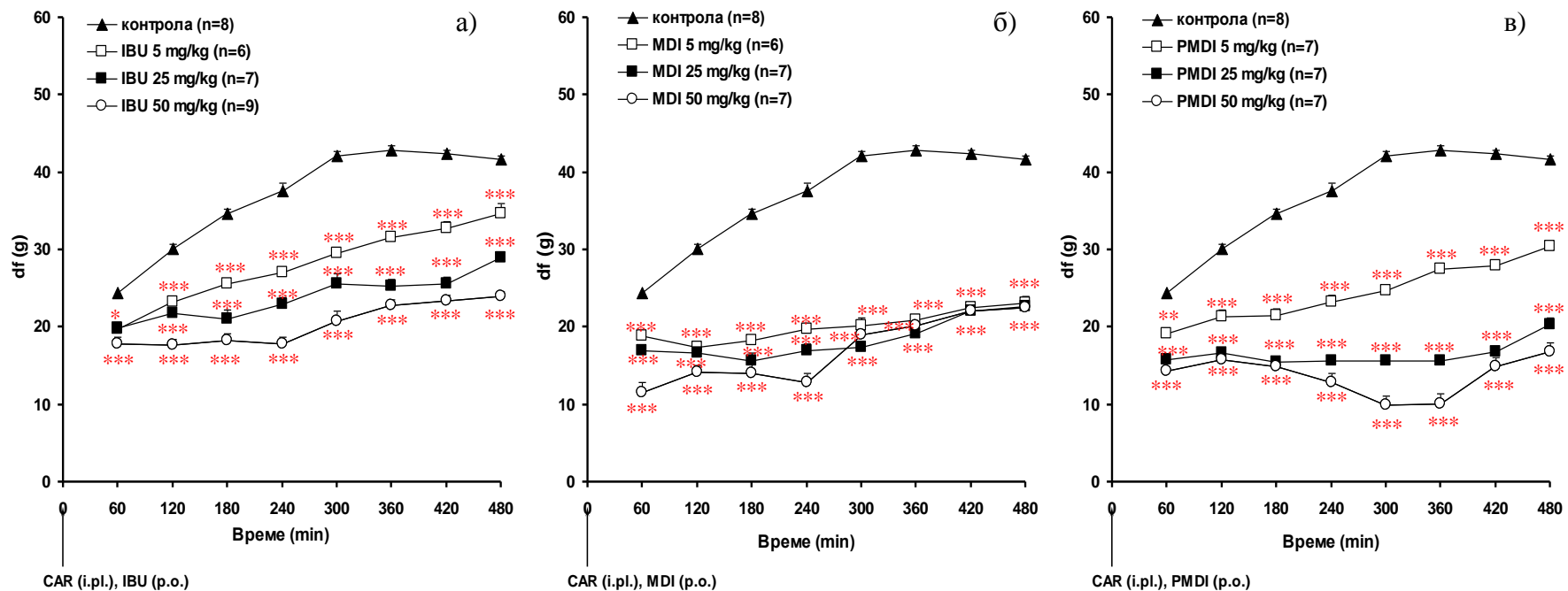
двофакторска ANOVA) (слика 4.26). Максимум антиедематозног дејства (%AE) за дозу од 5 mg/kg износи: 46,67% (IBU, 240. min), 52,54% (MDI, 300. min) и 56,51% (PMDI, 360. min); за дозу од 25 mg/kg: 66,9% (IBU, 120. min), 65,63% (MDI, 180. min) и 72,68% (PMDI, 120. min); за дозу од 50 mg/kg: 71,54% (IBU, 120. min), 75,94% (MDI, 120. min) и 86,16% (PMDI, 180. min). Криве односа log дозе и ефекта IBU/MDI/PMDI конструисане за вредности максималног %AE имају висок коефицијент корелације (није приказано). Средње ефективне дозе антиедематозног дејства ибупрофена, композита и физичке смеше у тренутку максималног ефекта приказане су у табели 4.15.

Табела 4.15. Средње ефективне дозе (ED_{50}) антихипералгезијског и антиедематозног дејства ибупрофена, композита и физичке смеше у инфламаторном моделу бола у пацова

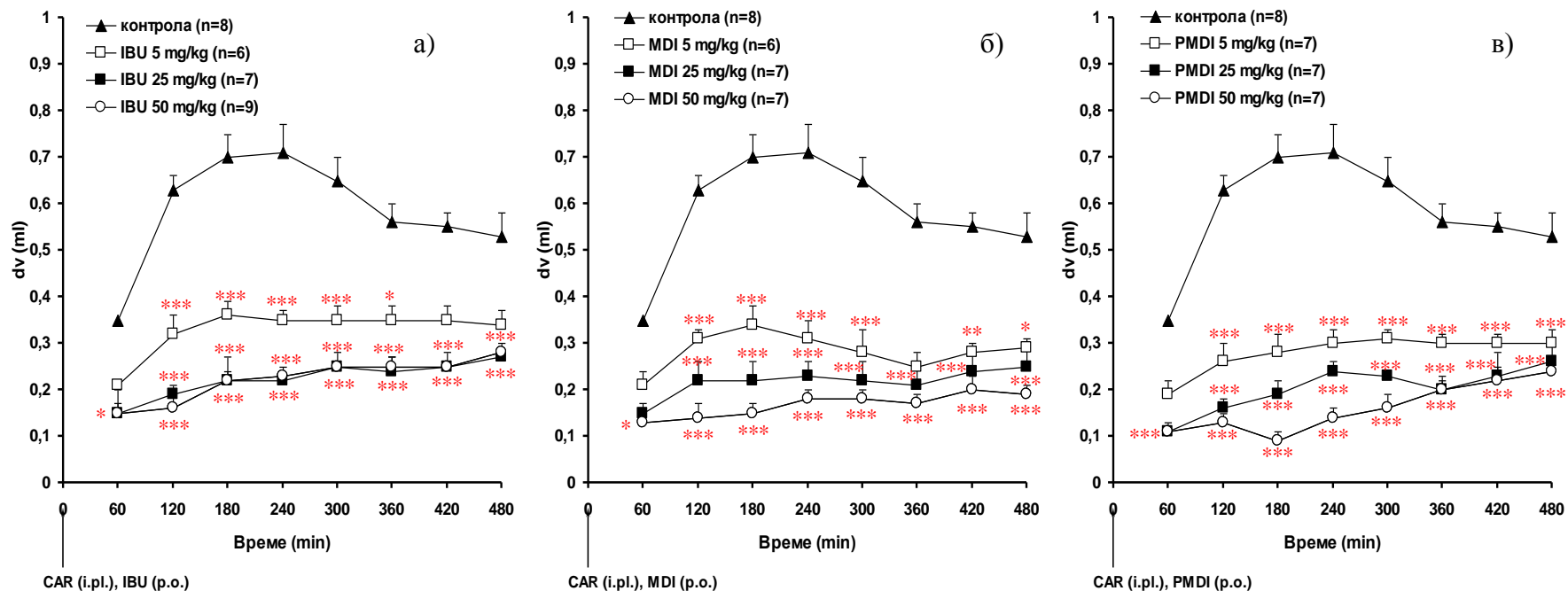
Третман	Антихипералгезијско дејство	Антиедематозно дејство
	$ED_{50} \pm SEM^*$	$ED_{50} \pm SEM$
IBU	44,36 \pm 9,18	6,42 \pm 1,13
MDI	3,57 \pm 1,76	4,11 \pm 1,16
PMDI	9,06 \pm 0,54	3,17 \pm 1,11

*SEM - стандардна грешка

Модификовани дијатомит примењен *per se* (p.o.) у највећој количини садржаној у MDI и PMDI у највећој испитиваној дози ибупрофена од 50 mg/kg није значајно утицао на развој хипералгезије/едема под утицајем карагенана ($p > 0,05$; *Student*-ов *t*-тест; није приказано).



Слика 4.25. Временски ток антихипералгезијског дејства ибупрофена (IBU) (а), композита ибупрофен/модификовани дијатомит (MDI) (б) и физичке смеше ибупрофена са модификованим дијатомитом (PMDI) (в), израженог као разлика у притисцима ослањања на здраву шапу и шапу са хипералгезијом, df (g). Базална мерења измерена су пре третмана (CAR (i.p.l.) + IBU или MDI или PMDI (p.o.)) (означено стрелицама). Свака тачка представља средњу вредност \pm SEM разлике у притисцима ослањања, df (g), добијену тестирањем 6-9 животиња. Статистичка значајност (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; двофакторска ANOVA, *Bonferroni post hoc* тест) одређена је у односу на контролу.



Слика 4.26. Временски ток антиедематозног дејства ибупрофена (IBU) (а), композита ибупрофен/модификовани дијатомит (MDI) (б) и физичке смеше ибупрофена са модификованим дијатомитом (PMDI) (в), израженог као разлика у запремини између третиране (инфламиране) и базалне запремине шапе у поређењу са контролном групом, dv (ml). Базална мерења измерена су пре третмана (CAR (i.pl.) + IBU или MDI или PMDI (p.o.)) (означено стрелицама). Свака тачка представља средњу вредност \pm SEM разлике у волуменима шапе, dv (ml), добијену тестирањем 6-9 животиња. Статистичка значајност (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; двофакторска ANOVA, *Bonferroni post hoc* тест) одређена је у односу на контролу.

4.3.2.2. Утицај носача на интензитет и дужину трајања антихипералгезијског/антидемотозног дејства ибупрофена

Адсорпциони носачи се све чешће користе као помоћне супстанце при формулацији фармацеутских облика у циљу повећања брзине растварања лековите супстанце и њене биолошке расположивости, као и модификације брзине/места ослобађања активне супстанце. Поред добро испитаних синтетских адсорпционих носача (SBA-15, MCM-41, Neusilin[®] и др.), све већи значај добијају и природни адсорпциони носачи. Дијатомити се у последњих неколико година испитују као потенцијални носачи због свог великог капацитета да везују лековите супстанце, биокомпатибилности и нетоксичности. Показано је да носачи на бази дијатомита повећавају капацитет везивања, пермеабилност и продужавају ослобађање индометацина и гентамицин-сулфата (Aw и сар., 2011), месалазина и преднизона (Zhang и сар., 2013) и диклофенак-натријума (Јанићијевић и сар., 2015) у *in vitro* условима. Дијатомити као носачи за модификовано ослобађање лековитих супстанци нису испитивани у *in vivo* условима, што је неопходно да би се разматрала њихова потенцијална клиничка примена.

Један од циљева ове фазе истраживања био је да се испита утицај модификованог дијатомита као потенцијално новог носача за ибупрофен у инфламаторном моделу бола у пацова. Ибупрофен у овом облику до сада није испитиван, и добра је кандидат супстанца због своје слабе растворљивости у води. Показано је да композит (MDI) и физичка смеша (PMDI) са модификованим колубарским дијатомитом, остварују већу ефикасност у односу на еквивалентне дозе чистог ибупрофена (IBU) у супримирању бола као манифестације запаљења у пацова ($p < 0,05$; двофакторска ANOVA) у готово свим временским тачкама (слике 4.27–4.29 а). Антидемотозно дејство MDI и PMDI било је поредбено ефектима IBU ($p > 0,05$; двофакторска ANOVA) (слике 4.27–4.29 б). Потребна су даља испитивања како би се објаснила потенцијација аналгетичког дејства ибупрофена од стране модификованог дијатомита, с обзиром да носач *per se* нема аналгетичка својства, нити постоје подаци из анималних студија о потенцијацији ефикасности лековитих супстанци у формулацији са дијатомитом као носачем. Недавно је показано да зеолит, такође природни адсорпциони носач, потенцира

антиедематозно дејство диклофенака у истим експерименталним условима (аналгетичко дејство није испитивано), међутим зеолит показује извесну унутрашњу активност за разлику од дијатомита (Крајишник и сар., 2014). Са друге стране, постоје нешто опсежнији литературни подаци о побољшаној ефикасности нестероидних антиинфламаторних лекова од стране синтетских адсорпционих носача у анималним моделима бола, нпр. целококсиба од стране хибридних микрочестица на бази липида и наночестица силицијум-диоксида (енгл. *silica-lipid hybrid microparticles* - Nguyen и сар., 2013) и диклофенак-натријума од стране глицерил моноолеат/магнезијум-трисиликат носача (Shah и сар., 2006). У наведеним радовима није испитивана интринзичка активност носача, али би се могло претпостави да је не поседују имајући у виду да се ови синтетски носачи убрајају у неактивне сировине које се користе као ексципијенси у фармацеутској индустрији (www.drugs.com/inactive).

Међутим, постоје литературни подаци да комплекси нестероидних антиинфламаторних лекова са металним јонима *in vivo* показују упоредиву (нпр. *in vivo* антиинфламаторна активност комплекса бакар(II)-ибупрофената и дирутенијум(II,III)-ибупрофената упоредива је са антиинфламаторном активношћу ибупрофена - Andrade и сар., 2000) или чак већу антиинфламаторну активност у односу на чисте супстанце (нпр. комплекси: кобалта(II), никла(II), паладијум(II) и мангана(II) са диклофенаком *in vivo* показују већу антиинфламаторну активност у односу на диклофенак-натријум - Konstandinidou и сар., 1998). Како резултати FTIR анализе узорка MDI указују између осталог и на стварање комплекса ибупрофена са алуминијум јонима на површини модификованог дијатомита, претпоставља се да овај комплекс у узорку MDI може довести до потенцијације аналгетичког дејства лековите супстанце. Могућност да током припреме и/или након примене суспензије узорка PMDI дође до адсорпције раствореног ибупрофена на модификовани колубарски дијатомит, а тиме и до настанка комплекса ибупрофена са алуминијум јонима, може објаснити чињеницу да и PMDI потенцира антихипералгезијско дејство ибупрофена.

Други циљ ове фазе истраживања односио се на праћење утицаја начина припреме узорака (композит и физичка смеша) на антихипералгезијско/антиедематозно дејство ибупрофена. Резултати показују да постоји значајна

разлика између MDI и PMDI у потенцирању антихипералгезијског дејства ибупрофена у зависности од примењене дозе лека (слике 4.27–4.29 а), у том смислу да MDI више потенцира ефикасност мањих доза ибупрофена ($p < 0,05$; *Bonferroni* тест) (слика 4.27 а), а PMDI већих доза ($p < 0,05$; *Bonferroni* тест) (слика 4.29 а). MDI вероватно у мањој мери потенцира аналгетичко дејство већих доза ибупрофена услед ограниченог капацитета носача да веже лек на себе, о чему говори податак да се проценти аналгетичког дејства свих испитиваних доза ибупрофена адсорбованог на носач не разликују значајно. Тиме добијени резултати можда указују да је потребно користити различите формулације у зависности од јачине ибупрофена за системску примену.

Начин припреме лековите супстанце са носачем, као ни сам носач, није значајно утицао на интензитет антиедематозног дејства ибупрофена ($p > 0,05$; *Bonferroni* тест).

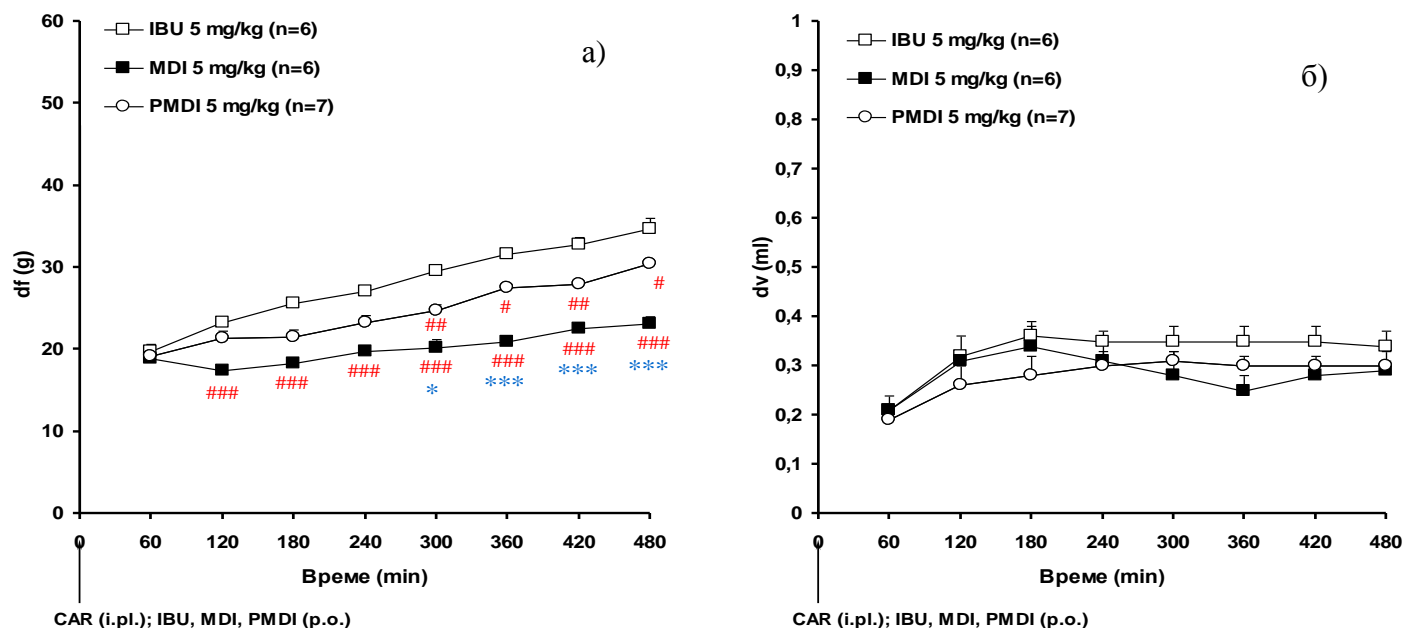
Поред интензитета дејства, праћен је и утицај носача/начина припреме лековите супстанце са носачем на дужину трајања дејства ибупрофена. Дужине трајања дејства IBU, MDI и PMDI упоређиване су посредством нагиба кривих односа максималног антихипералгезијског (%АН)/антиедематозног (%АЕ) ефекта и ΔРІК (видети одељак 3.2.18), који је мерило дужине трајања дејства лекова (Yaksh и сар., 1986; Томић и сар., 2010). Нагиби кривих упоређивани су тестом паралелизма. Третман са већим нагибом има дуготрајнији ефекат. Показано је да не постоји статистички значајна разлика у нагибима кривих за ибупрофен и композит/физичку смешу ибупрофена са модификованим дијатомитом (табела 4.16), указујући на приближно исту дужину трајања антихипералгезијског и антиедематозног дејства између свих испитиваних третмана ($p > 0,05$; тест паралелизма) (Yaksh и сар., 1986; Томић и сар., 2010). На бази овога се може закључити да потенцијално нови носач за лековите супстанце, модификовани дијатомит, као и начин припреме лековите супстанце са носачем, не утичу значајно на продужење дејства ибупрофена, барем не у овим експерименталним условима.

Дужина трајања дејства IBU, MDI и PMDI зависи од примењене дозе, јер криве односа %АН-ΔРІК/%АЕ-ΔРІК имају висок коефицијент линеарне корелације (табела 4.16) (Yaksh и сар., 1986; Томић и сар., 2010).

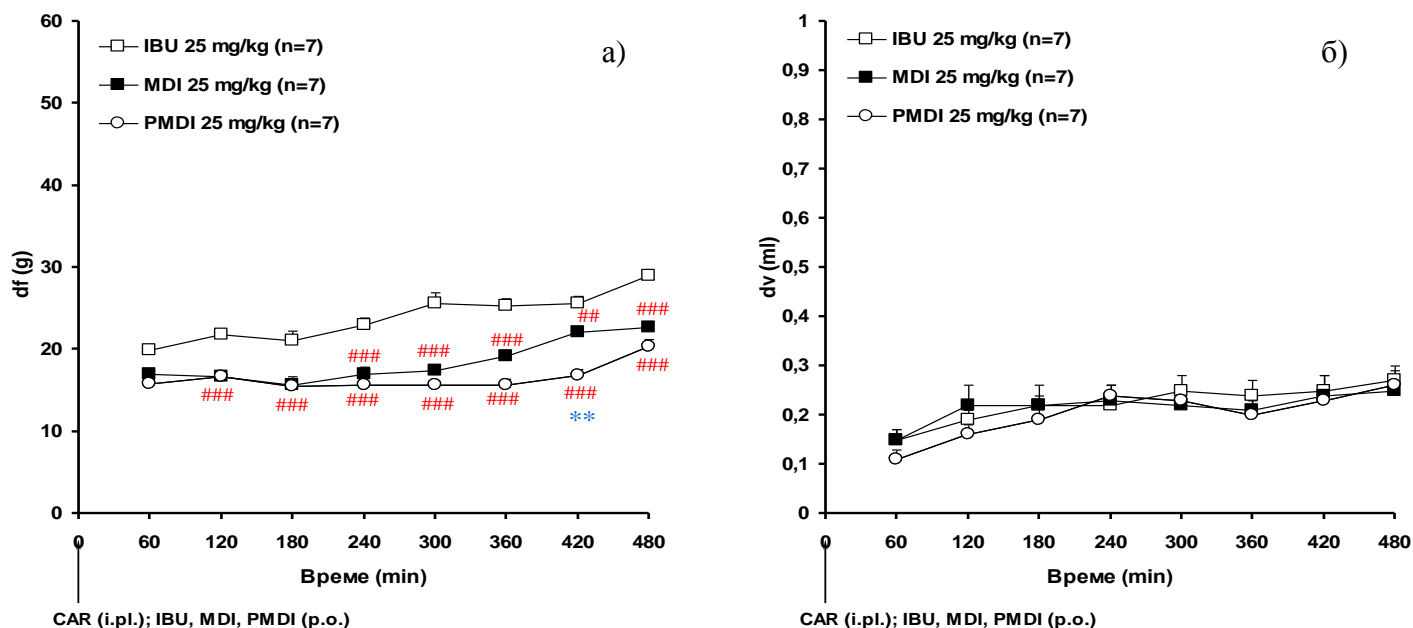
Табела 4.16. Параметри анализе дужине трајања дејства ибупрофена, композита и физичке смеше у инфламаторном моделу бола у пацова

Третман	Антихипералгезијско дејство		Антиедематозно дејство	
	Нагиб \pm SEM*	r**	Нагиб \pm SEM	r
IBU	167,40 \pm 2,11	1	2,29 \pm 0,39	0,986
MDI	150,52 \pm 14,61	0,995	2,05 \pm 0,21	0,995
PMDI	106,07 \pm 16,73	0,988	2,46 \pm 0,03	1

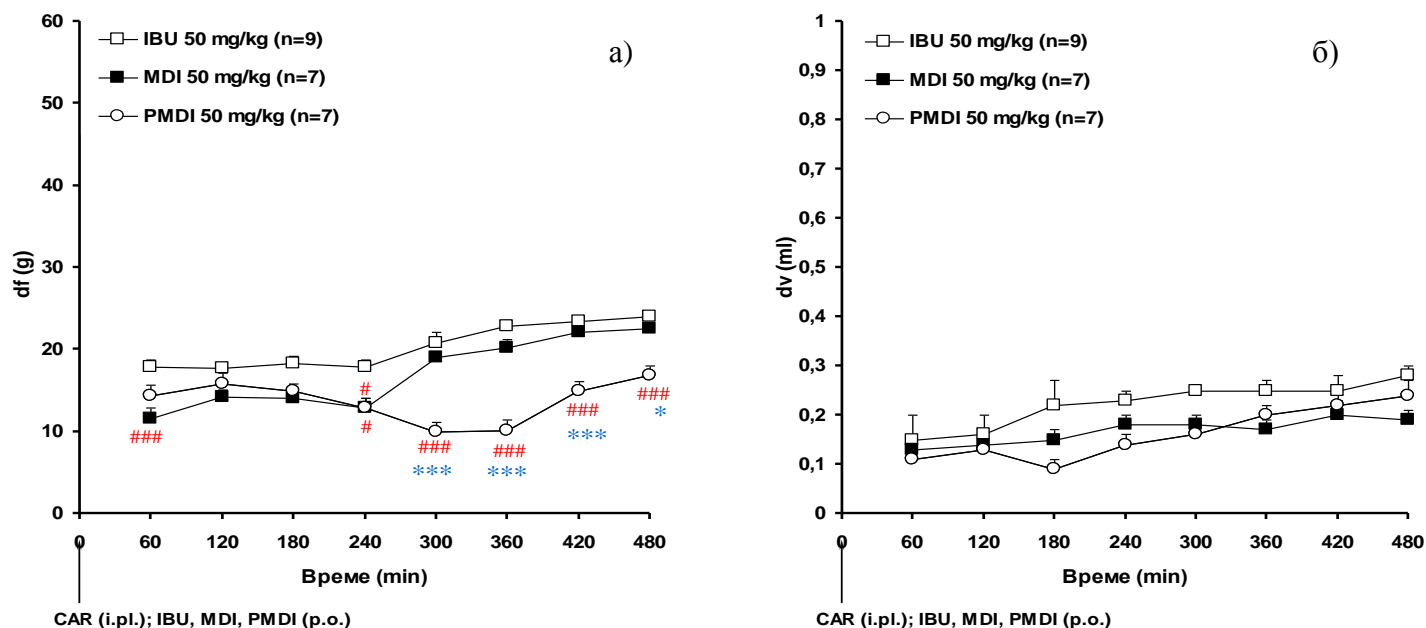
*SEM - стандардна грешка, r - коефицијент линеарне корелације



Слика 4.27. Временски ток антихипералгезијског (а) и антиедематозног (б) дејства ибупрофена (IBU), композита ибупрофен/модификовани дијатомит (MDI) и физичке смеше ибупрофена са модификованим дијатомитом (PMDI) у дози од 5 mg/kg. Антихипералгезијско дејство изражено је као разлика у притисцима ослањања на здраву шапу и шапу са хипералгезијом, df (g), док је антиедематозно дејство изражено као разлика у запремини између третиране (инфламиране) и базалне запремине шапе, dv (ml). Базална мерења измерена су пре третмана (CAR (i.pl.) + IBU или MDI или PMDI (p.o.)) (означено стрелицама). Свака тачка представља средњу вредност \pm SEM df (g)/dv (ml), добијену тестирањем 6-7 животиња. Статистичка значајност одређена је у односу на групу која је добила чист ибупрофен ($^{\#}p < 0,05$; $^{\#\#}p < 0,01$; $^{\#\#\#}p < 0,001$; двофакторска ANOVA, *Bonferroni post hoc* тест) и поређењем између MDI и PMDI ($^*p < 0,05$; $^{\#\#\#}p < 0,001$; *Bonferroni* тест).



Слика 4.28. Временски ток антихипералгезијског (а) и антиедематозног (б) дејства ибупрофена (IBU), композита ибупрофен/модификовани дијатомит (MDI) и физичке смеше ибупрофена са модификованим дијатомитом (PMDI) у дози од 25 mg/kg. Антихипералгезијско дејство изражено је као разлика у притисцима ослањања на здраву шапу и шапу са хипералгезијом, df (g), док је антиедематозно дејство изражено као разлика у запремини између третиране (инфламиране) и базалне запремине шапе, dv (ml). Базална мерења измерена су пре третмана (CAR (i.pl.) + IBU или MDI или PMDI (p.o.)) (означено стрелицама). Свака тачка представља средњу вредност \pm SEM df (g)/dv (ml), добијену тестирањем 7 животиња. Статистичка значајност одређена је у односу на групу која је добила чист ибупрофен ($^{##}p < 0,01$; $^{###}p < 0,001$; двофакторска ANOVA, *Bonferroni post hoc* тест) и поређењем између MDI и PMDI ($^{**}p < 0,01$; *Bonferroni* тест).



Слика 4.29. Временски ток антихипералгезијског (а) и антиедематозног (б) дејства ибупрофена (IBU), композита ибупрофен/модификовани дијатомит (MDI) и физичке смеше ибупрофена са модификованим дијатомитом (PMDI) у дози од 50 mg/kg. Антихиперагезијско дејство изражено је као разлика у притисцима ослањања на здраву шапу и шапу са хипералгезијом, df (g), док је антиедематозно дејство изражено као разлика у запремини између третиране (инфламиране) и базалне запремине шапе, dv (ml). Базална мерења измерена су пре третмана (CAR (i.pl.) + IBU или MDI или PMDI (p.o.)) (означено стрелицама). Свака тачка представља средњу вредност \pm SEM df (g)/dv (ml), добијену тестирањем 7-9 животиња. Статистичка значајност одређена је у односу на групу која је добила чист ибупрофен ($\#p < 0,05$; $\###p < 0,001$; двофакторска ANOVA, *Bonferroni post hoc* тест) и поређењем између MDI и PMDI ($*p < 0,05$; $***p < 0,001$; *Bonferroni* тест).

5. ЗАКЉУЧАК

I фаза експерименталног рада

- У овом раду комерцијално доступни (перуански) дијатомит *food grade* степена чистоће и пречишћен колубарски дијатомит коришћени су као полазни материјали који су одговарали фармакопејским захтевима у погледу микробиолошке чистоће и садржаја тешких метала.
- Присуство дијатомејског силицијум-диоксида у узорцима полазних материјала потврђено је FTIR и термалним анализама.
- Методе физичко-хемијске карактеризације полазних материјала указале су на разлике у: морфологији честица (перуански дијатомит су највећим делом чиниле билатерално симетричне, а пречишћен колубарски дијатомит радијално симетричне фрустуле), расподели величина честица (запремински средњи пречник честица колубарског дијатомита (42,35 μm) био је скоро дупло већи него у честица перуанског дијатомита (22,26 μm)) и вредности специфичне површине (специфична површина пречишћеног колубарског дијатомита (47,6 m^2/g) била је скоро 4 пута већа од перуанског дијатомита).
- Интеракција полазних материјала са модел лековитим супстанцама, диклофенак-натријумом и ибупрофеном, испитана је одређивањем адсорпционих изотерми. Ради поређења, на исти начин је испитана интеракција аустралијског дијатомита и бентонита са овим модел лековитим супстанцама. У условима испитивања није примећена адсорпција ибупрофена на испитиване дијатомите. Адсорпциони капацитет пречишћеног колубарског дијатомита за диклофенак-натријум (51,63 mg/g) био је већи у односу на капацитете адсорпције аустралијског (22,33 mg/g) и перуанског дијатомита (19,54 mg/g). Разлике у адсорпционим капацитетима дијатомита различитог порекла за диклофенак-натријум могу се једним делом објаснити разликама у специфичној површини испитиваних адсорбената. Наиме, обим везивања диклофенак-натријума за дијатомите различитог порекла (перуански < аустралијски < пречишћен колубарски) расте са порастом специфичне површине дијатомита (13,3 <

30,9 < 47,6 m²/g). Адсорпција диклофенак-натријума и ибупрофена на бентонит фармакопејског квалитета није запажена у условима испитивања, мада постоје подаци у литератури да се могу постићи високи капацитети адсорпције поменутих лековитих супстанци приликом њихове интеркалације у монтморилонит (главни минерал глине бентонита).

- У циљу повећања капацитета везивања диклофенак-натријума и ибупрофена извршена је модификација перуанског и пречишћеног колубарског дијатомита делимично неутралисаним алуминијум-сулфатом. Примењен је једноставан, једностепени поступак модификације који је захтевао мали утросак енергије и времена за извођење. Модификација перуанског дијатомита спроведена је на три нивоа (узорци MD250, MD500 и MD750), а модификација пречишћеног колубарског дијатомита на једном (средњем) нивоу (узорак MD).
- Изворна структура дијатомита очувана је и након модификације, што је показано SEM и FTIR анализом, а присуство делимично неутрализованог алуминијум-сулфата у узорцима модификованих дијатомита потврђено је EDS, FTIR и термалним анализама. У односу на полазне материјале, код модификованих дијатомита дошло је до: значајног повећања запреминског средњег пречника честица (укрупњавање честица), значајне промене зета потенцијала честица (промена својства површине честица) и смањења специфичне површине.
- У оквиру фармацеутско-технолошке карактеризације полазних и модификованих дијатомита извршено је одређивање насипне и тапкане густине и испитивање проточности прашкастих узорака. Показано је да модификација доводи до повећања насипне и тапкане густине и побољшања проточности тј. модификацијом се побољшавају одређена својства прашкова која су значајна у производном поступку чврстих фармацеутских облика.
- Стабилност модификованих дијатомита/спирање алуминијума (јона) испитана је у три медијума различитих рН вредности (0,1 М HCl, фосфатни пуфер рН 6,8 и фосфатни пуфер рН 7,4) и утврђено је да се једино значајније растварање алуминијума одвијало у киселој средини, док је

растварање у фосфатним пуферима било занемарљиво. Ограничена стабилност модификованих дијатомита у киселој средини указује на потребу разматрања формулационих решења за унапређење безбедности примене (нпр. гастрорезистентних облика).

II фаза експерименталног рада

- Интеракција модификованих дијатомита различитог порекла са модел лековитим супстанцама диклофенак-натријумом и ибупрофеном у раствору испитана је праћењем кинетика адсорпције и одређивањем адсорпционих изотерми.
- Праћењем кинетике адсорпције диклофенак-натријума на модификоване дијатомите уочено је да: модификовани колубарски дијатомит MD показује највећи равнотежни адсорпциони капацитет за диклофенак-натријум (384,48 mg/g); равнотежни адсорпциони капацитети модификованих перуанских дијатомита MD250 (265,71 mg/g) и MD500 (261,61 mg/g) су приметно нижи у односу на MD и веома слични међусобно, а најмању вредност равнотежног адсорпционог капацитета испољава модификовани перуански дијатомит MD750 (213,7 mg/g). Међутим, непосредно поређење адсорпционих капацитета модификованих перуанских дијатомита са модификованим колубарским дијатомитом није оправдано јер су услови адсорпције диклофенак-натријума на модификоване перуанске дијатомите били другачији. Праћењем кинетике адсорпције ибупрофена на модификоване дијатомите утврђено је да равнотежни адсорпциони капацитети за ибупрофен ($278,39 > 241 > 236,48 > 202,99$ mg/g) опадају према следећем редоследу адсорбената MD250 > MD > MD500 > MD750. Кинетика адсорпције диклофенак-натријума, као и ибупрофена, на модификоване дијатомите најбоље је описана моделом адсорпционе кинетике псеудо-другог реда, што указује на могућност да се у датим системима одвија хемисорпција.
- Одређивањем адсорпционих изотерми показано је да адсорпцију диклофенак-натријума, као и ибупрофена, на модификоване дијатомите боље описује *Langmuir*-ов модел, па се претпоставља да се лековите

супстанце адсорбују у монослоју на енергетски хомогену површину модификованих дијатомиа. Израчунате вредности максималног капацитета адсорпције код монослојне покривености (Q_{max}) диклофенак-натријумом износиле су 378,36 mg/g за MD500 и 394,17 mg/g за MD. Израчуната вредност Q_{max} модификованог перуанског дијатомиа MD500 знатно је већа од вредности адсорпционог капацитета одређеног у условима експеримента (262 mg/g), зато што су параметри поступка адсорпције диклофенак-натријума на модификоване перуанске дијатомите постављени тако да се омогући скоро 100% степен адсорпције диклофенак-натријума у релативно кратком временском периоду, услед чега се пун обим везивања супстанце није показао у самом испитивању. Израчунате вредности Q_{max} ибупрофена биле су 207,04 mg/g за MD500 и 207,47 mg/g за MD. Дакле, неорганска модификација дијатомиа значајно повећава капацитет адсорпције ових материјала за модел супстанце, што омогућава примену адсорпције као поступка везивања лековите супстанце на ове потенцијалне функционалне носаче.

- Структура модификованих дијатомиа, а самим тим и полазних дијатомиа, очувана је и након адсорпције лековитих супстанци на модификоване дијатомите што је потврђено SEM и FTIR анализама.
- У односу на FTIR спектар диклофенак-натријума, на FTIR спектрима композита добијених адсорпцијом диклофенак-натријума на модификоване дијатомите долази до померања/појаве нових пикова лековите супстанце. Уочене измене последица су преласка супстанце из облика соли у кисели облик током адсорпције. Ибупрофен се, из раствора у ком је био присутан у облику натријумове соли, адсорбује на модификоване дијатомите у киселом облику, али гради и комплекс са алуминијум јонима на површини честица модификованих дијатомиа.
- Анализом термограма композита добијених адсорпцијом лековитих супстанци на модификоване дијатомите утврђено је да се термално понашање испитиваних супстанци на носачу (модификованом дијатомиту) прилично разликује од оног својственог чистим лековитим супстанцама.

- Испитивања брзине растварања модел лековите супстанце из компримата који садрже модел супстанцу адсорбовану на модификовани дијатомит (композити) или физичку смешу истог садржаја модел супстанце и модификованог дијатомита спроведена су у сврхе *in vitro* биофармацеутске карактеризације. Добијени профили ослобађања лековите супстанце анализирани су применом математичких модела у циљу процене механизма ослобађања.
- Независно од рН вредности медијума за испитивање (фосфатни пуфер рН 6,8 или рН 7,5) као и врсте дијатомита који је коришћен за припрему носача (перуански или колубарски), компримати који садрже диклофенак-натријум адсорбован на носач или њихову физичку смешу продужено ослобађају лековиту супстанцу. Међутим, за разлику од физичких смеша диклофенак-натријума са модификованим перуанским односно модификованим колубарским дијатомитом, које на сличан начин ослобађају лековиту супстанцу у медијумима различитих рН вредности, количина лековите супстанце ослобођене након 8 h из композита диклофенак-натријум/модификован колубарски дијатомит (~30 mg) скоро 3 пута је већа од оне ослобођене из композита диклофенак-натријум/модификован перуански дијатомит. За описивање ослобађања диклофенак-натријума из компримата композита и физичких смеша лековите супстанце са модификованим дијатомитима најпогоднији је *Korsmeyer–Peppas*-ов модел. Вредност експонента n *Korsmeyer–Peppas*-овог модела указује да је не-Фикова дифузија (неправилни транспорт) механизам ослобађања диклофенак-натријума из компримата са модификованим дијатомитима.
- У фосфатном пуферу рН 7,2 уочено је успорено ослобађање лековите супстанце из компримата композита који садрже ибупрофен адсорбован на модификоване дијатомите као и из компримата физичке смеше ибупрофена са модификованим дијатомитима истог садржаја супстанце. Ослобађање ибупрофена из компримата композита као и из компримата физичке смеше најбоље је приказано *Korsmeyer–Peppas*-овим моделом. На основу вредности експонента n *Korsmeyer–Peppas*-овог модела може се

претпоставити да је механизам ослобађања ибупрофена из компримата са модификованим дијатомитима неправилни транспорт.

III фаза експерименталног рада

- Испитивање акутне токсичности/нешкодљивости није показало знаке токсичне реакције нити угинућа животиња у периоду од 72 h након пероралне примене полазних и модификованих дијатомита.
- У моделу инфламаторног бола у пацова сви испитивани третмани: ибупрофен, композит ибупрофен/модификовани колубарски дијатомит (лековита супстанца адсорбована на носач) - MDI и физичка смеша ибупрофена са модификованим колубарским дијатомитом - PMDI испољили су статистички значајно и дозно-зависно антихипералгезијско и антиедематозно дејство.
- Композит (MDI) и физичка смеша (PMDI) са модификованим дијатомитом, остварују већу ефикасност у односу на еквивалентне дозе чистог ибупрофена у супримирању бола као манифестације запаљења у пацова у готово свим временским тачкама испитивања. Такође, постоји значајна разлика између MDI и PMDI у потенцирању антихипералгезијског дејства ибупрофена у зависности од примењене дозе лека, у том смислу да MDI више потенцира ефикасност мањих доза ибупрофена, а PMDI већих доза ибупрофена. Антиедематозно дејство MDI и PMDI било је поредбено ефектима ибупрофена. Начин припреме лековите супстанце са носачем (композит или физичка смеша), као ни сам носач, није значајно утицао на интензитет антиедематозног дејства ибупрофена.
- Потенцијално нови носач за лековите супстанце, модификовани дијатомит, као и начин припреме лековите супстанце са носачем, нису утицали значајно на продужење дејства ибупрофена иако је у *in vitro* условима показано продужено ослобађање лековите супстанце.

6. ЛІТЕРАТУРА

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008. Toxicological Profile for Aluminum. U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.

Aguzzi C, Capra P, Bonferoni C, Cerezo P, Salcedo I, Sánchez R, Caramella C, Viseras C, 2010. Chitosan–silicate biocomposites to be used in modified drug release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA). *Appl. Clay Sci.* 50, 106-111.

Aivalioti M, Vamvasakis I, Gidaracos E, 2010. BTEX and MTBE adsorption onto raw and thermally modified diatomite. *J. Hazard. Mater.* 178, 136-143.

Al-Ghouti M, Khraisheh MAM, Ahmad MNM, Allen S, 2005. Thermodynamic behavior and the effect of temperature on the removal of dyes from aqueous solution using modified diatomite: a kinetic study. *J. Colloid Interf. Sci.* 287, 6-13.

Al-Qodah Z, Lafi WK, Al-Anber Z, Al-Shannag M, Harahsheh A, 2007. Adsorption of methylene blue by acid and heat treated diatomaceous silica. *Desalination* 217, 212-224.

Allen LV Jr (Ed), 2012. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed. Pharmaceutical Press, London, Philadelphia.

Allen LV Jr, Ansel HC, 2013. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 10th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.

Andini S, Bolognese A, Formisano D, Manfra M, Montagnaro F, Santoro L, 2012. Mechanochemistry of ibuprofen pharmaceutical. *Chemosphere* 88, 548-553.

Andrade A, Namora SF, Woisky RG, Wiezel G, Najjar R, Sertié JAA, de Oliveira Silva D, 2000. Synthesis and characterization of a diruthenium–ibuprofenato complex

Comparing its anti-inflammatory activity with that of a copper(II)–ibuprofenato complex. *J. Inorg. Biochem.* 81, 23-27.

Aw MS, Simovic S, Addai-Mensah J, Losic D, 2011. Silica microcapsules from diatoms as new carrier for delivery of therapeutics. *Nanomedicine* 6, 1159-1173.

Aw MS, Simovic S, Yu Y, Addai-Mensah J, Losic D, 2012. Porous silica microshells from diatoms as biocarrier for drug delivery applications. *Powder Technol.* 223, 52-58.

Baena Aristizábal Y, Manzo RH, Ponce d'Leon Quiroga LF, 2011. Preparation and physicochemical characterization of some polyelectrolyte-diclofenac complexes. *Vitae* 18, 305-311.

Bailey SW, 1980. Summary of recommendations of AIPEA nomenclature committee on clay minerals. *Am. Mineral.* 65, 1-7.

Bannach G, Arcaro R, Ferroni DC, Siqueira AB, Treu-Filho O, Ionashiro M, Schnitzler E, 2010. Thermoanalytical study of some anti-inflammatory analgesic agents. *J. Therm. Anal. Calorim.* 102,163-170.

Bariana M, Aw MS, Kurkuri M, Losic D, 2013. Tuning drug loading and release properties of diatom silica microparticles by surface modifications. *Int. J. Pharm.* 443, 230-241.

Barton CD, Karathanasis AD, 2002. Clay minerals, in: Lal R (Ed), *Encyclopedia of Soil Science*. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 187-192.

Bellinger EG, Sigeo DC, 2011. *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Bhattacharya IN, Gochhayat PK, Mukherjee PS, Paulb S, Mitra PK, 2004. Thermal decomposition of precipitated low bulk density basic aluminium sulfate. *Mater. Chem. Phys.* 88, 32-40.

Bhattacharyya L, Schuber S, Sheehan C, William R, 2006. Excipients: background/introduction, in: Katdare A, Chaubal MV (Eds), *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery systems*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-36.

Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P (Eds), 2015. *Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products*. Springer, Dordrecht.

British pharmacopoeia 2008. The Stationery Office, London.

Brydon JE, Singh SS, 1969. The nature of the synthetic crystalline basic aluminum sulphates as compared with basaluminite. *Can. Mineral.* 9, 644-654.

Butcher KSA, Ferris JM, Phillips MR, Wintrebert-Fouquet M, Jong Wah JW, Jovanovic N, Vyverman W, Chepurinov VA, 2005. A luminescence study of porous diatoms. *Mater. Sci. Eng. C* 25,658-663.

Campbell KT, Craig DQM, McNally T, 2014. Modification of ibuprofen drug release from poly(ethylene glycol) layered silicate nanocomposites prepared by hot-melt extrusion. *J. Appl. Polym. Sci.* 131, 40284.

Carratero MI, Pozo M, 2009. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical industry Part I. Excipients and medical applications. *Appl. Clay Sci.* 46, 73-80.

Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2005. *Guidance for industry: Nonclinical studies for development of pharmaceutical excipients*. FDA CDER, Rockville.

Chao Y, Zhu W, Chen F, Wang P, Da Z, Wu X, Ji H, Yan S, Li H, 2014. Commercial Diatomite for Adsorption of Tetracycline Antibiotic from Aqueous Solution. *Separ. Sci. Technol.* 49, 2221-2227.

Charnay C, Bégu S, Tourné-Péteilh C, Nicole L, Lerner DA, Devoisselle JM, 2004. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 533-540.

Chrzanowski W, Kim SY, Abou Neel EA, 2013. Biomedical Applications of Clay. *Aust. J. Chem.* 66, 1315-1322.

Costa P, Lobo JMS, 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123-133.

Datta M, Kaur M, 2014. In vitro release of sodium diclofenac from poloxamer 188 modified montmorillonite as an oral drug delivery vehicle. *Int. J. Pharm. Pharma. Sci.* 6, 100-110.

De Stefano L, Rotiroli L, De Stefano M, Lamberti A, Lettieri S, Setaro A, Maddalena P, 2009. Marine diatoms as optical biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1580-1584.

Del Nero M, Galindo C, Barillon R, Halter E, Madé B, 2010. Surface reactivity of α - Al_2O_3 and mechanisms of phosphate sorption: *In situ* ATR-FTIR spectroscopy and ζ potential studies. *J. Colloid Interf. Sci.* 342, 437-444.

Depan D, Kumar AP, Singh RP, 2009. Cell proliferation and controlled drug release studies of nanohybrids based on chitosan-g-lactic acid and montmorillonite. *Acta Biomater.* 5, 93-100.

Dugar RP, Gajera BY, Dave RH, 2016. Fusion Method for Solubility and Dissolution Rate Enhancement of Ibuprofen Using Block Copolymer Poloxamer 407. AAPS PharmSciTech, DOI: 10.1208/s12249-016-0482-6 (article in press)

El-Megharbel SM, Hamza RZ, Refat MS, 2015. Synthesis, spectroscopic and thermal studies of Mg(II), Ca(II), Sr(II) and Ba(II) diclofenac sodium complexes as anti-inflammatory drug and their protective effects on renal functions impairment and oxidative stress. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 135, 915-928.

Földvári M, 2011. Handbook of thermogravimetric system of minerals and its use in geological practice. Geological Institute of Hungary, Budapest.

Foo KY, Hameed BH, 2010. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. Chem. Eng. J. 156, 2-10.

Food Chemicals Codex 8th Edition, 2012. United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville.

Freundlich HMF, 1906. Over the adsorption in solution. J. Phys. Chem. 57, 385-471.

Fuhrmann T, Landwehr S, El Rharbi-Kucki M, Sumper M, 2004. Diatoms as living photonic crystals. Appl. Phys. B. 78, 257-260.

Gálico DA, Holanda BBC, Guerra RB, Legendre AO, Rinaldo D, Treu-Filho O, Bannach G, 2014. Thermal and spectroscopic studies on solid ibuprofen complexes of lighter trivalent lanthanides. Thermochim. Acta 575, 226-232.

Garcia-Gonzales MT, Vizcayno C, Cortabitarte J, 2000. Effect of kaolinite and sulfate on the formation of hydroxy-aluminum compounds. Clay Clay Miner. 48, 85-94.

Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R, 2015. Biomedical applications of cationic clay minerals. RSC Adv. 5, 29467-29481.

Ghizdavu LM, Ghizdavu L, 2007. New metal coordination compounds of sodium {2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl}acetate. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai*. 52, 73-80.

Giordano F, Rossi A, Pasquali I, Bettini R, Frigo E, Gazzaniga A, Sangalli ME, Mileo V, Cattinella S, 2003. Thermal degradation and melting point determination of diclofenac. *J. Therm. Anal. Calorim.* 73, 509-518.

Gordon R, Losic D, Tiffany MA, Nagy SS, Sterrenburg FAS, 2009. The Glass Menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends Biotechnol.* 27, 116-127.

Gordon R, Tiffany MA, 2011. Possible Buckling Phenomena in Diatom Morphogenesis, in: Seckbach J, Kociolek JP (Eds), *The Diatom World*. Springer Science & Business Media, Dordrecht, pp. 245-271.

Grochowicz M, Kierys A, 2015. Thermal characterization of polymer-silica composites loaded with ibuprofen sodium salt. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 114, 91-99.

Guan XH, Shang C, Chen GH, 2006. Competitive adsorption of organic matter with phosphate on aluminum hydroxide. *J. Colloid Interf. Sci.* 296, 51-58.

Gulturk E, Guden M, 2011. Thermal and acid treatment of diatom frustules. *J. Achiev. Mater. Manuf. Eng.* 46, 196-203.

Hsu PH, 1989. Aluminum hydroxides and oxyhydroxides, in: Dixon JB, Weed SB (Eds), *Minerals in Soil Environments*. Soil Science Society of America, Madison, pp. 331-378.

Hsu PH, Bates TF, 1964. Formation of X-ray amorphous and crystalline aluminium hydroxides. *Mineral. Mag.* 33, 749-768.

ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development, 2009. available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf.

Ilić IK, Stamatakis MG, Perraki TS, 2009. Mineralogy and technical properties of clayey diatomites from north and central Greece. *Cent. Eur. J. Geosci.* 1, 393-403.

Inglethorpe SDJ, 1993. *Industrial Minerals Laboratory Manual: Diatomite*, BGS Technical Report WG/92/39. British Geological Survey, Nottingham.

IPEC-Americas, 2008. *Qualification of Excipients for Use in Pharmaceuticals*. available from: <http://ipecamericas.org/sites/default/files/ExcipientQualificationGuide.pdf>

Jafarbeglou M, Abdouss M, Shoushtari AM, Jafarbeglou M, 2016. Clay nanocomposites as engineered drug delivery systems. *RSC Adv.* 6, 50002-50016.

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Dobričić V, Daković A, Krstić J, Marković M, Milić J, 2014. Inorganically modified diatomite as a potential prolonged-release drug carrier. *Mater. Sci. Eng. C* 42, 412-420.

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Nedić Vasiljević B, Dobričić V, Daković A, Antonijević MD, Milić J, 2015. Modified local diatomite as potential functional drug carrier—A model study for diclofenac sodium. *Int. J. Pharm.* 496, 466-474.

Jiang T, Li G, Qiu G, Fan X, Huang Z, 2008. Thermal activation and alkali dissolution of silicon from illite. *Appl. Clay Sci.* 40, 81-89.

Jiménez-Becerril J, García-Sosa I, Rivero IA, 2011. Synthesis of basic aluminum sulfate assisted by microwave heating. *Ceram. Int.* 37, 3627-3630.

Kafarska K, Czakis-Sulikowska D, Wolf WM, 2009. Novel Co(II) and Cd(II) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs Synthesis, properties and thermal investigation. *J. Therm. Anal. Calorim.* 96, 617-621.

Kaiser K, Zech W, 1999. Release of Natural Organic Matter Sorbed to Oxides and a Subsoil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 1157-1166.

Kamarudin NHN, Jalil AA, Triwahyono S, Salleh NFM, Karim AH, Mukti RR, Hameed BH, Ahmad A, 2013. Role of 3-aminopropyltriethoxysilane in the preparation of mesoporous silica nanoparticles for ibuprofen delivery: Effect on physicochemical properties. *Micropor. Mesopor. Mat.* 180, 235-241.

Karathanasis AD, 2009. Soil Mineralogy, in: Verheye WH (Ed), *Land Use, Land Cover and Soil Sciences - Volume VI: Soils and Soil Sciences - 1*, EOLSS Publishers Co. Ltd., Oxford, pp. 233-260.

Kashkai MA, Babaev IA, 1969. Thermal investigations on alunite and its mixtures with quartz and dickite. *Mineral. Mag.* 37, 128-134.

Kaur M, Datta M, 2013. Synthesis and characterization of biodegradable clay-polymer nanocomposites for oral sustained release of anti-inflammatory drug. *Eur. Chem. Bull.* 2, 670-678.

Kaur M, Datta M, 2014. Diclofenac Sodium Adsorption onto Montmorillonite: Adsorption Equilibrium Studies and Drug Release Kinetics. *Adsorpt. Sci. Technol.* 32, 365-387.

Kennedy BA (Ed), 1990. *Surface Mining*, 2nd ed. Society for Mining, Metallurgy, and Exploration Inc., Littleton, p. 153.

Kincl M, Meleh M, Veber M, Vrečer F, 2004. Study of physicochemical parameters affecting the release of diclofenac sodium from lipophilic matrix tablets. *Acta Chim. Slov.* 51, 409-425.

Kloprogge JT, Geus JW, Jansen JBH, Seykens D, 1992. Thermal stability of basic aluminum sulfate. *Thermochim. acta* 209, 265-276.

Kong Y, Ge H, Xiong J, Zuo S, Wei Y, Yao C, Deng L, 2014. Palygorskite polypyrrole nanocomposite: A new platform for electrically tunable drug delivery. *Appl. Clay Sci.* 99, 119-124.

Konstandinidou M, Kourounakis A, Yiangou M, Hadjipetrou L, Kovala-Demertzi D, Hadjikakou S, Demertzis M, 1998. Anti-inflammatory properties of diclofenac transition metalloelement complexes. *J. Inorg. Biochem.* 70, 63-69.

Kovala-Demertzi D, Hadjikakou S, Demertzis M, Deligiannakis Y, 1998. Metal ion-drug interactions. Preparation and properties of manganese (II), cobalt (II) and nickel (II) complexes of diclofenac with potentially interesting anti-inflammatory activity: Behavior in the oxidation of 3,5-di-tert-butyl-o-catechol, *J. Inorg. Biochem.* 69, 223-229.

Krajišnik D, Stepanović-Petrović R, Tomić M, Micov A, Ibrić S, Milić J, 2014. Application of artificial neural networks in prediction of diclofenac sodium release from drug-modified zeolites physical mixtures and antiedematous activity assessment. *J. Pharm. Sci.* 103, 1085-1094.

Krajišnik D, Daković A, Janićijević J, Milić J. Natural and Modified Silica-Based Materials as Carriers for NSAIDs, in: Čalija B (Ed), *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Potential benefits and challenges*. Elsevier, Cambridge, pp. 219-257 (in press) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804017-1.00008-X>

Kumeria T, Bariana M, Altalhi T, Kurkuri M, Gibson CT, Yang W, Losic D, 2013. Graphene oxide decorated diatom silica particles as new nano-hybrids: towards smart natural drug microcarriers. *J. Mater. Chem. B* 1, 6302-6311.

Langmuir I, 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 40, 1361-1403.

Lever T, Haines P, Rouquerol J, Charsley EL, Van Eckeren P, Burlett DJ, 2014. ICTAC nomenclature of thermal analysis (IUPAC Recommendations 2014). *Pure Appl. Chem.* 86, 545-553.

Li G, Feng Y, Zhu W, Zhang X, 2015. Enhanced adsorptive performance of tetracycline antibiotics on lanthanum modified diatomite. *Korean J. Chem. Eng.* 32, 2109-2115.

Llinàs A, Burley JC, Box KJ, Glen RC, Goodman JM, 2007. Diclofenac Solubility: Independent Determination of the Intrinsic Solubility of Three Crystal Forms. *J. Med. Chem.* 50, 979-983.

Losic D, Mitchell JG, Lal R, Voelcker NH, 2007. Rapid fabrication of micro- and nanoscale patterns by replica molding from diatom biosilica. *Adv. Funct. Mater.* 17, 2439-2446.

Losic D, Mitchell JG, Voelcker NH, 2009. Diatomaceous Lessons in Nanotechnology and Advanced Materials. *Adv. Mater.* 21, 1-12.

Losic D, Yu Y, Aw MS, Simovic S, Thierry B, Addai-Mensah J, 2010. Surface functionalisation of diatoms with dopamine modified iron-oxide nanoparticles: toward magnetically guided drug microcarriers with biologically derived morphologies. *Chem. Commun.* 46, 6323-6325.

Lu X, Meng L, Li H, Du N, Zhang R, Hou W, 2013. Facile fabrication of ibuprofen-LDH nanohybrids via a delamination/reassembling process. *Mater. Res. Bull.* 48, 1512-1517.

Madejova J, Komadel P, 2001. Baseline studies of the clay minerals society source clays: Infrared methods. *Clay Clay Miner.* 49, 410-432.

Mallick S, Pattnaik S, Swain K, 2008. Physicochemical Characterization of Interaction of Ibuprofen by Solid-State Milling with Aluminum Hydroxide. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34,726-734.

Manek E, Domján A, Menyhárd A, László K, 2015. Host-guest interactions in poly(*N*-isopropylacrylamide) gel: A thermoanalytical approach, *J. Therm. Anal. Calorim.* 120, 1273-1281.

Mann DG, 2002. Diatoms: Organism and Image, in: du Buf H, Bayer MM (Eds), *Automatic Diatom Identification*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, pp. 9-40.

Milić J, Čalija B, Krajišnik D, 2016. Funkcionalnost ekscipijenasa – značaj i farmakopejski status. *Arh. farm.* 66, 71-90.

Milović M, Simović S, Lošić D, Dashevskiy A, Ibrić S, 2014. Solid self-emulsifying phospholipid suspension (SSEPS) with diatom as a drug carrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* 63, 226-232.

Morris CJ, 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods. Mol. Biol.* 225, 115-121.

Moyle PR, Dolley TP, 2003. Chapter D: With or Without Salt-a Comparison of Marine and Continental-Lacustrine Diatomite Deposits, in: Bliss JD, Moyle PR, Long KR (Eds), *Contributions to Industrial-Minerals Research*. U.S. Geological Survey, Reston.

Murray HH, 1999. Applied clay mineralogy today and tomorrow. *Clay Miner.* 34, 39-49.

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed. The National Academies Press (US), Washington DC.

Nguyen TH, Tan A, Santos L, Ngo D, Edwards GA, Porter CJ, Prestidge CA, Boyd BJ, 2013. Silica-lipid hybrid (SLH) formulations enhance the oral bioavailability and efficacy of celecoxib: An in vivo evaluation. *J. Control. Release.* 167,85-91.

Nickel EH, 1995. The definition of a mineral. *Can. Mineral.* 33, 689-690.

Oumabady Alias Cannane N, Rajendran M, Selvaraju R, 2013. FT-IR spectral studies on polluted soils from industrial area at Karaikal, Puducherry State, South India. *Spectrochim. Acta A* 110, 46-54.

Palacios-Hernández TJ, Vásquez-Arciga H, Pérez-Benítez A, Bernès S, Höpfl H, González-Vergara E, Méndez-Rojas MA, 2013. Hemidirected one-dimensional lead(II) coordination polymers containing NSAIDs as ligands: Spectroscopic and structural characterization of $[\text{Pb}(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})]_n$, $[\text{Pb}(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_2(\text{H}_2\text{O})]_n$ and $[\text{Pb}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NO})_2]_n$. *Polyhedron* 52, 848-855.

Palomo ME, Ballesteros MP, Frutos P, 1999. Analysis of diclofenac sodium and derivatives. *J. Pharmaceut. Biomed.* 21, 83-94.

Pang J, Han C, Chao Y, Jing L, Ji H, Zhu W, Chang Y, Li H, 2015. Partitioning Behavior of Tetracycline in Hydrophilic Ionic Liquids Two-Phase Systems. *Separ. Sci. Technol.* 50, 1993-1998.

Park JH, Shin HJ, Kim MH, Kim JS, Kang N, Lee JY, Kim KT, Lee JI, Kim DD, 2016. Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug delivery systems. *J. Pharm. Investig.* 46, 363-375.

Qiu H, Lv L, Pan BC, Zhang QJ, Zhang WM, Zhang QX, 2009. Critical review in adsorption kinetic models. *J. Zhejiang Univ. Sci. A* 10, 716-724.

Qu F, Zhu G, Lin H, Zhang W, Sun J, Li S, Qiu S, 2006. A controlled release of ibuprofen by systematically tailoring the morphology of mesoporous silica materials. *J. Solid State Chem.* 179, 2027-2035.

Raković D, Dramićanin M, 2010. Fizička karakterizacija biomaterijala, in: Raković D, Uskoković D (Eds), *Biomaterijali*. Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, Beograd, pp. 335-351.

Randall LO, Selitto JJ, 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 111, 409-419.

Rea I, Martucci NM, De Stefano L, Ruggiero I, Terracciano M, Dardano P, Migliaccio N, Arcari P, Taté R, Rendina I, Lamberti A, 2014. Diatomite biosilica nanocarriers for siRNA transport inside cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 3393-3403.

Rodrigues LAS, Figueiras A, Veiga F, de Freitas RM, Nunes LCC, da Silva Filho EC, da Silva Leite CM, 2013. The systems containing clays and clay minerals from modified drug release: A review. *Colloid. Surface. B* 103, 642-651.

Ross R, Cox EJ, Karayeva NI, Mann DG, Paddock TBB, Simonsen R, Sims PA, 1979. An Amended Terminology for the Siliceous Components of the Diatom Cell. *Nova Hedwigia* 64, 513-533.

Round FE, Crawford RM, Mann DG, 2007. *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, Cambridge.

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME (Eds), 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London-Chicago.

Rowland RA, 1955. Differential thermal analysis of clay and carbonates. Proc. First Nat. Conf. on Clays and Clay Technology. Bull. 169, 151-163.

Salahuddin N, Kenawy ER, Abdeen R, 2012. Polyoxypropylene-montmorillonite nanocomposites for drug-delivery vehicles: preparation and characterization. J. Appl. Polym. Sci. 125, E157-E166.

Scheffe CR, Kappen P, Zuin L, Pigram PJ, Christensen C, 2009. Addition of carboxylic acids modifies phosphate sorption on soil and boehmite surfaces: A solution chemistry and XANES spectroscopy study. J. Colloid Interf. Sci. 330, 51-59.

Seckbach J, Kociolek JP (Eds), 2011. The Diatom World. Springer Science & Business Media, Dordrecht.

Setaro A, Lettieri S, Maddalena P, De Stefano L, 2007. Highly sensitive optochemical gas detection by luminescent marine diatoms. Appl. Phys. Lett. 91, 051921.

Shah MH, Biradar SV, Paradkar AR, 2006. Spray dried glyceryl monooleate-magnesium trisilicate dry powder as cubic phase precursor. Int. J. Pharm. 323, 18-26.

Silva IMP, Profirio DM, de Paiva REF, Lancellotti M, Formiga ALB, Corbi PP, 2013. A silver complex with ibuprofen: Synthesis, solid state characterization, DFT calculations and antibacterial assays. J. Mol. Struct. 1049, 1-6.

Singh BN, Kim KH, 2007. Drug Delivery: Oral Route, in: Swarbrick J (Ed), Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3rd ed. Informa Healthcare USA, Inc. New York, pp. 1242-1265.

Službeni glasnik Republike Srbije broj 63/2013. JP „Službeni glasnik“, Beograd.

Stepanović-Petrović RM, Micov AM, Tomić MA, Ugrešić ND, 2012. The local peripheral antihyperalgesic effect of levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth. Analg.* 115, 1457-1466.

Tabak A, Yilmaz N, Eren E, Caglar B, Afsin B, Sarihan A, 2011. Structural analysis of naproxenintercalated bentonite (Unye). *Chem. Eng. J.* 174, 281-288.

Tabrizi L, Chiniforoshan H, McArdle P, 2015. Synthesis, crystal structure and spectroscopy of bioactive Cd(II) polymeric complex of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium: Antiproliferative and biological activity. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 136, 429-436.

Tallarida RJ, Murray RB, 1986. *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs.* Springer Verlag, New York.

Terracciano M, Shahbazi MA, Correia A, Rea I, Lamberti A, De Stefano L, Santos HA, 2015. Surface bioengineering of diatomite based nanovectors for efficient intracellular uptake and drug delivery. *Nanoscale* 7, 20063-20074.

The European Pharmacopoeia 6th Edition, 2008. Council of Europe, Strasbourg.

The European Pharmacopoeia 8th Edition, 2013. Council of Europe, Strasbourg.

The IPEC Excipient Composition Guide, 2009. available from: <http://ipec-europe.org/UPLOADS/IPECCCompositionGuidefinal.pdf>

The IPEC Excipient Information Package (EIP): Template and User Guide, 2009. available from: http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/EIP_FINAL_-2009%281%29.PDF

The United States Pharmacopeia (USP 39 - NF 34), 2016. United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville.

Tita B, Jurca T, Rusu G, Bandur G, Tita D, 2013. Thermal Behaviour of Active Substance Versus Pharmaceutical Compounds for Ibuprofen. *Rev. Chim.* 64, 1089-1095.

Todd T, Zhen Z, Tang W, Chen H, Wang G, Chuang YJ, Deaton K, Pan Z, Xie J, 2014. Iron oxide nanoparticle encapsulated diatoms for magnetic delivery of small molecules to tumors. *Nanoscale* 6, 2073-2076.

Tomić MA, Vučković SM, Stepanović-Petrović RM, Ugrešić N, Prostran MS, Bošković B, 2004. The anti-hyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine are attenuated by treatment with adenosine receptor antagonists. *Pain* 111, 253-260.

Tomić MA, Vučković SM, Stepanović-Petrović RM, Ugrešić ND, Prostran MS, Bošković B, 2010. Synergistic interactions between paracetamol and oxcarbazepine in somatic and visceral pain models in rodents. *Anesth. Analg.* 110, 1198-1205.

Tudja P, Khan MZI, Meštrović E, Horvat M, Golja P, 2001. Thermal Behaviour of Diclofenac Sodium: Decomposition and Melting Characteristics. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 1245-1250.

U.S. Environmental Protection Agency, 1995. 11.22 Diatomite Processing, in: U.S. Environmental Protection Agency, AP-42, 5th ed, Volume I: Stationary Point and Area Sources. U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, pp. 11.22-1-11.22-5

U.S. Geological Survey, 1997. Minerals Yearbook, Vol. I, Metals & Minerals. U.S. Geological Survey, Reston.

U.S. Geological Survey, 2014. Mineral commodity summaries 2014. U.S. Geological Survey, Reston.

Vaculíková L, Plevová E, 2005. Identification of clay minerals and micas in sedimentary rocks. *Acta Geodyn. Geomater.* 2, 167-175.

Van Emmerick TJ, Sandström DE, Antzutkin ON, Angove MJ, Johnson BB, 2007. P-31 solid-state nuclear magnetic resonance study of the sorption of phosphate onto gibbsite and kaolinite. *Langmuir* 23, 3205-3213.

Vasani RB, Losic D, Cavallaro A, Voelcker NH, 2015. Fabrication of stimulus-responsive diatom biosilica microcapsules for antibiotic drug delivery. *J. Mater. Chem. B* 3, 4325-4329.

Vueba ML, Pina ME, Batista LAE, de Carvalho B, 2008. Conformational Stability of Ibuprofen: Assessed by DFT Calculations and Optical Vibrational Spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* 97, 845-859.

Worch E, 2012. Adsorption Technology in Water Treatment: Fundamentals, Processes, and Modeling. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin.

Yaksh TL, Noueihed RY, Durant PA, 1986. Studies of the pharmacology and pathology of intrathecally administered 4-anilinopiperidine analogues and morphine in the rat and cat. *Anesthesiology* 64, 54-66.

Yang JH, Lee JH, Ryu HJ, Elzatahry AA, Alothman ZA, Choy JH, 2016. Drug-clay nanohybrids as sustained delivery systems. *Appl. Clay Sci.* 130, 20-32.

Yang L, Choi SK, Shin HJ, Han HK, 2013. 3-Aminopropyl functionalized magnesium phyllosilicate as an organoclay based drug carrier for improving the bioavailability of flurbiprofen, *Int. J. Nanomed.* 8, 4147-4155.

Zhang H, Shahbazi MA, Mäkilä EM, da Silva TH, Reis RL, Salonen JJ, Hirvonen JT, Santos HA, 2013. Diatom silica microparticles for sustained release and permeation enhancement following oral delivery of prednisone and mesalamine. *Biomaterials* 34, 9210-9219.

Zhang Y, Zhang C, Zhang Y, Zhang G, Liu S, Xu Z, 2011. Development of Al₂O₃ film on diatomite for treating wastewater containing anionic polyacrylamide. *Chem. Eng. Technol.* 34, 2016-2021.

Zheng JP, Luan L, Wang HY, Xi LF, Yao KD, 2007. Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system. *Appl. Clay Sci.* 36, 297-301.

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm> [accessed 14.7.2016.]

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm> [accessed 11.7.2016.]

<http://www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/pretrazivanje-humanih-lekova/> [accessed 16.8.2016.]

<http://www.drugs.com/inactive> [accessed 24.8.2016.]

<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm260849.htm> [accessed 14.7.2016.]

7. ПРИЛОЗИ

7.1. Публиковани и саопштени радови који чине део докторске дисертације

Рад објављен у врхунском међународном часопису (M21):

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Nedić Vasiljević B, Dobričić V, Daković A, Antonijević MD, Milić J, 2015. Modified local diatomite as potential functional drug carrier—A model study for diclofenac sodium. *Int. J. Pharm.* 496, 466-474.

Рад објављен у истакнутом међународном часопису (M22):

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Dobričić V, Daković A, Krstić J, Marković M, Milić J, 2014. Inorganically modified diatomite as a potential prolonged-release drug carrier. *Mater. Sci. Eng. C* 42, 412-420.

Саопштења са међународних скупова штампана у целини (M33):

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Dobričić V, Milić J. Inorganic modification of diatomite as an approach for functionality improvement of a potential pharmaceutical excipient. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Portorož, Slovenia, 2014; *Farmaceutvski Vestnik* 65, 129-130.

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Dobričić V, Milić J. An investigation of interaction between ibuprofen and modified diatomite: potential drug carrier. 1st European Conference on Pharmaceutics Drug Delivery, Reims, France, 2015; Abstract book USB.

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Dobričić V, Todosijević M, Milić J. Modified food grade diatomite as potential functional pharmaceutical excipient for nonsteroidal antiinflammatory drugs. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow, Scotland, 2016; USB.

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34):

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Rajić M, Milić J. An investigation of natural and modified diatomite as potential carriers for diclofenac sodium. FIP Centennial Congress

of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Amsterdam, the Netherlands, 2012; CD ROM Abstract book.

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Dobričić V, Ristić S, Milić J. Modified diatomaceous earth as a potential carrier for prolonged release of diclofenac sodium. Advanced Materials World Congress, Izmir, Turkey, 2013; Peer reviewed book pp. 135-136.

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Dobričić V, Milić J. An investigation of inorganically-modified diatomaceous earth as potential pharmaceutical excipient. 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery, Pisa, Italy, 2013; Program and Abstracts p. 118.

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Milić J. An investigation of surfactant modified diatomaceous earth and natural zeolite as potential pharmaceutical excipients. II Congress of Pharmacists of Montenegro with the International Participation, Budva, Crna Gora, 2015; Abstract book pp. 221-222.

Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64):

Krajišnik D, Daković A, **Janićijević J**, Milić J. Ispitivanje prirodnih i modifikovanih alumosilikata kao potencijalnih farmaceutskih ekscipijenasa. 50. jubilarno savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, Srbija, 2012; Program i kratki izvodi radova MAT P7.

Janićijević J, Krajišnik D, Čalija B, Dobričić V, Milić J. Neorganski modifikovani dijatomit kao mogući nosač za isporuku ibuprofena. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 2014; Zbornik sažetaka pp. 385-387.

7.2. Биографија аутора

Јелена Јанићијевић рођена је 04.12.1985. године у Београду. Фармацеутски факултет Универзитета у Београду уписала је школске 2004/2005 године, а дипломирала 20.07.2010. године са општим успехом 9,61 у току студија и оценом 10 на дипломском испиту.

Као студент завршне године основних студија на Фармацеутском факултету (школска 2008/2009 година) била је стипендиста Фонда за младе таленте Републике Србије.

Приправнички стаж обавила је у Апотеци „Београд” у току 2010/2011 године, а стручни испит за дипломираног фармацеута положила је 28.12.2011. године.

Докторске академске студије из фармацеутске технологије на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2010/2011.

Као студент докторских академских студија добија стипендију Министарства просвете и науке, касније Министарства просвете, науке и технолошког развоја, и укључује се на научноистраживачки пројекат Министарства:

„Развој микро- и наносистема као носача за лекове са антиинфламаторним деловањем и метода за њихову карактеризацију” (евиденциони број ТР 34031) почевши од октобра 2011. закључно са септембром 2015. године.

У периоду 2012-2014. године учествовала је у извођењу практичне наставе из предмета Фармацеутска технологија 1 на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду.

7.3. Изјава о ауторству

Потписана: Јелена Јанићијевић

Број индекса: 14/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација природних и модификованих дијатомита као потенцијалних функционалних материјала/ексципијенаса за фармацеутску примену

- резултат сопственог истраживачког рада
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијском програму других високошколских установа
- да су резултати коректно наведени
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица

Потпис докторанда

У Београду, 4.11.2016.

Јанићијевић Јелена

7.4. Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора: Јелена Јанићијевић

Број индекса: 14/10

Студијски програм: Докторске академске студије из Фармацеутске технологије

Наслов рада: Карактеризација природних и модификованих дијатомита као потенцијалних функционалних материјала/ексципијенаса за фармацеутску примену

Ментор: проф. др Јела Милић, доц. др Данина Крајишник

Потписана: Јелена Јанићијевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на портал Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктор наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 4.11.2016.



7.5. Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација природних и модификованих дијатомица као потенцијалних функционалних материјала/ексципијенаса за фармацеутску примену која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

Потпис докторанда

У Београду, 4.11.2016.

Јанићијевић Јелена