



Université de Constantine 3 Salah Boubnider
Faculté de Génie des Procédés
Département de Génie Pharmaceutique

**DEVELOPPEMENT DES SYSTEMES DE DELIVRANCES DES MEDICAMENTS
EN VUE DE L'APPLICATION A LA LIBERATION PROLONGEE D'UN
PRINCIPE ACTIF**

THESE

Présentée pour l'Obtention du
Diplôme de Doctorat en Génie des Procédés
Option : Génie Pharmaceutique

PAR

Sarra BENSOUIKI

Année Universitaire

2021-2022



Université de Constantine 3 Salah Boubnider
Faculté de Génie des Procédés
Département de Génie Pharmaceutique

N° de série :

N° d'ordre :

DEVELOPPEMENT DES SYSTEMES DE DELIVRANCES DES MEDICAMENTS
EN VUE DE L'APPLICATION A LA LIBERATION PROLONGEE D'UN
PRINCIPE ACTIF

THESE

Présentée pour l'Obtention du
Diplôme de Doctorat en Génie des Procédés
Option : Génie Pharmaceutique

PAR

Sarra BENSOUIKI

Devant le Jury Composé de :

Rihab BOUSHABA	Présidente	Professeur	Université Constantine 3
Fouzia BELAIB	Directrice	Professeur	Université Constantine 3
Michèle SINDT	Co-directrice	HDR	Université Lorraine
Meriem EL KOLLI	Examineur	Professeur	Université Sétif 1
Melia GUESSOUM	Examineur	Professeur	Université Sétif 1
Lotfi BENMEKHBI	Examineur	MCA	Université Constantine 3
Mohamed Abd Esselem DEMS	Invité	MRA	CRBt

Année Universitaire
2021-2022

REMERCIEMENT

Les travaux de recherche qui font l'objet de cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire d'ingénierie des procédés de l'environnement (LIPE) de l'université Constantine 3-Salah Boubnider, le laboratoire de chimie et physique -approche multi-échelle des milieux complexes (LCPA2MC) de l'université Lorraine et le centre de recherche en biotechnologie Constantine (CRBt)

Je tiens tout d'abord à remercier profondément ma directrice de thèse Madame **Fouzia BELAIB**, Professeur à l'université Constantine 3-Salah Boubnider pour son encadrement scientifique, sa disponibilité permanente, ses encouragements, ses précieux conseils, la confiance qu'elle m'a accordée et ses qualités professionnelles et humaines.

Je tiens particulièrement à remercier ma co-directrice de thèse Madame **Michèle SINDT**, Maître de conférences HDR à l'Université de Lorraine - ICPM pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, pour l'intérêt qu'elle a apportée à mon travail. Je lui suis reconnaissante de la liberté et la confiance qu'elle m'a accordée et les moyens qu'elle m'a assurés pour mener cette thèse, Je voudrais aussi lui exprimer ma très grande reconnaissance pour ses qualités humaines.

Je suis très heureuse et honorée que Madame **Rihab BOUSHABA**, Professeur à l'Université Constantine 3-Salah Boubnider, Madame **Meriem EL KOLLI** Professeur à l'Université Sétif 1, Madame **Melia GUESSOUM** Professeur à l'Université Sétif 1, Monsieur **Lotfi BENMEKHBI** Maître de conférences A à l'Université Constantine 3-Salah Boubnider et Monsieur **Mohamed Abd Esselem DEMS**, Maître de recherche A au CRBt, aient accepté de juger ces travaux de recherche. Je les remercie sincèrement de l'intérêt qu'ils ont porté pour examiner ma thèse.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur le Professeur **Abdeslam Hassen MENIAI**, Doyen de la Faculté de Génie des Procédés- Université de Constantine 3-Salah Boubnider, pour ses conseils ses encouragements ainsi qu'aux moyens mis à ma disposition pour la réalisation de ces travaux.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur **Toufik BELHADJ MOSTEFA** PDG du laboratoire HUP PHARMA pour m'avoir octroyée les produits chimiques et les principes actifs pour la réalisation de ces travaux

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à mes Professeurs et mes aînés qui ont contribué à ma formation et particulièrement Professeur **Ouahida LOUAER** pour tous les

produits et les principes actifs qu'elle a mis à ma disposition, et Professeur **Nawel OUTILI** pour ses encouragements, sa disposition, ses conseils précieux et son aide.

Mes vifs remerciements à Docteur **Sandrine Rup-Jacques**, Ingénieur d'études à l'Université de Lorraine - ICPM pour sa disponibilité permanente, son aide, ses conseils pertinents, sa bonne humeur permanente, et pour m'avoir initiée à la spectroscopie RMN.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Docteur **Ala ABDESSAMED**, Docteur **Chawki BENSOUICI**, et Docteur **Ouahida ZEGHOUAN** chercheurs permanents au sein du CRBt ainsi que l'ensemble du personnel du CRBt qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je souhaite également exprimer mes remerciements au personnel technique de l'institut chimie physique-Université Lorraine et de la Faculté de Génie des Procédés pour leur collaboration.

Je remercie enfin tous les collègues et amis qui m'ont soutenue dans le cadre de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABREVIATIONS	xiii
RESUMÉ.....	iv
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PARTIE 1	
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
CHAPITRE I	
SYSTÈMES DE DÉLIVRANCE DES MÉDICAMENTS.....	5
1.1 Définition d'un système de délivrance de médicament	5
1.2 Systèmes à libération modifiée	5
1.2.1 La libération accélérée.....	5
1.2.2 La libération prolongée.....	6
1.2.3 La libération retardée.....	6
1.2.4 La libération séquentielle.....	6
1.3 L'ibuprofène	7
1.4 Le métronidazole	9
CHAPITRE II	
LES CYCLODEXTRINES	12
2.1 Généralités	12
2.2 Structure et caractéristiques physicochimiques des cyclodextrines.....	12
2.3 Les cyclodextrines modifiées.....	14
2.3.1 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPBCD).....	15
2.4 Formation de complexe d'inclusion	16
2.5 Les techniques de préparation des complexes d'inclusion CD/invité	18
2.5.1 L'inclusion par co-précipitation (cristallisation de la solution).....	18
2.5.2 L'inclusion par pétrissage (<i>paste/kneading</i>).....	19
2.5.3 Solubilisation suivie par une lyophilisation (<i>freeze-drying</i>)	19
2.6 Caractérisation des complexes.....	19
2.6.1 Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue ...	19
2.6.2 Détermination des constantes d'association et les paramètres thermodynamiques par UV-Visible.....	21

2.6.3	Étude de phase de solubilité	22
2.6.4	La résonance magnétique nucléaire du proton monodimensionnelle (¹ H RMN)	24
2.6.5	RMN 2D ¹ H- ¹ H NOESY et ROESY	24
2.6.6	La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	25
2.6.7	La calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	25
2.6.8	Analyse thermogravimétrique (ATG)	25
2.6.9	Microscopie électronique à balayage (MEB)	26
2.6.10	Test de dissolution <i>in vitro</i>	26
2.7	Applications	26
2.7.1	Domaine pharmaceutique	26
2.7.2	En agroalimentaire.....	28
2.7.3	Dans les industries cosmétiques	28
2.7.4	En environnement.....	29

CHAPITRE III

LES NANOPARTICULES POLYMÈRES	30	
3.1	Définition des nanoparticules polymères.....	30
3.2	Méthodes de préparation des nanoparticules polymères	31
3.2.1	Émulsion-évaporation du solvant	31
3.2.2	Émulsion-diffusion du solvant	31
3.2.3	La nanoprécipitation	32
3.2.4	Émulsion- <i>salting out</i>	32
3.2.5	La gélation ionique	33
3.3	Chitosane	33
3.4	Alginate de sodium	36
3.5	Caractérisation des nanoparticules.....	39
3.5.1	Microscopie électronique en transmission (MET)	39
3.5.2	Microscopie électronique à balayage à émission de champ (MEB-FEG).....	39
3.5.3	La diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	40
3.5.4	Efficacité d'encapsulation	41
3.5.5	Étude des interactions.....	42
3.5.6	Étude de libération <i>in vitro</i>	42
3.5.7	Modèles mathématiques pour les études de la libération d'un PA.....	42

PARTIE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES	45
-----------------------------	----

Stratégie de travail	46
----------------------------	----

CHAPITRE IV

NANOPARTICULES CHARGÉES D'IBUPROFÈNE	48
--	----

4.1 Liste des produits	48
------------------------------	----

4.2 Préparation des nanoparticules de l'alginate de sodium et de chitosane chargées d'ibuprofène.....	49
---	----

4.3 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	50
---	----

4.4 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	50
--	----

4.5 Microscopie électronique à balayage à émission de champs MEB-FEG	51
--	----

4.6 Efficacité d'encapsulation.....	51
-------------------------------------	----

4.7 Étude de Dissolution <i>in vitro</i>	51
--	----

4.8 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	51
---	----

4.9 La biodégradation <i>in vitro</i>	54
---	----

4.10 Évaluation de la cytotoxicité <i>in vitro</i> sur les larves d' <i>Artémia salina</i>	54
--	----

CHAPITRE V

NANOPARTICULES CHARGÉES DE MÉTRONIDAZOLE SOUS FORME D'UN COMPLEXE.....	57
--	----

5.1 Liste des produits	57
------------------------------	----

5.2 Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue.....	58
---	----

5.3 Détermination des constantes d'association et les paramètres thermodynamiques par UV-Visible	58
--	----

5.4 Étude de phase de solubilité.....	59
---------------------------------------	----

5.5 Préparation des mélanges physiques et complexes d'inclusion CD-MTZ	60
--	----

5.5.1 Préparation des mélanges physiques CD-MTZ.....	60
--	----

5.5.2 Préparation des complexes d'inclusion CD-MTZ.....	60
---	----

5.6 Caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion	61
--	----

5.6.1 La résonance magnétique nucléaire (RMN)	61
---	----

5.6.2 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	61
--	----

5.6.3 La calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	61
--	----

5.6.4 Analyse thermogravimétrique (ATG)	61
---	----

5.6.5 Microscopie électronique à balayage (MEB)	62
---	----

5.7 Étude de dissolution <i>in vitro</i>	62
--	----

5.8	Activité antibactérienne	62
5.9	Préparation des nanoparticules de CS chargées de MTZ sous forme d'un complexe HPBCD-MTZ	63
5.9.1	Préparation des nanoparticules CS vides.....	63
5.9.2	Préparation des nanoparticules du CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ.....	64
5.10	Caractérisation des nanoparticules du CS-TPP chargées de complexe d'inclusion HPBCD-MTZ.....	65
5.10.1	La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	65
5.10.2	Microscopie électronique en transmission (MET) des NPs chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ	66
5.10.3	Microscopie électronique à balayage à émission de champs (MEB- FEG) des NPs chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ.....	66
5.10.4	La diffusion dynamique de la lumière (DLS) des NPs chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ	66
5.10.5	Étude de libération <i>in vitro</i>	66
PARTIE 3		
RÉSULTATS ET DISCUSSION		68
CHAPITRE VI		
NANOPARTICULES CHARGÉES D'IBUPROFÈNE		69
6.1	La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	69
6.2	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	71
6.3	Microscopie électronique à balayage à émission de champs (MEB-FEG).....	72
6.4	Efficacité d'encapsulation.....	73
6.5	Dissolution <i>in vitro</i>	73
6.6	Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	76
6.7	La biodégradation <i>in vitro</i>	78
6.8	Évaluation de la cytotoxicité <i>in vitro</i> sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	79
CHAPITRE VII		
NANOPARTICULES CHARGÉES DE MÉTRONIDAZOLE SOUS FORME D'UN COMPLEXE D'INCLUSION		81
7.1	Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue.....	81
7.2	Détermination des constantes d'association et les paramètres thermodynamiques par UV-Visible	82
7.3	Étude de phase de solubilité.....	85

7.4	Caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion	87
7.4.1	La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton monodimensionnelle 87	
7.4.2	RMN 2D ¹ H- ¹ H NOESY et ROESY	90
7.4.3	La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	94
7.4.4	La calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	97
7.4.5	Analyse thermogravimétrique (ATG)	98
7.4.6	Microscopie électronique à balayage (MEB)	101
7.5	Étude de dissolution <i>in vitro</i>	102
7.6	Activité antibactérienne	104
7.7	Caractérisation des nanoparticules de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ	107
7.7.1	La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	107
7.7.2	Morphologie et taille des NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ	110
7.7.3	Étude de dissolution <i>in vitro</i>	112
	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	115
	BIBLIOGRAPHIE	119
	ANNEXE A	137
	ANNEXE B	138
	ANNEXE C	139

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1. 1	Différents profils des concentrations plasmatiques des PA.....	7
1. 2	Structure chimique de l'ibuprofène.....	7
1. 3	Mécanisme d'action des AINS non sélectifs.....	8
1. 4	Structure chimique du métronidazole.....	9
1. 5	Mécanisme d'action du métronidazole.....	10
2. 1	Structures chimiques de la β -cyclodextrine.....	15
2. 2	Structures chimiques de la 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrine	16
2. 3	Mécanisme de formation du complexe d'inclusion.....	17
2. 4	Représentation des différentes stœchiométries des complexes d'inclusion...	18
2. 5	Différentes courbes de job obtenues pour différentes stœchiométries.....	21
2. 6	Les classifications des diagrammes de solubilité selon Higuchi et Connors..	23
3. 1	Les deux principaux types de nanoparticules polymères (NPs)	30
3. 2	Structure chimique de chitine et chitosane	34
3. 3	Réticulation ionique du chitosane par le tripolyphosphate de sodium	35
3. 4	Structure chimique des monomères α -L-gulonate (G) et β -D mannuronate (M).....	36
3. 5	Différente séquence en monomères G et M rencontrées dans les chaînes d'alginate de sodium sous forme de blocs : (a) : GGGG ; (b) : MMMM et (c) : GGMM.....	37
3. 6	Mécanisme de gélification de l'alginate en présence de Ca^{2+} , le modèle boîte à œufs (<i>egg box</i>)	38
3. 7	Représentation d'une particule avec sa couche d'hydratation constituant ensemble le diamètre hydrodynamique de la particule.	41
4. 1	Description de la méthode de préparation des nanoparticules de NaAL/CS chargées d'ibuprofène.....	50
4. 2	Description de la méthode suivie pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	53
4. 3	Description de la méthode suivie pour l'évaluation de la cytotoxicité sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	56
5. 1	Protocole expérimental suivi pour la détermination de stœchiométrie par UV-Vis.....	58
5. 2	Protocole expérimental suivi pour la détermination des grandeurs thermodynamiques par UV-Vis.....	59
5. 3	Protocole expérimental suivi pour l'étude de phase de solubilité.....	60
5. 4	Description de la méthode suivie pour l'évaluation de l'activité antibactérienne par la technique microdilution.....	63
5. 5	Description de la méthode de préparation des nanoparticules de CS-TPP vides et des nanoparticules de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ.....	65
6. 1	Spectroscopie FTIR de NaAL, CS, IBP et les NPs de NaAL/CS chargées	

	d'IBP.....	71
6. 2	Thermogrammes DSC de NaAL, CS, IBP et les NPs de NaAL/CS chargées d'IBP.....	72
6. 3	Image MEB-FEG de NPs chargées d'ibuprofène.....	73
6. 4	Profil de libération de l'IBP à partir de NPs de NaAL/CS dans FGS (pH= 1,2), FSI (pH= 6,8) et PBS (pH=7,4)	74
6. 5	Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro des NPs chargées d'IBP dans FGS (pH=1,2), FIS (pH=6,8) et PBS (pH=7,4) par la méthode dénaturation protéique.	78
6. 6	Biodégradation in vitro du CS, NaAL et NPs chargées d'IBP par lysozyme ...	79
7. 1	Courbes de Job à 25 °C et λ max=320 nm des systèmes (a) BCD-MTZ et (b) HPBCD-MTZ.	81
7. 2	Tracé de Benesi-Hildebrand pour les systèmes (a) BCD-MTZ et (b) HPBCD-MTZ.	84
7. 3	Tracé de Van't Hoff pour les systèmes (a) BCD-MTZ et (b) HPBCD-MTZ. ...	85
7. 4	Profils de phase de solubilité de (a) BCD-MTZ et (b) HPBCD-MTZ.....	86
7. 5	Les spectres RMN ¹ H de (a) BCD, MTZ et BCD-MTZ CI (b) HPBCD, MTZ et HPBCD-MTZ CI.....	89
7. 6	Structure chimique de (a) métronidazole (b) β -cyclodextrine (c) 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrine.....	90
7. 7	Expansion de la carte RMN 2D du complexe d'inclusion BCD-MTZ dans D2O (a) NOESY (b) NOESY durant 5h (c) ROESY durant 9h.....	92
7.8	Expansion de la carte RMN 2D du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ dans D2O (a) NOESY (b) ROESY (c) ROESY durant 6h.....	94
7.9	Spectres FTIR de (a) MTZ, BCD et BCD-MTZ CI (b) MTZ, HPBBCD et HPBCD-MTZ CI.	96
7. 10	Thermogrammes DSC de (a) MTZ, BCD, BCD-MTZ MP et BCD-MTZ CI (b) MTZ, HPBBCD et BCD-MTZ MP HPBCD-MTZ CI.	98
7. 11	Thermogrammes ATG de (a) MTZ, BCD et HPBCD (b) BCD-MTZ CI et BCD-MTZ MP (c) HPBCD-MTZ CI et HPBCD-MTZ MP.....	100
7. 12	Images MEB de (a) métronidazole (MTZ), (b) β -cyclodextrine (BCD), (c) 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPBCD), (d) BCD-MTZ MP, (e) HPBCD-MTZ MP, (f) BCD-MTZ MP CI, et (g) HPBCD-MTZ CI.....	102
7. 13	Profil de libération du MTZ à partir du : MTZ libre, BCD-MTZ CI, HPBCD-MTZ CI, BCD-MTZ MP et HPBCD-MTZ MP dans (a) Eau distillée (b) PBS pH=7,4.....	104
7. 14	Histogramme d'activité antibactérienne du métronidazole libre et encapsulé avec la BCD et l'HPBCD à (a) 170 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b) 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ et (c) 42,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	107
7. 15	Spectres FTIR de (a) CS, TPP, et NPs de CS-TPP vides (b) HPBCD-MTZ CI, NPs de CS-TPP vides, et NPs de CS chargées du HPBCD-MTZ CI.....	109
7. 16	Images de NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ obtenues par (a) microscopie électronique en transmission (b) microscopie électronique à balayage à émission de champs.....	111

7. 17	Distribution de taille de NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ obtenue par DLS.....	112
7. 18	Profil de libération du MTZ à partir de NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ dans PBS pH=7,4.....	113

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1	Propriété physicochimique et structural de α -, β - et γ cyclodextrine..... 13
2.2	Quelques formes pharmaceutiques commercialisées utilisant la BCD, HPBCD et SBEB CD..... 27
3.1	Interprétation du mécanisme de libération d'un principe actif à partir d'une matrice polymérique d'une géométrie sphérique..... 44
4.1	Estimation de la toxicité des produits testés sur les larves d' <i>Artémia salina</i> selon la concentration létale 50% (CL50) 56
6.1	Résultats de l'efficacité d'encapsulation (EE%) et capacité de charge (LC%) des nanoparticules chargées en IBP..... 73
6.2	Paramètres cinétiques de la libération de l'IBP à partir de NPs de NaAL/CS dans FGS, FIS et PBS..... 75
6.3	Le coefficient diffusionnel (A) et le coefficient d'érosion (B) obtenus pour le modèle de Kopcha..... 76
6.4	Résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro de NPs chargées d'IBP et de l'IBP pur par la méthode de dénaturation du sérum d'albumine bovine... 77
6.5	Pourcentage de mortalité des larves d' <i>Artemia salina</i> après une exposition de 24h aux NPs chargées d'IBP..... 80
7.1	Les constants d'association (Ka) et les grandeurs thermodynamiques obtenus durant l'association du MTZ avec la BCD et l'HPBCD..... 83
7.2	Efficacité de complexation (CE) et rapport molaire optimal (MTZ:CD) obtenus à partir des diagrammes de phase de solubilité..... 87
7.3	Attributions et variations des déplacements chimiques (δ) des protons de la BCD et de l'HPBCD en présence et en absence du MTZ..... 87
7.4	Le pourcentage du MTZ libéré à partir du MTZ libre, BCD-MTZ MP, HPBCD-MTZ MP, BCD-MTZ CI et HPBCD-MTZ CI..... 104
7.5	Les coefficients de corrélation (R ²) des différents modèles appliqués au profile de dissolution in vitro de NPs de CS-TPP chargées de complexe HPBCD-MTZ dans PBS (pH= 7,4)..... 114

LISTE DES ABREVIATIONS

°C :	Degré celsius
µl :	Microllilitre
¹ H RMN :	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN 2D :	Résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle
ABS :	Absorbance
AINS :	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ATG :	Analyse thermogravimétrique
BCD :	β-Cyclodextrine
C :	Concentration
CD :	Cyclodextrine
CE :	Efficacité de complexation
CI :	Complexe d'inclusion
CL50 :	Concentration létale médiane
COX :	Cyclooxygénase
CS :	Chitosane
<i>D</i> :	Coefficient de diffusion translationnel
DCI :	Dénomination commune internationale
DD :	Degré de désacétylation
DLS :	<i>Dynamic light scattering</i>
DMSO :	Diméthyle sulfoxyde
DO :	Densité optique
DS :	Degré de substitution moyen par cyclodextrine
DSC :	Calorimétrie différentielle à balayage
E.COLI :	<i>Escherichia coli</i>
EE% :	Efficacité d'encapsulation
FEG :	<i>Field emission gun</i>
FGS :	Fluide gastrique simulé sans enzyme
FIS :	Fluide intestinal simulé sans enzyme
FTIR :	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
h :	Heure
HPBCD :	2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrine
I :	Invité
IBP :	Ibuprofène
K :	Kelvin
K _a :	Constant d'association
KB :	Constante de Boltzmann
kV :	Kilovolt
LC :	<i>Loading Capacity</i>
M :	Molaire
MEB :	Microscopie électronique à balayage
MEB-FEG:	Microscopie électronique à balayage à émission de champs
MET :	Microscopie électronique en transmission

MHB :	Bouillon mueller-hinton
min:	Minute
mL :	Millilitre
MP :	Mélange physique
MTZ :	Métronidazole
NaAL :	Alginate de sodium
nm :	Nanomètre
NOE :	<i>Nuclear overhauser effect</i>
NOESY :	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
Ø_h :	Diamètre hydrodynamique
PA :	Principe actif
PBS :	<i>Phosphate bufferd saline</i>
pH :	Potentiel hydrogène
ppm :	Parties par millions
R^2 :	Coefficient de régression
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROESY :	<i>Rotating frame overhauser effect spectroscopy</i>
S.AUREUS :	<i>Staphylococcus aureus</i>
S_0 :	Solubilité aqueuse intrinsèque
SBEB CD :	Sulfobutylether β -cyclodextrin
SDM :	Système de délivrance des médicaments
T :	Température
TPP :	Tripolyphosphate de sodium
UFC :	Unité formant colonie
UV-Vis :	Ultra-violet visible
δ :	Déplacement chimique
ΔG :	Variation d'énergie libre de Gibbs
ΔH :	Variation d'enthalpie
ΔS :	Variation d'entropie
η :	Viscosité dynamique du milieu de dispersion
λ :	Longueur d'onde

RESUMÉ

Certains principes actifs (PA) présentent des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques pénalisantes, du fait qu'elles réduisent considérablement la biodisponibilité des PA, ce qui implique des prises répétitives. L'objectif de cette étude est de concevoir des systèmes de délivrance de médicament (SDM) destinés à la voie orale à base de biopolymères préparés par des méthodes qui n'impliquent pas l'utilisation de solvants organiques toxiques ce qui permet d'améliorer la biodisponibilité des PA, contrôler leur libération, améliorer leur rapport bénéfice/risque et une meilleure observance du traitement.

Dans notre étude, deux PA ont été choisis comme modèle pour les introduire dans des SDM : l'ibuprofène (IBP) et le métronidazole (MTZ) qui présentent des activités biologiques intéressantes mais des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques problématiques.

Deux axes ont été abordés. Le premier a porté sur la préparation et la caractérisation des nanoparticules polymères (NPs) chargées d'ibuprofène. Les NPs ont été préparées par la méthode de « gélation ionique » à base de l'alginate de sodium (NaAL) en utilisant le chlorure de calcium comme agent de réticulation suivie par la formation du complexe de polyélectrolyte en utilisant le chitosane (CS). Les analyses de FTIR, DSC, MEB-FEG et l'efficacité d'encapsulation (EE%) ont été employés pour vérifier la formation des NPs. Des études de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*, biodégradation *in vitro* et de cytotoxicité testée par la méthode de *Brine shrimp* ont été également réalisées. Les résultats montrent que les NPs ont une taille autour de 100 nm et une EE% satisfaisante. La DSC a montré que l'encapsulation de l'IBP a diminué sa cristallinité. L'étude de dissolution *in vitro* ainsi que l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire ont montré que les nanoparticules ont un comportement pH-sensibles et peuvent atteindre le profil d'ordre cinétique pseudo-zéro. Les NPs chargées d'IBP ont présenté une activité anti-inflammatoire supérieure à celle de l'IBP libre. L'administration de NPs à différentes concentrations n'entraîne aucun effet toxique chez les larves d'*Artémia* traités. Cela indique que les NPs de NaAL/CS est un système prometteur pour la libération de l'IBP qui peut atteindre un profil d'ordre cinétique pseudo-zéro.

Le deuxième axe a porté sur la préparation et la caractérisation des NPs chargées de MTZ sous forme de complexe d'inclusion (CI) de cyclodextrine (CD). En premier lieu, une étude comparative entre le complexe d'inclusion du MTZ formé avec la β -cyclodextrine (BCD) et celui formé avec la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPBCD) a été effectuée pour choisir le meilleur complexe à encapsuler dans les NPs de CS. Les techniques de spectroscopie UV-visible, résonance magnétique nucléaire du proton (^1H RMN), 2D ROESY/NOESY RMN, FTIR, DSC, ATG et MEB ont été utilisées comme outils pour la caractérisation des complexes obtenus. Des études de phase de solubilité, de dissolution *in vitro* et l'évaluation de l'activité antibactérienne ont été également réalisées. Les résultats montrent que les deux CDs sont capables d'inclure le MTZ et d'augmenter sa solubilité, sa stabilité, sa vitesse de dissolution et son activité antibactérienne. Les grandeurs thermodynamiques déterminées montrent que les deux complexes formés sont thermodynamiquement stables. Les analyses thermiques et la MEB ont révélé une amorphisation du MTZ après son insertion dans la cavité des deux CDs. Le complexe d'inclusion du HPBCD-MTZ a présenté une solubilité et une activité antibactérienne meilleures que celles du complexe BCD-MTZ. Par la suite le complexe d'inclusion HPBCD-MTZ a été incorporé dans les nanoparticules de chitosane par la méthode de «

gélation ionique » en utilisant comme agent de réticulation le tripolyphosphate de sodium. La structure, la morphologie ainsi que le mécanisme de libération des NPs ont été étudiés par différentes techniques. Les résultats montrent que le complexe de HPBCD-MTZ s'est incorporé dans les nanoparticules de chitosane qui ont présenté une taille autour de 100 nm et une excellente distribution de taille. L'étude de dissolution montre que les NPs sont capables de libérer la totalité du MTZ d'une manière contrôlée, suggérant que les NPs de CS chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ peuvent être un système alternatif efficace pour modifier la libération de MTZ et augmenter sa solubilité.

Les résultats de cette thèse mettent en évidence le potentiel prometteur des SDM « complexes d'inclusion des cyclodextrines et nanoparticules polymères » pour l'optimisation des formulations pharmaceutiques.

Mots clés : Nanoparticules polymères, Complexe d'inclusion, Ibuprofène, Métronidazole, Chitosane, Alginate de sodium, β -cyclodextrine, 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrine.

ABSTRACT

Certain drugs have penalizing physicochemical and pharmacokinetic properties, significantly reducing the bioavailability of the drug. Therefore, lead to repetitive administration. The objective of this study was to develop oral drug delivery systems (DDS) based on biopolymers, prepared by methods that do not involve toxic organic solvents, thereby improving the bioavailability of the drug, controlling its release, improving its benefit/risk ratio, and showing better compliance with treatment.

In our study, two drugs were selected as a model to be introduced into DDS: ibuprofen (IBP) and metronidazole (MTZ) that exhibit powerful biological activities but problematic physicochemical and pharmacokinetic properties.

Two axes were addressed in this work. The first one dealt with the preparation and characterization of nanoparticles (NPs) loaded with IBP. NPs were prepared by ionic gelation technique based on sodium alginate (NaAL) crosslinked with calcium chloride followed by polyelectrolyte complexation using chitosan (CS). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), field emission scanning electron microscopes (FE-SEM) and percentage of encapsulation efficiency (EE %) have been used to confirm the synthesis and encapsulation of IBP. The results show that the NPs have a size of around 100 nm. In vitro drug release and evaluation of anti-inflammatory activity in different media indicate that the NPs are pH sensitive and permit the protection of the drug against total dissolution in the gastric medium, control its release, and increase its solubility and biological activity. The toxicity of NPs tested against *Artemia salina* showed that the NPs displayed non-toxicity effects. In vitro biodegradation by lysozyme and all the results obtained indicate that the NaAL/CS NPs is a promising system for IBP release that can achieve pseudo-zero-order kinetics.

The second axis was devoted to the preparation and characterization of NPs loaded with the inclusion complex (IC) of MTZ.

Firstly, a comparative study between the IC of MTZ formed with β -cyclodextrin (BCD) and that formed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) was carried out to select the best complex to be encapsulated into CS NPs. Characterizations were performed with UV-Visible, ^1H NMR, 2D NOESY NMR, 2D ROESY NMR, FTIR, DSC, ATG, and SEM. These investigations were complemented with phase solubility studies, *in vitro* drug release, and antibacterial activity. Results showed that CDs could successfully encapsulate MTZ, reduce its crystallinity, and increase its solubility. Thermal analysis showed that the thermal stability of MTZ was improved in the presence of both CDs. The *in vitro* drug release of ICs showed a considerable increase in the dissolution rate in comparison with the pure MTZ. An improvement of antibacterial activity was observed after encapsulation, especially for HPBCD-MTZ IC. Then CS NPs were prepared from the preformed HPBCD-MTZ IC by ionic gelation method. The structure, morphology, and drug release of NPs have been studied by different methods. Results show that the NPs have a spherical shape with a uniform diameter (100 nm) and generate a controlled release system, suggesting that such HPBCD-MTZ IC-loaded CS NPs can be an efficient alternative to modify the MTZ release and increase its solubility.

The results of this thesis highlight the promising potential of DDS “inclusion complexes of cyclodextrins and polymeric nanoparticles” to optimize pharmaceutical formulations pharmaceutical formulations.

Keywords: Polymeric nanoparticles, Inclusion complex, Ibuprofen, Metroniazole, Chitosan, Sodium alginate, β -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

الملخص

تمتلك بعض المكونات النشطة خصائص فيزيوكيميائية وحركية دائرية تعيق إلى حد كبير التوافر البيولوجي مما يؤدي بالمرضى إلى أخذ جرعات متكررة.

الهدف من هذه الدراسة هو تطوير أنظمة توصيل أدوية مخصصة للإستخدام عن طريق الفم محضرة ببوليمرات حيوية وبطرق لا تتضمن أي مذيبات عضوية سامة مما يمكنها من رفع مستوى التوافر البيولوجي للمكون النشط، التحكم في تحريره، تحسين نسبة الفائدة/المخاطر وتوفير تقييد أفضل بالعلاج.

في هاته الأطروحة تم إختيار إثنين من المكونات النشطة كنموذج: الإيبوبروفان (Ibuprofène) والميترونيدازول (Métronidazole)، اللذان يمتلكان أنشطة بيولوجية مثيرة للإهتمام لكن لهما خصائص فيزيوكيميائية وحركية دائرية محدودة.

تمت مناقشة إثنين من المحاور، في المحور الأول تطرقنا إلى تحضير وتوصيف الجسيمات النانوية المحملة بالإيبوبروفين المتشكلة من ألجينات الصوديوم و التي تم تحضيرها بطريقة الهلام الأيوني (gélation ionique) متبوعة بتشكيل مركب متعدد الإلكتروليت بإستخدام الكيتوزان.

للتأكد من تشكل هاته الجسيمات وتغليفها للإيبوبروفين اعتمدنا على تحاليل تحويل فورييه للطيف بالأشعة تحت الحمراء (FTIR)، المسح التفاضلي المسعر (DSC)، المجهر الإلكتروني الماسح المزود ببندقية مجال الانبعاث (MEB-FEG) متبوعة بدراسات تقييمية لنشاطها المضاد للالتهاب، لتحللها في المختبر وكذا سميتها الخلوية بطريقة الأرتيميا. أظهرت النتائج أن الجسيمات النانوية ذات قطر قدر بـ 100 نانومتر وأنها قادرة على تغليف نسبة كبيرة من المكون النشط والتقليل من نسبة تبلوره. أثبتت دراسة تحرير المكون النشط وتقييم النشاط المضاد للالتهاب أن الجسيمات النانوية حساسة لدرجة الحموضة ولها قدرة على التحكم بتحرير الإيبوبروفين، بالإضافة إلى ذلك تمتلك هاته الجسيمات النانوية نشاطا مضادا للالتهاب أكبر مقارنة بالذي يمتلكه الإيبوبروفين الحر وأنها لم تثبت أي وجود لسمية خلوية على يرقات الأرتيميا. وعلى هذا، فإن الجسيمات النانوية لألجينات الصوديوم والكيتوزان تعتبر نظام فعال وبديل من أجل تحسين أداء الإيبوبروفين.

في المحور الثاني ركزنا على تطوير جسيمات نانوية محملة بالميترونيدازول على هيئة مركب تضمين. في المرحلة الأولى أجرينا مقارنة بين مركب التضمين للميترونيدازول المتشكل مع البيتا-سايكلودكسترين والذي تشكل مع 2-هيدروكسيبروبيل-بيتا-سايكلودكسترين وهذا بغرض إختيار مركب التضمين الأمثل لتغليفه بالجسيمات النانوية للكيتوزان.

من أجل دراسة مركبي التضمين أستعملت تقنية مطيافية الأشعة المرئية وفوق البنفسجية (UV-Vis)، التحليل الطيفي بالرنين المغناطيسي النووي للبروتون ($^1\text{H RMN}$)، التحليل الطيفي بالرنين المغناطيسي النووي ثنائي الأبعاد (2D RMN): مطيافية تأثير الزائد النووي (2D NOESY) مطياف تأثير الإطار النووي الدوار (2D ROESY)، تحويل فورييه للطيف بالأشعة تحت الحمراء (FTIR) المسح التفاضلي المسعر (DSC)، التحليل الوزني الحراري (ATG) والمجهر الإلكتروني الماسح (MEB)

أظهرت النتائج أن كلا السايكلودكسترين قادران على إدخال الميترونيدازول داخل تجويفهما وتحويله إلى غير متبلور وزيادة كل من ذوبانيته وسرعة انحلاله بالماء مما أدى الى زيادة نشاطه المضاد للبكتيريا. أثبت حساب الكميات الدينامكية الحرارية أن كلا مركبي التضمين المتشكلان مستقران دينامكيا حراريا. أظهر مركب التضمين للميترونيدازول

المتشكل مع 2-هيدروكسيبروبيل-بيتا-سايكلودكسترين ذوبانية ونشاطاً مضاداً للبكتيريا أكبر من نظيره المتشكل مع البيتا-سايكلودكسترين.

فيما بعد تم تغليف مركب التضمين للميترونيدازول المتشكل مع 2-هيدروكسيبروبيل-بيتا-سايكلودكسترين بالجسيمات النانوية للكتوزان المحضرة بطريقة الهلام الأيوني (gélation ionique). تمت دراسة الهيكل، الشكل وكذا آلية تحرير المكون النشط بعدة طرق. أثبتت النتائج أنه تم تغليف مركب التضمين بنجاح وأن الجسيمات النانوية ظهرت بقطر قدر بـ 100 نانومتر وأنها قادرة على التحكم في تحرير المكون النشط. وعلى هذا، فإن استخدام نظام توصيل أدوية مزدوج "الجسيمات النانوية المحملة بمركب التضمين" يساعد علاوة على توفير نظام يتحكم بتحرير المكون النشط نظاماً يعمل على تحرير مكون فائق الإنحلال.

من خلال هذه الأطروحة سلطنا الضوء على القدرات الواعدة لأنظمة توصيل الأدوية "الجسيمات النانوية ومركبات التضمين للسايكلودكسترين" على تحسين المستحضرات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: الجسيمات النانوية، مركب التضمين، الإيبيروفان، الميترونيدازول، الكيتوزان، ألجينات الصوديوم، البيتا-سايكلودكسترين، 2-هيدروكسيبروبيل-بيتا-سايكلودكسترين.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

De nombreux principes actifs (PA) à effet thérapeutique potentiel sont abandonnés en raison de leurs propriétés physico-chimiques limitant leur passage à travers les barrières biologiques ou tout obstacle les séparant de la cible pharmacologique, ce qui conduit à de faibles quantités de médicament arrivant au site actif. D'autres facteurs limitent l'utilisation de ces PA, dont les effets indésirables importants voire toxiques dus à l'accumulation de ces molécules dans des tissus qui ne sont pas impliqués dans la maladie. Ainsi que leur dégradation au cours de leur acheminement vers leur cible thérapeutique. En parallèle, Les nouvelles méthodes de haut « *screening* », ainsi que l'extraction des plantes médicinales aboutissent à la découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique mais pour la plupart d'entre elles ont une faible solubilité aqueuse.

Afin de surmonter toutes ces limitations, les chercheurs ont développé des systèmes de délivrance des médicaments (SDM) qui sont capables d'optimiser les qualités fondamentales de tout médicament : modulation de leur durée d'action, amélioration de leur biodisponibilité, maîtrise du moment et/ou du lieu de leur effet, amélioration de leur rapport bénéfice/risque via une distribution plus favorable dans l'organisme et une meilleure observance du traitement. En outre, les SDM permettent d'atteindre d'autres objectifs, tels que la protection des substances encapsulées qui sont sensibles à la lumière, l'humidité, la chaleur ou l'oxygène ou encore la protection de ces substances contre la dégradation enzymatique et le pH acide lors de leur transport dans l'organisme. Grâce à ces systèmes, l'industrie pharmaceutique y trouve une issue lui permettant de donner un nouveau souffle à des médicaments préexistants [1].

L'essor considérable de ce domaine a permis de proposer différents types de SDM destinés à plusieurs voies d'administration (voie orale, voie cutanée, voie parentérale, voie transdermiques, voie pulmonaire et voies muqueuse) comme les complexes d'inclusion (CI) de cyclodextrines (CDs), les hydrogels, les liposomes, les microparticules et les nanoparticules [2].

Dans le domaine pharmaceutique, l'utilisation des systèmes nanoparticulaires composés de polymères suscite d'immenses espoirs pour développer de nouvelles formulations innovatrices.

L'intérêt pour les polymères, et plus particulièrement les biopolymères repose sur leur biodégradabilité, leur très grande diversité de composition, d'architecture et de fonctionnalisation, leur non-toxicité et biocompatibilité pour nombre d'entre eux [3]. Parmi

les biopolymères les plus utilisés pour le développement de nanoparticules pour la délivrance de principes actifs, nous pouvons citer le chitosane (CS) et l'alginate de sodium (NaAL) [4].

Dans notre étude, deux principes actifs ont été choisis : l'ibuprofène et le métronidazole pour être encapsuler dans des systèmes nanopolymériques destinés à la voie orale.

L'ibuprofène (IBP) est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) parmi les plus prescrits mais qui présente une faible solubilité aqueuse et une courte durée de demi-vie. En outre, Il présente plusieurs effets indésirables, le plus fréquent est l'apparition de troubles digestifs pouvant aller jusqu'à la formation d'ulcères [5,6].

Le métronidazole (MTZ) est un antibiotique et antiparasitaire qui constitue une molécule de premier choix dans le traitement des différentes infections [7–9]. Cependant, Il est peu soluble dans les milieux aqueux [7,9–11] et il présente des propriétés mutagènes et génotoxiques confirmées chez l'être humain ainsi que chez les animaux de laboratoire. Le MTZ a prouvé sa cancérogénicité chez les animaux de laboratoire et pourrait avoir des effets cancérigènes chez l'être humain [12].

L'introduction de ces deux PA dans des systèmes de délivrance nanopolymérique permet d'améliorer leur biodisponibilité, de moduler leur durée d'action et de diminuer les prises journalières et par conséquent minimiser leurs effets secondaires et favoriser l'observance des patients.

Dans ce contexte deux systèmes différents de nanoparticules biopolymère destinées à la voie orale ont été développés pour chaque PA.

Le premier système consiste à encapsuler l'ibuprofène dans des nanoparticules à base d'alginate de sodium et du chitosane pour former un complexe de polyélectrolyte.

Le système de délivrance du MTZ est constitué de deux systèmes de délivrance mixtes. En premier, nous avons étudié la formation des complexes d'inclusion du MTZ avec deux types de CDs afin de choisir le meilleur complexe pour être encapsulé par la suite dans des nanoparticules à base du CS.

Ce manuscrit s'articule en trois grandes parties constituées de sept chapitres :

La **première partie** de ce manuscrit présente une synthèse bibliographique incluant trois chapitres. Dans le **premier chapitre** nous présentons le concept de systèmes de délivrance des médicaments. Nous décrivons ensuite les deux modèles de PA étudiés dans ce travail :

l'ibuprofène et le métronidazole et l'état d'avancement de la recherche en matière d'encapsulation. Le **chapitre 2** présente un aperçu sur l'intérêt de l'utilisation des CDs pour l'encapsulation moléculaire des substances actives. La préparation et la caractérisation des complexes d'inclusion en solution et en phase solide sont également décrites dans ce chapitre.

Le **chapitre 3** porte sur l'importance des nanoparticules polymères (NPs) comme vecteur des substances actives ainsi que leurs méthodes de préparation et caractérisation, en développant la technique ionique gélation comme technique prometteuse. Nous présentons également dans ce chapitre le chitosane et l'alginate de sodium en tant que deux biopolymères largement utilisés dans la synthèse des nanoparticules polymères.

La **deuxième partie** développe la stratégie de travail que nous avons suivi. La préparation et la caractérisation des nanoparticules chargées d'ibuprofène à base de l'alginate de sodium et de chitosane ainsi que l'évaluation de leur activité biologique faisant l'objet du **chapitre 4**. Dans le **chapitre 5** nous avons étudié l'inclusion du métronidazole avec deux types de CDs ainsi que leur activité antibactérienne afin de choisir le meilleur complexe pour la formation et la caractérisation des NPs à base du chitosane.

La **troisième partie** s'intéresse aux résultats obtenus et à leur discussion pour les nanoparticules polymères chargées d'ibuprofène abordés dans le **chapitre 6** et les nanoparticules polymères chargées de métronidazole sous forme d'un complexe d'inclusion discutés dans le **chapitre 7**.

Ce manuscrit s'achève par une conclusion générale et perspective.

PARTIE 1

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

SYSTÈMES DE DÉLIVRANCE DES MÉDICAMENTS

1.1 Définition d'un système de délivrance de médicament

Un système de délivrance des médicaments (SDM) est plus connu sous l'acronyme anglais DDS (*drug delivery system*) alors que la dénomination exacte devrait être : « système de délivrance des substances actives ». En réalité, ce que délivrent exactement les SDM est un ou plusieurs PA et non un médicament (entité contenant généralement une ou plusieurs molécules, un ou plusieurs excipients et un conditionnement). Malgré cette dénomination limitée c'est le sigle SDM qui a été retenu [1].

Le SDM est défini comme tout système, tout dispositif ou toute forme capable d'améliorer le rapport bénéfice/risque d'un médicament en maîtrisant la vitesse, le moment et/ou le site de la libération dans l'organisme d'une molécule pharmacologiquement active, ce qui favorise l'observance des patients. Le domaine d'application de SDM est très étendu, ils font partie d'un certain nombre de dispositifs médicaux ainsi que pratiquement toutes les formes d'administration des médicaments sauf, notamment, les gélules simples, les comprimés simples et les solutions injectables, formes dites parfois conventionnelles [1].

Dans la littérature, différents types de SDM ont été développés, tels que les liposomes, les complexes d'inclusion de cyclodextrines, les microparticules et les nanoparticules. En raison de la grande diversité et la complexité de ces systèmes, seuls les deux types appliqués dans cette thèse (les complexes d'inclusion de cyclodextrines et les nanoparticules polymères) seront présentés dans les deux chapitres qui suivent, ainsi que leurs méthodes de préparations et de caractérisation.

1.2 Systèmes à libération modifiée

1.2.1 La libération accélérée

Les préparations à libération accélérée sont des systèmes dont la vitesse de libération de la molécule active est plus précoce que celle de la forme à libération conventionnelle destinée à la même voie d'administration. Cette accélération peut être obtenue en augmentant la vitesse de désagrégation, ce qui offre une absorption sans délai du PA conduisant à une action pharmacologique rapide, ces préparations s'adressent

notamment à certains PA, tels que les antalgiques, pour lesquels il est souhaitable une action aussi rapide que possible. Les comprimés effervescents, orodispersibles, solubles, dispersibles ou les lyophilisats oraux en sont de bons exemples [13].

1.2.2 La libération prolongée

Dans ce type de préparation, la vitesse de libération de la substance active est plus lente que celle de la libération immédiate ou elle peut être contrôlée, programmée, ou soutenue. La libération peut être prolongée en introduisant le PA au sein d'un système ou une matrice à partir de laquelle le PA sera libéré lentement. La libération prolongée peut présenter un profil de libération d'ordre cinétique zéro, indépendant du temps avec une concentration plasmatique efficace constante pendant une longue durée. Ce profil de libération contrôlée avec une vitesse de libération qui compenserait l'élimination correspondrait au cas « profil idéal » recherché, servant à réduire les prises journalières, diminuer les effets indésirables par suppression des pics plasmatiques et à améliorer l'observance des patients (Figure 1.1) [13–15].

1.2.3 La libération retardée

Les formes à libération retardée ou appelée souvent « formes retard » sont des préparations dans lesquelles la libération du PA est retardée dans le temps ou l'espace par rapport à la libération immédiate, le profil plasmatique est déplacé vers la droite. Les systèmes retards sont conçus généralement pour maîtriser le lieu et/ou le moment de libération permettant de protéger les muqueuses intestinales et aux substances actives de parvenir intactes où l'absorption demeure possible en les protégeant contre la dégradation sous pH acide ou encore l'action de certaines enzymes. Les formes à libération retardée comprennent majoritairement les préparations de formes gastro-résistantes (Figure 1.1) [13].

1.2.4 La libération séquentielle

La libération du PA peut être répétée ou séquentialisée avec un profil plasmatique présentant plusieurs courbes de concentration plasmatique conventionnelles qui se succèdent le plus souvent pour obtenir un effet prolongé (Figure 1.1) [13].

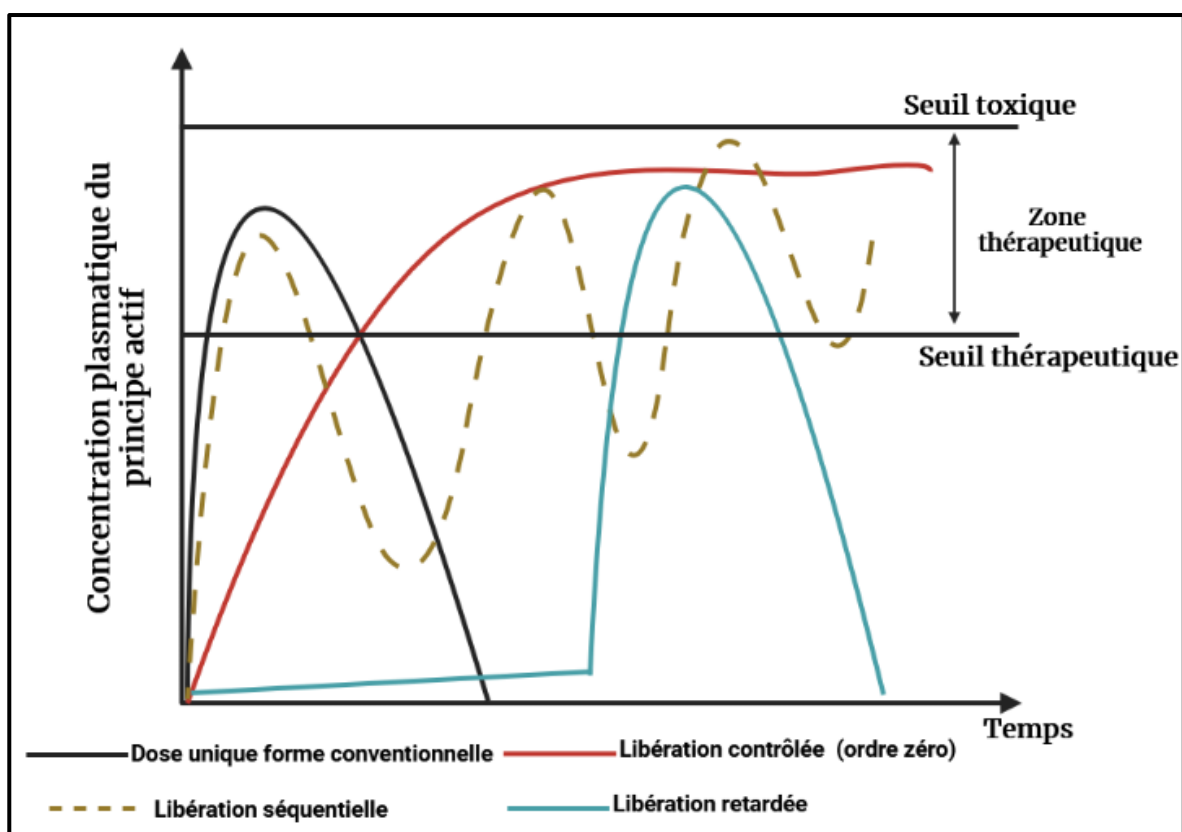


Figure 1. 1 : Différents profils des concentrations plasmatiques des PA (Image créée sur BioRender).

Dans notre étude, deux PA ont été choisis comme modèle pour les introduire dans des SDM : l'ibuprofène et le métronidazole.

1.3 L'ibuprofène

L'ibuprofène (IBP) ou l'acide 2-[4-(2 méthylpropyl)phényl] propanoïque est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) connu pour ses propriétés antipyrétiques et analgésiques appartient au groupe des acides de type 2-arylpropanoïque. L'ibuprofène est un PA hydrophobe constitué d'un seul groupement fonctionnel hydrophile (-COOH) et une partie hydrophobe (hydrocarbonée inerte), de par la présence d'un cycle aromatique (Figure 1.2) [5,6].

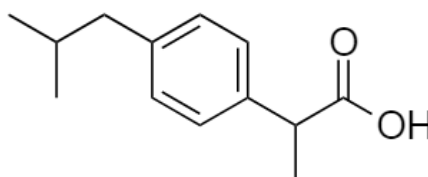


Figure 1. 2 : Structure chimique de l'ibuprofène (Chemdraw ultra 7.0).

L'IBP est un inhibiteur non sélectif d'une enzyme appelée cyclooxygénase (COX) qui existe sous deux iso-formes COX1 (constitutive) et COX2 (inductible). La réaction inflammatoire stimule la synthèse des prostaglandines qui se fait en deux étapes. D'abord, les phospholipides membranaires sont hydrolysés en acide arachidonique par l'enzyme phospholipase A2. Ensuite, l'acide arachidonique est métabolisé en prostaglandines par les cyclo-oxygénases, l'action de l'IBP se situe à ce niveau, en bloquant la synthèse de prostaglandines par l'inhibition non sélective de cyclo-oxygénases ce qui atténue les réponses inflammatoires (Figure 1.3) [5,6,16].

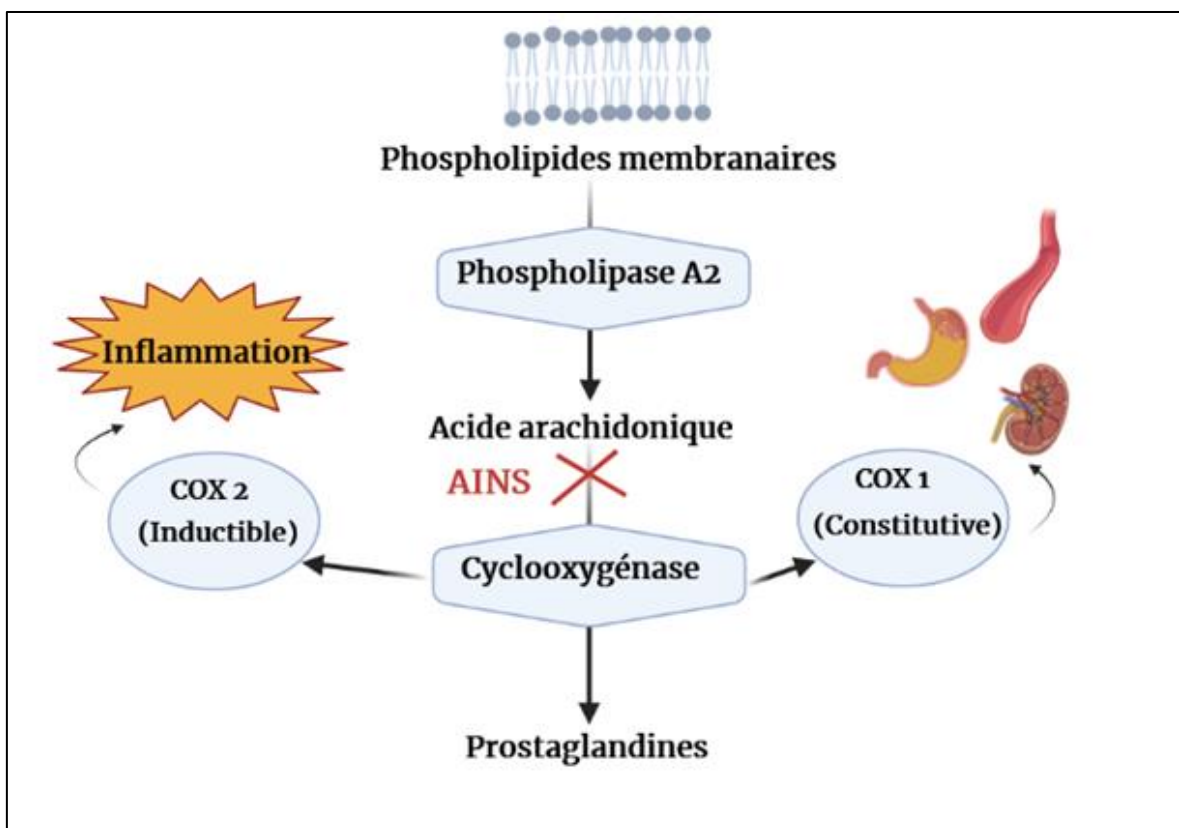


Figure 1. 3: Mécanisme d'action des AINS non sélectifs (Image créée sur BioRender).

L'IBP présente une courte durée de demi-vie ($T_{1/2}$) (1,5-3h) et un temps de concentration maximale (T_{max}) de 1,5h ce qui conduit à une administration répétée. Les surdoses massives de l'IBP peuvent entraîner des effets toxiques graves. De divers signes cliniques sont associés à l'ingestion de très fortes doses de ce médicament, à savoir une hémorragie gastro-intestinale, une insuffisance rénale aiguë, des problèmes respiratoires, une dépression du système nerveux central, une toxicité hépatique, une hypothermie et une thrombopénie [5].

Du fait de sa faible solubilité aqueuse et ses propriétés pharmacologiques limitées (T_{\max} et la courte durée de $T_{1/2}$), l'introduction de l'IBP dans un SDM est recommandée pour surmonter à la fois les sous-dosages conduisant à une faible biodisponibilité et les surdosages engendrant une toxicité.

Dans la littérature, de nombreux SDM chargés d'ibuprofène ont été développés. Reis et al ont préparé des NPs chargées d'IBP à base du poly (DL-lactic acid) en utilisant la technique émulsion-diffusion de solvant, les NPs obtenues ont montré une taille de $281,1 \pm 66,7$ nm et une diminution de la toxicité gastrique par rapport à l'IBP libre dû à sa libération contrôlée à partir de ces NPs. [17]. D'autre part, Balleño et al ont porté un intérêt aux nanoparticules de poly (éthyle cyanoacrylate) chargées d'IBP synthétisées par polymérisation de l'éthyle cyanoacrylate, ces NPs ont libéré la majorité du PA dans les premières 80–120 min. L'analyse des données du profil de libération a montré que sa libération suit le modèle de Weibull [18]. Jiang et al ont proposé un système nanopolymérique d'IBP à base du DEAE dextran, les nanoparticules ont présenté une taille de 120 nm. L'étude de libération dans les milieux de dissolution à pH 1,0, 5,8 et 7,4 a montré que les NPs libèrent respectivement 60, 80 et 90% du PA [19].

1.4 Le métronidazole

Le métronidazole (MTZ) [1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl 5-nitroimidazole] (Figure 1.4) est l'un des antibiotiques phares de la famille des nitro-5-imidazolés. Lors de sa découverte, il a prouvé son efficacité contre *Trichomonas vaginalis*. Actuellement, il est prescrit pour traiter différents infections causées par différents microorganismes [7–9].

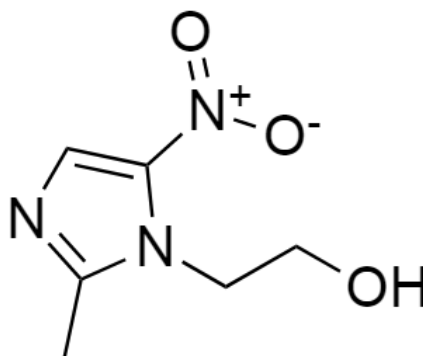


Figure 1. 4 : Structure chimique du métronidazole (Chemdraw ultra 7.0).

Le MTZ est un PA inactif qui doit subir une étape d'activation par réduction pour entraîner des dommages ou fragmentation de l'ADN du micro-organisme ciblé par un

mécanisme encore mal connu (Figure 1.5). Brièvement, après pénétration dans la cellule de la bactérie ou la parasite, les groupements nitro du MTZ ($-NO_2$) subissent une réduction par une enzyme appelée nitroréductases qui est classée en deux groupes selon la présence ou non de l'oxygène [20,21] :

Les nitroréductases sensibles à l'oxygène : dont la réduction du groupement nitro se fait en un seul transfert électronique. Le pyruvate est converti en acetyl-coenzymeA par l'enzyme pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (PFOR), conduisant à la formation des radicaux nitroso et par conséquent des dommages de l'ADN et la mort cellulaire.

Les nitroréductases insensibles à l'oxygène : dont la réduction du groupement nitro conduit à la formation de dérivés hydroxylamino ou amino en fonction de co-facteurs NAD(P)H entraînant des dommages oxydatifs et la mort cellulaire.

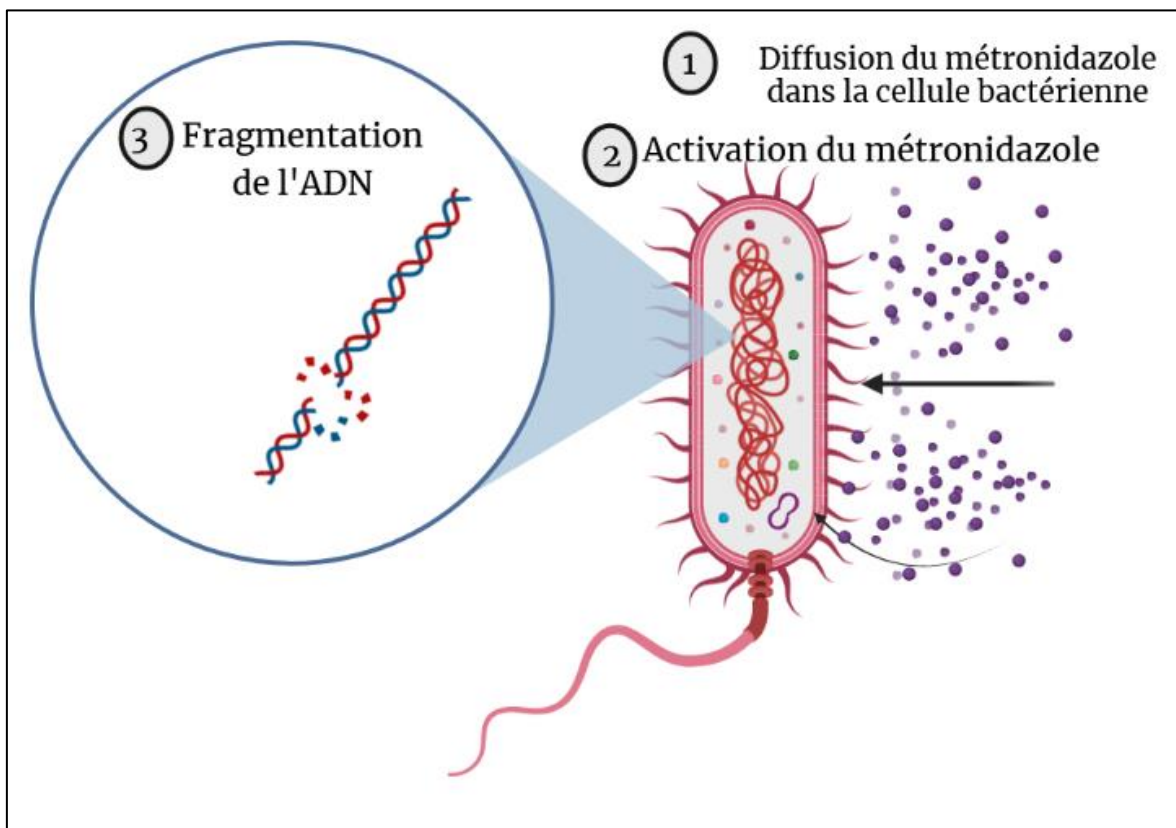


Figure 1. 5 : Mécanisme d'action du métronidazole (Image créée sur BioRender).

Le MTZ est largement administré par voie orale, mais il existe sous d'autres formes : parentérale, topique et vaginale. La faible solubilité aqueuse du MTZ limite son utilisation pour les formulations aqueuses [7,9–11].

L'apparition de bactéries multirésistantes a mené les prescripteurs à augmenter les durées de traitement et les posologies des antibiotiques. Le MTZ est également concerné par ces résistances bactériennes et parasitaires ce qui implique une modification de son schéma posologique habituel et par conséquent favorise la survenue d'effets indésirables et diminue l'observance des patients.

Le MTZ présente des propriétés mutagènes et génotoxiques confirmées chez l'être humain ainsi que chez les animaux de laboratoire. Il a prouvé sa cancérogénicité chez les animaux de laboratoire et pourrait avoir des effets cancérigènes chez l'être humain [12]. Une deuxième génération de 5-nitroimidazoles constituée de trois nouveaux composés (le secnidazole, l'ornidazole et le tinidazole) a été synthétisée et commercialisée avec un spectre d'action commun avec le MTZ [22–24]. Cette génération présente une demi-vie d'élimination plus longue que le métronidazole permettant de réduire la durée du traitement. Le secnidazole et le tinidazole ne sont commercialisés que par voie orale et ils ont une demi-vie respectivement de 19 et de 12,5h *versus* 8h pour le métronidazole, autorisant une seule administration journalière par rapport à trois prises par jour pour le métronidazole [22,25]. L'ornidazole est le seul composé de cette deuxième génération à exister sous forme injectable. Il a également une demi-vie d'élimination plus longue que le MTZ (14,4 h *versus* 8h), permettant une seule perfusion intraveineuse par jour alors que le MTZ nécessite trois injections par jour [26,27]. Cependant, l'efficacité ainsi que le profil de tolérance et la disponibilité de la forme injectable du MTZ par rapport aux autres 5-nitroimidazoles en font la molécule de choix dans le traitement des infections [28].

Afin de pallier les problématiques de résistance, de solubilité aqueuse, ainsi que les effets toxiques il est recommandé d'introduire le MTZ dans un SDM.

Plusieurs études ont utilisé le MTZ comme un PA modèle pour développer de nouveaux SDM, parmi elles ; on trouve les complexes d'inclusion de CDs pour augmenter sa solubilité et sa stabilité [11,29,30]. D'autres ont utilisé les NPs comme dispositif incorporant le MTZ dans le but de moduler sa vitesse de libération [31,32]. Cependant, des études limitées utilisent les systèmes de délivrance mixtes encapsulant les complexes d'inclusion (substance active-CD) dans des nanostructures comme dans le domaine pharmaceutique [7,33–35], les huiles essentielles [36], domaine agroalimentaire [37], les arômes et les saveurs telles la vanilline [38] et le menthol [39]. Tous ces systèmes développés ont montré une solubilité élevée tout en contrôlant leur libération, une durée de conservation longue, une stabilité à des températures très élevées.

CHAPITRE II

LES CYCLODEXTRINES

2.1 Généralités

En 1891, Villiers était le premier qui a rapporté l'obtention de 3 g de substance cristalline à partir d'une fermentation d'1 kg d'amidon de pomme de terre par les bactéries *Bacillus amylobacter*, qu'il nomme «cellulosine» vu la similarité de ses propriétés physico-chimique avec celles de la cellulose, notamment la résistance à l'hydrolyse acide et propriétés non réductrices [40]. 15 ans plus tard, Schardinger a isolé la souche bactérienne *Bacillus macerans* capable de produire d'une façon reproductible deux substances cristallines distinctes nommés après α - et β -dextrine sous l'action de l'enzyme cyclodextrine glucosyl transférase (CGTase). De nos jours, cette souche bactérienne reste la source d'enzyme la plus utilisée [41,42]. En 1930, Freudenberg et son équipe étudient la structure de l' α - et la β -dextrine. Ils ont montré qu'elles ont une structure cyclique composée d'unités de glucose reliées par des liaisons glycosidiques α -(1-4) dans une conformation 4C_1 [43]. C'est cette même équipe qui découvre et élucide, en 1948, la structure de la γ -cyclodextrine (constituée de 8 unités glucose) [44]. En 1954, Cramer était attiré par leur capacité à former des complexes d'inclusion [45], alors qu'en 1957, Le groupe de French s'intéressait à la production des CDs ayant un nombre plus important d'unités de glucose [46]. Toutefois, le brevet de Freudenberg, Cramer, et Plieninger déposé en 1953 reste la révolution dans le monde des CDs [47]. Ils ont démontré que la complexation avec les dextrines protège les molécules sensibles contre l'oxydation et augmente considérablement la solubilité.

2.2 Structure et caractéristiques physicochimiques des cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités α -D-glucopyranose en conformation chaise, reliées par des liaisons glycosidiques de type α -(1-4), ce qui leur confèrent une structure tridimensionnelle sous une forme d'un cône tronqué avec deux extrémités ouvertes [48–51], délimitant une cavité centrale (surface de contact avec la molécule invitée) tapissée par des squelettes carbonés et des liaisons d'éther des résidus glucoside et est dotée d'un environnement relativement hydrophobe. L'extérieure de la cavité (surface de contact avec le solvant) est garni par des groupements hydroxyles conférant une hydrophilie relative aux CDs [50,52,53]. Les deux zones de

polarité distinctes confèrent aux CDs un caractère particulier dit « amphiphile ». Cette propriété associée à leur structure tridimensionnelle leur permet de jouer le rôle d'une molécule cage et inclure entièrement ou partiellement des molécules hydrophobes dans leur cavité, il en résulte la formation d'un complexe d'inclusion.

Les CDs natives peuvent être constituées de 6 jusqu'à 13 unités de α -D-glucopyranose [54]. Les plus rencontrées sont dénommées α -, β - et γ -CD constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités de α -D-glucopyranose, qui sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Elles ont l'avantage d'être des produits biodégradables, biocompatibles, et non nocifs pour la santé humaine et sont autorisées par l'industrie agroalimentaire comme additifs alimentaires [52,55]. Les CDs sont fabriqués industriellement à la suite d'une dégradation enzymatique de l'amylose par la CGTase d'origine bactérienne (*Bacillus macerans*, *Alkalophylic bacillus*,...) [56,57]. Les principales propriétés physico-chimiques des CDs natives sont décrites dans le Tableau 2.1.

Tableau 2. 1: Propriété physico-chimique et structural de α -, β - et γ -cyclodextrine [52,58].

Propriétés	α - cyclodextrine	β - cyclodextrine	γ - cyclodextrine
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Formule brute	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
Masse moléculaire	972	1135	1297
Diamètre de la cavité (nm)	0,57	0,78	0,95
Diamètre de la périphérie (nm)	1,37	1,53	1,69
Hauteur du cône (nm)	0,79 \pm 0,1	0,79 \pm 0,1	0,79 \pm 0,1
Solubilité dans l'eau à 25 °C (g L ⁻¹)	145	18,5	232

La masse molaire, le diamètre externe, le volume et le diamètre de la cavité augmentent en allant de l' α -CD à la γ -CD. Tandis que la hauteur du cône est la même pour les trois CDs (0,78 nm). En revanche la solubilité aqueuse varie d'une manière moins régulière. Il est à noter que la β -cyclodextrine (BCD) possède la plus faible solubilité aqueuse en comparaison à celles de l' α - et de la γ -CD. Ceci peut s'expliquer par l'intensité des liaisons hydrogènes établies entre les groupes hydroxyles secondaires (2-OH) et (3-OH) des entités glucoses voisines. Ces liaisons forment une ceinture complète de liaisons hydrogène qui lui confère une structure rigide et stable et prévient l'hydratation par les molécules d'eau [59]. Dans le cas de l' α -CD l'une de ces unités de glucose est distordue,

donc il y a seulement quatre liaisons hydrogènes établies au lieu de six. Pour la γ -CD, ces unités de glucopyranose ne sont pas coplanaires, par conséquent, peu d'interactions entre les hydroxyles secondaires se forment, rendant sa structure plus flexible et explique sa grande solubilité par rapport à celles des deux autres CDs [60]. Toutefois, la BCD reste la plus intéressante du point de vue complexation, il existe de nombreuses formes pharmaceutiques commercialisées utilisant le complexe d'inclusion de BCD incorporant des PA [61].

2.3 Les cyclodextrines modifiées

Dans le but d'élargir les applications des CDs natives, de nombreux dérivés ont été synthétisés. Les principaux objectifs de la synthèse des dérivés de CDs sont [62,63]: *a)* Augmenter leur solubilité aqueuse notamment dans le cas de la BCD. *b)* Accroître la capacité de complexation. *c)* Inclure des groupements spécifiques facilitant la complexation. *d)* Améliorer leur affinité pour une molécule donnée. *e)* Synthétiser des polymères. *f)* Améliorer la stabilité des complexes formés. *g)* Apporter de nouvelles propriétés telles que l'introduction de chromophores ou de motifs fluorescents.

La BCD (Figure 2.1) est la plus ciblée par les modifications, les dérivés les plus utilisés sont ceux obtenus par substitution des groupements hydroxyles primaire ou secondaire [51]. Dans le domaine pharmaceutique nous rencontrons fréquemment des dérivés de type hydroxypropyle (HP), méthyle (ME) et sulfobutyle (SBE) [50,64].

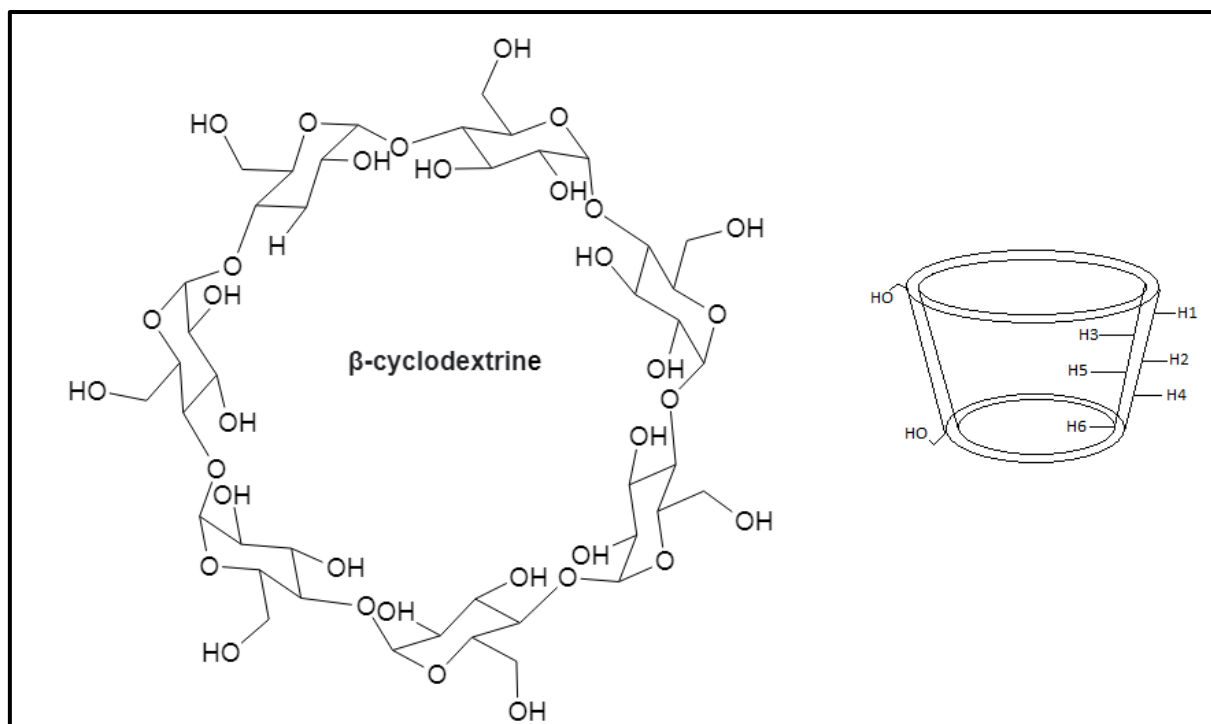


Figure 2. 1 : Structures chimiques de la β -cyclodextrine (Chemdraw ultra 7.0).

2.3.1 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPBCD)

L'HPBCD (Figure 2.2) est un dérivé hydrophile obtenu par une modification chimique de la BCD dans un milieu alcalin par l'oxyde de propylène [65].

L'HPBCD présente une solubilité aqueuse très importante par rapport à celle des CDs natives et leur dérivés (solubilité dans l'eau = 500 mg mL^{-1} à $25 \text{ }^\circ\text{C}$) [65,66] et une taille identique à celle de la BCD (Tableau 2.1). L'HPBCD est très bien tolérée chez l'homme, elle a démontré une faible toxicité, dépendant de la dose ainsi que la voie d'administration avec la diarrhée comme principal effet secondaire observé chez l'homme [67].

En raison de sa faible toxicité et sa solubilité aqueuse élevée l'HPBCD présente un large intérêt dans le domaine pharmaceutique [68]. Parmi les différents dérivés synthétisés, seul l'HPBCD a sa propre monographie dans la pharmacopée européenne, pharmacopée britannique et *United states pharmacopée/ National Formulary* (USP -NF). L'HPBCD est considérée comme l'excipient le plus polyvalent parmi les CDs, elle est introduite dans différentes formulations destinées à plusieurs voies d'administration (orale, parentéral, rectal, oculaire et cutanée) [69].

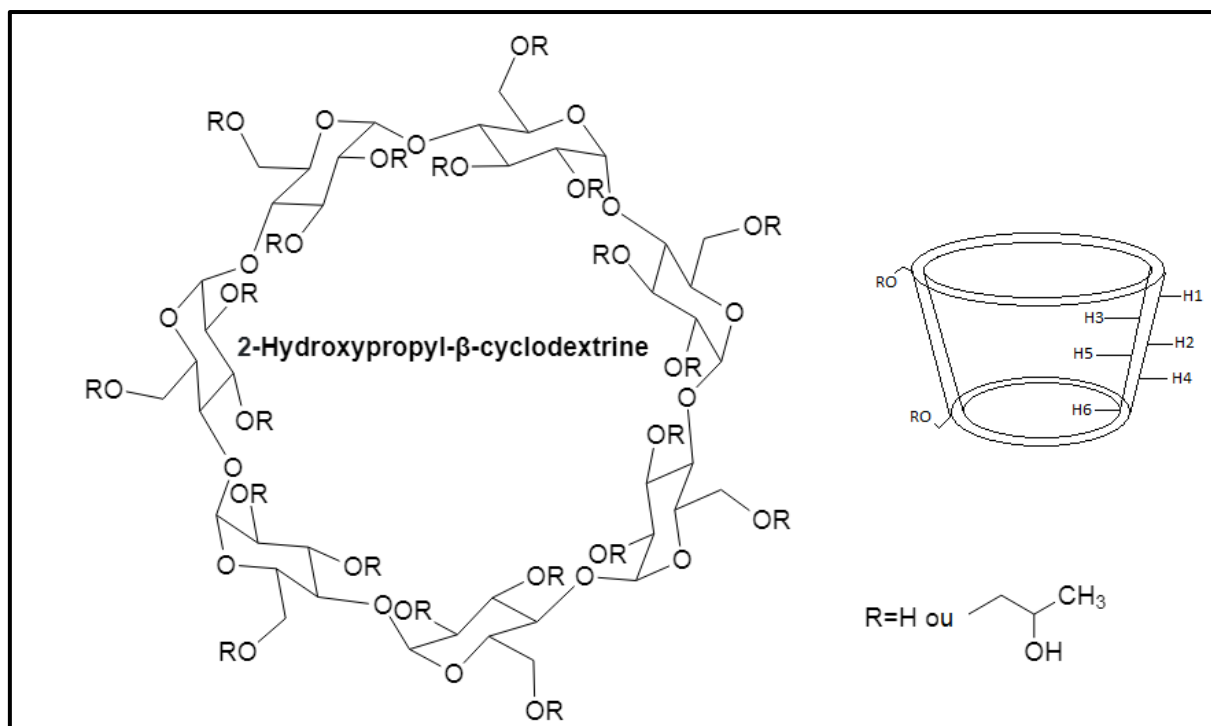


Figure 2. 2: Structures chimiques de la 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrine (Chemdraw ultra 7.0).

2.4 Formation de complexe d'inclusion

Grace à leur structure, les CDs peuvent accueillir dans leur cavité interne de façon réversible, partiellement ou en totalité de diverses classes de composés pour former un complexe d'inclusion. En solution, la cavité apolaire de la CD est occupée par des molécules d'eau, ce qui rend le système énergétiquement défavorable du fait des interactions polaire – apolaire. En présence d'une molécule appropriée, moins polaires que l'eau, les molécules d'eau vont être déplacées vers l'extérieur de la cavité pour céder la place à l'invité (Figure 2.3). Une fois dans la cavité, la molécule invitée forme des interactions de différentes nature comme les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène et les interactions de type Van der Waals avec la CD, stabilisant le système. Durant la formation du complexe d'inclusion, il n'y a aucune liaison covalente qui se forme ou se rompt, ce qui rend la réversibilité du système possible [63,70–72].

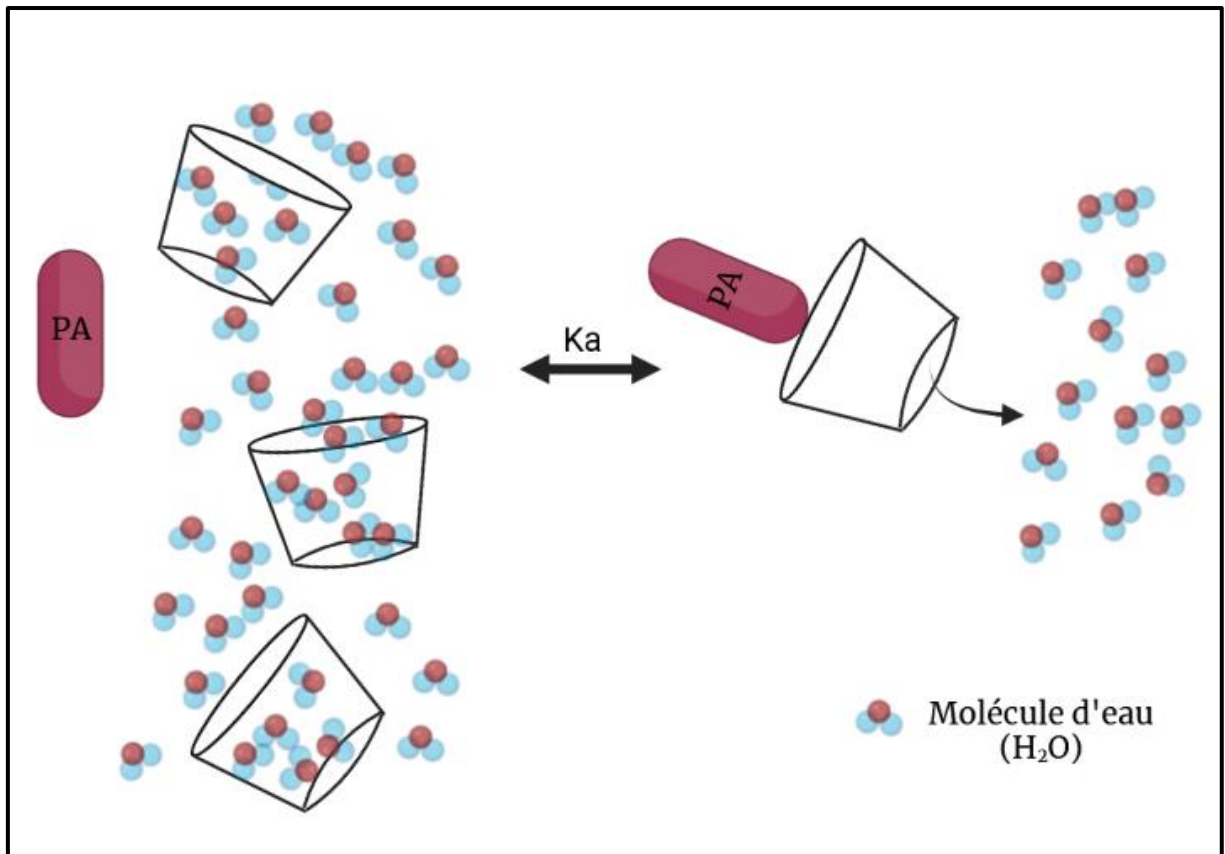


Figure 2.3 : Mécanisme de formation du complexe d'inclusion (Image créée sur BioRender).

La compatibilité géométrique entre la CD et la molécule invitée s'avère primordiale pour le mécanisme de formation du complexe d'inclusion. En effet, des invités de taille importante ne peuvent s'insérer dans la cavité centrale, même de façon partielle, ils ne peuvent pas former des complexes d'inclusion stables. Il en est de même pour les invités de petite taille qui pourront s'insérer dans la cavité parce que les CDs ne pourront pas les maintenir dedans du fait des faibles interactions formées entre eux.

Durant la formation du complexe d'inclusion, il est possible qu'une ou plusieurs molécules de CD mobilisent une ou plusieurs molécules invitées. On parle alors de la stœchiométrie, le cas le plus fréquemment rencontré est l'obtention d'un complexe hôte/invité de stœchiométrie 1:1, d'autres structures et association plus compliquées peuvent être obtenues avec différentes stœchiométries telles que (2:1, 1:2, 2:2), en faisant apparaître, dans l'ordre hôte:invité (Figure 2.4) [73–77].

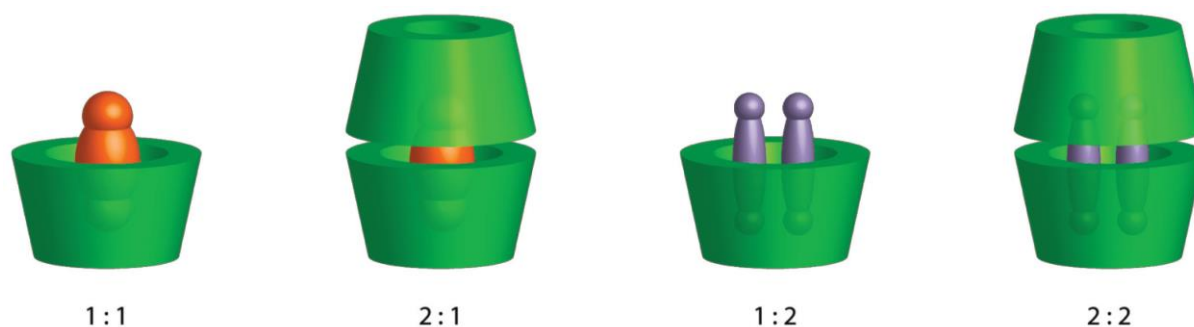


Figure 2. 4: Représentation des différentes stœchiométries des complexes d'inclusion [73].

2.5 Les techniques de préparation des complexes d'inclusion CD/invité

Diverses techniques de préparation de complexes d'inclusion ont été proposées. Le choix de la méthode de préparation est basé sur les applications envisagées et les propriétés physico-chimiques de la molécule invitée. La préparation des complexes d'inclusion peut s'effectuer en milieu solide ou liquide en allant des simples méthodes de laboratoire jusqu'à l'échelle industrielle. Le principe de la préparation consiste généralement à dissoudre l'invité en présence de la CD puis laisser un équilibre s'établir. Le complexe sera par la suite récupéré sous forme solide [51,63,78]. Les techniques souvent utilisées sont les suivantes :

2.5.1 L'inclusion par co-précipitation (cristallisation de la solution)

Cette technique est l'une des premières techniques inventées pour la formation des complexes, et reste largement utilisée au niveau des laboratoires. Une solution de CD est agitée à une température qui peut aller jusqu'à 60°C (si l'invité tolère), l'invité sera ajouté au cours de l'agitation. Un refroidissement lent lors de l'agitation de la solution CD: invité permet la co-précipitation du complexe. Le précipité est ensuite récupéré par filtration, décantation ou centrifugation et rincer par la suite dans le but d'enlever l'excès d'invité non incorporé. Cette technique est simple et facile à réaliser, elle ne demande qu'un bécher, agitateur et une source de chaleur. Cependant, elle est difficile à extrapoler à grande échelle (*scaling-up*) notamment pour les grandes quantités d'eau utilisées. Toutefois, elle peut être utilisée comme étude préliminaire à petite échelle pour vérifier la faisabilité de la complexation, la caractérisation du complexe et leur application et fonctionnalités [79].

2.5.2 L'inclusion par pétrissage (*paste/kneading*)

Cette technique consiste à préparer une pâte en mélangeant la CD et la molécule invitée en présence d'une petite quantité d'eau à l'aide d'un mortier et un pilon, ou un pétrisseur à l'échelle industrielle. Le temps de pétrissage nécessaire pour achever la complexation varie selon la molécule à incorporer, la quantité d'eau et le dispositif utilisé. Le complexe obtenu est séché directement, ou rincé avec de l'eau puis récupéré par filtration ou centrifugation. Cette technique est largement utilisée pour inclure les invités qui présentent une très faible solubilité dans l'eau, comme les huiles essentielles [80].

2.5.3 Solubilisation suivie par une lyophilisation (*freeze-drying*)

Cette méthode consiste en la dissolution des quantités requises de la CD et l'invité sous une agitation constante et la lyophilisation de la solution obtenue. La basse température utilisée pour le séchage est intéressante dans le cas des composés thermolabiles et/ou volatils [51,63,78,81].

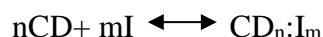
2.6 Caractérisation des complexes

L'étude des complexes d'inclusion s'appuie sur différentes étapes. La première étape est la détermination de la stœchiométrie du système formé. Après avoir défini la stœchiométrie du complexe, il faut étudier la constante d'association et les paramètres thermodynamiques qui reflètent la stabilité et les différentes forces d'interactions intervenantes durant l'inclusion. La dernière étape consiste à déterminer la géométrie du complexe ainsi que ces caractéristiques physico-chimiques. De nombreuses méthodes analytiques sont utilisées pour vérifier la réalité d'inclusion, étudier les propriétés physico-chimiques du complexe et pour mesurer les différents paramètres influençant le phénomène d'inclusion. Nous présentons par la suite les méthodes couramment employées pour caractériser les complexes d'inclusion en solution ainsi qu'à l'état solide.

2.6.1 Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue

La méthode de job ou la méthode de variation continue [82,83] est une méthode de titration simple et largement utilisée pour déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion de CDs. Le principe de cette technique est d'examiner l'évolution d'une propriété spectrale (déplacement chimique pour RMN [84], absorbance pour UV-Vis [82],

ou intensité pour fluorescence [85]) au cours d'une titration, tout en gardant la somme des concentrations en molécule invitée et en CD constante mais dont les proportions varient continuellement. Supposant que la formation du complexe implique n molécules de CD et m molécules à inclure (I), ceci sera décrit par :



$[\text{CD}] + [\text{I}]$: Constant

R : $[\text{I}] / ([\text{I}] + [\text{CD}])$ est la proportion molaire de la molécule invitée

En UV-Vis, la détermination de la stœchiométrie se fait par l'enregistrement d'une série de spectres d'absorption de l'invité, vu que les CDs ne présentent pas de chromophore, puis on suit la variation des spectres qui doivent se déplacer en présence de CD

Soit :

$$\Delta\text{ABS} = \text{ABS}_I - \text{ABS}_{\text{Complexe}}$$

ABS_I : l'absorbance de l'invité libre

$\text{ABS}_{\text{Complexe}}$: l'absorbance de l'invité dans le système CD : Invité

La stœchiométrie d'un système est obtenue en rapportant $\Delta\text{ABS} \times R$ en fonction du R. En générale, le tracé de job ou la courbe obtenue est sous forme d'une cloche qui passe par un maximum, la valeur du R correspondante au maximum de la courbe donne la stœchiométrie (Figure 2.5). Par exemple, un maximum obtenu à $R=0,5$ indique que le complexe est d'ordre 1:1. Pour un complexe d'ordre 2:1, la courbe passe par un maximum correspondant à la valeur de $R=0,66$. Dans le cas où la courbe de job est centrée sur une valeur de $R=0,33$ le complexe formé est de type 1:2 [86]. En faisant apparaitre, dans l'ordre hôte : invité.

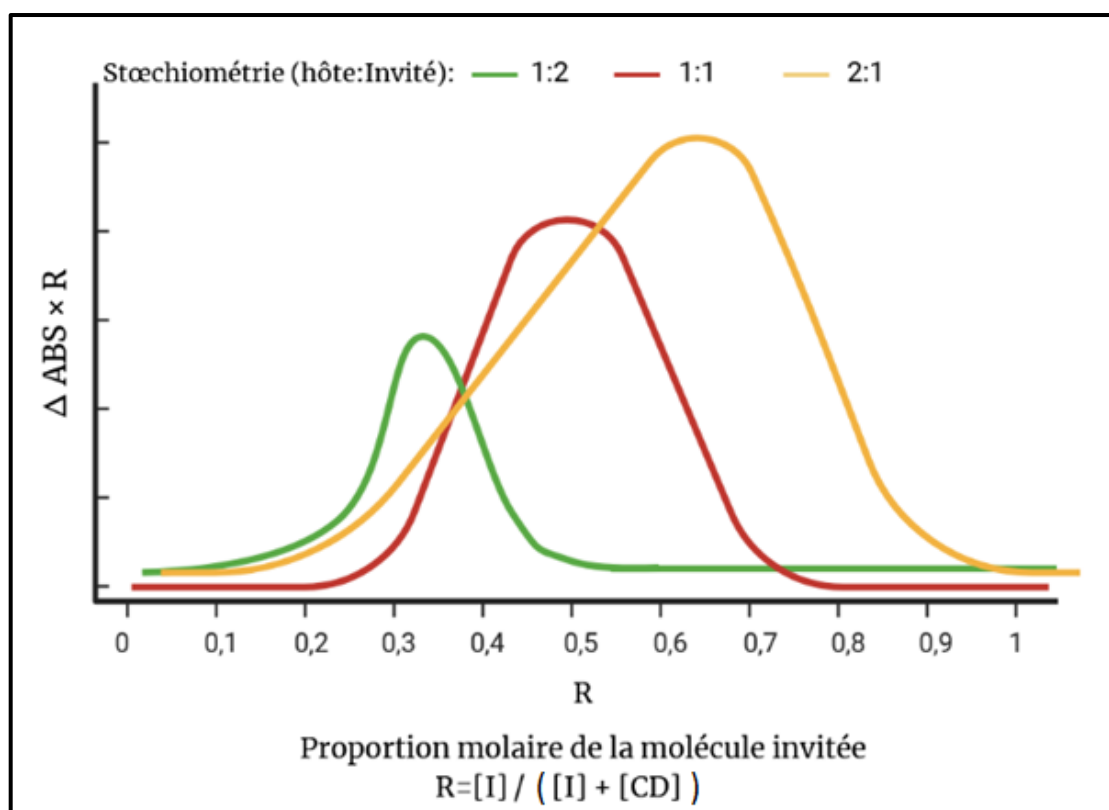


Figure 2. 5: Différentes courbes de job obtenues pour différentes stœchiométries (Image créée sur BioRender).

2.6.2 Détermination des constantes d'association et les paramètres thermodynamiques par UV-Visible

L'équilibre thermodynamique ou la stabilité des complexes est exprimée à une température donnée en termes de constante d'association ou de stabilité (K_a).

Il existe différentes approches pour déterminer les constantes d'association. La majorité de ces déterminations sont des approches graphiques qui s'appuient sur l'équation de double-réciproque déterminée pour la première fois par Benesi et Hildbrand [87]. Cette méthode repose sur le principe d'une titration qui consiste à préparer une série d'expériences dans lesquelles on augmente la concentration de la molécule hôte (molécule titrante) alors que celle de l'invité (molécule titrée) reste fixe. Au cours de cette titration il est possible de suivre les variations spectrales dues à la modification intrinsèque des propriétés des deux espèces suite à l'inclusion [86,88]. Cette variation peut être mesurée par l'une des méthodes analytiques. À titre d'exemple, la spectroscopie UV-Visible qui est la plus ancienne utilisée par Benesi et Hildbrand, dans laquelle l'étude de l'évolution de

l'absorbance de l'invité en présence de quantité croissante de CD permet alors d'avoir une relation linéaire entre l'absorbance et le K_a (Équation 2.1) :

$$\frac{1}{\Delta \text{ABS}} = \frac{1}{\Delta \varepsilon [\text{I}] K_a} \times \frac{1}{[\text{CD}]} + \frac{1}{\Delta \varepsilon [\text{I}]} \quad (2.1)$$

Avec :

ΔABS : différence dans l'absorbance de l'invité en présence et en absence de CD

$\Delta \varepsilon$: différence dans le coefficient d'extinction molaire

K_a : constante d'association

$[\text{CD}]$: concentration du CD

$[\text{I}]$: concentration de l'invité

En portant $1/\Delta \text{ABS}$ en fonction de $1/[\text{CD}]$, on obtient une droite de pente $(1/(\Delta \varepsilon [\text{I}] K_a))$ et d'ordonnée à l'origine $(1/\Delta \varepsilon [\text{I}])$. De ce fait, la constante K_a est acquise en divisant l'ordonnée à l'origine par la pente.

L'étude de la constante d'association en fonction de la température sert également à déterminer d'autres grandeurs thermodynamiques, comme la variation d'enthalpie (ΔH), la variation d'entropie (ΔS) ainsi que la variation de l'enthalpie libre (ΔG) à l'aide des équations de van't Hoff (Équation 2.2) et de Gibbs-Helmholtz (Équation 2.3)

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2.2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.3)$$

Où, T est la température absolue (K) et R est la constante molaire des gaz ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$).

2.6.3 Étude de phase de solubilité

Cette approche connue également sous le nom de méthode Higushi et Connors [89] est réalisée afin d'évaluer la capacité de CDs d'augmenter la solubilité des substrats hydrophobes. Elle permet en effet d'obtenir la courbe de solubilité de l'invité en mesurant sa concentration maximale qu'il peut atteindre en présence de CDs. Du point de vue expérimental, il s'agit de mettre des quantités égales (en excès) de l'invité dans des volumes fixes du solvant qui contiennent des concentrations croissantes de CD, à une température donnée, puis de filtrer les mélanges après agitation, et enfin de mesurer la quantité du composé solubilisé. Un diagramme de solubilité est donc établi, en rapportant

graphiquement la solubilité de l'invité en fonction de la concentration de CD. Deux types de diagramme sont généralement obtenus A et B (Figure 2.6).

Le diagramme de type A est obtenu lorsque la solubilité de la molécule invitée accroît d'une manière continue avec l'augmentation de la concentration en CD. La ligne marquée A_L décrit une augmentation linéaire de la solubilité sous l'augmentation de la concentration de CD. Le type A_P (diagramme positif) est obtenu lorsque l'addition des solutions de concentration croissante de CD aboutit à un plus fort accroissement de solubilité. Les diagrammes négatifs de type A_N sont rarement observés et leur interprétation est délicate [90].

Le diagramme de type B est généralement observé lorsque le complexe formé présente une solubilité limitée ou inférieure à celle de l'invité libre.

Le diagramme de type B se distingue par deux types de profils. Le profil B_s se divise en trois parties, la partie linéaire représente l'augmentation de la solubilité de l'invité en fonction de la concentration en CD où la solubilité de l'invité augmente avec l'augmentation de la concentration en CD, suivi d'un plateau où le complexe formé atteint sa solubilité maximale, au-delà l'ajout de CD diminue la solubilité et conduit à la précipitation du complexe.

Le profil B_I , désigne les diagrammes où la solubilité du complexe est inférieure à celle de l'invité libre [90].

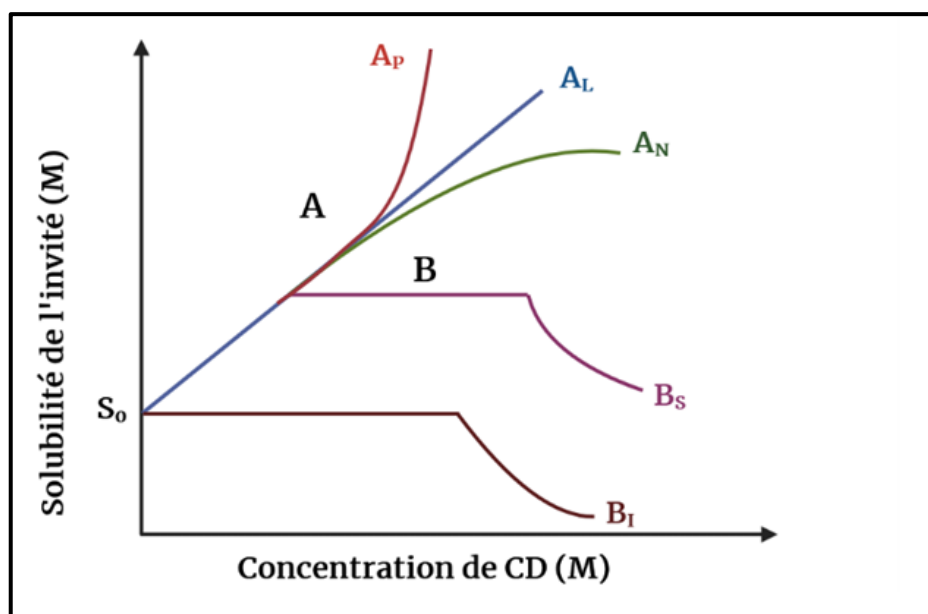


Figure 2. 6: Les classifications des diagrammes de solubilité selon Higuchi et Connors (Image créée sur BioRender).

Les diagrammes de solubilité de type A_L et la partie linéaire des diagrammes B_S permettent également à calculer l'efficacité de complexation (CE) selon l'équation suivante :

$$CE = \frac{\text{Pente}}{1 - \text{Pente}} \quad (2.4)$$

Ce paramètre sert à déterminer le rapport optimal invité:CD pour la formation de complexes selon la relation suivante :

$$\text{Invité:CD} = 1 : \left(\frac{CE+1}{CE} \right) \quad (2.5)$$

2.6.4 La résonance magnétique nucléaire du proton monodimensionnelle (^1H RMN)

La RMN est une technique performante et précise employée pour mettre en évidence la formation des complexes d'inclusion. L'exploitation de cette technique peut nous amener jusqu'à la détermination de la direction de pénétration de l'invité dans la cavité, ainsi que la conception de sa conformation spatiale et sa structure. En effet, le transfert de l'agent actif invité à l'intérieure de la cavité de la molécule cage induit systématiquement une variation dans l'environnement magnétique des protons intervenant dans le processus d'inclusion. Ceci s'exprime par une modification de la valeur de déplacement chimique (δ) de ces protons [91]. En effet, La modification de la fréquence de résonance des protons pointés vers l'intérieur de la cavité de la CD (H3 et H5) (Figures 2.1 et 2.2) témoigne de l'insertion de l'invité dans la cavité, et par conséquent à la formation du complexe. Tandis que, les protons externes (H1, H2 et H4) (Figures 2.1 et 2.2) restent inchangés et/ou présentent des changements faibles par rapport à ceux des protons internes. En outre, la molécule invitée présente quant à elle, des variations de résonance au niveau de ces protons [92].

2.6.5 RMN 2D ^1H - ^1H NOESY et ROESY

La RMN bidimensionnelle (2D) tel que les techniques NOESY (*nuclear overhauser effect spectroscopy*) et ROESY (*rotating frame overhauser effect spectroscopy*) fournit des informations importantes et très précises sur le mode d'inclusion à travers lesquelles on peut visualiser la structure tridimensionnelle du complexe [86,93,94]. L'inspection des données expérimentales permet de détecter la proximité spatiale entre les protons de l'hôte et ceux de l'invité, en se basant sur l'observation des taches de corrélations et les

interactions dipolaires qui se produisent lorsque deux protons de deux molécules sont proche à une distance inter- et intramoléculaires qui ne dépasse pas 4 Å [95].

2.6.6 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR est un outil rapide et direct pour étudier les complexes d'inclusion CD/invité à l'état solide. Cette technique permet de détecter les groupes fonctionnels impliqués dans le processus de complexation et la formation des liaisons hydrogènes en comparant les données spectroscopiques infrarouges de la molécule invitée et la CD, libres à ceux de leur complexe d'inclusion correspondant. Généralement les spectres des complexes d'inclusion sont similaires à celui de la CD en question, dans lesquels la majorité des pics caractéristiques de la molécule invitée ou de la partie incorporée dans la cavité de la CD auront disparu, déplacés ou subissent une réduction significative d'intensité [96]. Ces altérations sont indicatives de l'inclusion et sont relativement liées à la translocation de la molécule invitée à la cavité hydrophobe de la CD qui limite ses vibrations [97,98].

2.6.7 La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC est l'une des techniques thermo-analytiques utilisée pour étudier les transformations physiques et les caractéristiques thermiques d'une espèce libre ou plusieurs composants (complexe). Elle est employée dans plusieurs travaux de recherche pour la caractérisation des complexes d'inclusion à l'état solide, vu qu'elle est facile à mettre en œuvre et ne nécessite que de petites quantités d'échantillons.

Suite à l'incorporation de l'invité dans la cavité de la CD les propriétés thermiques de l'invité subissent plusieurs changements. Dans le cas où la CD s'associe avec une molécule qui se présente sous forme cristalline pour former un complexe, nous pouvons constater une disparition ou une diminution significative du pic de fusion de cette molécule dans le thermogramme du complexe d'inclusion [99,100], cela donne un signe sur l'éventualité de la formation du complexe.

2.6.8 Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique qualitative et quantitative. Elle a pour objectif la mesure de la perte de masse d'un échantillon en fonction de la température, la caractérisation et l'étude du comportement thermique des matériaux

étudiés. Dans la caractérisation des complexes d'inclusion elle a été employée pour mettre en évidence leur formation. Lors de la complexation, la plupart des molécules d'eau retenues dans la cavité se libèrent, tandis que la molécule invitée est maintenue dedans. Ce transfert est détectable à l'aide de l'ATG, en comparant la variation de masse issue de l'évaporation du CD libre à celle du complexe, qui va certainement diminuer. En outre, l'entrée de l'invité dans la cavité change son comportement thermique, et par conséquent des décalages, diminutions, et disparitions des processus thermiques vont apparaître sur le thermogramme du complexe. Tous ces changements sont indicatifs de la formation des complexes [99].

2.6.9 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique qualitative permettant l'observation de la morphologie, la taille, et la texture de la surface des matériaux étudiés. Dans l'étude du phénomène d'inclusion la MEB n'est pas une technique décisive à travers laquelle on peut conclure la formation d'un complexe d'inclusion mais elle reste quand même une méthode complémentaire qui donne des informations importantes. Avec celle-ci, la morphologie des complexes d'inclusion obtenue est comparée à celle de la CD, PA et les mélanges physiques [101].

2.6.10 Test de dissolution *in vitro*

Les tests de dissolution *in vitro* sont employés pour évaluer l'effet de l'incorporation de la molécule active dans la cavité de CD, dans le cas où le but de l'inclusion est l'amélioration de la solubilité. En comparant le profil de dissolution des complexes d'inclusion à ceux de la molécule active libre et de leur mélange physique, une augmentation de la vitesse de dissolution et de la quantité de la molécule invitée dissoute est attendue, cela est dû principalement à l'augmentation de la solubilité de l'invité résultant de la formation du complexe d'inclusion. Plusieurs études utilisent cette technique pour évaluer la formation des complexes d'inclusion [101,102].

2.7 Applications

2.7.1 Domaine pharmaceutique

L'industrie pharmaceutique est l'une des plus grandes consommatrices des CDs. La faible solubilité des PA dans les phases aqueuses abouti à une faible biodisponibilité et par

conséquent un effet pharmacologique réduit. Pour pallier cet inconvénient, les CD's ont été utilisées principalement dans les sciences pharmaceutiques en tant qu'agents complexant afin d'augmenter la solubilité et la stabilité des PA. Cette approche remplace avantageusement les méthodes classiques qui impliquent des surfactants et des co-solvants organiques, parfois à l'origine des effets secondaires. D'autre part, le taux et la vitesse de libération des PA peuvent être contrôlés par la formation des complexes d'inclusion. Toutefois, ces deux paramètres dépendent des propriétés physico-chimiques du PA et celles du complexe.

La formation des complexes d'inclusion sert également à la suppression ou la réduction de l'amertume du PA et l'amélioration de ses caractéristiques organoleptiques [103]

L'introduction des CDs dans les sciences pharmaceutiques a permis de spectaculaires progrès, à tel point que l'industrie pharmaceutique est devenue la première consommatrice de CDs. De nombreux brevets, publications, revues et ouvrages décrivent les avantages et les différentes applications des CDs dans ce domaine [79,104–106]. Il existe plusieurs produits pharmaceutiques à base de CD, surtout la BCD et l'HPBCD qui ont été mis sur le marché (Tableau 2.2).

Tableau 2. 2 : Quelques formes pharmaceutiques commercialisées utilisant la BCD, HPBCD et SBEB CD.

DCI (PA)	Nom commercial	Formulation	Laboratoire
HPBCD			
Indométacine	INDOCOLLYRE	Collyre en solution	Chauvin
Itraconazole	SPORANOX	Solution buvable	Janssen
Létermovir	PREVYMIS	Solution à diluer pour perfusion	MSD France
Cladribine	MAVENCLAD	Comprimé	Merck Serono
BCD			
Piroxicam	BREXIN	Comprimé	Pierre Fabre
Cétirizine dichlorhydrate	CETIRIZINE EG	Comprimé à sucer	EG Labo
Nicotine	NICORETTE MICROTAB	Comprimé sublingual	Johnson & Johnson

Suite du **Tableau 2.2**

BCD			
Glucagon	BAQSIMI	Poudre nasale	Lilly France
SBEB CD			
Délafloxacine	QUOFENIX	Solution à diluer pour perfusion	Menarini

2.7.2 En agroalimentaire

Dans ce domaine, elles sont utilisées pour *a)* incorporer les molécules volatiles, telles que les arômes qui sont préalablement introduites dans les préparations alimentaires ou les boissons, afin de les protéger contre la dégradation au cours des processus de transformation ou durant le stockage. En outre, la formation du complexe CD/arôme permet de minimiser la quantité des arômes utilisés. *b)* Protéger les composés labiles contre l'oxydation en agissant comme des inhibiteurs du brunissement des jus de fruits résultant de l'oxydation des composés phénoliques catalysée par les polyphénoloxydases; ainsi que la protection contre la contamination microbienne et la dégradation induites par la lumière, humidité, et chaleur. *c)* Masquer ou supprimer les odeurs ou les goûts indésirables présents dans certains nutriments tels que les composés amers. *d)* Augmenter la durée de conservation des produits alimentaires [107].

2.7.3 Dans les industries cosmétiques

Située à mi-chemin entre les applications dans le domaine pharmaceutique et agroalimentaire l'industrie cosmétique utilise couramment les CDs dans la formulation de leurs produits. Les CDs sont employés pour *a)* stabiliser les parfums et diminuer leurs volatilités. *b)* Protéger les vitamines, les arômes et les colorants contre les réactions de décomposition durant le processus de fabrication et le stockage ; *c)* Stabiliser les suspensions et les émulsions. *d)* Augmenter la stabilité des matériaux en les protégeant contre l'oxydation, l'hydrolyse, l'évaporation et la dégradation. *e)* Convertir les préparations liquides ou huileuses en poudre. *f)* Améliorer l'absorption dermique ; *g)* Améliorer la solubilité des produits lipophiles. *h)* Réduire ou masquer les odeurs indésirables des ingrédients [63,108].

2.7.4 En environnement

L'utilisation des CDs dans les sciences environnementales a été largement discutée et détaillée dans la littérature. Elles sont utilisées pour le traitement d'eau afin d'augmenter l'encapsulation, l'adsorption, et la stabilisation des agents contaminants [109]. Les CDs sont également employées pour réduire et extraire la volatilité des polluants organiques atmosphériques ainsi que ceux qui se trouvent dans les eaux ou les sols[61,110]. Les CDs servent également à l'élimination des hydrocarbures aromatique polycyclique [111,112], de la nitrosamine [113], benzène, phénol, p-chlorophénol et pesticide [114].

CHAPITRE III

LES NANOPARTICULES POLYMÈRES

3.1 Définition des nanoparticules polymères

Les nanoparticules polymères sont des particules colloïdales solides de diamètre submicronique compris entre 10 et 1000 nm [115]. Il existe deux types de nanoparticules ayant une structure différente (Figure 3.1): les nanosphères sont des systèmes de type matrice polymérique contenant la molécule active, les nanocapsules sont de type vésiculaire enveloppé par une couche polymérique où le principe actif est confiné dans un réservoir liquide ou solide [116].

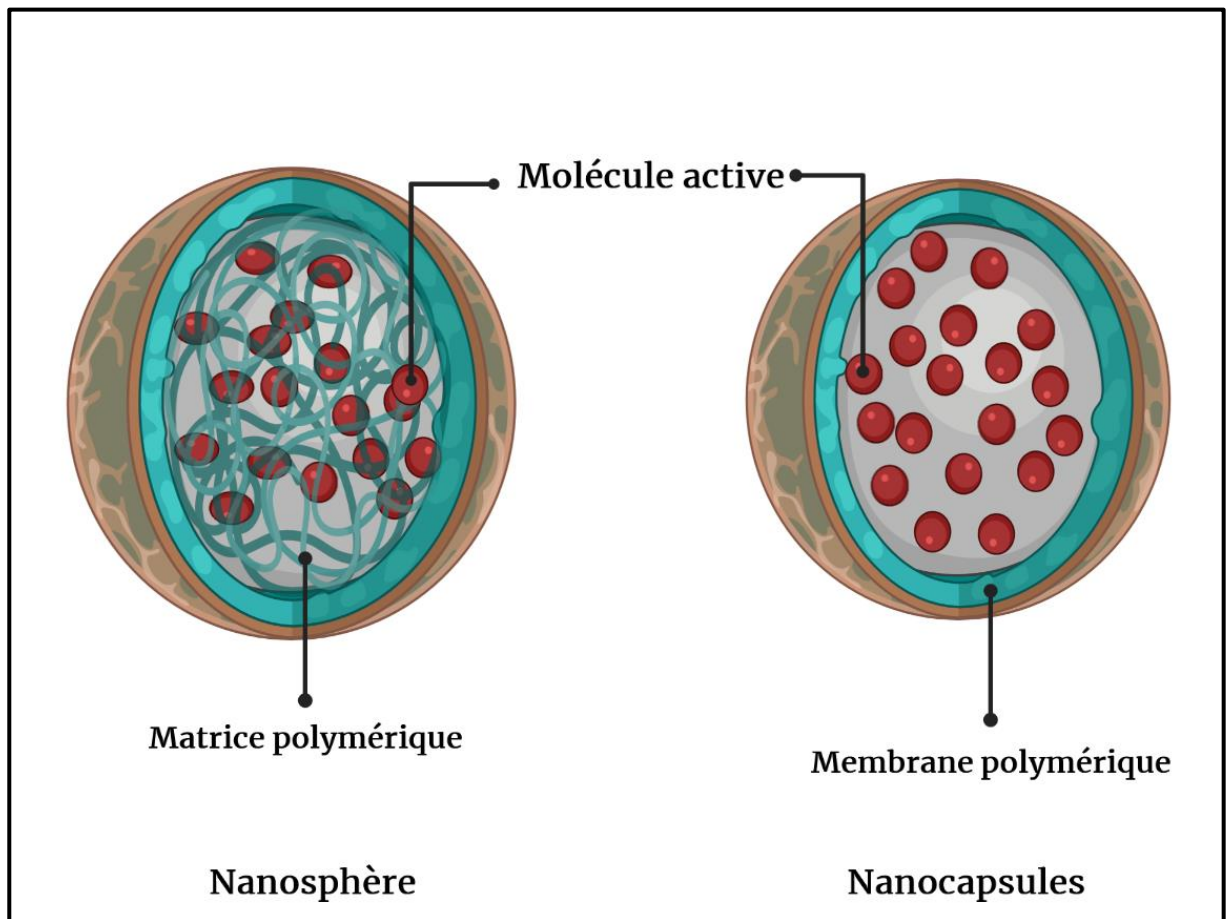


Figure 3. 1: Les deux principaux types de nanoparticules polymères (Image créée sur BioRender).

3.2 Méthodes de préparation des nanoparticules polymères

Il existe de nombreuses méthodes de préparation des nanoparticules polymères. Généralement elles sont classées en deux catégories. La première est basée sur le mécanisme de polymérisation de monomères, tandis que la deuxième utilise des polymères préformés. La deuxième méthode est la plus employée car elle contourne les inconvénients liés à la polymérisation *in situ* comme :

- Les interactions avec le PA qui peuvent avoir lieu au cours de la préparation des NP
- Le contrôle de la cinétique de polymérisation
- L'étape d'élimination des monomères résiduels et des réactifs.

De plus, les polymères préformés possèdent des propriétés physico-chimiques bien déterminés.

Les méthodes utilisant les polymères préformés sont basées sur la précipitation ou la gélification d'un polymère préalablement dissous dans un solvant pour former des NP solides [117]. Les principales méthodes de préparation utilisant des polymères préformés sont les suivantes :

3.2.1 Émulsion-évaporation du solvant

Le principe de cette technique consiste à préparer une phase organique non miscible à l'eau, constituée de polymère, principe actif et de solvant organique volatil (chloroforme et dichlorométhane) [118,119]. Cette phase est ensuite dispersée dans une phase aqueuse contenant un agent stabilisant pour former une émulsion fine et stable par fort cisaillement ou ultrasonication [120]. L'élimination du solvant organique se fait par élévation de la température, ou sous vide ou encore sous l'effet combiné des deux, ou simplement par agitation à température ambiante ce qui conduit à l'obtention des nanoparticules. Cette technique n'est adaptée que pour l'encapsulation des PA lipophiles [121].

3.2.2 Émulsion-diffusion du solvant

Cette technique requiert l'emploi d'un solvant organique partiellement miscible à l'eau, (l'alcool benzylique, le carbonate de propylène ou lactate de butyle) [122–124]. Le solvant organique et l'eau doivent être mutuellement saturés avant l'ajout du polymère. La phase organique constituée du polymère et du PA est émulsifiée dans une phase aqueuse

contenant un stabilisant (Pluronic F-68 ou l'alcool polyvinylique (PVA)) sous forte agitation mécanique. La dilution de l'émulsion formée entraîne la diffusion du solvant vers la phase aqueuse externe conduisant à la précipitation du polymère et la formation des NPs [125]. Il est possible de produire des nanocapsules à cœur lipidique en ajoutant une huile à la phase organique. Le solvant organique peut être éliminé à la fin par filtration ou évaporation [126].

3.2.3 La nanoprécipitation

La technique de la nanoprécipitation, aussi appelée « déplacement de solvant ». Cette technique requiert trois éléments essentiels : le polymère, le solvant du polymère et le non-solvant du polymère. Le solvant du polymère doit être miscible au non-solvant en toutes proportions et facilement évaporables tel que l'acétone ou l'éthanol. Cependant, le polymère et le PA doivent être insolubles dans le non-solvant. La solution organique du polymère comprenant le PA est injectée, avec un débit modéré, dans la solution du non-solvant contenant éventuellement un surfactant hydrophile. La diffusion spontanée du solvant dans la phase aqueuse conduit à la précipitation du polymère insoluble dans le mélange (solvant/non-solvant) sous forme de nanoparticules piégeant le PA. Pour l'obtention des nanocapsules une huile doit être ajoutée à la phase organique pour permettre au polymère de former l'écorce à condition qu'elle soit insoluble dans la phase aqueuse [127].

3.2.4 Émulsion-*salting out*

Cette méthode est très proche de la méthode d'émulsion-diffusion de solvant, la différence réside dans le choix du solvant organique utilisé pour la préparation de la phase organique. Le procédé de *salting out* consiste à préparer une phase aqueuse par une dissolution de sels en excès (plusieurs moles par litre) dans l'eau. Les sels les plus employés sont le chlorure de magnésium et le chlorure de calcium. La phase organique constituée de polymère et PA dissous dans un solvant organique totalement miscible à l'eau, généralement l'acétone, est ajoutée dans la phase aqueuse. La saturation en sel de la phase aqueuse permet l'obtention d'une émulsion sous agitation mécanique vigoureuse. La dilution de l'émulsion avec une grande quantité d'eau conduit au rétablissement de la miscibilité entre l'acétone et l'eau. L'acétone diffuse dans la phase aqueuse externe et le

polymère précipite sous forme de nanoparticules. En dernier lieu, le solvant et le sel sont éliminés par une filtration ou par des cycles de centrifugation/lavages [128].

3.2.5 La gélation ionique

Elle compte parmi les rares méthodes n'utilisant pas de solvant organique où les nanoparticules sont synthétisées en milieu totalement aqueux. Les nanogels ioniques sont formés à partir d'une solution aqueuse de polysaccharides chargés qui se gélifient en présence d'ions de charge opposé. Pour avoir des nanoparticules, la gélation doit être réalisée avec des concentrations diluées pour éviter la formation de gels macroscopiques, cela correspond à la phase de pré-gel dans laquelle, les chaînes polymères interagissent avec l'agent gélifiant via des interactions électrostatiques pour former des agrégats nanométriques.

Le procédé consiste à extruder au travers d'une aiguille de seringue une solution aqueuse de polymère dans une solution chargée d'ions de signe opposé sous homogénéisation de haute vitesse. Les gouttelettes tombées se transforment, après interaction ionique en nanogels. La formation des particules est spontanée et instantanée [129,130].

La gélation ionique est une technique simple, économique et facile à mettre en œuvre. Elle permet l'obtention des NPs de taille bien définie et de distribution de taille homogène avec une grande quantité de PA incorporée.

Les polymères les plus utilisés pour cette technique sont l'alginate de sodium et le chitosane. La principale propriété de ces deux polymères est leur capacité à se gélifier en présence d'ions multivalents conduisant à la création des liaisons ioniques et la formation de réticules tridimensionnels rigide piégeant le PA.

3.3 Chitosane

Le chitosane (CS) est un polysaccharide biodégradable dérivé de la chitine. La chitine est un copolymère de N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) et N-D-glucosamine (GlcN) unis par des liaisons β -(1 \rightarrow 4), obtenue à partir d'exosquelette des crustacés, de certaines familles de champignons et des insectes. Il est le deuxième polymère naturel le plus abondant sur terre, après la cellulose. Contrairement à la chitine, le chitosane se trouve rarement dans la nature, il n'est présent que chez les zygomycètes, quelques insectes et une classe particulière de champignons [131,132]. Toutefois, la chitine demeure la source

principale du chitosane. Le chitosane est un biopolymère de structure linéaire proche à celle de la chitine, résulte d'une désacétylation alcaline de la chitine (Figure 3.2) ou d'une hydrolyse enzymatique (chitine désacétylase) [133]. Il est donc caractérisé par une prédominance des unités D-glucosamine (unité désacétylée) avec des fractions molaires de N-acetyl-D-glucosamine (unité acétylée), ce qui lui confère un caractère cationique et un comportement relativement hydrophile par rapport à la chitine. Le chitosane possède un $pK_a=6,5$. Il est soluble dans les solutions d'acide diluées (acide acétique, acide formique et acide lactique) où les groupements amine vont se protoner pour donner un polyélectrolyte cationique [134,135].

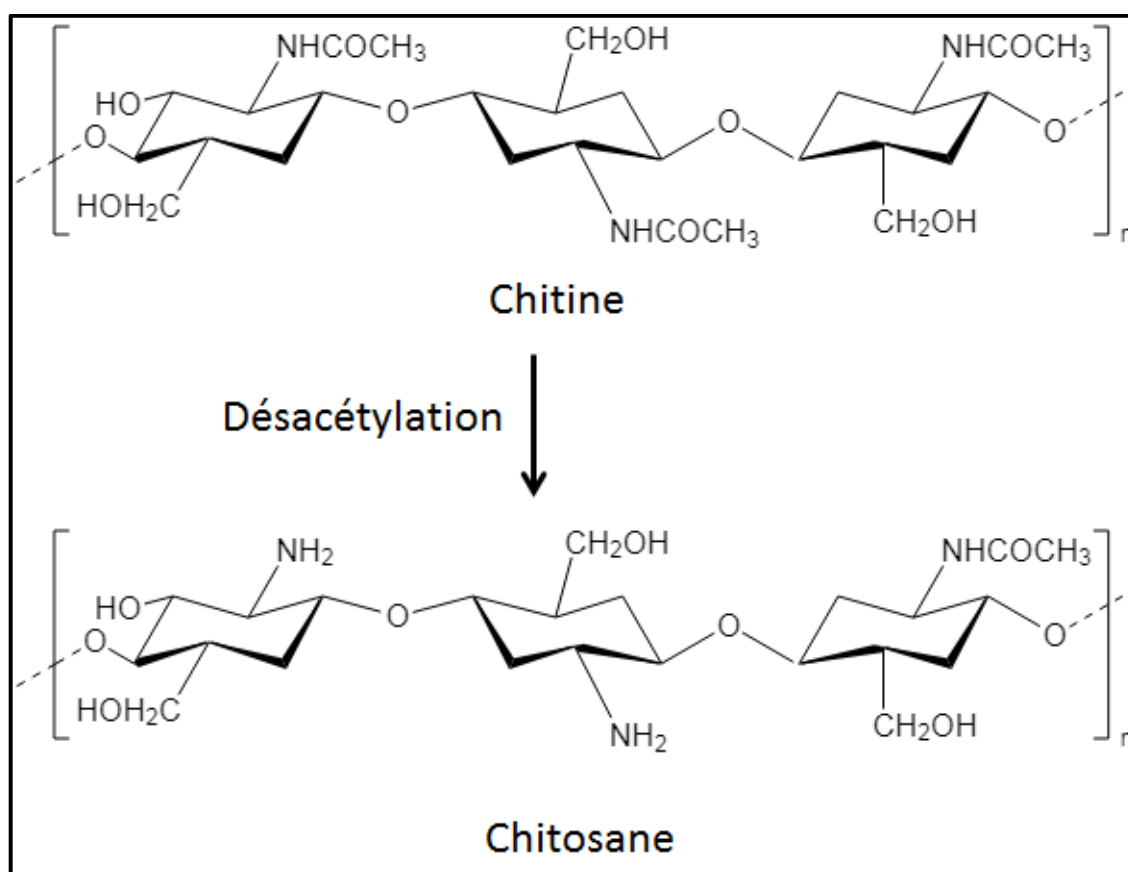


Figure 3. 2 : Structure chimique de chitine et chitosane (Chemdraw ultra 7.0).

Le principal paramètre caractéristique du chitosane est le degré de désacétylation (DD), il influe sur de nombreuses propriétés physicochimiques ou encore sur ses caractéristiques biologiques [136,137]. Il permet également de distinguer entre la chitine et le chitosane avec un seuil symbolique à 60 % de DD [138]. Le DD est défini comme étant la fraction molaire des unités glucosamine. Tandis que le degré d'acétylation (DA)

est la fraction molaire des unités N-acetyl-D-glucosamine [136,137]. De nombreuses méthodes de détermination de DD ont été utilisées tels que la spectrométrie infrarouge (IR) [139,140], l'analyse élémentaire [141], la spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-Vis) [142,143], le titrage potentiométrique [144], dosage conductimétrique [145] et la résonance magnétique nucléaire du proton (^1H RMN) [146]. Parmi toutes ces techniques, la ^1H RMN reste la méthode la plus précise pour la détermination du DD. Différentes équations ont été proposées pour déterminer le DD à partir du spectre ^1H RMN proton, la plus employée a été développée par Hirai et al (Équation 3.1) [146], en se basant sur l'intégrale du pic de résonance correspondant aux protons du groupe acétyle (H_{AC}), et l'intégrale correspondant aux protons H2-H6.

$$\text{DD \%} = \left(1 - \left(\frac{1}{3} \text{H}_{\text{AC}} / \frac{1}{6} \text{H}_{2-6} \right) \right) \times 100 \quad (3.1)$$

Les nanoparticules de chitosane peuvent être préparées par différentes techniques, la plus employée est la gélification ionique. Le procédé implique l'interaction des groupes NH_3^+ du chitosane (forme protonnée de la glucosamine à un pH entre 4,0 et 6,5) avec des ions polyvalents (le sulfate, le citrate) ou des molécules anioniques contenant des groupes phosphate (le polyphosphate, le β -glycerophosphate et le tripolyphosphate de sodium (TPP)). Le TPP est l'agent de réticulation ionique le plus utilisé pour former des nanoparticules à base de CS. Le TPP est un sel non toxique obtenu par la triple condensation des groupes $-\text{PO}_4$.

La formation des nanoparticules de chitosane est immédiate après l'ajout d'une solution de TPP dans une solution de CS (Figure 3.3) [147]. Les NPs de CS réticulées avec du TPP ont l'avantage d'être stables et non toxique.

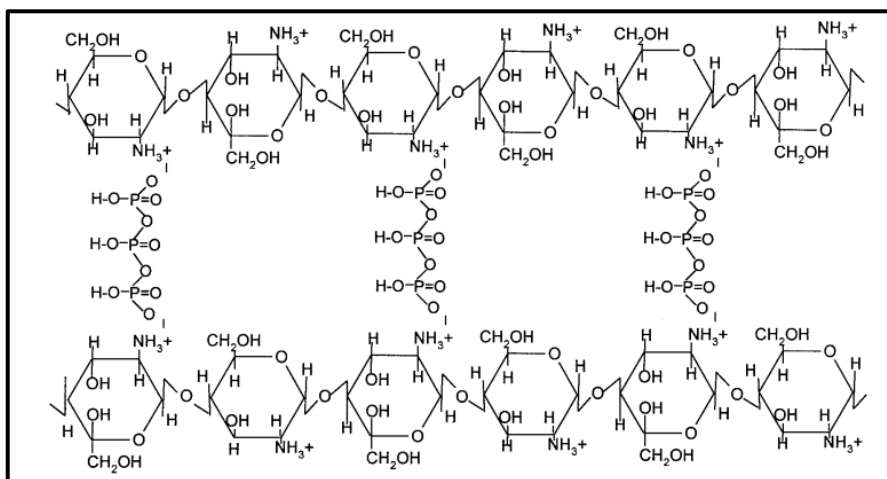


Figure 3. 3: Réticulation ionique du chitosane par le tripolyphosphate de sodium [148].

3.4 Alginate de sodium

Le terme « alginate » est un nom utilisé pour désigner les sels de l'acide alginique, ainsi que tout dérivé de cet acide. Naturellement, Les alginates se présentent dans les parois cellulaires des algues brunes sous forme de sel de calcium, magnésium et sodium. La production industrielle de cette famille de polymères est basée sur la culture des algues brunes ; cependant, les alginates sont également produites par une biosynthèse bactérienne (*Azobacter* et *Pseudomonas*) afin d'obtenir des alginates de composition donnée et une distribution de séquences particulière. Le processus d'obtention des alginates consiste à transformer les sels insolubles dans l'eau (calcium et magnésium) en sel soluble, alginate de sodium. Ainsi en pratique, l'alginate de sodium est la forme la plus répandue du sel d'alginate [149]. L'alginate de sodium (NaAL) est un polysaccharide anionique linéaire composé de β -D-mannuronate (unité M) et α -L-guluronate (unité G) (Figure 3.4) unis par des liaisons 1 \rightarrow 4 glycosidiques. Les deux unités peuvent s'associer pour former des blocs homopolymériques de M (MM), de G (GG) et hétéropolymériques (ou polyalternés) MG/GM (Figure 3.5). La composition de l'alginate en mannuronate et guluronate ainsi que la distribution de la séquence dépend de la nature de l'algue, la saison de récolte, les conditions de culture et du climat, voire même la force des courants marins [150–152].

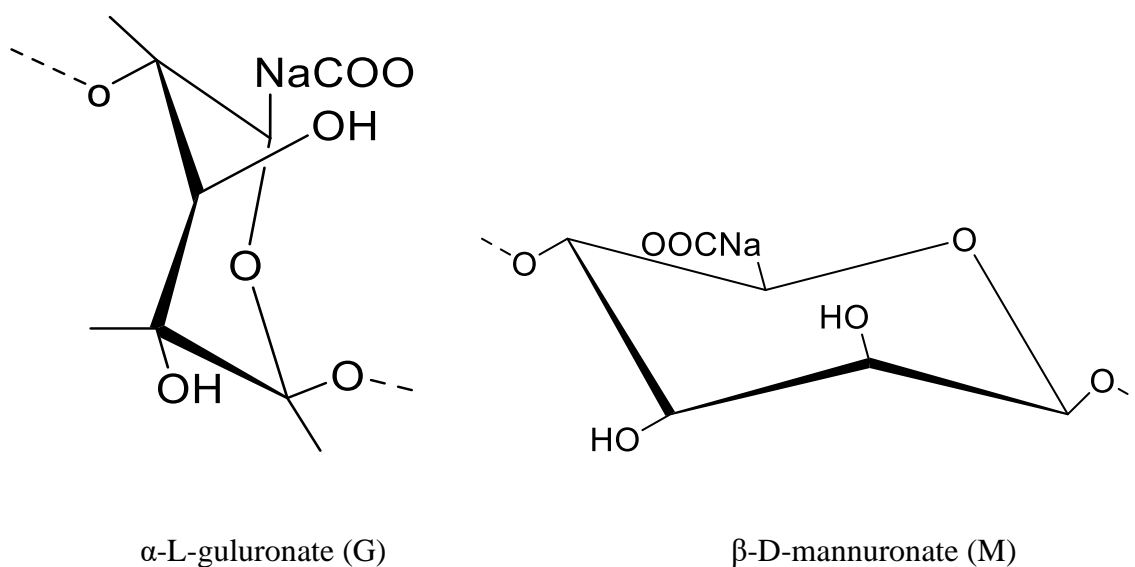


Figure 3. 4: Structure chimique des monomères α -L-guluronate (G) et β -D-mannuronate (M) (Chemdraw ultra 7.0).

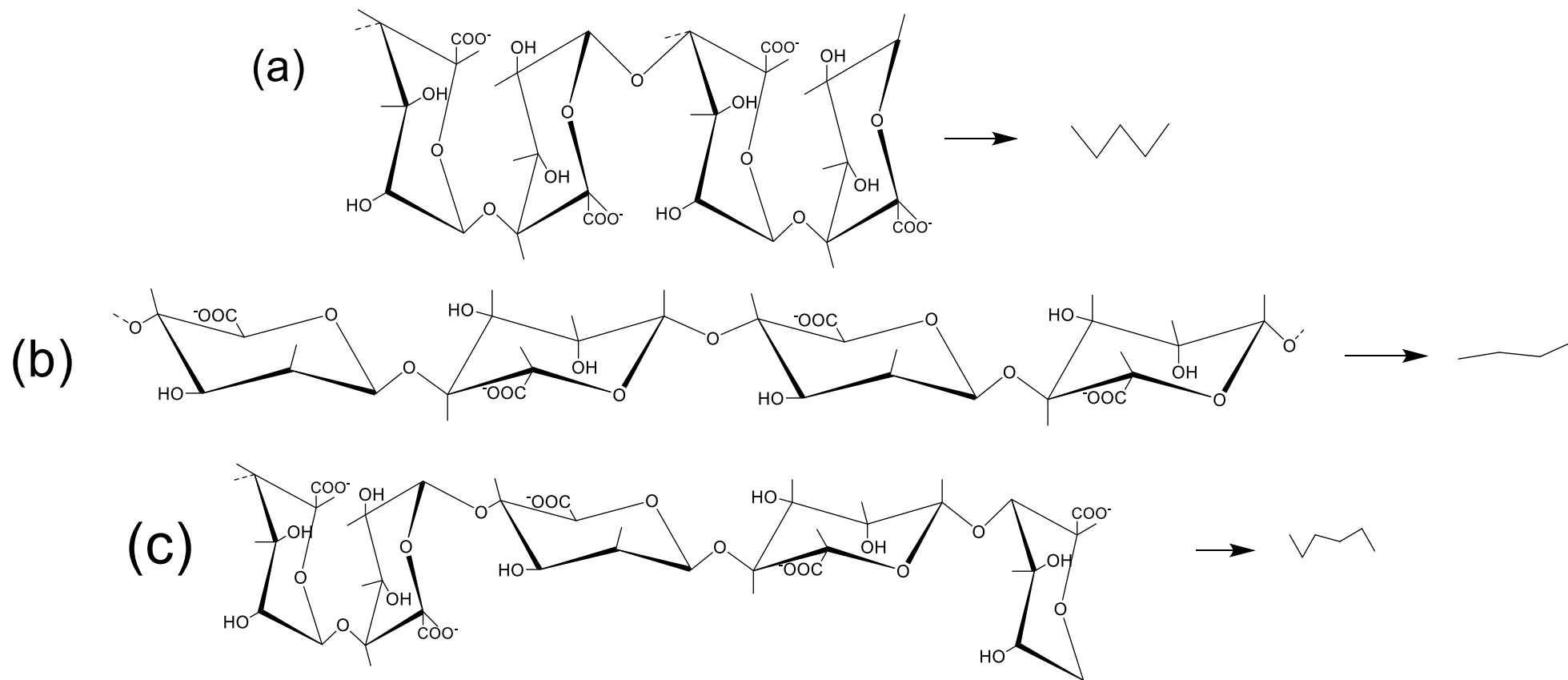


Figure 3. 5: Différente séquence en monomères G et M rencontrées dans les chaînes d'alginate de sodium sous forme de blocs : (a) : GGGG ; (b) : MMMM et (c) : GGMMG (Chemdraw ultra 7.0).

Les nanoparticules d'alginate de sodium sont formées en présence d'ions divalents via le mécanisme de gélification. La gélification de l'alginate de sodium, induite par des cations divalents tels que le Ca^{+2} , Ba^{+2} , et Sr^{+2} , conduit à la formation des liaisons ioniques accompagnées de changements conformationnels [153]. Pour des raisons de stéréochimie, ce phénomène ne concerne que les blocs homopolymériques G qui présentent une géométrie particulière « zigzag étroit » (Figure 3.5) dû aux interactions diaxiales entre les unités G permettant une capture efficace du cation. La conformation « ruban aplati » (Figure 3.5) de blocs homopolymériques M ne permet pas de complexer le Ca^{+2} . Aucune coopérativité ou changement conformationnel n'ont été mis en évidence quels que soit la longueur de la chaîne polymannuronate. En effet, il a été démontré que ce mécanisme est facilité si la chaîne polyguluronate possède 18 à 26 monomères homopolymériques en G [154–156]. L'introduction des cations divalents tels que les Ca^{+2} dans une solution d'alginate de sodium permet d'établir des ponts entre les fonctions carboxylique des deux segments hélicoïdaux du bloc homopolymériques G et former une zone de jonction [157]. Cet agencement est appelé modèle boîte à œufs ou « *egg-box* », l'œuf étant le calcium (Figure 3.6).

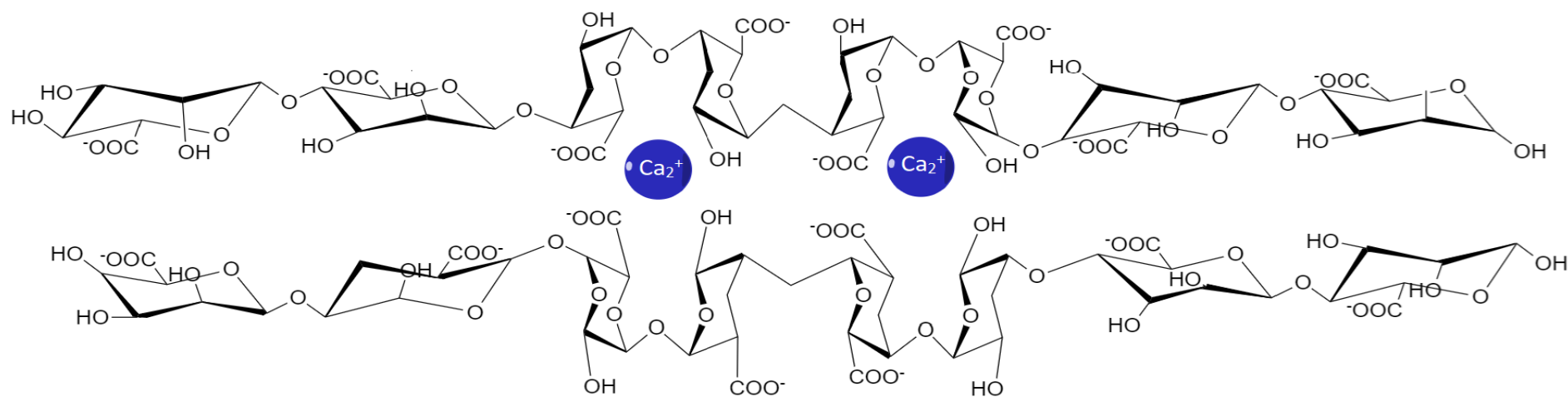


Figure 3. 6: Mécanisme de gélification de l'alginate en présence de Ca^{+2} , le modèle boîte à œufs (*egg box*) (Chemdraw ultra 7.0)

L'ajout d'une solution polycationique à la solution pré-gel de l'alginate de sodium conduit à la formation des interactions électrostatiques ce qui contribue à la stabilisation du complexe et l'obtention des nanoparticules par la formation du complexe polyélectrolyte. Le polycation le plus recommandé et le plus utilisé est le chitosane vu ces propriétés biologiques similaire à celle de l'alginate comme la biodégradabilité, la biocompatibilité et la non toxicité [158,159].

3.5 Caractérisation des nanoparticules

Les propriétés des nanoparticules peuvent être évaluées par différentes techniques telles que, la microscopie électronique à transmission, la microscopie électronique à balayage, la diffusion dynamique de la lumière, FTIR, analyses thermiques, efficacité d'encapsulation.

3.5.1 Microscopie électronique en transmission (MET)

La microscopie électronique en transmission (MET) permet d'observer directement la taille des NPs et de distinguer entre les nanosphères et les nanocapsules [160]. Le principe de cette technique consiste à diriger un faisceau d'électrons sur un échantillon mince à l'aide d'un système de lentilles magnétiques pour donner une image. Dans cette technique, l'échantillon à observer diffusera selon sa densité électronique plus ou moins les électrons du faisceau, seulement les électrons transmis seront détectés. Dans le cas de molécules biologiques ou de polymères, l'observation des objets nécessite un traitement préalable appelé technique de coloration afin d'augmenter la visibilité des échantillons de faible contraste. Cela consiste à mettre au contact de l'échantillon déposé une solution contenant un agent contrastant ayant un numéro atomique élevé tel que l'acétate d'uranyle, l'acide phosphotungstique et les lanthanides. Dans le cas où des interactions peuvent avoir lieu entre l'échantillon et l'agent colorant (chimisorption ou adsorption), ce dernier se fixera au-dessus et l'échantillon apparaîtra plus contrasté On parlera de coloration positive. Sinon, l'agent contrastant se fixera sur la membrane du carbone et au bord des échantillons, ce qui permet d'assombrir le fond sans colorer l'échantillon lui-même. On parlera alors de coloration négative.

3.5.2 Microscopie électronique à balayage à émission de champ (MEB-FEG)

La MEB-FEG est une technique avancée de haute résolution utilisée lorsque le MEB conventionnel est incapable de donner des informations claires sur la morphologie de certains

échantillons tels que les nanoparticules à base de polymères [161]. Elle est dotée d'un canon à émission de champ (FEG, en anglais pour *Field Emission Gun*), qui nous offre des observations directes à très basse tension d'accélération (3 kV ou moins) sans recourir à la métallisation, Cela permet de minimiser l'effet de charge sur les échantillons non conducteurs, de ne pas détruire les matériaux sensibles aux électrons et d'améliorer la résolution [162]. En effet, la limite de résolution des MEB-FEG peut atteindre 1 nm.

3.5.3 La diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (plus connue sous l'acronyme anglais DLS : *dynamic light scattering*) permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules en suspension. Elle consiste à mesurer l'intensité de la lumière diffusée par une solution colloïdale après avoir été irradiée par un laser, en fonction du temps. Les fluctuations des particules en suspension sont liées aux mouvements browniens. Plus les particules sont petites plus le mouvement brownien est rapide, moins intense est la diffusion des rayons lumineux. L'estimation du coefficient de diffusion des particules permet de remonter à leur diamètre hydrodynamique via l'équation de Stokes-Einstein [163].

$$\varnothing_h = \frac{K_B T}{3\pi\eta D} \quad (3.2)$$

\varnothing_h : diamètre hydrodynamique

D: coefficient de diffusion translationnel

η : viscosité dynamique du milieu de dispersion

K_B = constante de Boltzmann

T : température du solvant

Toutefois, cette technique est une méthode de mesure indirecte avec laquelle la taille des particules mesurée diffère de celle obtenue avec les méthodes microscopiques (méthode directes). Cette différence est due au fait que la DLS mesure le diamètre hydrodynamique des nanoparticules, qui correspond au diamètre de la nanoparticule et sa couche d'hydratation, tandis que les méthodes microscopiques tels que la MET et la MEB-FEG mesurent la taille réelle de la particule (Figure 3.7) [161].

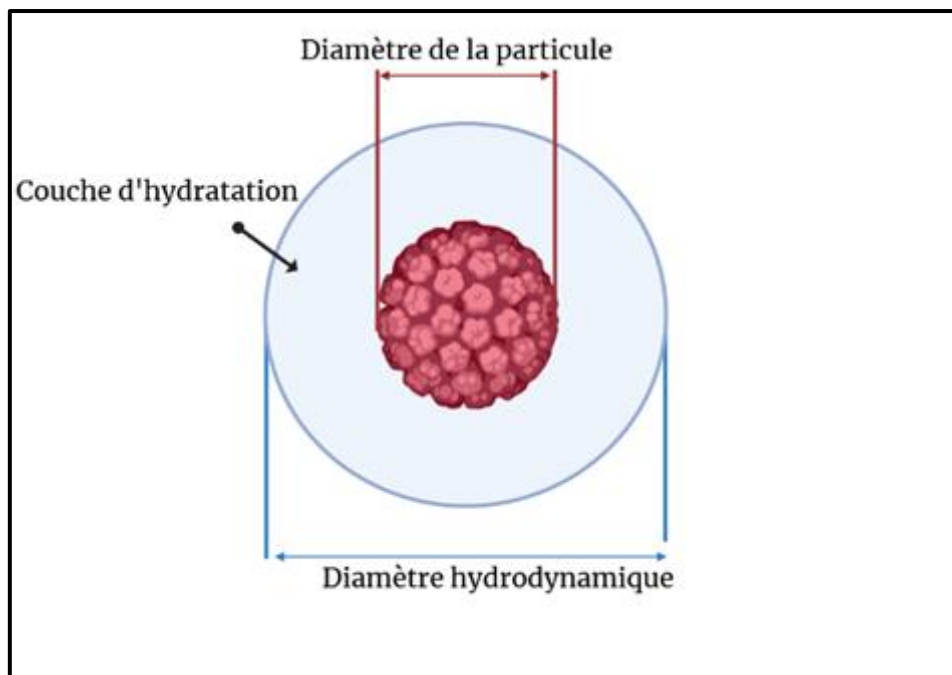


Figure 3. 7: Représentation d'une particule avec sa couche d'hydratation constituant ensemble le diamètre hydrodynamique de la particule (Image créée sur BioRender).

3.5.4 Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation (EE%) est un paramètre essentiel dans le développement d'une nouvelle nanoformulation. Ce paramètre influe sur la quantité des excipients employée ainsi que la pharmacocinétique et la toxicité du médicament. Il dépend des propriétés du principe actif et du matériau utilisé, du procédé appliqué, la manière dont le principe actif a été chargé dans les NPs. La détermination de l'efficacité d'encapsulation se fait après séparation des nanoparticules du milieu par ultracentrifugation. L'EE% est mesurée par des méthodes spectroscopiques ou chromatographiques, de manière directe par un dosage spécifique du principe actif contenu dans les nanoparticules après lavages, ou indirecte dans laquelle, la quantité du principe actif restante dans le milieu de dispersion peut également être dosée. Elle est alors décrite comme le rapport entre la quantité de molécule active incorporée dans les nanoparticules ou adsorbée à la surface et la quantité de molécule active initialement introduite [164,165].

Un autre paramètre significatif utilisé pour la caractérisation des NPs est la capacité de charge (LC, *loading capacity*) qui correspond à la masse de principe actif encapsulé par rapport à la masse de nanoparticules préparées [164,165].

$$EE\% = \frac{\text{Quantité du principe actif incluse dans les nanoparticules}}{\text{Quantité du principe actif initialement introduite}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$LC\% = \frac{\text{Masse de principe actif dans les nanoparticules}}{\text{Masse des nanoparticules préparées}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.5.5 Étude des interactions

La FTIR et la DSC sont parmi les méthodes utilisées pour relever les différentes interactions présentes entre les constituants lors de la formation des nanoparticules. La FTIR est utilisée pour étudier les groupes fonctionnels intervenant dans les interactions ioniques ou covalentes pour former des nanoparticules et les spectres caractéristiques du PA à encapsuler [166].

La DSC est utilisée pour mettre en évidence l'état physique des nanoparticules et la cristallinité de la molécule active encapsulée dedans, en comparant les températures caractéristiques (température de fusion des polymères et PA, température de transition vitreuse ou température de cristallisation) et les enthalpies libres des constituants libres avec celles des nanoparticules [166,167].

3.5.6 Étude de libération *in vitro*

L'étude de la libération *in vitro* des nanoparticules dans différents milieux caractéristiques est pertinente pour la prédiction de leur performance et leur comportement *in vivo*. Les études de dissolution *in vitro* des nanoparticules destinée à la voie orale peuvent être réalisées dans des dispositifs mimant les conditions physiologiques (température et péristaltisme digestif) qui consistent en de simples récipients contenant le milieu de dissolution chauffé et agité [168].

3.5.7 Modèles mathématiques pour les études de la libération d'un PA

Les modèles mathématiques ont pour but d'étudier les différents phénomènes de libération à partir de différentes formes thérapeutiques. Ces modèles permettent d'anticiper la nature et les paramètres de relargage ainsi que l'effet de la taille, la morphologie et la composition de la matrice sur la cinétique de libération. Ainsi, ces modèles mathématiques permettent de prédire le taux de libération, optimiser la cinétique de libération, étudier les différents phénomènes physiques qui gèrent la libération et par conséquent de concevoir de nouvelles formes et profils de libération permettant d'améliorer l'efficacité thérapeutique des

PA. Ces modèles décrivent la quantité du PA libéré (Q_t) à partir d'un système en fonction du temps (t). Plusieurs modèles ont été proposés comme l'ordre zéro, le premier ordre, Korsmeyer-Peppas et Kopcha.

a) Le modèle cinétique d'ordre zéro

Le modèle cinétique d'ordre zéro décrit un système dans lequel la vitesse de libération du principe actif est indépendante de sa concentration dissoute et le PA est libéré de manière constante au cours du temps. Il s'agit véritablement d'un système à libération contrôlée [169].

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (3.5)$$

Où: Q_t est la quantité de principe actif libérée à l'instant t , Q_0 est la quantité de principe actif initialement libérée, K_0 est la constante de cinétique d'ordre zéro, t est le temps.

b) Le modèle cinétique de premier ordre

Le modèle cinétique de premier ordre décrit un système dans lequel la vitesse de libération du principe actif est dépendante de sa concentration [169].

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2.303} \quad (3.6)$$

Avec: Q_t est la quantité de principe actif libérée à l'instant t , Q_0 est la quantité initiale de principe actif, K_1 est la constante de cinétique de premier ordre, t est le temps.

c) Le modèle de Korsmeyer-Peppas

En 1983, Korsmeyer et al ont proposé un modèle simple qui décrit la libération d'un PA à partir d'une matrice polymérique, cette équation est présentée par une relation entre la fraction du principe actif libéré et le temps [170].

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_{KP} t^n \quad (3.7)$$

Où: Q_t est la quantité de principe actif libérée à l'instant t , Q_∞ est la quantité de principe initialement contenue dans la matrice, K_{KP} est la constante de cinétique de Korsmeyer-Peppas, n est l'exposant de libération décrivant le mécanisme de libération, t est le temps.

Ce modèle est applicable sur les premiers 60 % de la fraction du PA libéré.

Selon la valeur de l'exposant de libération représentée par **n**, il est possible de déduire le mécanisme qui régit la libération à partir d'une classification en fonction du type de comportement observé et de la géométrie de la matrice (Tableau 3.1).

Tableau 3. 1: Interprétation du mécanisme de libération d'un principe actif à partir d'une matrice polymérique d'une géométrie sphérique [170].

n	Mécanisme
$n \leq 0,43$	Diffusion de Fick
$0,43 < n < 0,85$	Transport irrégulier (diffusion anormale)
$n = 0,85$	Cas II de transport
$n > 0,85$	Super cas II de transport

d) Modèle de Kopcha

Le modèle Kopcha permet d'évaluer et de quantifier la contribution de la diffusion et l'érosion [171].

$$Q_t = At^{1/2} + Bt \quad (3. 8)$$

Où : Q_t est la quantité de principe actif libérée à l'instant t , A est le coefficient diffusionnel, B est le coefficient d'érosion, t est le temps.

Si le coefficient diffusionnel " A " est plus grand que le coefficient d'érosion " B ", on peut déduire que la libération du PA à partir de la matrice est dirigée par le processus de diffusion.

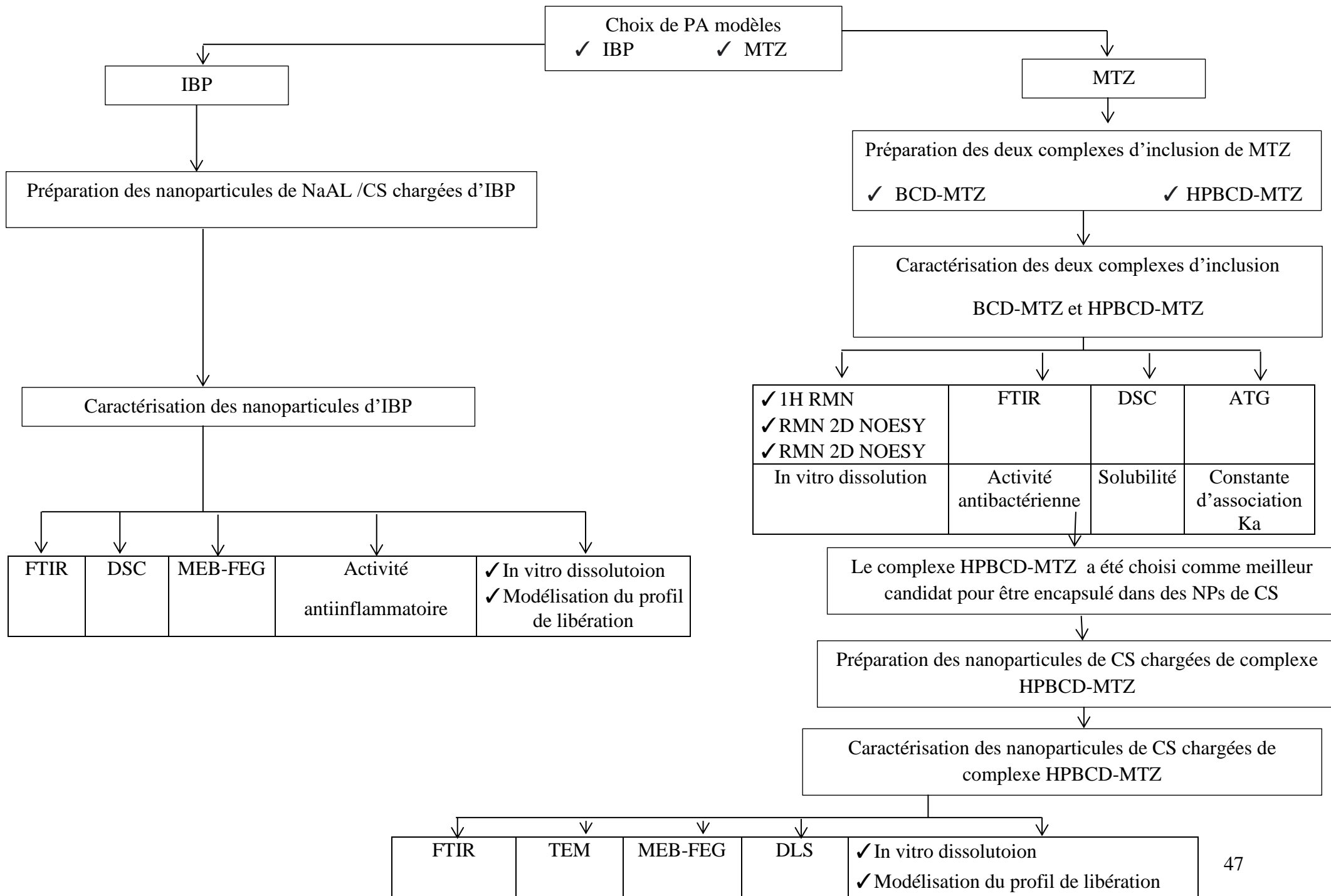
Si le coefficient d'érosion " B " est plus grand que le coefficient diffusionnel " A ", on peut déduire que la libération du PA à partir de la matrice est dirigée par le processus d'érosion.

PARTIE 2
MATÉRIELS ET MÉTHODES

Stratégie de travail

Cette partie présente le matériel, méthodes et techniques utilisés, elle est divisée en deux chapitres, le premier est consacré pour la préparation et la caractérisation des nanoparticules chargées d'ibuprofène destinées à la voie orale. Le deuxième chapitre porte sur la préparation et la caractérisation des complexes d'inclusion du métronidazole et l'incorporation du métronidazole sous forme de complexe dans des nanoparticules de chitosane destinées à la voie orale. Toutes les méthodes et techniques décrites dans cette partie sont basées sur celles présentées dans la partie théorique.

Le digramme ci-dessous (Digramme 1) résume la stratégie suivie dans notre travail, les techniques et méthodes utilisées et les paramètres recherchés.



Digramme 1: Stratégie de travail.

CHAPITRE IV

NANOPARTICULES CHARGÉES D'IBUPROFÈNE

4.1 Liste des produits

- Alginate de sodium (formule moléculaire : $(C_6H_7NaO_6)_n$), produit par Sigma-Aldrich.
- Chitosane (formule moléculaire : $(C_6H_{11}NO_4)_n$; poids moléculaire : moyen ; degré de désacétylation déterminé par 1H RMN : 83,63% (voir ANNEXE A)), produit par Sigma-Aldrich.
- Ibuprofène (formule moléculaire : $C_{13}H_{18}O_2$; poids moléculaire : 206,29 g mol⁻¹), fournis par Biogalenic Constantine (L.I.C).
- Sérum d'albumine bovine produit par VWR.
- Trisma[®] chlorhydrique (formule moléculaire : $NH_2C(CH_2OH)_3.HCl$; poids moléculaire : 157,60 g mol⁻¹), produit par Fluka.
- Lysozyme *from chicken egg white* produit par Sigma-Aldrich.
- Chlorure de calcium (formule moléculaire : $CaCl_2$; poids moléculaire: 110,98 g mol⁻¹), produit par Sigma-Aldrich.
- Acide acétique (pureté 99% ; formule moléculaire : CH_3COOH poids moléculaire : 60,052 g mol⁻¹), produit par VWR.
- Acide chlorhydrique 37% (formule moléculaire : HCl ; poids moléculaire : 36,46 g mol⁻¹), produit par VWR.
- Hydroxyde de sodium (formule moléculaire : $NaOH$; poids moléculaire : 40 g mol⁻¹), produit par Biochem Chemopharma.
- Hydrogénophosphate de sodium (formule moléculaire : NaH_2PO_4 ; poids moléculaire 141,96 g mol⁻¹), produit par Sigma-Aldrich.
- Chlorure de sodium (formule moléculaire : $NaCl$; poids moléculaire 58,44 g mol⁻¹), produit par Sigma-Aldrich.
- Phosphate de potassium monobasique (formule moléculaire : KH_2PO_4 ; poids moléculaire 136,086 g mol⁻¹), produit par Sigma-Aldrich.
- Chlorure de potassium (formule moléculaire : KCl ; poids moléculaire 74,55 g mol⁻¹), produit par Sigma-Aldrich.

4.2 Préparation des nanoparticules de l'alginate de sodium et de chitosane chargées d'ibuprofène

Les NPs ont été préparées par la méthode de gélation ionique suivie par une complexation polyélectrolyte [172].

0,075 g de NaAL est dissout dans 20 mL d'eau ultra pure (système Milli-Q) le pH de la solution est ajusté jusqu'au 5,3 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 37%. Une solution de 36 mM de CaCl_2 a été préparée dans l'eau ultra pure (système Milli-Q). 0,08% (w/v) de CS a été préparée dans l'acide acétique 1% (v/v), le pH de la solution est ajusté à 5,5 avec une solution de NaOH 0,2 M. une quantité de 100 mg de l'IBP a été dissoute dans 2 mL d'éthanol et ensuite versée dans la solution de NaAL et maintenue sous agitation magnétique. Le CaCl_2 est extrudé au travers d'une aiguille de seringue dans la solution du NaAL comprenant l'IBP sous une homogénéisation à 11 000 tr min^{-1} (PT 2100, POLYTRON). Les gouttelettes tombées se transforment, après interaction entre le Ca^{2+} et l'alginate, en nanoparticules de gels piégeant l'IBP dans leurs réseaux tridimensionnels. Par la suite, la solution de CS est ajoutée doucement dans la préparation précédente sous la même vitesse d'homogénéisation pour former un complexe polyélectrolyte entre le CS et le NaAL. La suspension obtenue est soumise à une ultracentrifugation (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Fisher Scientific) à 15 000 tr min^{-1} pendant 40 min à 4 °C pour séparer les NPs. Le culot récupéré est redispersé dans l'eau ultra pure (système Milli-Q) et lyophilisée à l'aide d'un lyophilisateur (Alpha 1–4 LD plus, Martin Christ) pendant 15h (Figure 4.1).

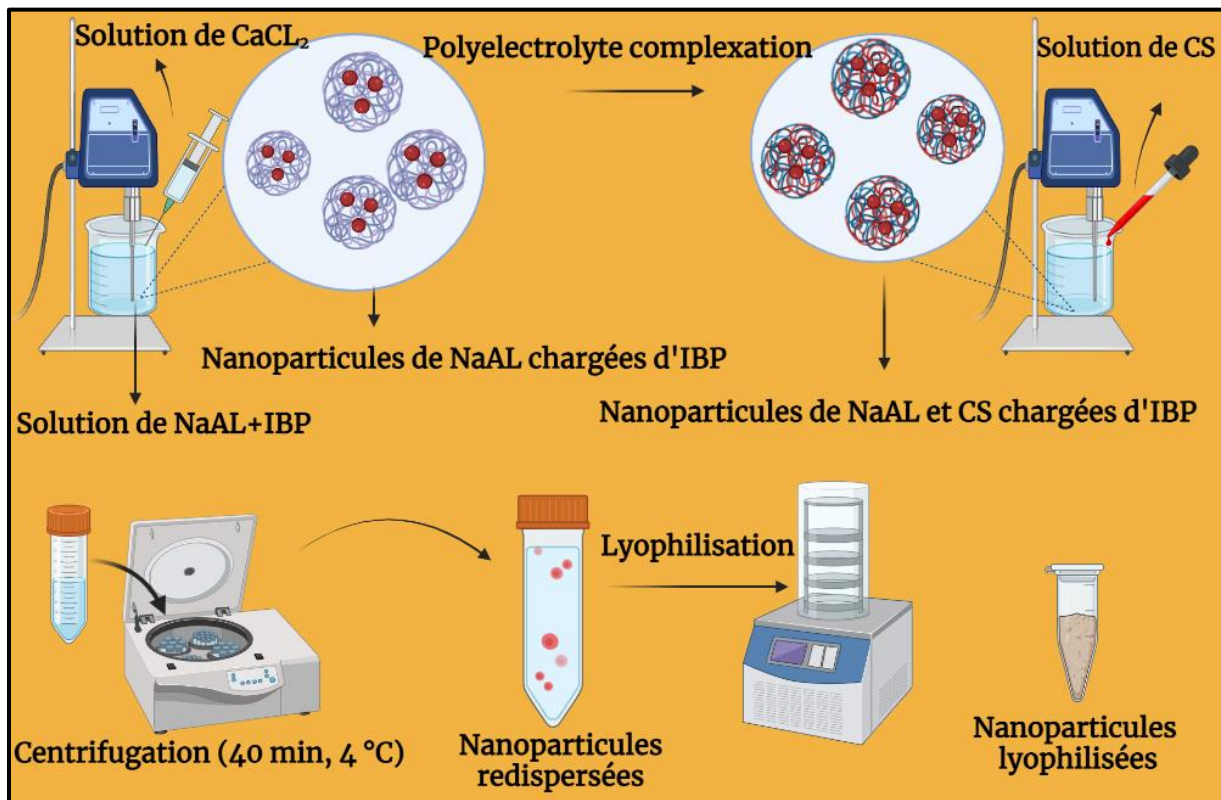


Figure 4. 1 : Description de la méthode de préparation des nanoparticules de NaAL/CS chargées d'ibuprofène (Image créée sur BioRender).

4.3 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR est utilisée pour identifier les groupements fonctionnels et leurs éventuelles interactions pour former des NPs. Le spectre infrarouge de NPs chargées d'IBP lyophilisées est analysé et comparé à ceux de NaAL, CS et IBP, libres. Les spectres sont enregistrés par un spectromètre FTIR (FTIR-4100, Jasco) dans une plage de 500 à 4000 cm⁻¹.

4.4 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC est utilisée pour vérifier l'encapsulation de l'IBP et étudier la cristallinité de ce PA. Les thermogrammes ont été enregistrés à l'aide d'un calorimètre différentiel à balayage (DSC 131 Evo, Setaram instrumentation). Les échantillons (NaAL, CS, IBP et les NPs chargées d'IBP lyophilisées) sont placés dans un creuset en aluminium, puis fermés et analysés sous un flux d'argon. L'analyse balaie une gamme de température entre 20 et 300 °C avec une vitesse de 10 °C min⁻¹. Un creuset en aluminium vide, scellé de la même manière que l'échantillon, a été utilisé comme référence.

4.5 Microscopie électronique à balayage à émission de champs MEB-FEG

La taille et la morphologie des nanoparticules sont observées par un microscope électronique à balayage à émission de champs (JSM-7100F, Jeol Ltd., Japan). Les NPs lyophilisées ont été déposées sur un support échantillon et fixées par un ruban adhésif en carbone pour générer les électrons sous une tension d'accélération de 2 kV.

4.6 Efficacité d'encapsulation

La méthode indirecte est utilisée pour déterminer l'efficacité d'encapsulation des NPs chargées d'IBP.

La dispersion colloïdale des NPs chargées d'IBP est soumise à une ultracentrifugation 15 000 tr min⁻¹ pendant 40 min. le surnageant est prélevé et analysé par un spectrophotomètre UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) à une longueur d'onde (λ) égale à 265 nm pour quantifier l'IBP non encapsulé. L'EE% et la CL% sont calculés à partir des Équations 3.3 et 3.4. L'analyse est reproduite trois fois.

4.7 Étude de Dissolution *in vitro*

L'étude de la libération *in vitro* de l'IBP a été réalisée dans un bécher dans le fluide gastrique simulé sans enzyme (FGS) pH=1,2 pendant 2h et durant 8h dans le fluide intestinal sans enzyme (FIS) pH=6,8 et le *phosphate buffered saline* (PBS) pH=7,4. Le volume du milieu de dissolution et la masse des NPs ont été fixés pour les trois milieux (volume = 200 mL, masse = 50 mg) à une température de 37 °C \pm 0,5 °C et une vitesse d'agitation de 50 tr min⁻¹. Une sonde à fibre optique du spectrophotomètre UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) a été immergée dans le milieu de dissolution. À des temps prédéterminés, l'absorbance a été mesurée à $\lambda=265$ nm à l'aide de la sonde pour quantifier l'IBP libéré. Le protocole de préparation des trois milieux de dissolution est inséré en **Annexe B**.

La cinétique de libération de l'IBP à partir de NPs de NaAL/CS a été étudiée en utilisant les modèles mathématiques suivants : ordre zéro (Équation 3.5), premier ordre (Équation 3.6), Korsmeyer-Pepass (Équation 3.7) et Kopcha (Équation 3.8).

4.8 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'inflammation peut se traduire par une diminution de certaines protéines (par exemple l'albumine) dûe à leur dénaturation [173]. La dénaturation des protéines aboutie à la perte irréversible de leur configuration tridimensionnelle, provoquée par plusieurs facteurs

tels que la chaleur, les pH extrêmes, les forces ioniques et les solvants organiques [174]. Les AINS sont capable d'inhiber non seulement la synthèse de prostaglandines mais aussi la dénaturation de protéines [173]. De ce fait, l'activité anti-inflammatoire des NPs chargées d'IBP a été évaluée *in vitro* en utilisant la méthode de dénaturation protéique du sérum d'albumine bovine (en anglais, BSA pour *bovine serum albumin*) par la chaleur [175]. Cette évaluation a été réalisée en deux parties. La première partie consiste à examiner l'activité biologique des NPs dans l'eau, alors que la deuxième repose sur l'évaluation des NPs dans les trois milieux de dissolution étudiés (FGS, FIS et PBS).

a) Préparation des solutions pour l'étude de l'activité anti-inflammatoires *in vitro* dans l'eau

Une solution mère de NPs chargées d'IBP est préparée à la concentration $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ dans l'eau ultra pure (système Milli-Q). Une dilution en cascade est effectuée dans de l'eau ultra pure (1000 , 500 , et $250 \mu\text{g mL}^{-1}$). Parallèlement, une solution d'IBP pur à $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a été préparée dans l'eau ultra pure.

b) Préparation des solutions pour l'étude de l'activité anti-inflammatoires *in vitro* dans FGS, FIS et PBS

Les NPs chargées d'IBP ont été dispersées dans FIS et PBS pendant 8h et dans le FGS pendant 2h.

Toutes les solutions préparées dans les deux parties ont été filtrées (0,22 µm) pour éliminer les produits qui n'ont pas réagi.

c) Description de la méthode

Une solution de BSA à 0,2% w/v a été préparée dans un tampon de trizma hydrochloride (Tris-HCl) (pH=6,6). Une série de tube a été préparée en mettant 500 µL de chaque solution préparée dans les deux parties et 500 µL de BSA (0,2% w/v). Un tube contrôle a été préparé en mélangeant 500 µL de BSA avec 500 µL du solvant utilisé. Tous les tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 15 min et chauffés par la suite dans un bain mari pendant 5 min à 72 °C. Après refroidissement de 10 min, les absorbances de toutes les solutions sont enregistrées à 660 nm en utilisant le Tris-HCl comme un blanc (Figure 4.2). Chaque essai est répété trois fois et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition de la dénaturation(\%)} = \frac{\text{ABS}_{\text{Contrôle}} - \text{ABS}_{\text{échantillon}}}{\text{ABS}_{\text{Contrôle}}} \times 100 \quad (4.1)$$

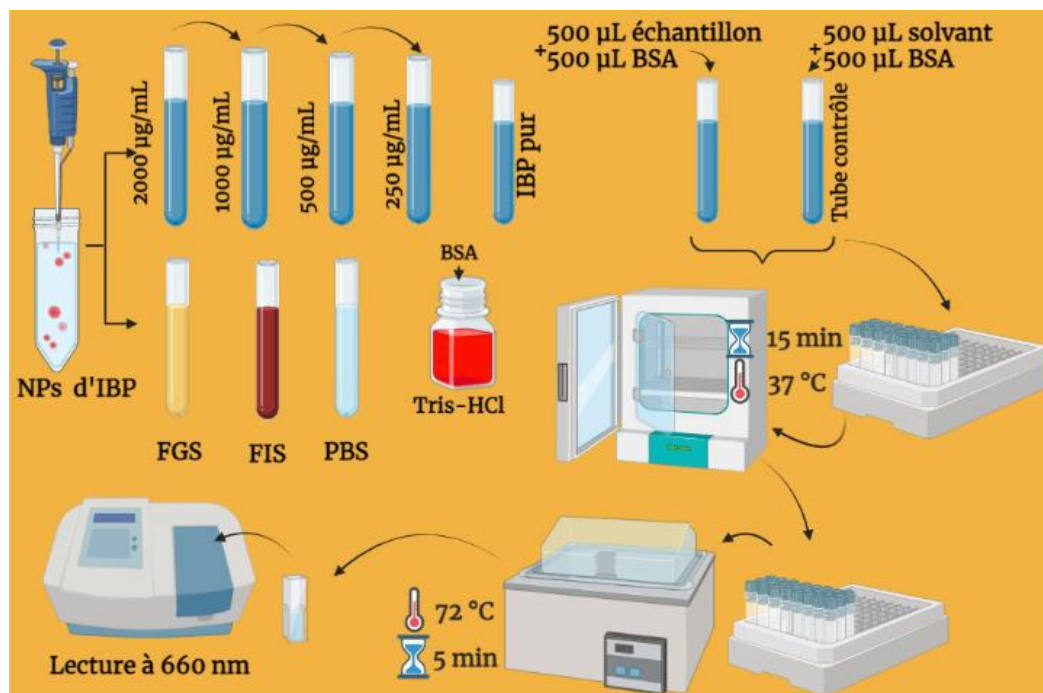


Figure 4. 2 : Description de la méthode suivie pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire (Image créée sur BioRender).

4.9 La biodégradation *in vitro*

La dégradation des NPs chargées d'IBP par le lysozyme a été déterminée selon la méthode décrite par Gomathi et al. [176]. Des masses identiques de NaAL, CS et de NPs chargées d'IBP ont été placées séparément dans des sachets à infusion et immergés chacun par la suite dans une solution de PBS contenant le lysozyme à 10 mg L⁻¹ et incubés à 37 °C. À des temps prédéterminés (24, 48, 72, 96 et 120 h), les sachets à infusion sont prélevés, rincés avec de l'eau ultra pure (système Milli-Q), séchés à 40 °C puis pesés. Le pourcentage de dégradation de chaque échantillon à chaque point de mesure est déterminé à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ Dégradation} = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100 \quad (4.2)$$

Avec, m_0 est la masse initiale de l'échantillon, m_t est la masse de l'échantillon à temps t .

4.10 Évaluation de la cytotoxicité *in vitro* sur les larves d'*Artémia salina***a) Principe**

La cytotoxicité des NPs a été examinée sur des larves d'*Artémia salina* selon la méthode mise au point par Vanhaecke et al. [177]. Ce test s'appuie sur la survie des larves d'*Artémia salina* en présence de l'échantillon à tester dans l'eau de mer. En effet, les résultats de ce test corrélerent avec ceux de la cytotoxicité sur les cellules A-549 du carcinome pulmonaire, les cellules 9PS et 9KB (carcinome nasopharyngien humain) ainsi que les cellules HT-29 du carcinome du côlon [178,179]. Ce test présente les avantages d'être simple, économique et reproductible. Il est largement utilisé pour tester la toxicité des différents produits tels que les nanostructures, les extraits de plantes, les produits pharmaceutiques, les produits chimiques, les produits agroalimentaires, les métaux lourds et les pesticides [180].

b) Description de la préparation des *Artémia*

Les cystes d'*Artémias* (2 g) sont mis à éclore dans un litre d'eau de mer artificielle, et placés ensuite dans un incubateur pendant 48 h (Paramètres de culture : une salinité de 38 g L⁻¹, une température de 28 °C, une lumière artificielle continue, une aération et un flux d'oxygène constant). Après la période indiquée, Les *nauplii* ont été récoltés dans des boîtes de Pétries en utilisant une micropipette sous loupe binoculaire aidant à séparer les larves des

œufs non éclos et des débris d'œufs (le cycle de vie d'*artémia salina* est donné dans l'Annexe C).

c) Préparation des solutions de NPs chargées d'IBP à tester

Les NPs ont été préparés à raison de 4000 µg mL⁻¹ de solvant de dissolution (diméthyl sulfoxyde (DMSO)). Nous avons procédé ensuite à cinq dilutions successives (2000, 1000, 500, 250 and 125 µg mL⁻¹). Une série de tubes a été préparée contenant les solutions de NPs préparées (100 µL) et une colonie de dix larves *nauplii*. Le volume final de chaque tube est ajusté à 5 mL avec l'eau de mer. Parallèlement, des tubes témoins ne contenant pas de substance à tester ont été préparés. Chaque test est répété trois fois pour chaque concentration. Tous les tubes préparés ont été placés dans un incubateur pendant 24h sous les mêmes conditions de culture citées précédemment. Après 24h, le comptage sous loupe binoculaire du nombre de larves survivantes dans chaque tube (Figure 4.3) permet d'évaluer la toxicité de l'échantillon testé et de calculer le pourcentage de mortalité en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Mortalité \%} = \frac{(\text{Mortalité du Test} - \text{Mortalité du témoin})}{(100 - \text{Mortalité du témoin})} \times 100 \quad (4.3)$$

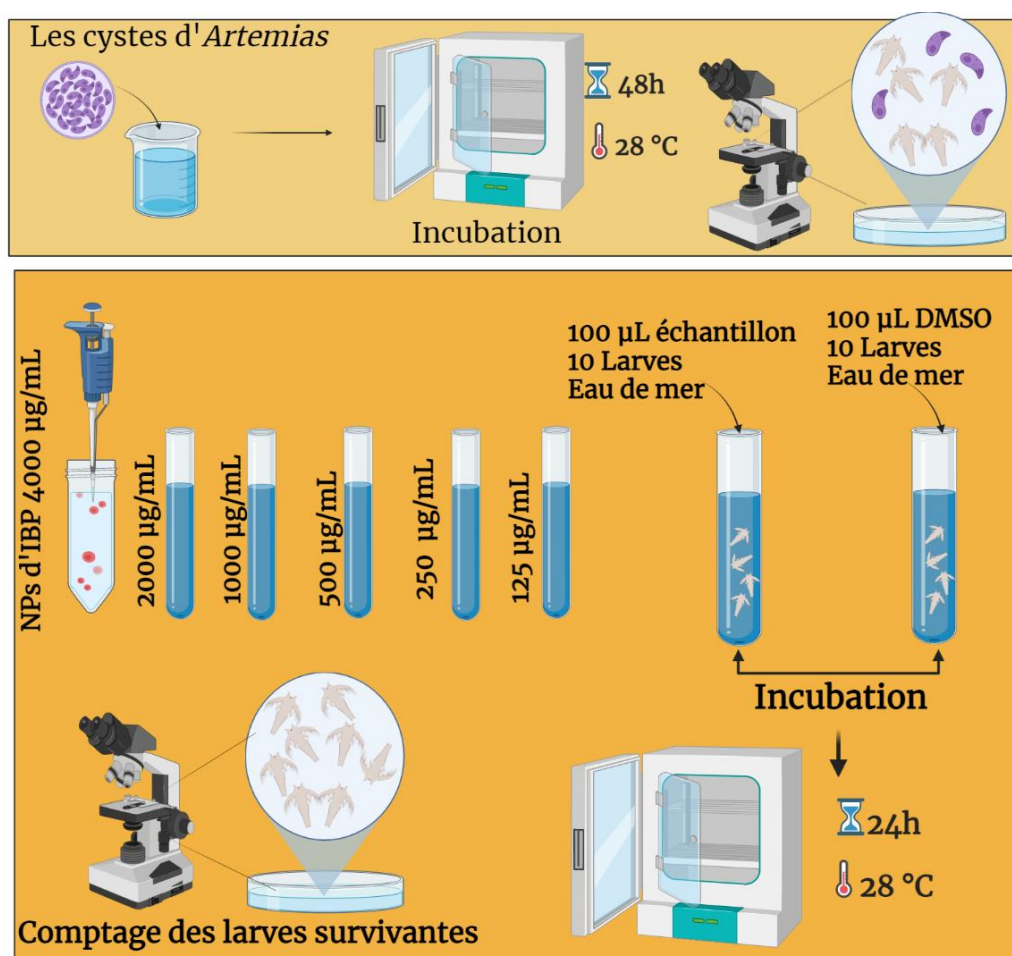


Figure 4. 3 : Description de la méthode suivie pour l'évaluation de la cytotoxicité sur les larves d'*Artémia salina* (Image créée sur BioRender).

La toxicité de l'échantillon est estimée en utilisant le tableau de corrélation associant la concentration létale de 50% (CL50) des larves *nauplii* au degré de toxicité (Tableau 4.1) [181,182].

Tableau 4. 1: Estimation de la toxicité des produits testés sur les larves d'*Artémia salina* selon la concentration létale 50% (CL50) [178].

CL ₅₀	Toxicité
CL ₅₀ ≥ 1000 µg mL ⁻¹	Non cytotoxique
1000 µg mL ⁻¹ > CL ₅₀ ≥ 500 µg mL ⁻¹	Faiblement cytotoxique
500 µg mL ⁻¹ > CL ₅₀ ≥ 250 µg mL ⁻¹	Cytotoxicité modérée
250 µg mL ⁻¹ > CL ₅₀ ≥ 100 µg mL ⁻¹	Fortement cytotoxique.

CHAPITRE V

NANOPARTICULES CHARGÉES DE MÉTRONIDAZOLE SOUS FORME D'UN COMPLEXE

5.1 Liste des produits

- β -cyclodextrine (formule moléculaire : $C_{42}H_{70}O_{35}$ poids moléculaire : 1135 g mol^{-1}), produit par Sigma-Aldrich.
- 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (degré de substitution 0,8) produit par Sigma-Aldrich
- Chitosane (formule moléculaire : $(C_6H_{11}NO_4)_n$; poids moléculaire : moyen ; degré de désacétylation déterminé par 1H RMN (voir ANNEXE A): 83,63%) produit par Sigma-Aldrich.
- Métronidazole (formule moléculaire : $C_6H_9N_3O_3$; poids moléculaire : $171,16 \text{ g mol}^{-1}$) fournis par HUP Pharma Constantine.
- Sodium tripolyphosphate (formule moléculaire : $Na_5P_3O_{10}$, poids moléculaire : $367,864 \text{ g mol}^{-1}$) produit par Acros Organics.
- Acide chlorhydrique 37% (formule moléculaire : HCl ; poids moléculaire : $36,46 \text{ g mol}^{-1}$), produit par VWR.
- Hydroxyde de sodium (formule moléculaire : $NaOH$; poids moléculaire : 40 g mol^{-1}), produit par Biochem Chemopharma.
- Acide acétique (pureté 99 % ; formule moléculaire : CH_3COOH poids moléculaire : $60,052 \text{ g mol}^{-1}$), produit par VWR.
- Chlorure de sodium (formule moléculaire : $NaCl$; poids moléculaire $58,44 \text{ g mol}^{-1}$), produit par Sigma-Aldrich.
- Chlorure de potassium (formule moléculaire : KCl ; poids moléculaire $74,55 \text{ g mol}^{-1}$), produit par Sigma-Aldrich.
- Hydrogénophosphate de sodium (formule moléculaire : NaH_2PO_4 ; poids moléculaire $141,96 \text{ g mol}^{-1}$), produit par Sigma-Aldrich.
- Phosphate de potassium monobasique (formule moléculaire : KH_2PO_4 ; poids moléculaire $136,086 \text{ g mol}^{-1}$), produit par Sigma-Aldrich.
- Bouillon Mueller-Hinton produit par Scharlau Microbiology.

5.2 Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue

La méthode de job ou la méthode de variation continue [82,83] a été employée afin de déterminer la stœchiométrie des deux complexes étudiés : BCD-MTZ et HPBCD-MTZ. Dans notre travail la propriété physico-chimique suivie est l'absorbance (ABS) en UV-Vis.

Nous avons préparé dans l'eau distillée une série de mélange BCD/MTZ et HPBCD/MTZ de concentration différentes, tout en gardant $[MTZ]+[CD]=\text{constante}=50 \mu\text{M}$. L'absorbance a été enregistrée pour chacune de ces solutions à 25 °C sur un spectrophotomètre UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) (Figure 5.1). La stœchiométrie des deux systèmes est obtenue en rapportant $\Delta\text{ABS} \times R$ en fonction du R.

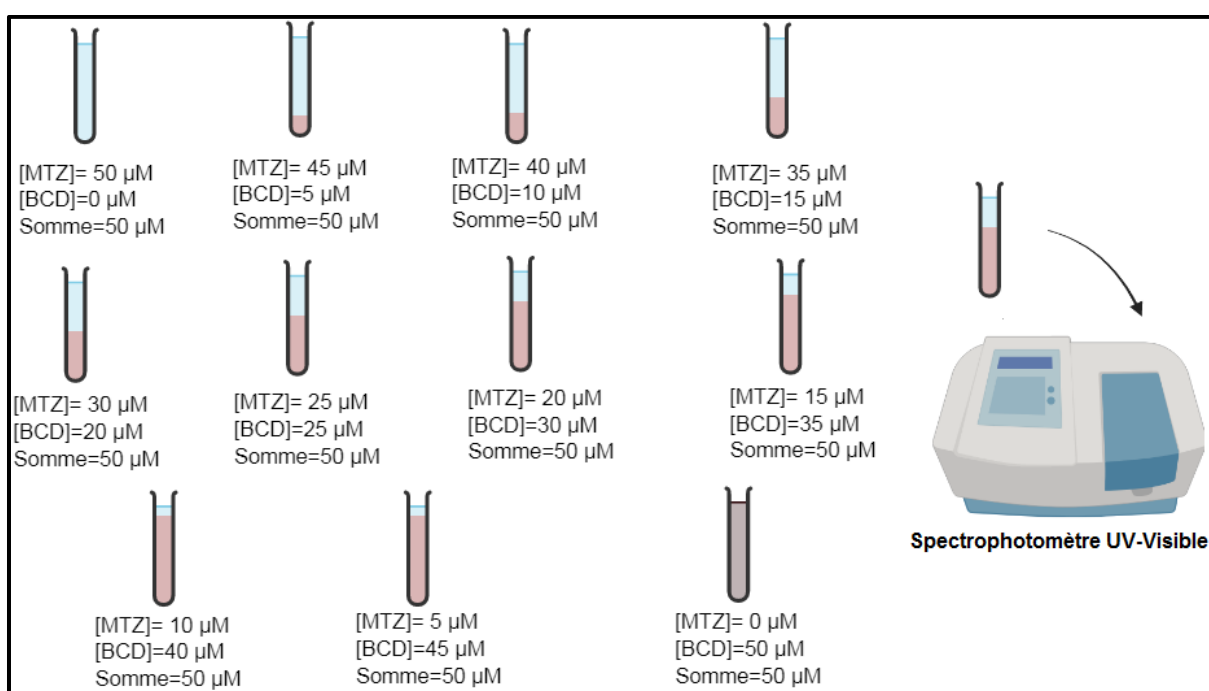


Figure 5. 1: Protocole expérimental suivi pour la détermination de stœchiométrie par UV-Vis (Image créée sur Chemix).

5.3 Détermination des constantes d'association et les paramètres thermodynamiques par UV-Visible

Dans notre travail, nous avons utilisé la spectroscopie UV-Vis pour déterminer les constantes d'association (K_a) [86,88] ainsi que les autres grandeurs thermodynamiques (ΔG , ΔH et ΔS) à quatre différentes températures (293,15, 303,15, 308,15, 313,15 et 318,15 K) en utilisant l'eau distillée comme solvant.

Nous avons réalisé une série de mélange pour les deux systèmes BCD-MTZ et HPBCD-MTZ où le MTZ (molécule titrée) est maintenue à une concentration fixe de 25 μM alors que les

deux CDs (molécule titrante) sont ajoutées à des concentrations croissantes 50-300 μM . L'absorbance de chaque solution a été mesurée sur un spectrophotomètre UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) (Figure 5.2).

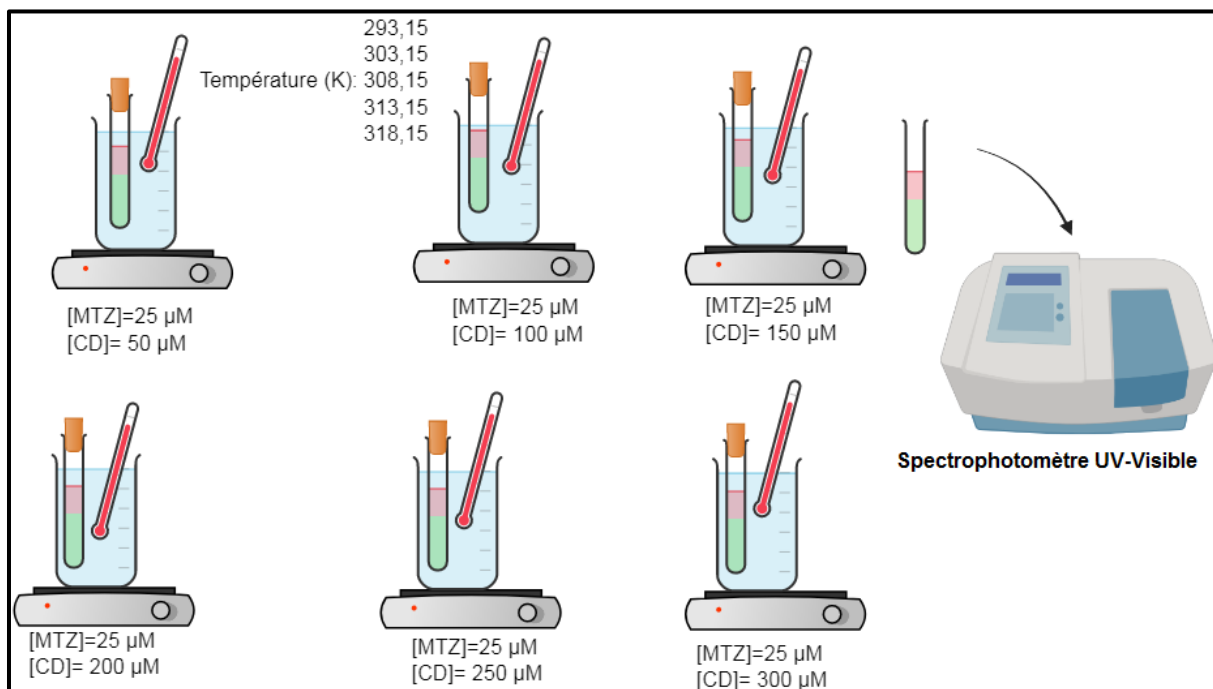


Figure 5. 2 : Protocole expérimental suivi pour la détermination des grandeurs thermodynamiques par UV-Vis (Image créée sur Chemix).

5.4 Étude de phase de solubilité

Une étude comparative entre la capacité de solubilisation de la BCD et l'HPBCD a été faite selon la méthode décrite par Higuchi et Connors [89]. Un excès du MTZ (70 mM) est ajouté à des solutions de CD à des concentrations croissantes (14-70 mM) dans des flacons ambrés. Les mélanges sont ensuite soumis à une agitation de 120 tr min^{-1} à 25 °C pendant cinq jours pour atteindre l'équilibre. Toutes les solutions ont été filtrées (0,22 μm), diluées et analysées en spectroscopie UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) à $\lambda_{\text{max}}=320 \text{ nm}$ pour déterminer la concentration du MTZ (Figure 5.3).

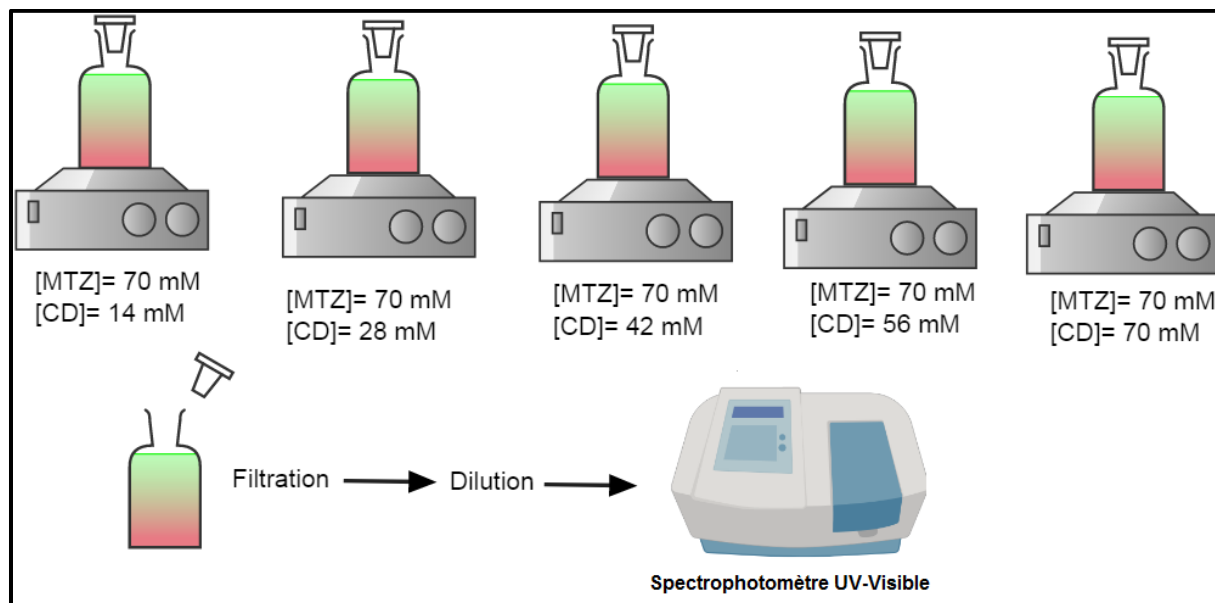


Figure 5.3 : Protocole expérimental suivi pour l'étude de phase de solubilité (Image créée sur Chemix).

5.5 Préparation des mélanges physiques et complexes d'inclusion CD-MTZ

La préparation des mélanges physiques ainsi que les complexes d'inclusion du BCD-MTZ et HPCD-MTZ est basée sur les résultats obtenus dans les parties de méthode de variation continue, diagramme de solubilité et Benesi-Hildebrand suggérant un rapport molaire CD:MTZ de 1:1.

5.5.1 Préparation des mélanges physiques CD-MTZ

Les mélanges physiques sont préparés en mélangeant dans un mortier les quantités correspondantes de CDs et MTZ.

5.5.2 Préparation des complexes d'inclusion CD-MTZ

Dans un volume d'eau distillée précis, le MTZ et les CDs sont mélangés selon le rapport molaire CD:MTZ (1:1). Les solutions sont ensuite soumises à une agitation douce de 120 tr min^{-1} pendant 24 h à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ suivi d'une filtration de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Les filtrats sont lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur (Alpha 1-4 LD plus, Martin Christ) pendant 18h. Les poudres récupérées sont considérées comme les complexes d'inclusion solides.

5.6 Caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion

5.6.1 La résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres ^1H RMN du MTZ, BCD, HPBCD et leurs complexes d'inclusion ainsi que les expériences de 2D ROESY et 2D NOESY ont été enregistrés sur un spectromètre (Bruker Avance 400 MHz) à 25 °C. Tous les échantillons ont été préparés dans l'eau deutérée à 99,98 % (D_2O), filtrées (0,22 μm) et dégazées avant analyse. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm (parties par millions).

5.6.2 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR est utilisée pour évaluer la formation des complexes d'inclusion du MTZ avec la BCD et l'HPBCD à l'aide d'un spectromètre (Nicolet iS5, Thermo Fischer Scientific Inc, USA) équipé avec un accessoire ATR (réflexion totale atténuée) iD7 dans un intervalle de fréquence entre 4000 et 400 cm^{-1} .

5.6.3 La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Le comportement thermique des échantillons a été étudié à l'aide d'un appareil DSC (Q2000, TA Instruments) dans le but de vérifier la formation des complexes en comparant les courbes DSC du MTZ, BCD et HPBCD libres à ceux de leurs complexes, ainsi que leurs mélanges physiques. Pour chaque mesure, une masse d'échantillon est introduite dans un creuset en aluminium scellées hermétiquement. Un creuset vide est utilisé comme référence. Les thermogrammes ont été enregistrés dans un intervalle de température allant de 25 à 300 °C avec une vitesse de montée de 10 °C min^{-1} , sous un flux gazeux inerte d'azote.

5.6.4 Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'ATG a été employée pour dévoiler le phénomène de formation du complexe. En s'appuyant sur l'observation des différents changements qui se produisent sur les thermogrammes des complexes d'inclusion ainsi que les mélanges physiques et les comparer à ceux des produits de départ. Les analyses thermogravimétriques sont réalisées sur un appareil (Q50, TA Instruments). Les échantillons sont pesés et chauffés de la température ambiante à 500 °C avec une vitesse de 10 °C min^{-1} .

5.6.5 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images MEB ont été enregistrées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (TESCAN, VEGA3) à une tension d'accélération de 30 kV. Avant la visualisation des échantillons, une étape de métallisation au carbone est nécessaire pour augmenter la conductivité et permettre d'acquérir les images.

5.7 Étude de dissolution *in vitro*

L'étude de dissolution a été menée pour évaluer l'effet de l'inclusion du MTZ dans les deux cavités de CDs sur sa vitesse de dissolution. Elle a été également suivie et comparée à celle des mélanges physiques. Les études de dissolution ont été effectuées dans l'eau distillée et *phosphate buffer saline* (PBS) pH=7,4 (Température=37 °C ± 0,5 °C, vitesse d'agitation=70 tr min⁻¹). À des temps prédéterminés, des échantillons de 5 mL étaient prélevés et remplacés par le même milieu de dissolution. Les échantillons prélevés sont filtrés (0,22 µm) et analysés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) à λ=320 nm.

5.8 Activité antibactérienne

Pour évaluer l'effet de l'inclusion du MTZ sur son pouvoir antibactérien, une étude comparative entre l'activité antibactérienne du MTZ libre et ses deux complexes d'inclusion a été réalisée, en utilisant la technique de microdilution [183,184], dans une plaque de microtitration de 96 multipuits contre quatre souches bactérienne de référence ATCC (*American type culture collection*), deux de gram négatif: *Escherichia coli* (*E.coli*) 25922 et *Salmonella* 13076. Deux de gram positif: *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) 25923 et *Bacillus cereus* 10876. Les échantillons ont été préparés dans l'eau distillée stérile avec une concentration du MTZ identique dans les trois échantillons à évaluer (170 µg mL⁻¹). Deux dilutions ont été réalisées à 85 et 42,5 µg mL⁻¹. Dans chaque puits nous avons disposé 100 µL de bouillon Mueller-Hinton (MHB) inoculé avec 10⁶ UFC mL⁻¹ de bactérie et 100 µL de chaque échantillon préparé. Le témoin comporte 200 µL de MHB inoculé avec 10⁶ UFC mL⁻¹. Chaque test a été réalisé en trois fois. Toutes les microplaques ont été recouvertes de leurs couvercles, placées dans un agitateur de microplaque pendant 15s à 200 tr min⁻¹, puis incubées à 37 °C pendant 24h. La croissance bactérienne a été déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 630 nm à l'aide d'un lecteur microplaque (ELx800, BioTek

Instruments, USA) (Figure 5.4). Les résultats sont exprimés en moyenne de pourcentage de l'activité antibactérienne \pm les écart-types.

Le pourcentage d'activité antibactérienne du MTZ libre et les deux complexes d'inclusion pour chaque concentration est calculé selon l'équation 5.1.

$$\% \text{ Activité antibactérienne} = \frac{(DO_t - DO)}{DO_t} \quad (5.1)$$

Avec :

DO_t : la densité optique de la culture bactérienne du témoin

DO : la densité optique de la culture bactérienne de l'échantillon à tester

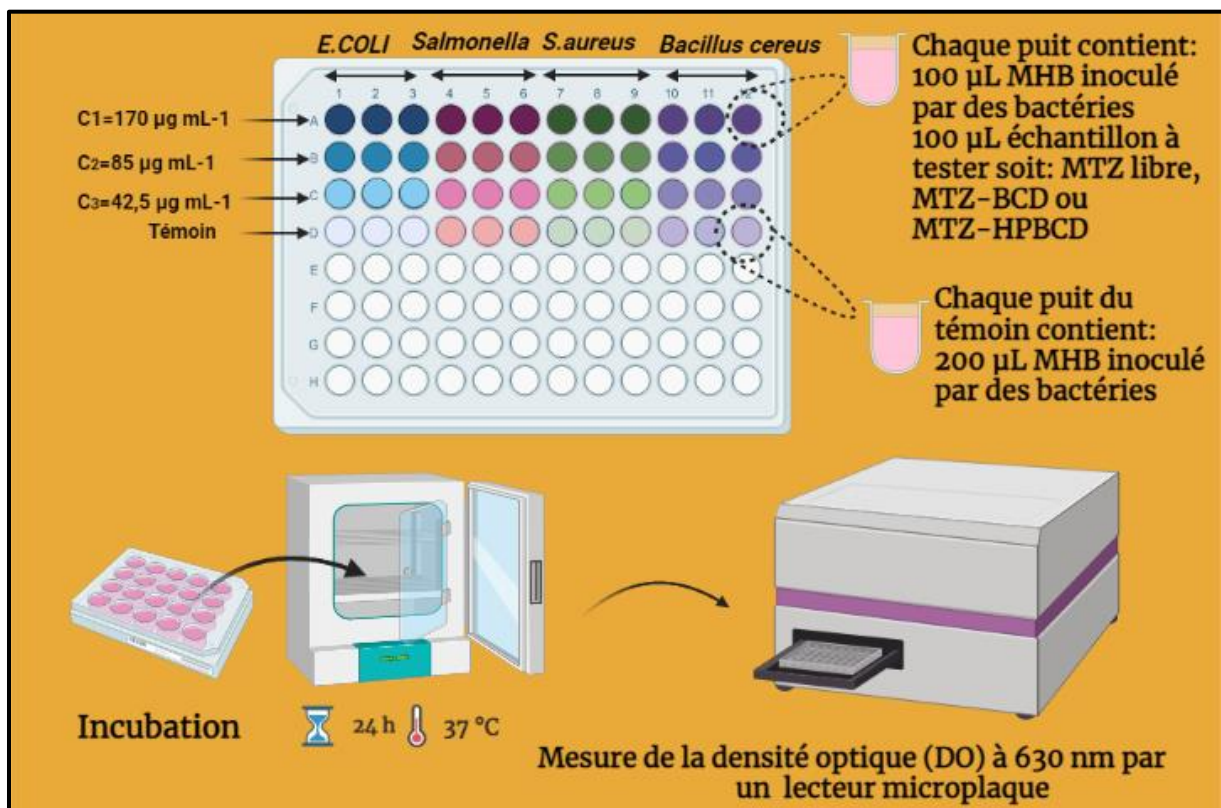


Figure 5. 4 : Description de la méthode suivie pour l'évaluation de l'activité antibactérienne par la technique microdilution (Image créée sur BioRender).

5.9 Préparation des nanoparticules de CS chargées de MTZ sous forme d'un complexe HPBCD-MTZ

5.9.1 Préparation des nanoparticules CS vides

Les nanoparticules du CS sont préparées au moyen de la gélation ionique en utilisant le TPP comme agent de réticulation selon les méthodes décrites dans la littérature [185–187].

0,1% (w/v) du CS a été préparé dans l'acide acétique 3% (v/v). Ensuite, le pH de la solution est ajusté jusqu'au 4,5 à l'aide d'une solution de NaOH (1 N). Le TPP est dissout dans l'eau déionisée à une concentration de 1 mg mL⁻¹, Le pH de la solution est ajusté à 4,1 avec une solution concentrée de l'HCl. La solution du TPP (1 mL) est extrudée lentement au travers d'une aiguille de seringue dans la solution du CS (5 mL) sous une homogénéisation à grande vitesse (8 000 tr min⁻¹), les NPs se forment spontanément via les interactions entre les groupes NH₃⁺ et les groupes négatifs du TPP. Pour assurer la réticulation, la suspension reste sous agitation pendant 30min additionnelle. La suspension obtenue est soumise à une ultracentrifugation (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Fisher Scientific) à 15 000 tr min⁻¹ pendant 40 min à 4 °C pour séparer les NPs. Le culot récupéré est redispersé dans l'eau ultra pure (système Milli-Q) et soniqué pendant 5min. La dispersion obtenue est ensuite lyophilisée à l'aide d'un lyophilisateur (Alpha 1-4 LD plus, Martin Christ) pendant 16h (Figure 5.5).

5.9.2 Préparation des nanoparticules du CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ

Les NPs chargées de complexe d'inclusion HPBCD-MTZ ont été préparées de la même méthode que la préparation des NPs vides citée au-dessus. Brièvement, le complexe d'inclusion HPBCD-MTZ a été mélangé avec la solution du TPP avant la formation des NPs. Ce mélange est ensuite extrudé lentement au travers d'une aiguille de seringue dans la solution du CS, conduisant à la formation spontanée des NPs piégeant le complexe d'inclusion (Figure 5.5).

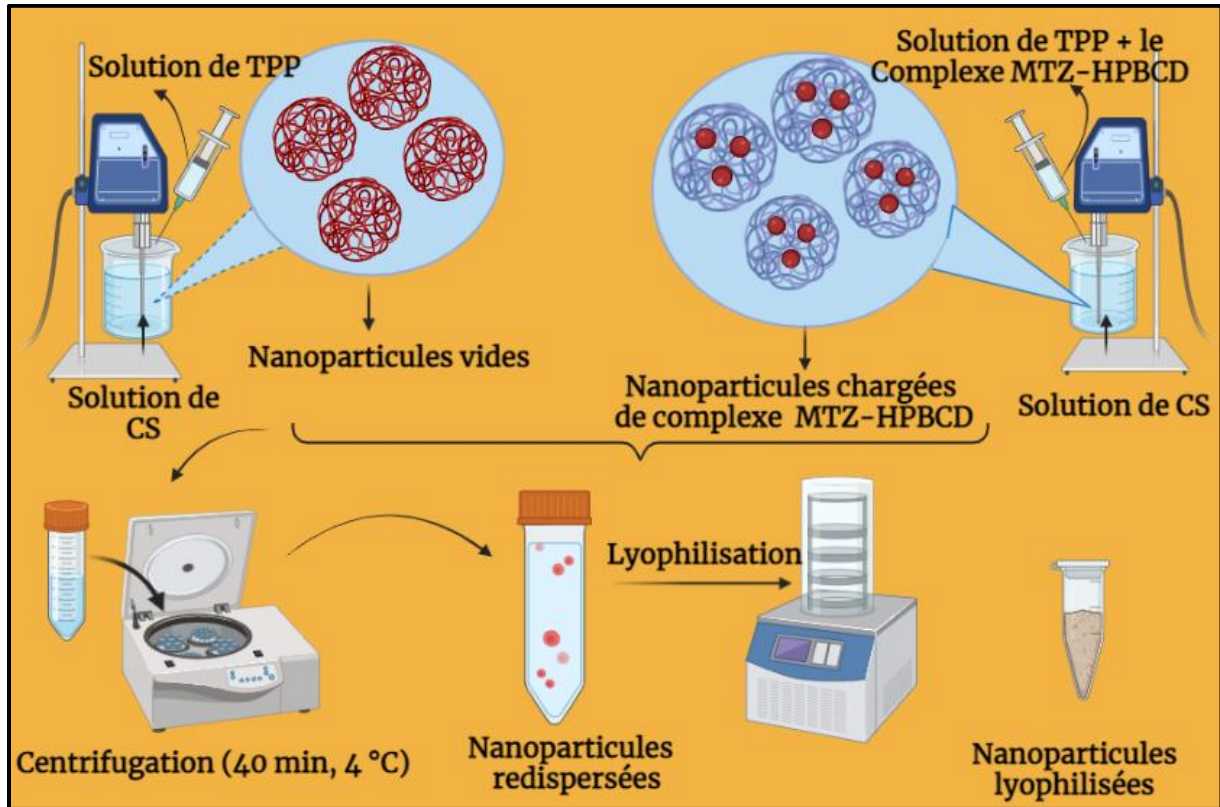


Figure 5. 5 : Description de la méthode de préparation des nanoparticules de CS-TPP vides et des nanoparticules de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ (Image créée sur BioRender).

5.10 Caractérisation des nanoparticules du CS-TPP chargées de complexe d'inclusion HPBCD-MTZ

5.10.1 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR est utilisée pour vérifier la réticulation ainsi que l'encapsulation du complexe.

Les spectres FTIR du CS, TPP, complexe d'inclusion HPBCD-MTZ lyophilisé, NPs du CS-TPP vides lyophilisées et des NPs du CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ lyophilisées sont enregistrés sur un spectromètre (Nicolet iS5, Thermo Fischer Scientific Inc, USA) équipé avec un accessoire ATR (réflexion totale atténuée) iD7 dans une plage de 4000 à 500 cm^{-1} .

5.10.2 Microscopie électronique en transmission (MET) des NPs chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ

Pour l'étude de la taille et la morphologie des NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ, une dispersion dans l'eau ultra pure de NPs lyophilisé est passée 5 min dans un bain à ultrason à température ambiante. Une goutte de la dispersion est déposée par la suite sur une grille en cuivre avec un film de carbone ultrafin, et traitée à l'acétate d'uranyle (coloration négative) afin d'augmenter la visibilité de l'échantillon. Après séchage de la goutte, La grille est examinée avec un microscope électronique en transmission (G2, Tecnai) travaillant à 200 kV.

5.10.3 Microscopie électronique à balayage à émission de champs (MEB- FEG) des NPs chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ

La taille et la morphologie des NPs chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ sont observées par un microscope électronique à balayage à émission de champs (JSM-7100F, Jeol Ltd., Japan). Les NPs lyophilisées ont été déposées sur un support échantillon et fixées par un ruban adhésif en carbone pour générer les électrons, en appliquant une tension d'accélération de 2 kV.

5.10.4 La diffusion dynamique de la lumière (DLS) des NPs chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ

Les mesures de DLS ont été effectuées sur un dispositif Zetasizer (Zetasizer Ultra, Malvern Panalytical) pour déterminer le diamètre hydrodynamique et la distribution de taille des NPs. Les NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ lyophilisées ont été dispersées dans l'eau ultra pure (système Milli-Q) et analysées par la suite.

5.10.5 Étude de libération *in vitro*

L'étude de la libération *in vitro* des NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ a été réalisée dans un bécher dans le PBS (pH=7,4) pendant 8h à une température de $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ et une vitesse d'agitation de 70 tr min^{-1} . À des temps prédéterminés, des échantillons de 5 mL étaient prélevés et remplacés par le même milieu. Les échantillons prélevés sont filtrés ($0,22 \text{ }\mu\text{m}$) et analysés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) à $\lambda=320 \text{ nm}$.

La cinétique de libération du MTZ à partir de NPs CS-TPP chargées du complexe HPBCD-MTZ a été étudiée en utilisant les modèles mathématiques suivants : ordre zéro (Équation 3.5), premier ordre (Équation 3.6) et Korsmeyer-Pepass (Équation 3.7).

PARTIE 3
RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE VI

NANOPARTICULES CHARGÉES D'IBUPROFÈNE

6.1 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres FTIR de NaAL, CS, IBP et de NPs chargées d'IBP sont illustrés dans la (Figure 6.1).

Le spectre FTIR de NaAL montre deux pics caractéristiques à 1601 et 1419 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations d'élongation asymétrique et symétrique des anions carboxylate (COO^-). La large bande à 3263 cm^{-1} est due aux vibrations de valence de la liaison de groupes O–H. Les vibrations d'élongation asymétrique de la liaison C–H apparaissent autour de 2916 cm^{-1} . Les pics caractéristiques de la structure du polysaccharide sont apparus autour de 1300 cm^{-1} et 1030 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations d'élongation des liaisons C–O et C–O–C. La bande à 1098 cm^{-1} est attribuée aux vibrations d'élongation du C–C et du C–O du noyau pyranose. Un autre pic caractéristique de l'alginate de sodium (Na^+/O^-) est apparu à 818 cm^{-1} [188,189].

Le spectre du CS présente une bande de vibration d'élongation des groupements hydroxyle (OH) à 3357 cm^{-1} et une bande de vibrations d'élongation amine N–H ainsi que les liaisons hydrogène inter et intramoléculaires (O–H) à 3284 cm^{-1} . Les bandes à 2916 et 2871 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux vibrations d'élongation asymétrique et symétrique des groupements CH. Les pics caractéristiques du CS sont repérés à 1656, 1570 et 1308 cm^{-1} , correspondent respectivement aux vibrations de déformation de C=O, aux vibrations de déformation des groupements NH (amide II) et aux vibrations de déformation des groupements CO–NH (amide III). Les pics du CS caractéristiques des polysaccharides détectés à 1149, 1070 et 1030 cm^{-1} sont associés respectivement aux vibrations de déformation asymétrique du bridge C–O–C, aux vibrations d'élongation de C–O du C3 et aux vibrations d'élongation de C–O du C6. Le pic dû aux vibrations de déformation de CH est apparu à 889 cm^{-1} . Le pic à 1376 cm^{-1} est attribué à la déformation symétrique des groupements CH_3 [188,190–192].

Dans le cas d'IBP, une bande attribuée aux vibrations d'élongation des groupements hydroxyle est apparue à 3728 cm^{-1} . Un pic intense caractéristique lié à la liaison C=O d'un acide carboxylique (COOH) est repéré à 1702 cm^{-1} . Les bandes à 2952 et 2866 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations d'élongation asymétrique de CH_3 et aux vibrations d'élongation symétrique de CH_2 . Le pic à 1503 cm^{-1} est associé aux vibrations

d'élongation du C=C du cycle aromatique. Les pics à 929 et 775 cm^{-1} présentent respectivement les vibrations de déformation avec rotation du CH_3 et CH_2 . [193]

Dans le spectre des NPs chargées d'IBP nous avons remarqué le déplacement du pic caractéristique des groupes COO^- de 1419 à 1400 cm^{-1} , ce changement est dû aux échanges ioniques entre le Na^+ et les Ca^{2+} qui s'associent préférentiellement aux fragments polyguluronate. La bande liée aux vibrations d'élongation de la liaison O-H des NPs est apparue plus étroite par rapport à celle de NaAL et CS libres, indiquant la formation des liaisons hydrogène intramoléculaires entre les deux polysaccharides. Un nouveau pic est apparu à 1637 cm^{-1} confirmant la formation du groupe $-\text{NH}_3\text{C}$ suite à la formation du complexe polyélectrolyte via les interactions entre les groupes NH_3^+ et COO^- , de ce fait le pic associé aux groupements amine protonés est décalé vers 1546 cm^{-1} [188]. Nous pouvons conclure par les changements cités ci-dessus que les groupes COO^- de l'alginate sont des groupes bifonctionnels qui participent à la fois dans la réticulation avec les ions Ca^{2+} et la formation du complexe polyélectrolyte. La liaison glycosidique caractéristique des polysaccharides n'a subi aucun changement, cela indique qu'elle ne participe ni dans le processus de la gélation ionique ni dans la formation du complexe polyélectrolyte [194,195]. Le pic caractéristique de l'IBP (1702 cm^{-1}) est apparu mais avec une très faible intensité. Le pic responsable des vibrations de déformation avec rotation du CH_2 est déplacé à 794 cm^{-1} . Tous les autres pics caractéristiques de l'IBP ont disparu. La disparition, la diminution de l'intensité ainsi que le déplacement des bandes caractéristiques de l'IBP indiquent que ce dernier est bien incorporé à l'intérieur des NPs. Toutes ces observations confirment trois points essentiels: la formation des NPs par la gélation ionique, la formation du polyélectrolyte complexe et l'encapsulation de l'IBP [196].

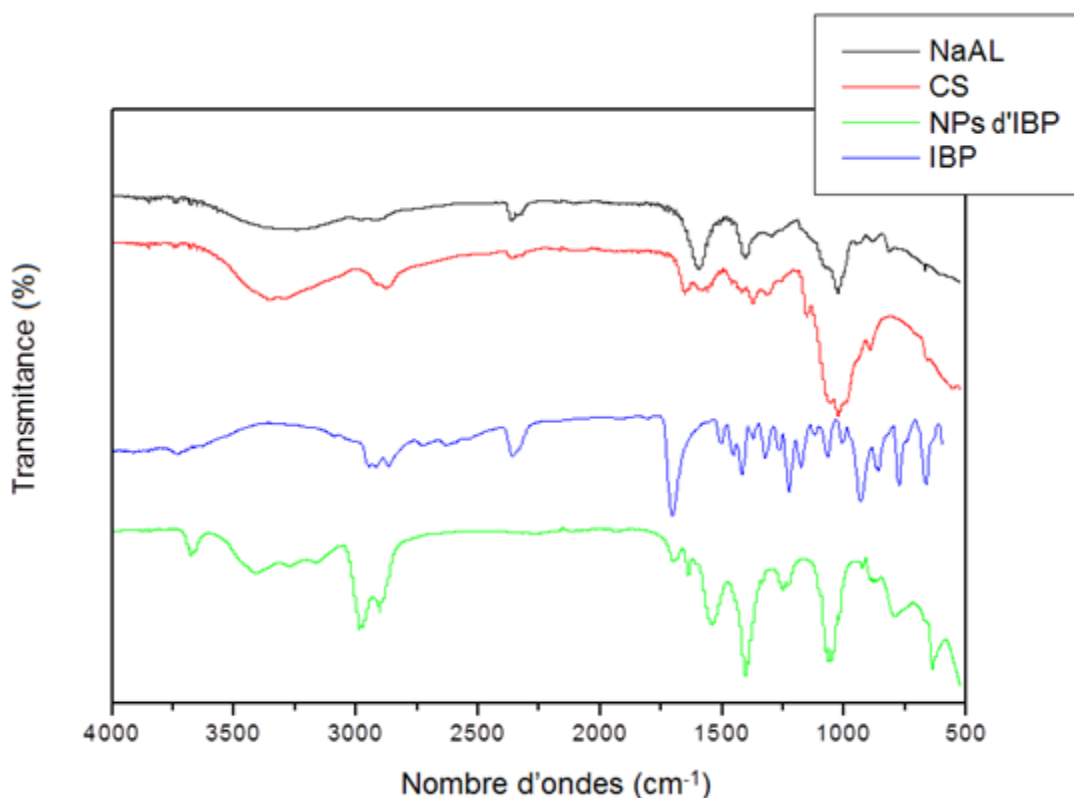


Figure 6. 1 : Spectroscopie FTIR de NaAL, CS, IBP et les NPs de NaAL/CS chargées d'IBP.

6.2 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les thermogrammes obtenus des échantillons analysés sont illustrés dans la (Figure 6.2) Le thermogramme de l'IBP libre montre un pic caractéristique à 78,5 °C, indiquant la température de fusion de ce PA.

Dans le cas de NaAL, la déshydratation était à 122 °C. Des pics exothermiques sont apparus à 241, 260 et 297 °C correspondent à la décomposition du polymère et la décarboxylation des groupes COO^- [194]. Le thermogramme du CS présente une bande à 102 °C attribuée à l'évaporation des molécules d'eau. Le pic exothermique à 288 °C est le résultat de la décomposition des groupes amines présents dans le CS [191].

Les nanoparticules présentent un pic endothermique à 119 °C correspondant à la déshydratation des nanoparticules, les pics endothermiques à 207 °C et le pic exothermique à 290 °C correspondent à la dégradation du complexe polyélectrolyte par une déshydratation des groupes hydrophiles présents dans les polymères ainsi qu'une dépolymérisation par oxydation et décarboxylation [194]. Le pic caractéristique du point de fusion de l'IBP est apparu à 70 °C avec une très faible intensité. Ce changement se traduit par la diminution de la cristallinité d'IBP suite à son encapsulation dans les NPs [196].

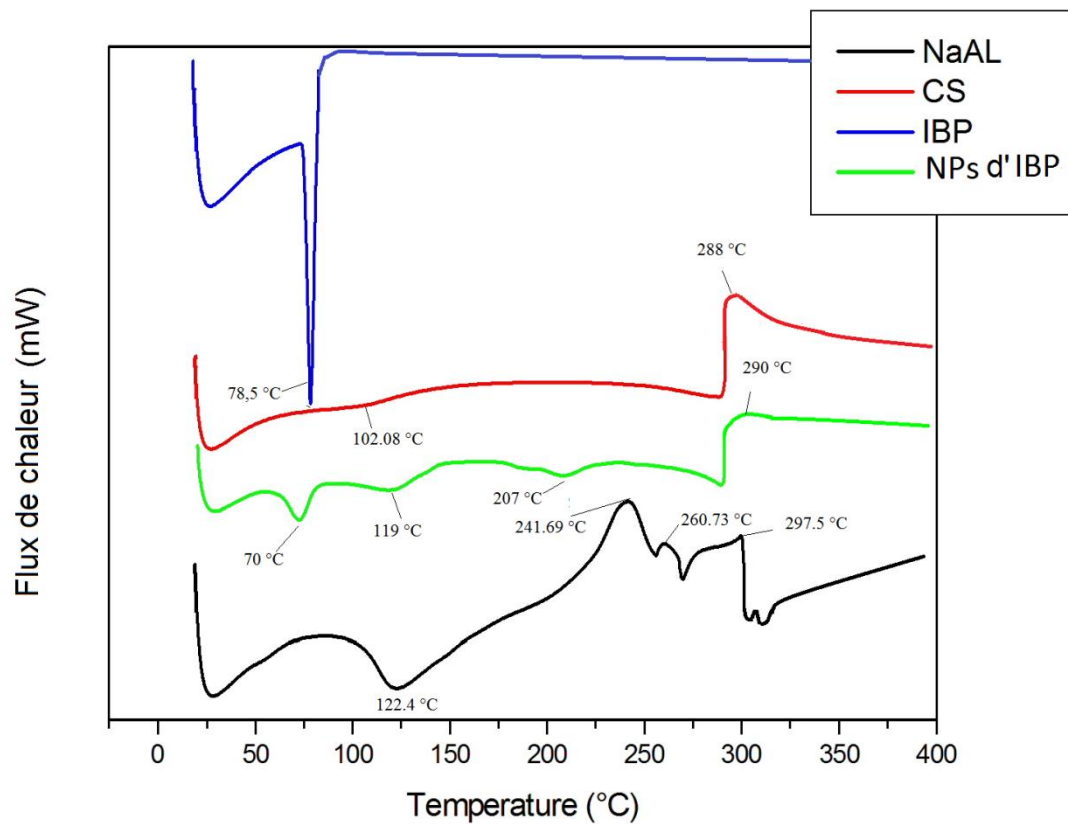


Figure 6. 2 : Thermogrammes DSC de NaAL, CS, IBP et les NPs de NaAL/CS chargées d'IBP.

6.3 Microscopie électronique à balayage à émission de champs (MEB-FEG)

Les NPs ont présenté une forme sphérique régulière avec une taille autour de 100 nm (Figure 6.3).

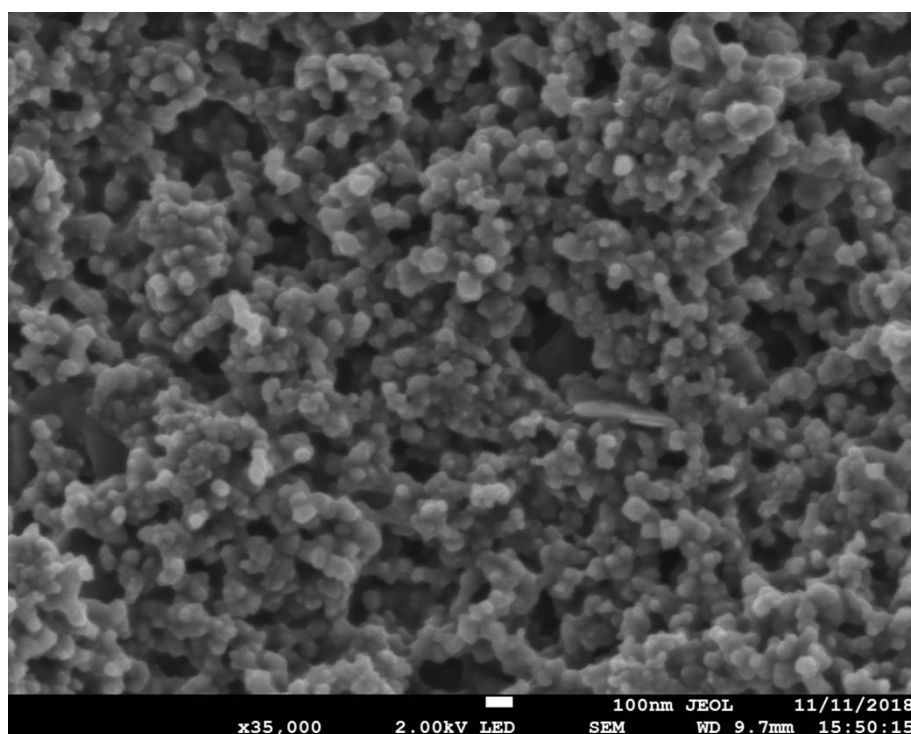


Figure 6. 3: Image MEB-FEG de NPs chargées d'ibuprofène.

6.4 Efficacité d'encapsulation

Les valeurs de l'EE% ainsi que LC% déterminées par spectroscopie UV-Vis sont listées dans le Tableau 6.1.

Tableau 6. 1 : Résultats de l'efficacité d'encapsulation (EE%) et capacité de charge (LC%) des nanoparticules chargées en IBP.

Expérience	EE%	LC%
1	98,4557	32,8185
2	98,5503	32,8501
3	98,0436	32,6812
Moyenne ±écart-type	98,3498 ± 0,2041	32,7832 ± 0,06804

Les nanoparticules chargées en IBP ont présenté une efficacité d'encapsulation très élevée.

6.5 Dissolution *in vitro*

Le profil de dissolution de l'IBP dans les trois milieux de dissolution est présenté dans la (Figure 6.4). Au bout de 2h, seulement 8,47% du PA a été libéré dans le FGS. À pH= 6,8 et 7,4 les NPs libèrent respectivement 88,74 81,52% d'IBP au bout de 8h. Cela suggère que les

nanoparticules présentent un comportement pH-sensibles. Les NPs ont pu retenir la majorité du PA encapsulé et minimiser les pertes dans le milieu gastrique. Cela est dû au revêtement des NPs avec du CS qui n'est pas sensible aux milieux acides (FGS) et limite leur pénétration au sein des NPs [4]. Une autre barrière physique contre la libération de l'IBP dans le milieu gastrique est attribuée au réseau tridimensionnel étroit de l'alginate qui se forme dans le FGS [4].

Au bout de 2h les NPs libèrent dans FSI et PBS respectivement 31,04 et 41,66% d'IBP. Dans les milieux FSI et PBS, le CS est plus sensible, il facilite la pénétration de ces milieux dans le réseau tridimensionnel du NaAL, où des échanges d'ions se déroulent entre le Ca^{2+} liés aux groupes COO^- et le Na^+ du milieu, en générant des forces électrostatiques répulsives entre les groupes COO^- , conduisant à une relaxation de la chaîne, ce qui a pour effet d'augmenter le gonflement des nanogels et par conséquent le relargage de l'IBP [197].

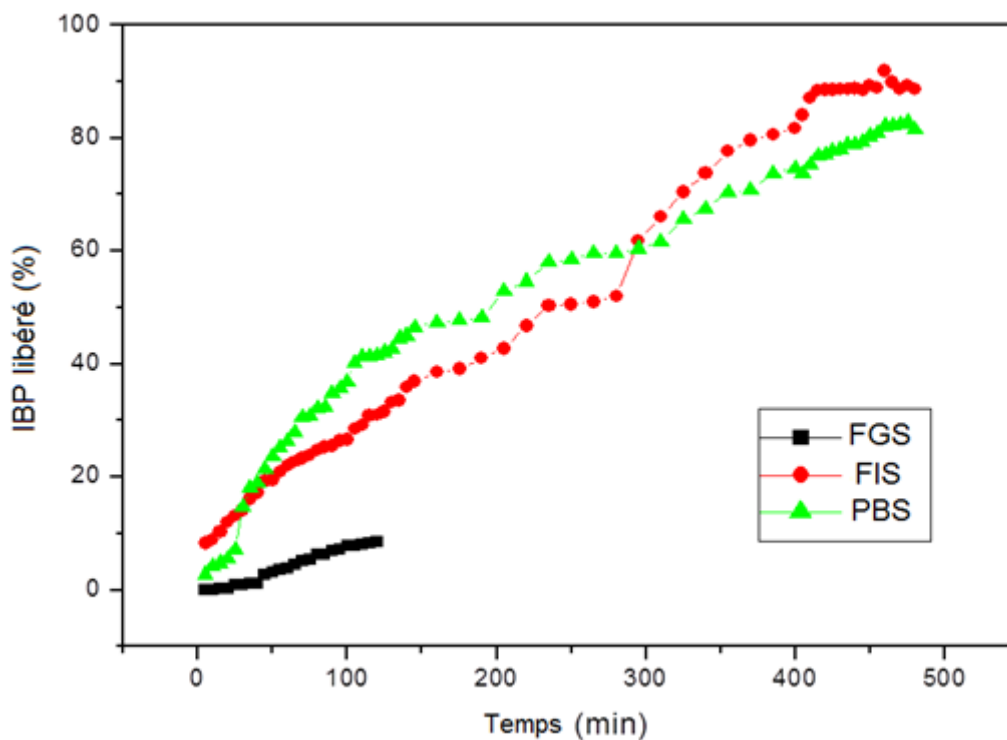


Figure 6. 4: Profil de libération de l'IBP à partir de NPs de NaAL/CS dans FGS (pH= 1,2), FSI (pH= 6,8) et PBS (pH=7,4).

Plusieurs phénomènes peuvent intervenir en même temps dans la libération d'un principe actif. Pour mieux définir ces phénomènes qui gèrent la libération de l'IBP à partir de NPs de NaAL/CS dans chaque milieu de dissolution étudié, nous avons eu recours aux

modèles mathématiques suivant : ordre zéro (Équation 3.5), premier ordre (Équation 3.6), Korsmeyer-Peppas (Équation 3.7) et Kopcha (Équation 3.8).

Les valeurs obtenues de coefficients de corrélation (R^2), de constantes de vitesse ainsi que l'exposant caractéristique du modèle de Korsmeyer-Peppas « n » sont regroupées dans le Tableau 6.2.

Tableau 6. 2: Paramètres cinétiques de la libération de l'IBP à partir de NPs de NaAL/CS dans FGS, FIS et PBS.

Milieu	Ordre zéro		Premier ordre		Korsmeyer-Peppas		
	R^2	K	R^2	K	R^2	K	n
FGS	0,9808	0,0852	0,8059	0,0377	0,9836	$2,28 \times 10^{-4}$	1,7762
FIS	0,9919	0,1792	0,9176	0,0041	0,9795	2,6521	0,5185
PBS	0,942	0,1452	0,6365	0,0039	0,9424	1,1948	0,7056

La comparaison entre les coefficients de détermination (R^2) permet d'identifier le modèle s'ajustant le mieux aux données. Le modèle qui présente la valeur la plus élevée est considéré comme le plus adéquat.

En analysant ces résultats, on constate en premier que le modèle cinétique de premier ordre ne peut être considéré comme acceptable pour aucun milieu de dissolution étudié vu que ses coefficients de détermination (R^2) sont inférieurs aux autres modèles. Les modèles qui décrivent le mieux les profils de libération dans les trois milieux sont la cinétique d'ordre zéro et Korsmeyer-Peppas.

La libération d'ordre cinétique zéro signifie que la vitesse de libération de l'IBP est indépendante de sa concentration dissoute. Ce profil de libération contrôlée avec une vitesse de libération qui compenserait l'élimination, correspond au cas « profil idéal » recherché, servant à réduire les prises journalières et diminuer les effets indésirables [169].

Le modèle de Korsmeyer-Peppas est appliqué sur les valeurs expérimentales de Q_t/Q_∞ inférieures ou égales à 60%, comme décrit dans la section « Modèles mathématiques pour les études de la libération d'un principe actif ». Lorsque $n \leq 0,43$ le PA est libéré par diffusion dite de type Fickienne. Dans la région $0,43 < n < 0,85$, plusieurs mécanismes sont impliqués, une combinaison de diffusion et une érosion ou des phénomènes d'hydratation et gonflement de matrices polymériques (diffusion anormale). Dans le cas où « n » est supérieur à 1 le mécanisme de libération est contrôlé par un gonflement et une relaxation des chaînes de polymère (érosion) « Le transport super cas II » [170].

La valeur de « n » obtenue dans le milieu gastrique est supérieure à 1. Cela indique que le mode de libération dans ce milieu est dépendant de gonflement et d'érosion.

On remarque que les valeurs de « n » obtenues pour les milieux FIS et PBS sont dans la région $0,43 < n < 0,85$. Ce qui nous permet de conclure que le mécanisme de libération dans ces milieux est non-Fickien ou anormal. C'est-à-dire que ce mode de libération est régi simultanément par la diffusion et l'érosion.

Le modèle de Kopcha est quant à lui appliqué aux résultats expérimentaux pour quantifier la contribution de la diffusion et celle de l'érosion.

Les résultats obtenus (Tableau 6.3) indique que la libération de l'IBP dans le FIS et le PBS est principalement due à la diffusion avec des valeurs de A beaucoup plus grandes que celle de B. En effet, même si le phénomène d'érosion contribue plus au moins au transport de l'IBP, la diffusion reste le phénomène majeur dans la libération de l'IBP dans ces deux milieux.

En milieu gastrique, la valeur de B est plus importante que celle de A suggérant que le mécanisme prédominant est l'érosion. Ce résultat est en cohérence avec celui obtenu dans le modèle Korsmeyer-Pepass.

Tableau 6. 3 : Le coefficient diffusionnel (A) et le coefficient d'érosion (B) obtenus pour le modèle de Kopcha.

Milieu de dissolution	A	B
FGS	-0,2532	0,0949
FIS	2,9413	0,0191
PBS	1,0897	0,1872

6.6 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

a) Résultats de l'étude de l'activité anti-inflammatoires *in vitro* dans l'eau

Les pourcentages d'inhibition de NPs chargées d'IBP à différentes concentrations et de l'IBP libre contre la dénaturation protéique de la BSA par la chaleur sont présentés dans le Tableau 6.4. Les résultats montrent qu'à la plus faible concentration étudiée ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) le pourcentage d'inhibition de NPs chargées d'IBP atteint 76,01% par rapport à 56,13% de celui de l'IBP libre ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). La faible solubilité aqueuse de l'IBP est la principale cause de son pourcentage d'inhibition faible par rapport à celui de l'IBP encapsulé. La

nanoencapsulation augmente la solubilité des agents actifs et par conséquent leur activité biologique.

Tableau 6. 4 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de NPs chargées d'IBP et de l'IBP pur par la méthode de dénaturation du sérum d'albumine bovine.

NPs chargées d'IBP	
Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inhibition de dénaturation (%) \pm écart-type
2000	101,7311907 \pm 1,9220
1000	101,3659606 \pm 4,9122
500	92,64207451 \pm 2,4324
250	76,01899196 \pm 2,4978
IBP libre à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	56,135026 \pm 3,6657

b) Résultats de l'étude de l'activité anti-inflammatoires *in vitro* dans FGS, FIS et PBS

Les résultats de l'étude comparative entre le pouvoir inhibiteur de la dénaturation thermique de la BSA de NPs chargées d'IBP dans les différents milieux de dissolution sont montrés dans la Figure 6.5. L'histogramme indique que seulement 26,45% d'inhibition de dénaturation de BSA est présenté par les NPs chargées d'IBP dans FGS. Tandis que, 88,81 et 61,63% d'inhibition de dénaturation de BSA sont présentés respectivement par les NPs chargées d'IBP dans FIS et PBS. Ces résultats sont cohérents avec ceux reportés par l'étude de la libération *in vitro*, indiquant le comportement pH sensible des NPs généré par les polymères intelligents (NaAL/CS).

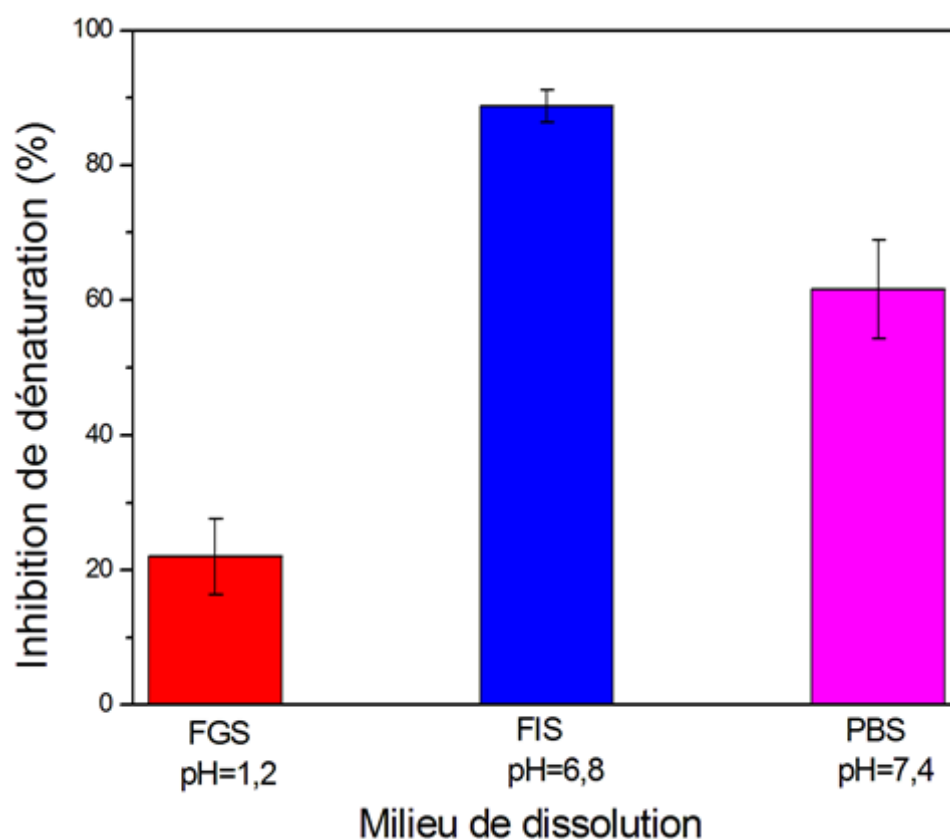


Figure 6.5 : Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des NPs chargées d'IBP dans FGS (pH=1,2), FIS (pH=6,8) et PBS (pH=7,4) par la méthode dénaturation protéique.

6.7 La biodégradation *in vitro*

Les résultats de la dégradation *in vitro* par lysozyme sont illustrés dans la Figure 6.6. Les NPs chargées d'IBP présentent un pourcentage de dégradation *in vitro* par lysozyme de 40%, cela est dû à l'incorporation de l'IBP dans un système nanométrique à base des polymères biodégradable.

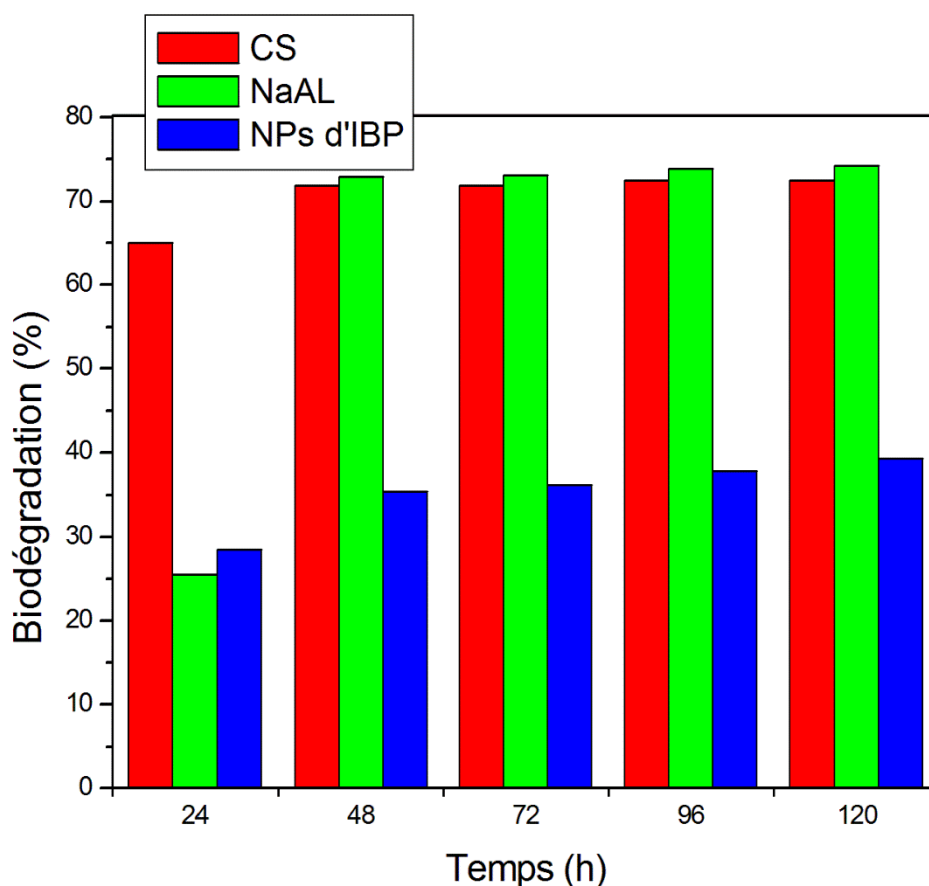


Figure 6. 6 : Biodégradation *in vitro* du CS, NaAL et NPs chargées d'IBP par lysozyme

6.8 Évaluation de la cytotoxicité *in vitro* sur les larves d'*Artemia salina*

Le pourcentage de mortalité des larves d'*Artemia salina* est déterminé après une exposition de 24h aux NPs testées, rapportée à la mortalité moyenne à six concentrations entre 125 à 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, à raison de trois répliques par concentration (Tableau 6.5). À partir de ces résultats, la valeur de CL50 déterminée par régression linéaire de la courbe qui exprime le pourcentage des larves tuées en fonction de la concentration de NPs est de 0,2485 mg mL^{-1} . Selon le tableau d'estimation de toxicité (Tableau 4.1), les NPs chargées d'IBP ne présentent pas de toxicité à la dose appliquée car la CL50 obtenue est largement supérieure à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [181]. En considérant les corrélations entre le test de toxicité larvaire (*brine shrimp*) et les tests de toxicité appliqués sur les cellules A-549 du carcinome pulmonaire, les cellules HT-29 du carcinome du côlon et les cellules 9PS et 9KB (carcinome nasopharyngien humain) [178,179] on peut dire sous réserve de poursuite des investigations, que les NPs chargées d'IBP testées ne présentent pas d'activité cytotoxique et peuvent donc être employées sans

aucun risque de toxicité. Ce test de toxicité constitue alors un pré-screening pour déterminer le degré toxicité [198].

Tableau 6. 5 : Pourcentage de mortalité des larves d'*Artemia salina* après une exposition de 24h aux NPs chargées d'IBP.

Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Test 1	Test 1	Test 1	Mortalité (%)
4000	1	1	0	1,33
2000	0	0	1	0,66
1000	0	1	0	0,33
500	0	1	1	0,66
250	1	0	0	0,33
125	1	0	0	0,33

CHAPITRE VII

NANOPARTICULES CHARGÉES DE MÉTRONIDAZOLE SOUS FORME D'UN COMPLEXE D'INCLUSION

7.1 Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue

Les courbes des deux systèmes sont présentées sur la Figure 7.1. Un maximum à $R=0,5$ est observé pour les deux systèmes. Donc le MTZ forme un complexe de stœchiométrie 1:1 avec la BCD et l'HPBCD.

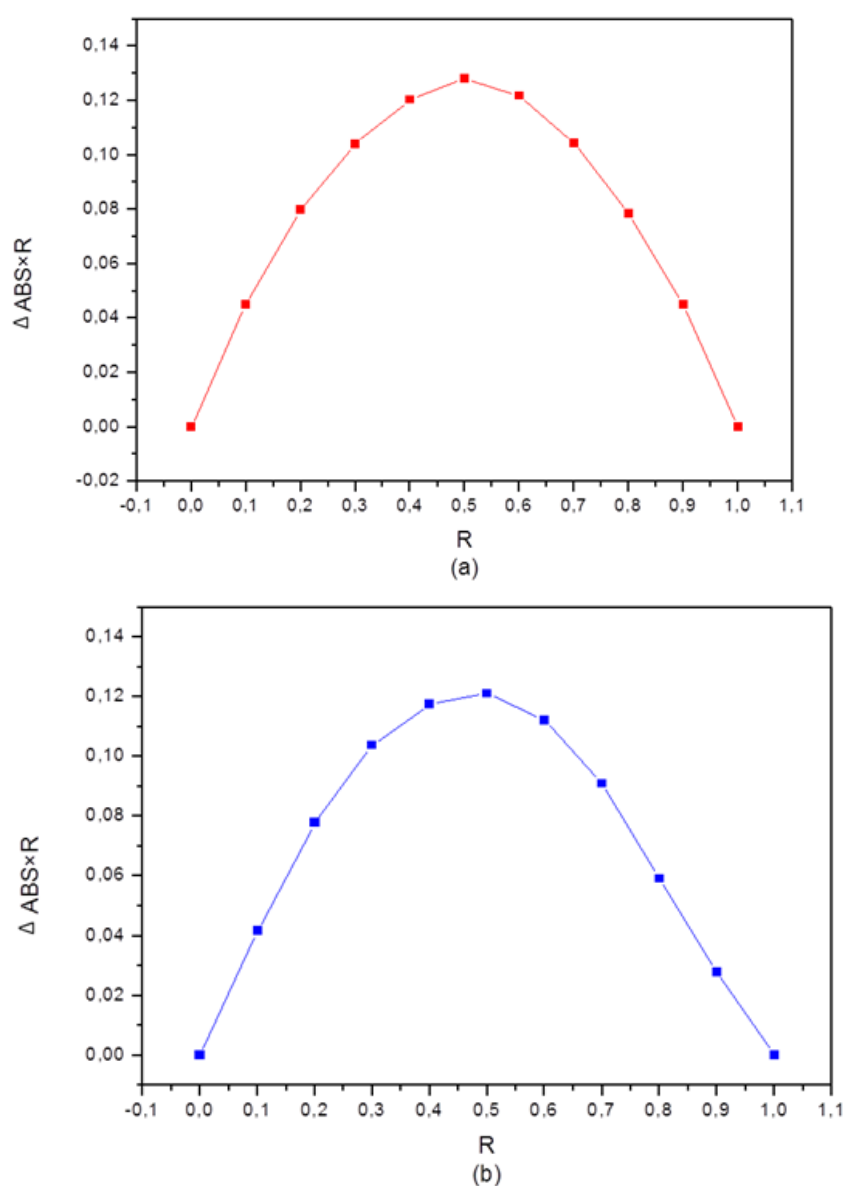


Figure 7. 1: Courbes de Job à 25 °C et $\lambda_{\text{max}}=320$ nm des systèmes (a) BCD-MTZ et (b) HPBCD-MTZ.

7.2 Détermination des constantes d'association et les paramètres thermodynamiques par UV-Visible

Les grandeurs thermodynamiques obtenues pour les systèmes (MTZ–BCD) et (MTZ–HPBCD) sont récapitulées dans le Tableau 7.1

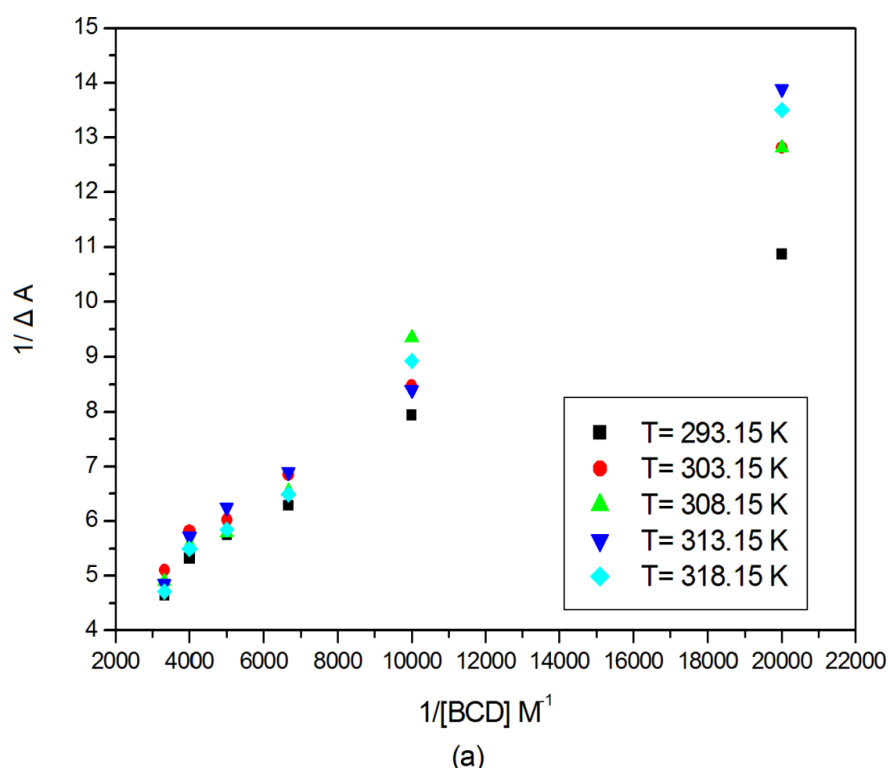
La linéarité des tracés de Benesi-Hildebrand (Figure 7.2) des deux systèmes et à toutes les températures étudiées, confirme que la stœchiométrie des deux systèmes est de 1:1 [86]. Les graphes de van't Hoff (Figure 7.3) présentent une relation linéaire entre $\ln(K_a)$ et $(1/T)$. Le Tableau 7.1 montre que les constantes d'association pour les deux systèmes diminuent avec l'augmentation de la température, cela indique que les interactions entre (BCD:MTZ) et (HPBCD:MTZ) pour la formation des complexes d'inclusion sont de nature exothermique [88]. Toutes les valeurs de ΔG calculées sont négatives, cela signifie que thermodynamiquement l'inclusion du MTZ dans la cavité de la BCD et l'HPBCD est un processus spontané [88].

Pour les deux associations (BCD:MTZ) et (HPBCD:MTZ) une augmentation d'entropie a été enregistrée, ce qui est favorable pour la spontanéité et la stabilité des deux systèmes. Donc les deux systèmes sont enthalpiquement et entropiquement favorable ($\Delta H < 0$ et $\Delta S > 0$), ce qui rend le processus de formation des complexes entre le MTZ et les deux CDs thermodynamiquement favorable.

Habituellement, une augmentation de la valeur d'entropie est un signe de la présence d'interactions hydrophobes. Une combinaison d'une valeur positive de ΔS et une valeur négative de ΔH peut suggérer que les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène et les interactions de Van der Waals interviennent lors de la formation des complexes d'inclusion. Aussi, une valeur positive de ΔS et une valeur négative élevée de ΔH peuvent être un indicatif de la présence de liaisons hydrogène et de forces électrostatiques. De ce fait, les forces intervenant durant la formation des deux complexes (MTZ–BCD) et (MTZ –HPBCD) sont probablement les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène et les forces électrostatiques. Une valeur positive de ΔS est fort probablement due à l'expulsion des molécules d'eau de la cavité des CDs [199–202].

Tableau 7. 1: Les constants d'association (K_a) et les grandeurs thermodynamiques obtenus durant l'association du MTZ avec la BCD et l'HPBCD.

Temperature (K)	BCD				HPBCD			
	$K_a \times 10^3$ (M^{-1})	ΔG ($kJ mol^{-1}$)	ΔH ($kJ mol^{-1}$)	ΔS ($J.K^{-1} mol^{-1}$)	$K_a \times 10^3$ (M^{-1})	ΔG ($kJ mol^{-1}$)	ΔH ($kJ mol^{-1}$)	ΔS ($J.K^{-1} mol^{-1}$)
293,15	9,635	-22,357			3,071	-19,629		
303,15	7,625	-22,530			2,728	-19,857		
308,15	7,171	-22,744	-12,159	34,53	2,452	-19,971	-12,943	22,807
313,15	6,823	-22,984			2,257	-20,085		
318,15	6,488	-23,217			2,020	-20,199		



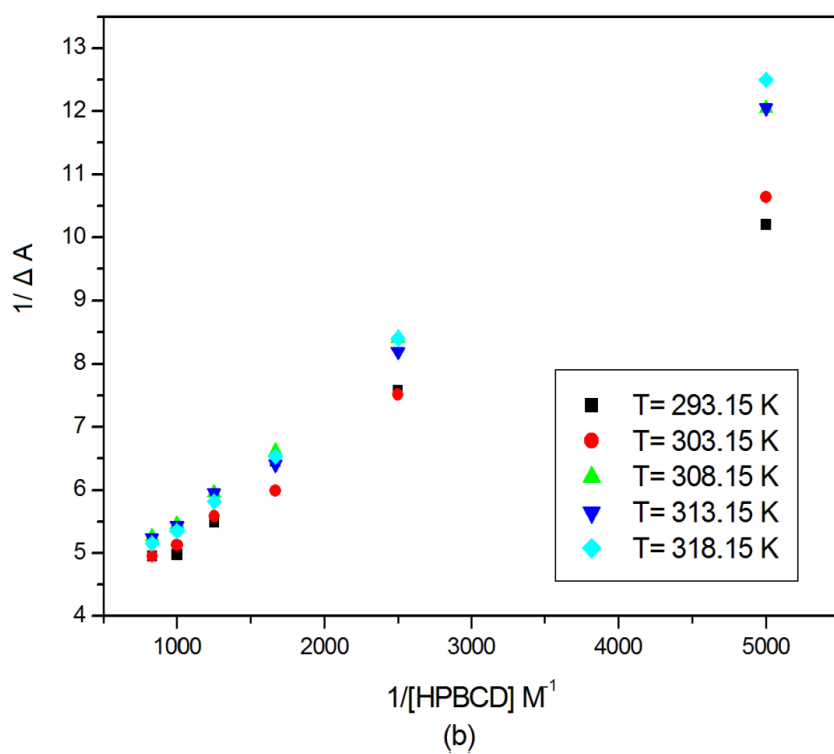
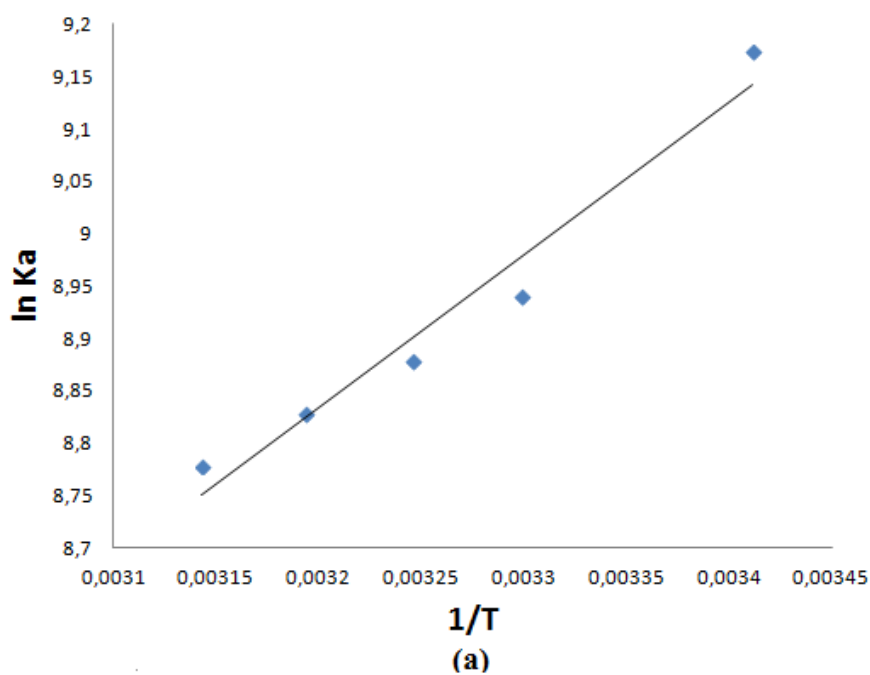


Figure 7.2 : Tracé de Benesi-Hildebrand pour les systèmes (a) BCD-MTZ et (b) HPBCD-MTZ.



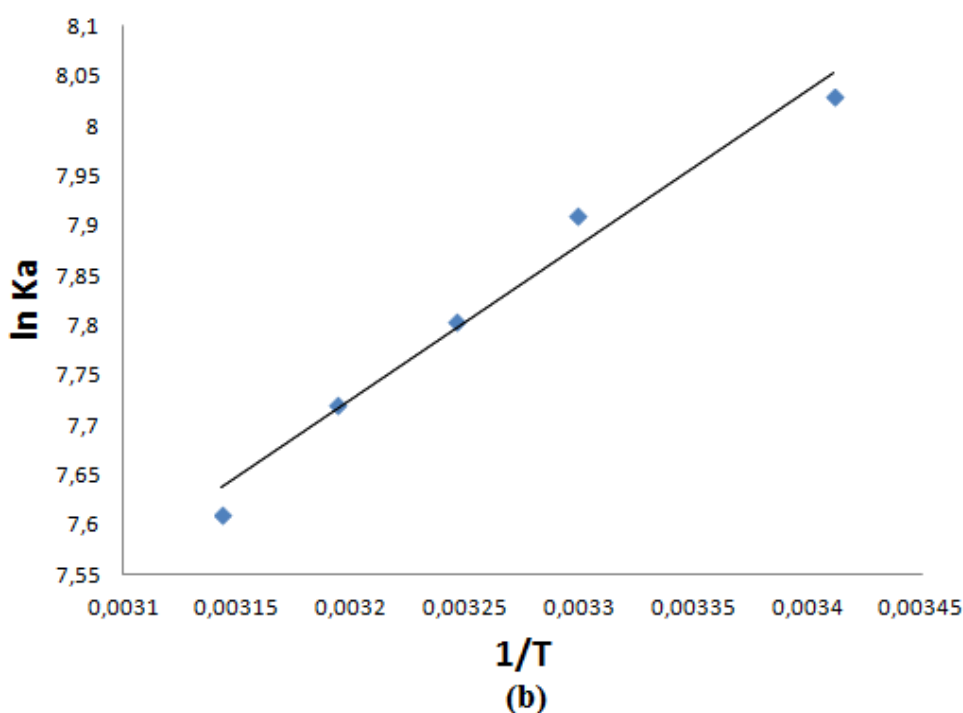


Figure 7. 3: Tracé de Van't Hoff pour les systèmes (a) BCD-MTZ et (b) HPBCD-MTZ.

7.3 Étude de phase de solubilité

Les courbes de la phase de solubilité obtenues sont présentées dans la Figure 7.4. Dans le domaine des concentrations étudiées, Nous constatons que la solubilité aqueuse du MTZ augmente linéairement avec la concentration de l'HPBCD, tandis que le profil de solubilité du MTZ en présence de BCD se divise en deux parties. La première partie présente une augmentation linéaire de la solubilité du MTZ en fonction de la concentration de BCD, suivie de la deuxième partie représentée d'un plateau où le système formé atteint sa solubilité maximale. Cela peut être dû à la faible solubilité aqueuse de la BCD à 25 °C. Selon la classification de Higuchi et Connors, le profil de solubilité du MTZ en présence de la BCD est classé B_S, alors que le profil du système HPBCD-MTZ est de type A_L [89].

Les pentes de la courbe du système HPBCD-MTZ et la portion linéaire du profil B_S sont inférieure à un, suggérant une formation de complexe CDs :MTZ de stœchiométrie 1:1 [203], en cohérence avec les résultats reportés par la méthode de Job et Benesi-Hildebrand.

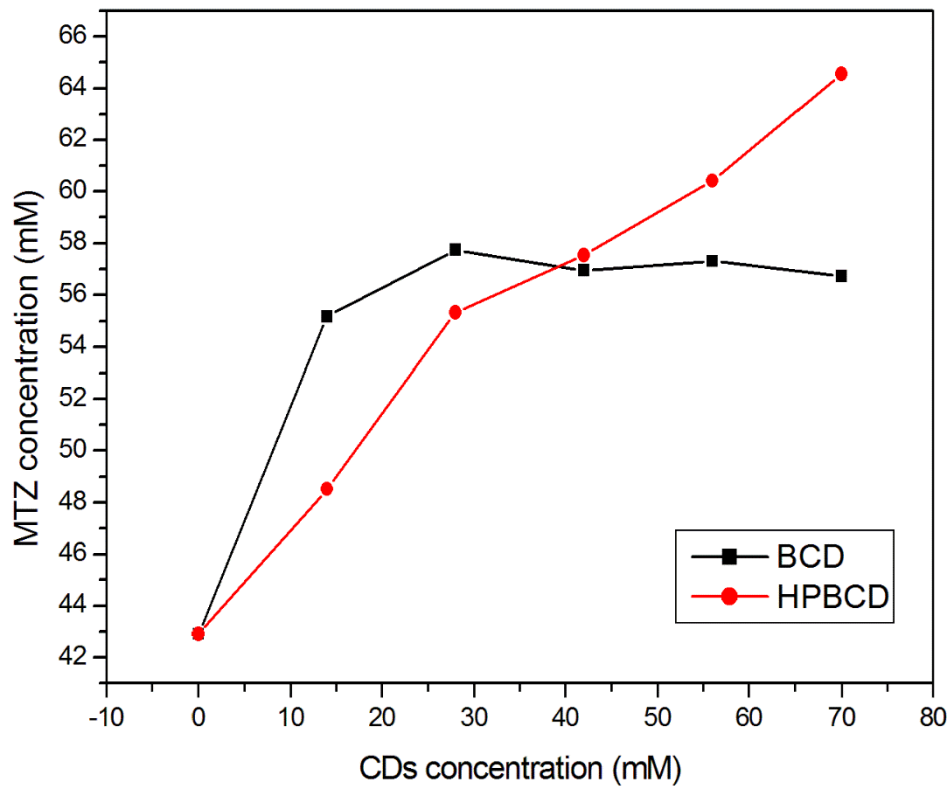


Figure 7. 4: Profils de phase de solubilité de (a) BCD-MTZ et (b) HPBCD-MTZ.

Un paramètre important lors des études de phase de solubilité est l'efficacité de complexation (CE) calculé conformément à l'équation 2.4. Ce paramètre permet de traduire le potentiel solubilisant de CDs vis-à-vis le MTZ. En se basant sur la CE nous pouvons estimer le rapport molaire optimal (MTZ:CD) selon l'équation 2.5. Ce paramètre est très utile pour les formulations incluant les complexes d'inclusion de CDs pour des visées pharmaceutiques [79]. Les valeurs obtenues sont reportées dans le Tableau 7.2.

Nous pouvons remarquer que $CE_{BCD} < CE_{HPBCD}$. Cela confirme que le dérivé de la BCD (HPBCD) est un meilleur agent de solubilisation que la BCD native. Le rapport molaire optimal (MTZ:CD) montre qu'une sur sept molécules de la BCD sont capables de former un complexe soluble dans l'eau, tandis que seulement une sur trois molécules de l'HPBCD sont capable de le former [204].

Tableau 7. 2: Efficacité de complexation (CE) et rapport molaire optimal (MTZ:CD) obtenus à partir des diagrammes de phase de solubilité.

	BCD	HPBCD
CE	0,17	0,42
Le rapport molaire optimal (MTZ:CDs)	1:7	1:3

7.4 Caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion

7.4.1 La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton monodimensionnelle

La spectroscopie RMN est une technique remarquable pour vérifier le phénomène d'inclusion. En effet, cette technique est basée sur la comparaison des spectres ^1H RMN des espèces libres avec celui du complexe d'inclusion et l'observation des variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta$). L'insertion de l'invité dans la cavité des CDs perturbe les déplacements chimiques (δ). La spectroscopie RMN est le seul outil qui offre la possibilité de suivre les réponses spectrales des deux composés présents simultanément en solution. En partant de ce principe, nous avons étudié les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) de la BCD et l'HPBCD sous forme libre et complexée dans l'eau deutérée. Un récapitulatif des variations de déplacement chimique de la BCD et de l'HPBCD est reporté dans le Tableau 7.3.

Tableau 7. 3: Attributions et variations des déplacements chimiques (δ) des protons de la BCD et de l'HPBCD en présence et en absence du MTZ.

BCD				HPBCD			
^1H	δ (Libre) (ppm)	δ (Complex) (ppm)	$\Delta\delta^{(a)}$ (ppm)	^1H	δ (Libre) (ppm)	δ (Complex) (ppm)	$\Delta\delta^{(a)}$ (ppm)
H1	4,974	4,942	-0,032	H1	5,1616	5,1594	-0,0022
H2	3,565	3,534	-0,031	H2	3,5387	3,5345	-0,0042
H3	3,85	3,786	-0,064	H3	3,938	3,927	-0,011
H4	3,493	3,453	-0,04	H4	3,4198	3,4156	-0,0042
H5	3,782	3,726	-0,056	H5	3,8505	3,8366	-0,0139
H6	3,785	3,744	-0,041	H6	3,8732	3,8581	-0,0151

$$^{(a)} : \Delta \delta = \delta_{(\text{complex})} - \delta_{(\text{free})}$$

Pour les deux complexes d'inclusion, la présence du MTZ a induit une variation vers les champs forts de la valeur du déplacement chimique de tous les protons de la BCD ainsi que l'HPBCD (Figure 7.5). Ces changements sont principalement attribués à l'effet anisotropique dans la cavité des deux CDs issu de l'incorporation des groupements riche en électrons- π du MTZ [95]. Cela suggère que le noyau aromatique du MTZ se trouve dans la cavité apolaire des deux CDs. De plus, ces variations vers les champs forts suggèrent la présence d'interactions hydrophobes entre le MTZ et la cavité des deux CDs [205].

Les protons trouvés dans la cavité hydrophobe des deux CDs (H3 et H5) (Figure 7.6) ainsi que le proton situé à l'entrée étroite de la cavité (H6) présentent une variation de déplacement chimique plus considérable par rapport à celle des protons localisés à la surface externe de la cavité (H1, H2, et H4).

Dans le cas du complexe BCD-MTZ, le proton H3 a présenté la variation la plus importante ($\Delta\delta = -0,064$ ppm), suivi par le proton H5 ($\Delta\delta = -0,056$ ppm) et en dernier on trouve le H6 ($\Delta\delta = -0,041$ ppm). À la vue de cet ordre, nous pouvons supposer que le MTZ a pénétré à travers le coté large de la cavité de la BCD.

D'autre part, les protons pointés vers l'intérieure de la cavité de l'HPBCD ont présenté un ordre opposé à celui de la BCD, où la variation du proton H6 ($\Delta\delta = -0,015$ ppm) était plus grande par rapport à celle de H5 et H3 ($\Delta\delta = -0,0139$ et $\Delta\delta = -0,011$ ppm, respectivement). Dans ce cas, deux hypothèses se présentent. Soit le MTZ a une préférence d'introduction dans la cavité hydrophobe de l'HPBCD via le coté le plus étroit, ou le MTZ a été bien introduit en profondeur jusqu'au côté étroit de la cavité.

Le faible changement de $\Delta\delta$ observé chez les protons externes (H1, H2, et H4) des deux CDs a été aussi reporté dans la littérature, ce faible décalage est dû aux réarrangements des CDs après l'insertion des molécules actives dans leur cavité.

Tous les changements de déplacement chimiques des protons des deux CDs observés confirment que le MTZ a interagit avec la cavité hydrophobe de la BCD ainsi que l'HPBCD et il est bien inclus dedans [88].

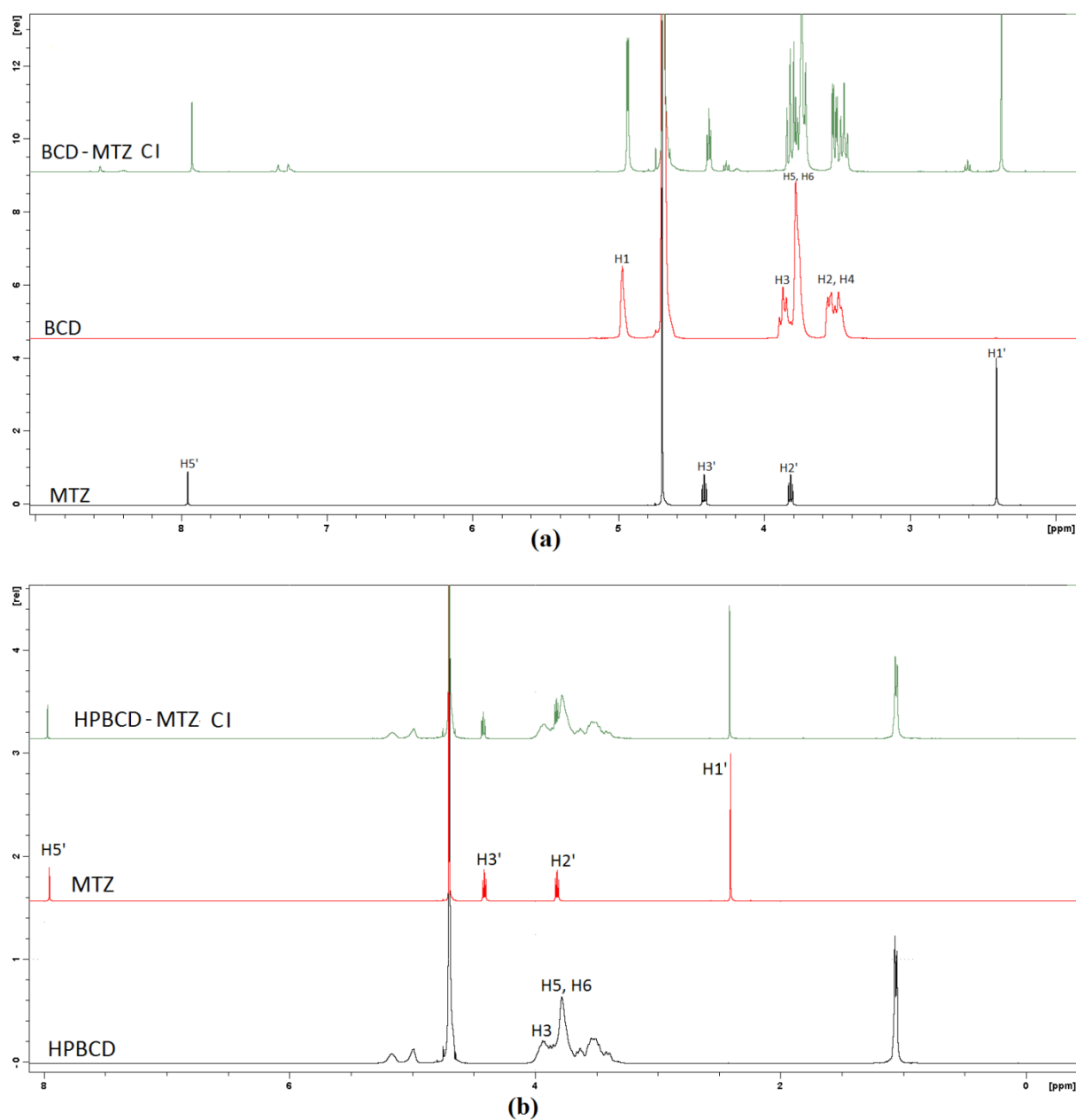
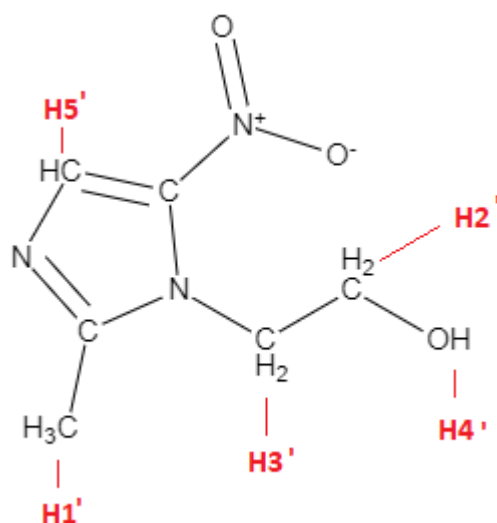
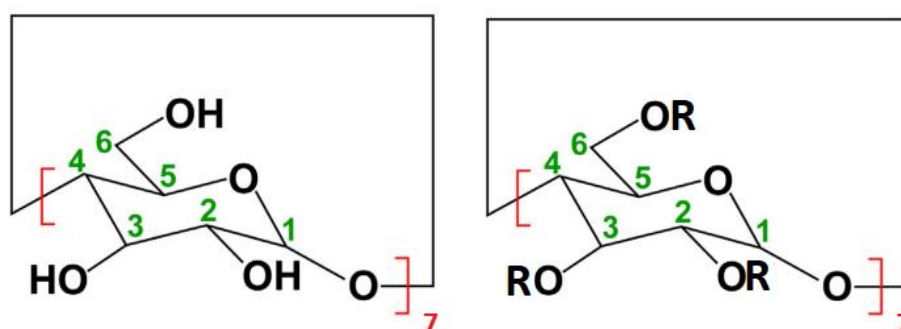


Figure 7. 5: Les spectres RMN ^1H de (a) BCD, MTZ et BCD-MTZ CI (b) HPBCD, MTZ et HPBCD-MTZ CI dans D_2O .



(a)



(b)

(c)

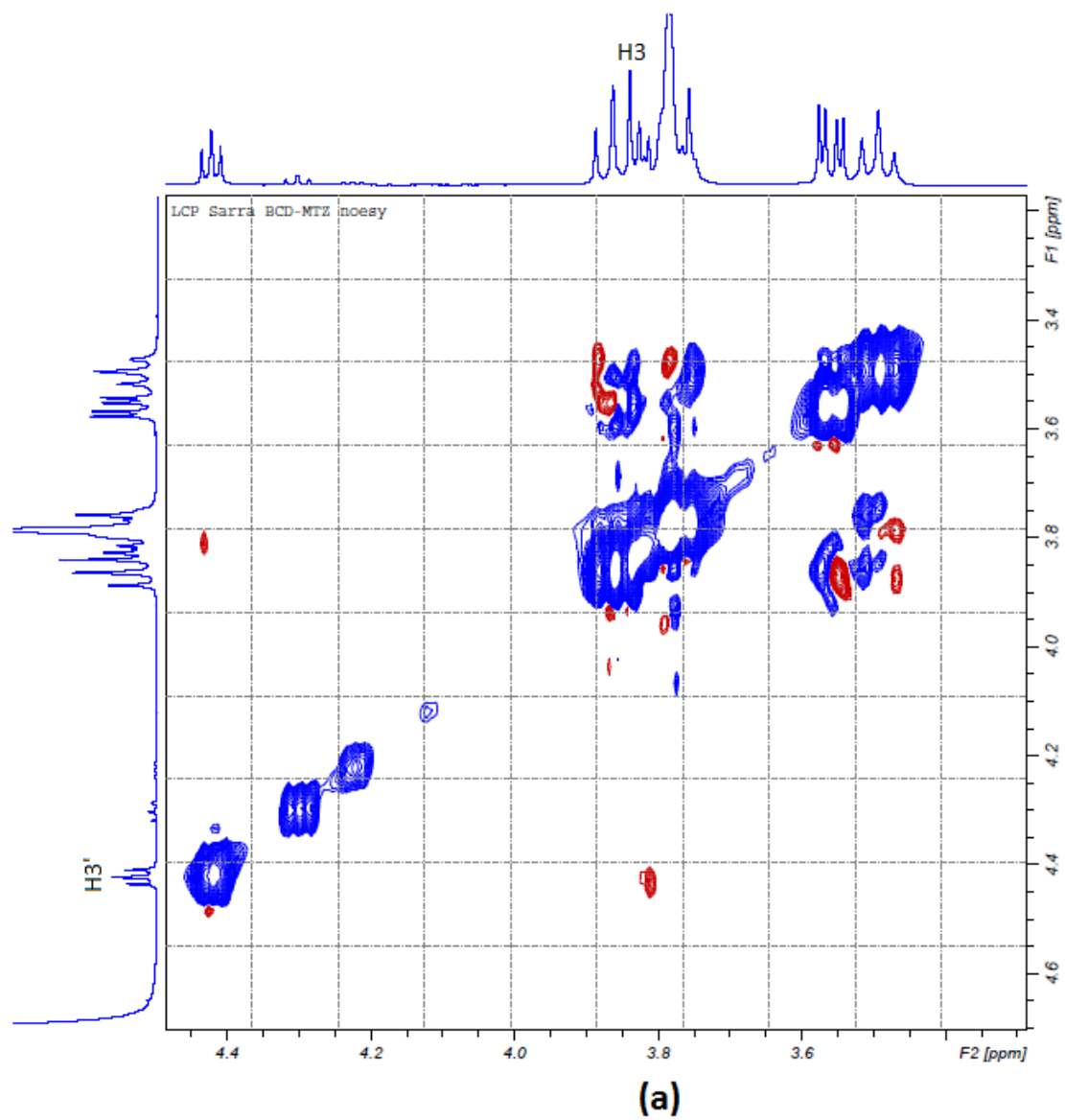
Figure 7. 6 : Structure chimique de (a) métronidazole (b) β -cyclodextrine (c) 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrine.

7.4.2 RMN 2D ^1H - ^1H NOESY et ROESY

Sur la carte 2D NOESY et ROESY du complexe BCD-MTZ (Figure 7.7) nous avons repéré des taches de corrélation NOE entre le H3' du MTZ et le H3 de la BCD. En outre, le H2' du MTZ était en corrélation avec le H3 et H5 de la BCD.

L'inspection des deux cartes de 2D NOESY et ROESY du complexe HPBCD-MTZ (Figure 7.8) montre la présence de série d'interactions entre les protons H2' et H3' (Figure 7.6) du MTZ et tous les protons de la cavité hydrophobe de l'HPBCD (H3, H5, et H6). Contrairement à la BCD, le proton H6 de l'HPBCD a interagi avec les deux protons du MTZ, ce résultat est

en cohérence avec celui reporté par ^1H RMN, où nous avons trouvé que le H6 était le proton le plus affecté par rapport aux autres.



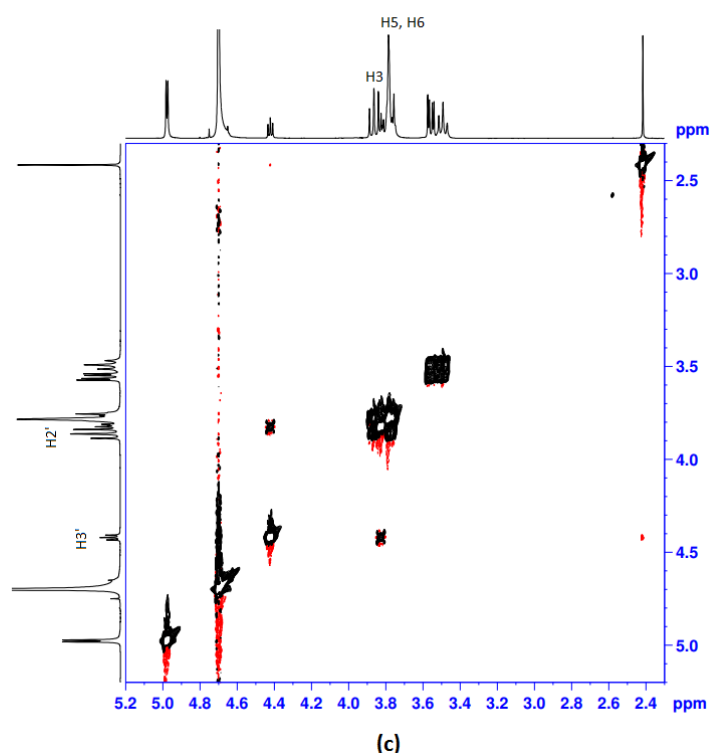
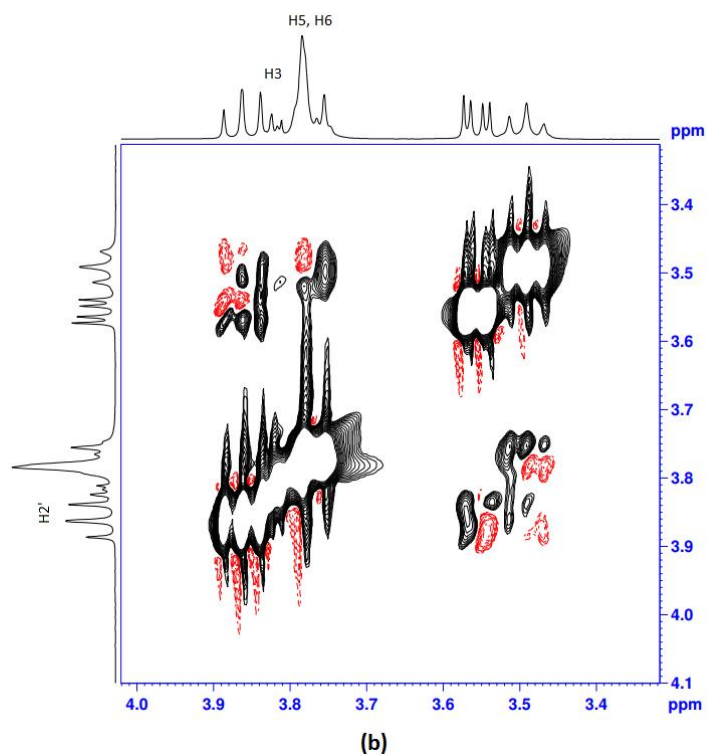
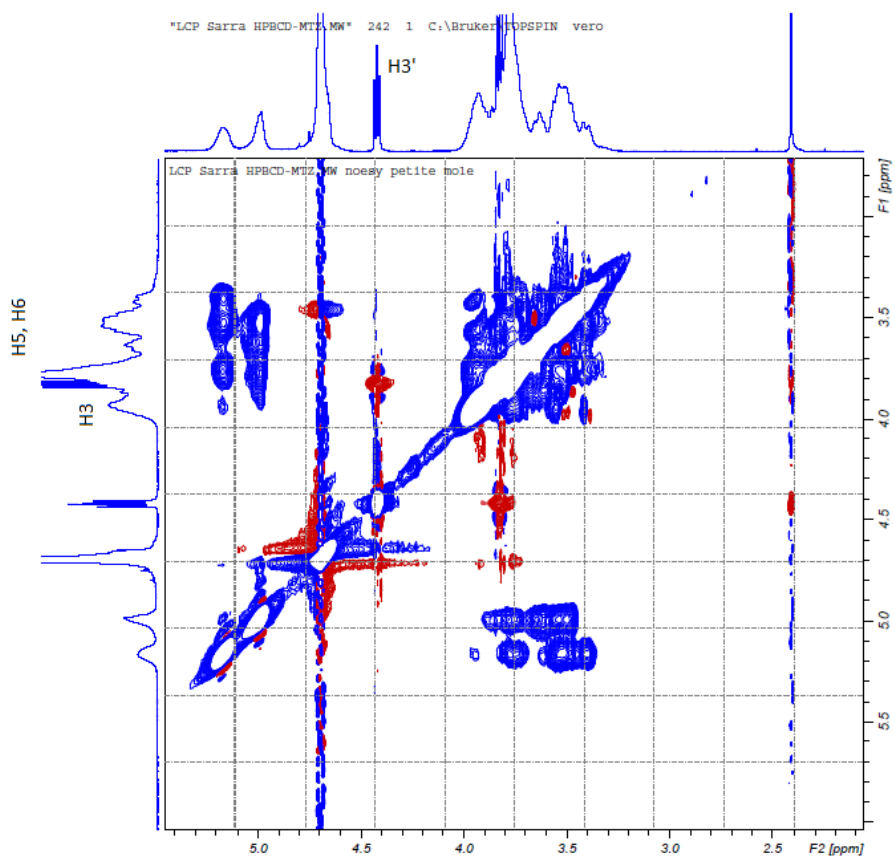
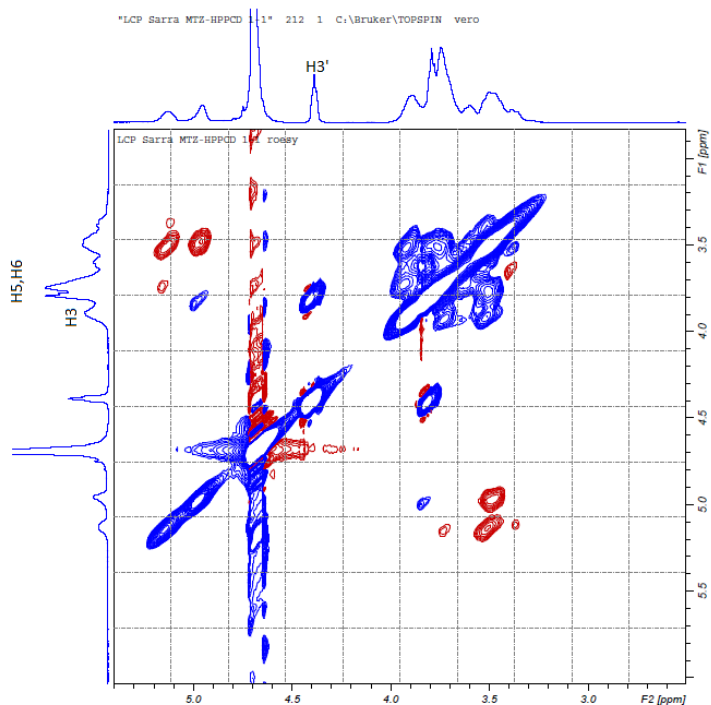


Figure 7.7 : Expansion de la carte RMN 2D du complexe d'inclusion BCD-MTZ dans D₂O
 (a) NOESY (b) NOESY durant 5h (c) ROESY durant 9h.



(a)



(b)

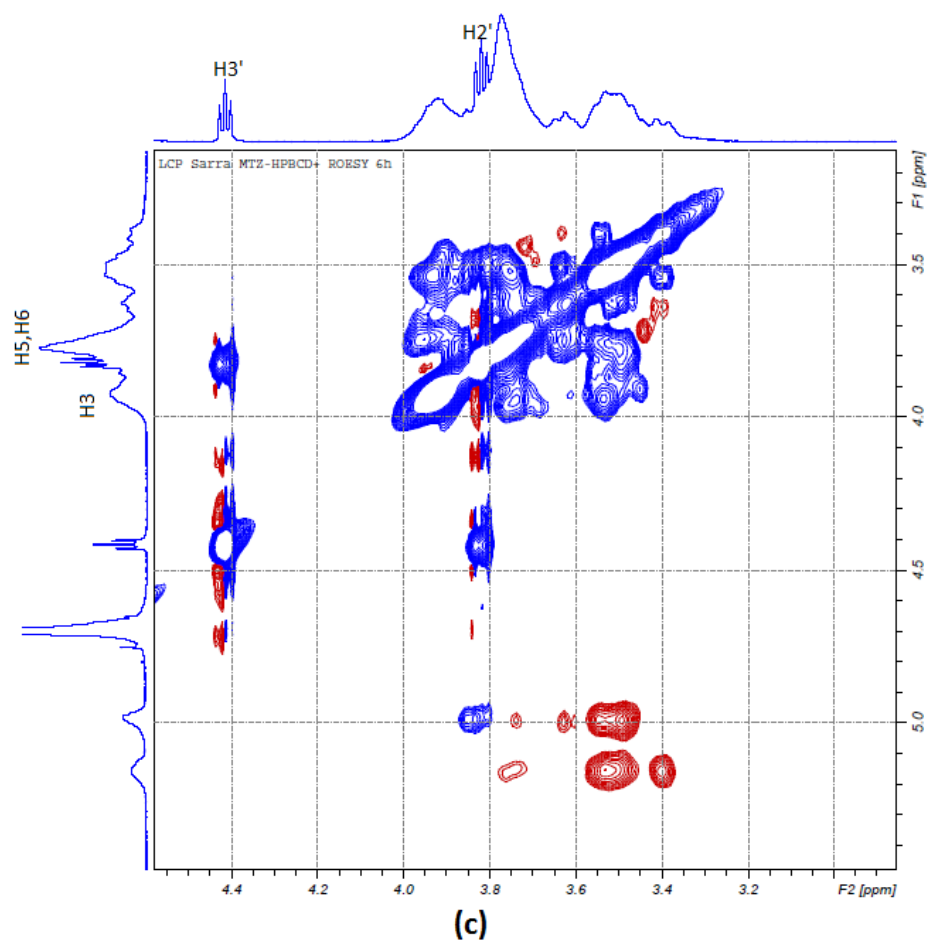


Figure 7. 8: Expansion de la carte RMN 2D du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ dans D₂O (a) NOESY (b) ROESY (c) ROESY durant 6h.

La variation des déplacements chimiques des protons internes de la BCD et l'HPBCD, le faible déplacement des protons localisés à la surface externe et l'apparition des taches de corrélations entre les protons du MTZ et les protons de la cavité interne des deux CDs, confirment l'insertion du MTZ dans la cavité de la BCD ainsi que l'HPBCD et la formation des deux complexes d'inclusion.

7.4.3 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres FTIR du MTZ, BCD, HPBCD et de leurs complexes d'inclusion sont illustrés dans (Figure 7.9).

Le spectre du MTZ présente des pics caractéristiques à 1533, 1366, 1187 cm⁻¹ correspondent respectivement aux vibrations d'élongation des groupes NO₂/NO, de la liaison N=O, et du groupe amine tertiaire. Les pics liés aux vibrations d'élongation de la liaison O-H et les

vibrations sp^2 des liaisons CH/C=CH sont apparus respectivement à 3210 et 3102 cm^{-1} . Les vibrations d'élongation des liaisons CO/C–OH et C–NO₂ sont détectés respectivement à 1072 et 863 cm^{-1} [206,207].

Le spectre du BCD (Figure 7.9a) montre une bande à 3284 cm^{-1} liée aux vibrations d'élongation de la liaison O–H. Les pics apparus à 2924, 1647, 1152, 1076 et 1020 cm^{-1} sont attribués respectivement aux vibrations d'élongation asymétrique du CH, vibrations de flexion de la liaison H–O–H, vibrations d'élongation de la liaison glycosidique C–O–C, vibrations d'élongation de la liaison C–C et aux vibrations d'élongation de la liaison C–O [208–210].

Le spectre de l'HPBCD (Figure 7.9b) présente des pics à 3343, 2968, 1080, et 1022 cm^{-1} générés respectivement par les vibrations d'élongation de la liaison O–H, vibrations d'élongation antisymétriques du groupe méthyle présent dans l'hydroxypropyl, les vibrations d'élongation de la liaison C–O– de l'hydroxypropyl et par les vibrations d'élongation de la liaison glycosidique C–O–C. Les pics situés entre 950-530 cm^{-1} sont des pics caractéristiques de l'anneau des deux CDs [209].

Les spectres des deux complexes d'inclusion (Figure 7.9) ressemblent beaucoup plus aux spectres des deux CDs libres, dans lesquels la majorité des pics caractéristiques du MTZ ont disparu et masqués par les pics de CDs. La disparition de la bande caractéristique du MTZ correspond aux vibrations de valence O–H est un indicateur de la formation de liaisons hydrogène entre le MTZ et les deux CDs [211]. Toutefois, quelques pics caractéristiques du MTZ sont reproduits dans les deux spectres de complexes d'inclusion mais avec une très faible intensité. La disparition et la diminution d'intensité des pics du MTZ est probablement dû à la restriction du MTZ dans la cavité de CDs, ce qui par conséquent limite ses vibrations.

La présence du pic correspond aux vibrations d'élongation de la liaison glycosidique C–O–C avec la même intensité dans les deux spectres de complexes d'inclusion indique que le MTZ est incorporé à travers la ligne axiale des deux cavités [207].

Les bandes caractéristiques de la BCD et l'HPBCD n'ont pas subi de changements significatifs et tous les déplacements sont dus aux réarrangements des deux CDs et la libération des molécules d'eau des deux cavités.

Aucun nouveau pic ou une nouvelle bande n'est apparue, cela signifie qu'aucune liaison chimique n'a été formée entre le MTZ et les deux CDs [212].

Tous les changements cités au-dessus comme la disparition ou la diminution d'intensité des pics caractéristiques du MTZ confirment que ce dernier est bien introduit dans la cavité de la BCD et l'HPBCD.

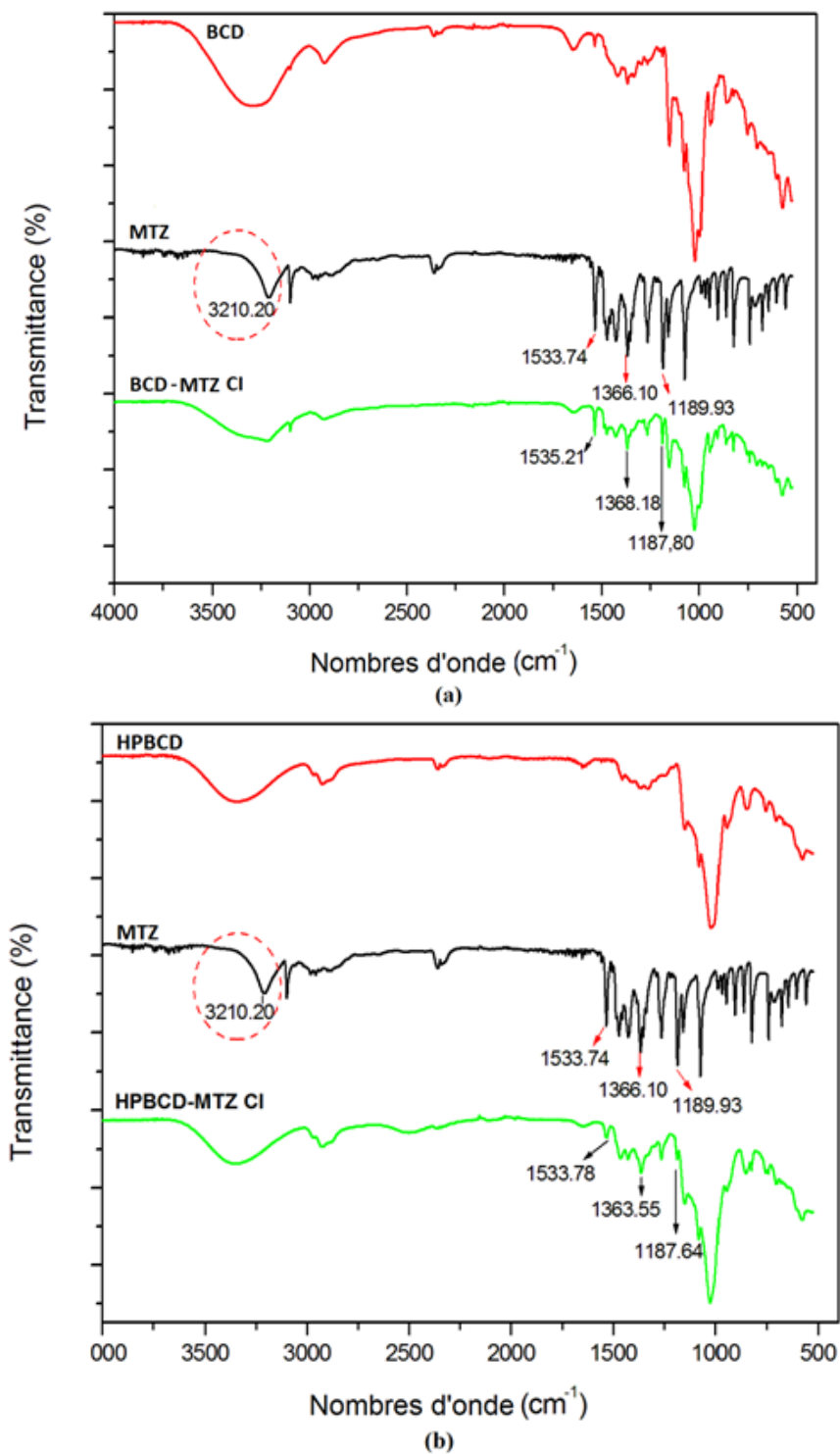


Figure 7. 9 : Spectres FTIR de (a) MTZ, BCD et BCD-MTZ CI (b) MTZ, HPBBCD et HPBCD-MTZ CI.

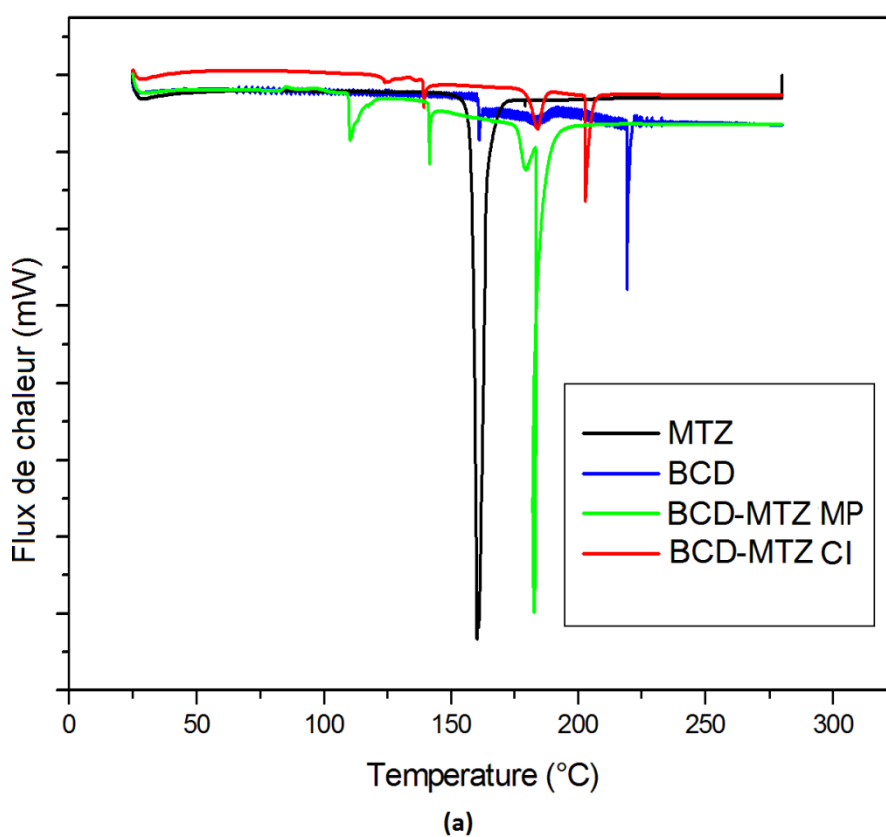
7.4.4 La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La courbe DSC du MTZ (Figure 7.10) présente un pic étroit endothermique à 160 °C attribué à son point de fusion.

Les thermogrammes des deux CDs montrent deux pics endothermiques, le premier est dû à l'évaporation des molécules d'eau situées à l'intérieure de la cavité, le deuxième est le résultat de la décomposition et la dégradation des macrocycles.

Pour les deux thermogrammes des complexes d'inclusion une disparition ou une diminution du pic caractéristique du MTZ a été observée, signifiant la disparition de la maille (réseau) cristalline du MTZ et sa conversion à l'état amorphe, ce qui pourrait être attribué à la complexation. Tandis que les spectres des mélanges physiques étaient en superposition des pics caractéristiques des composés libres dans lesquels on observe le pic caractéristique du MTZ. Cela indique que la préparation d'un mélange physique (hôte:invité) ne suffit pas pour inclure l'invité dans la cavité de la CD [213].

Les analyses thermiques ont montré, que suite au processus d'inclusion le MTZ est stabilisé et protégé contre la dégradation thermique au sein de la cavité des CDs.



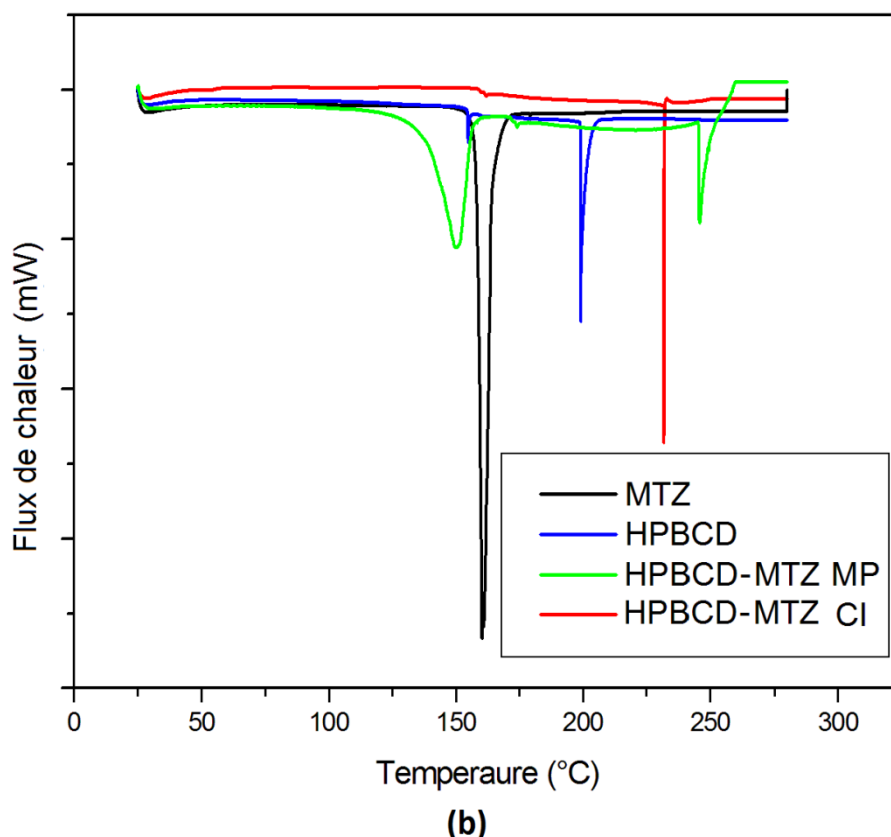
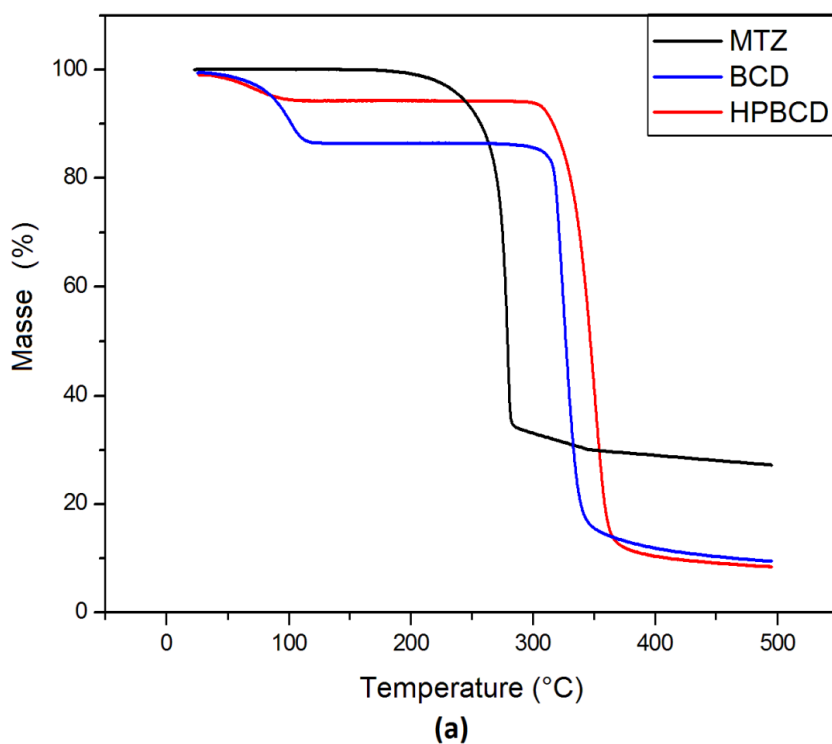


Figure 7. 10: Thermogrammes DSC de (a) MTZ, BCD, BCD-MTZ MP et BCD-MTZ CI (b) MTZ, HPBBCD et BCD-MTZ MP HPBCD-MTZ CI.

7.4.5 Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les thermogrammes du MTZ, BCD et l'HPBCD à l'état libre sont présentés dans la (Figure 7.11a). Le thermogramme du MTZ montre un seul processus de perte de masse dû à sa fusion où il a perdu 72,64 % de sa masse initiale. Les thermogrammes de la BCD et l'HPBCD ont présenté deux phénomènes de perte de masse. Le premier s'étend de la température ambiante à environ 120 °C correspondant essentiellement à l'évaporation des molécules d'eau présentes à l'intérieur de la cavité. Le deuxième domaine de perte de masse est dû à la dégradation et la décomposition des CDs. Sur les thermogrammes des mélanges physiques (Figure 7.11b, c) nous avons détecté tous les événements thermiques caractéristiques du MTZ, BCD, et HPBCD à l'état libre. En outre, les thermogrammes des deux complexes (Figure 7.11 b, c) ont montré une disparition du pic caractéristique du MTZ, suggérant que le principe actif est protégé thermiquement au sein de la cavité.

Le processus d'évaporation des molécules d'eau des CDs libres a fait perdre la BCD et l'HPBCD environ 13,03 et 4,82%, respectivement de leur poids initial, tandis que les deux complexes BCD-MTZ et HPBCD-MTZ ont perdu respectivement 5,4 et 2,4%. Cela indique que la majorité des molécules d'eau de la BCD et HPBCD ont été libérées et remplacées par le MTZ et par conséquent l'inclusion du MTZ dans la cavité des deux CDs.



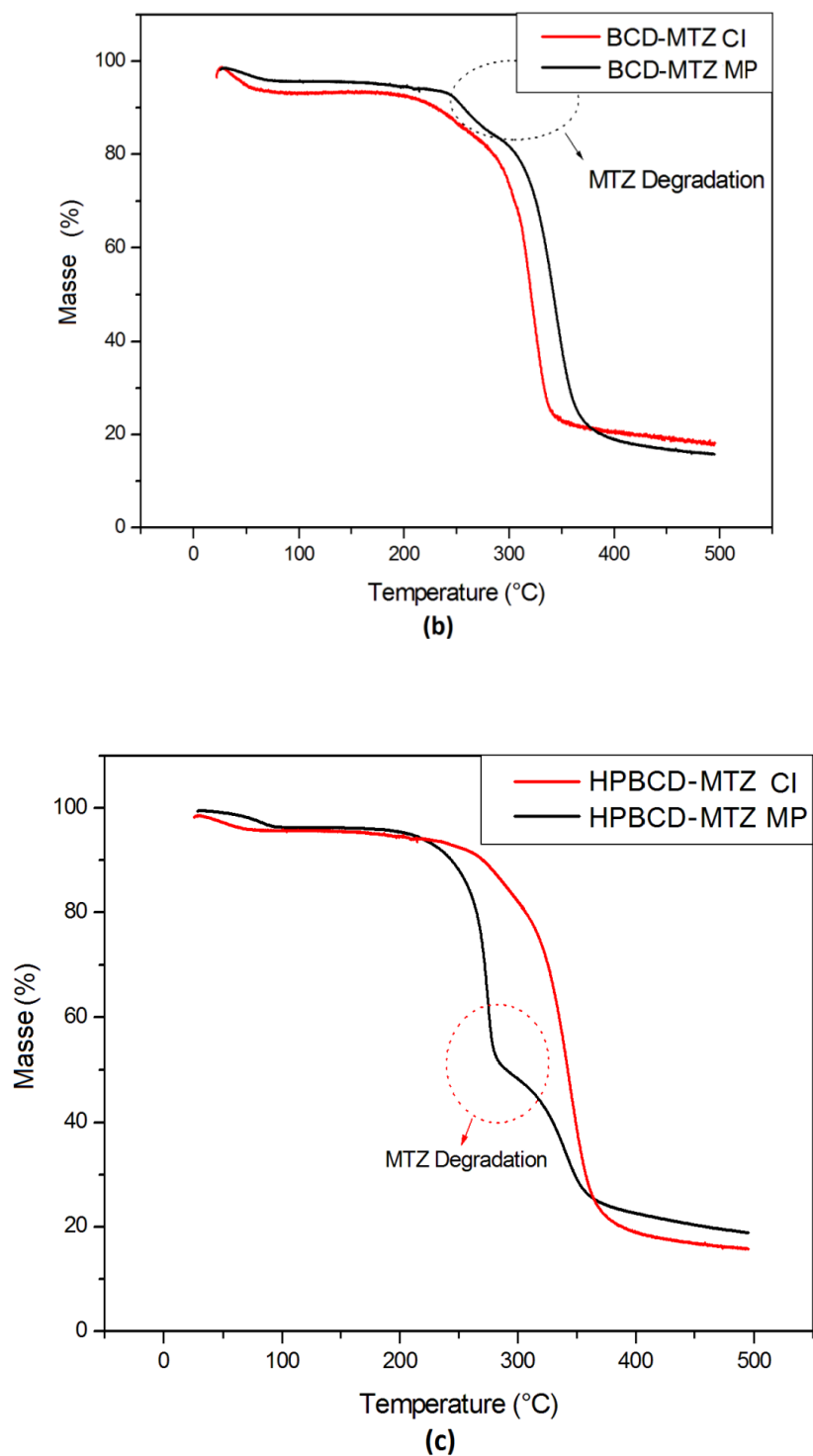


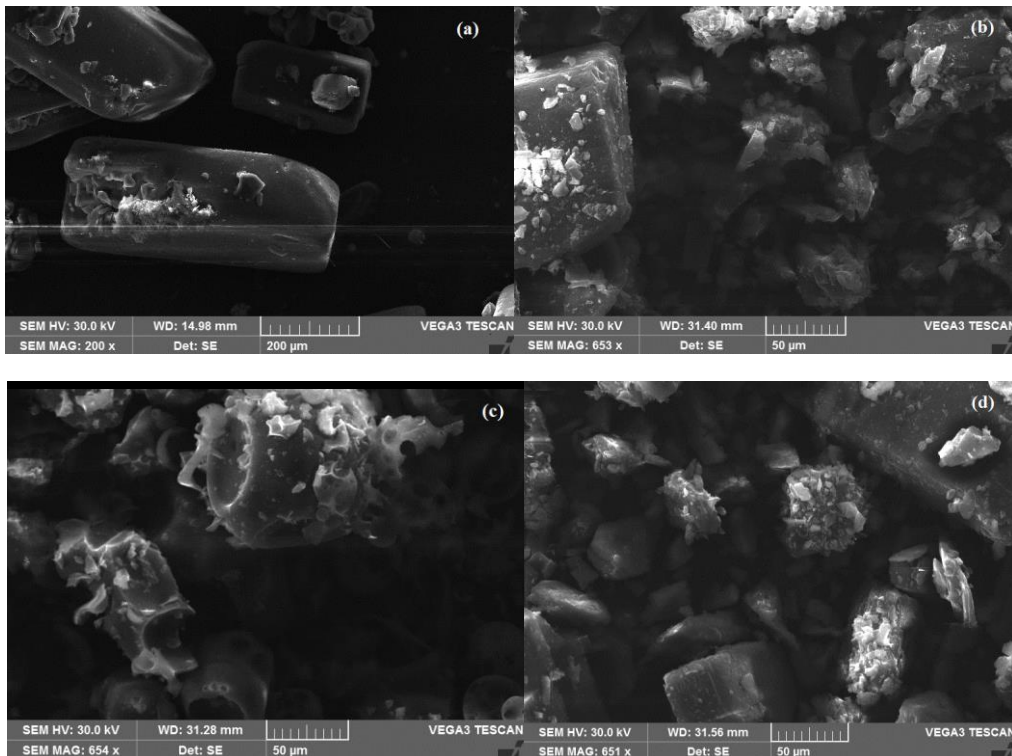
Figure 7. 11: Thermogrammes ATG de (a) MTZ, BCD et HPBCD (b) BCD-MTZ CI et BCD-MTZ MP (c) HPBCD-MTZ CI et HPBCD-MTZ MP.

7.4.6 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images de microscopie électronique à balayage du MTZ, BCD, HPBCD, de leurs complexes d'inclusion ainsi que leurs mélanges physiques sont illustrées dans (Figure 7.12).

Les images du MTZ montrent qu'il se présente sous forme cristalline avec des formes prismatiques et un aspect lisse. La BCD est apparue sous forme de cristaux de taille différente alors que l'HPBCD possède une forme de sphères poreuses et cassées.

Les images MEB des deux mélanges physiques étaient une simple accumulation des deux structures du MTZ et la CD en question, où on peut facilement les différencier. Cela indique l'absence d'interaction entre le MTZ et les deux CDs. Tandis que les deux complexes d'inclusion ont présenté un changement radical au niveau de la structure et de l'aspect, nous pouvons observer la disparition de la cristallinité du MTZ, ainsi que la morphologie caractéristique de la BCD et l'HPBCD, et l'apparition d'une nouvelle structure amorphe qui se présente sous forme de particules de très petite taille qui ont une tendance à s'agglomérer, cela révèle la formation d'une seule phase et la probabilité de la formation de complexes d'inclusion



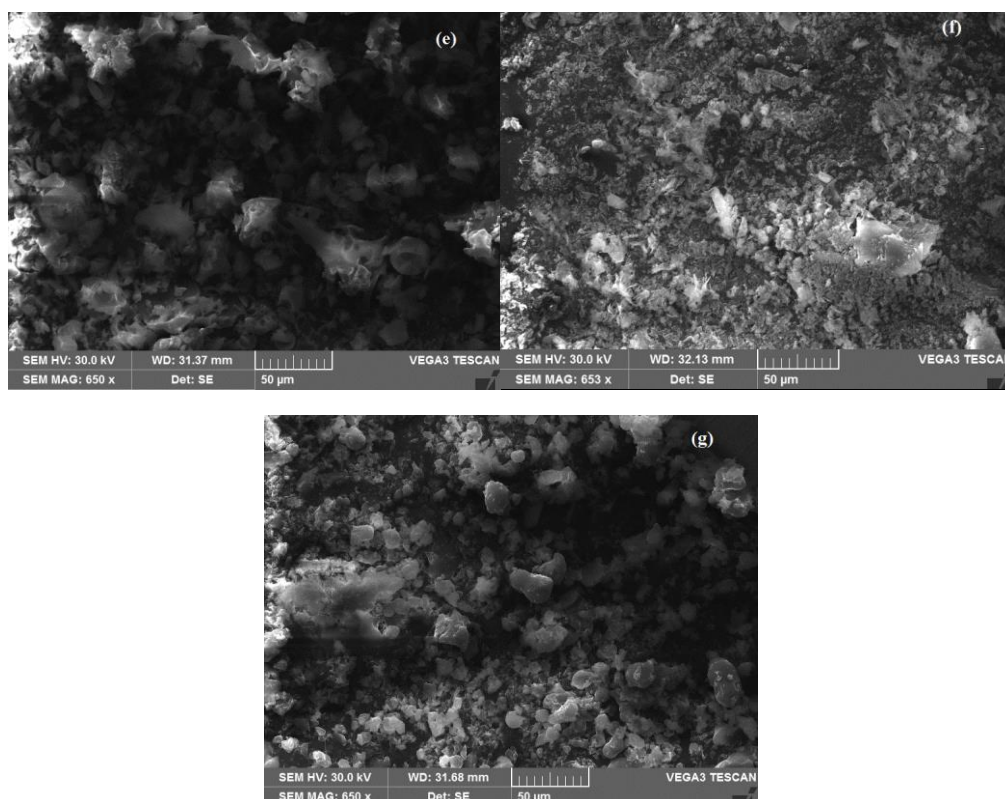


Figure 7. 12 : Images MEB de (a) métronidazole (MTZ), (b) β -cyclodextrine (BCD), (c) 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPBCD), (d) BCD-MTZ MP, (e) HPBCD-MTZ MP, (f) BCD-MTZ CI, et (g) HPBCD-MTZ CI.

7.5 Étude de dissolution *in vitro*

Les profils de libération du MTZ à partir du MTZ libre, des complexes d'inclusion et des mélanges physiques sont présentés dans la Figure 7.13.

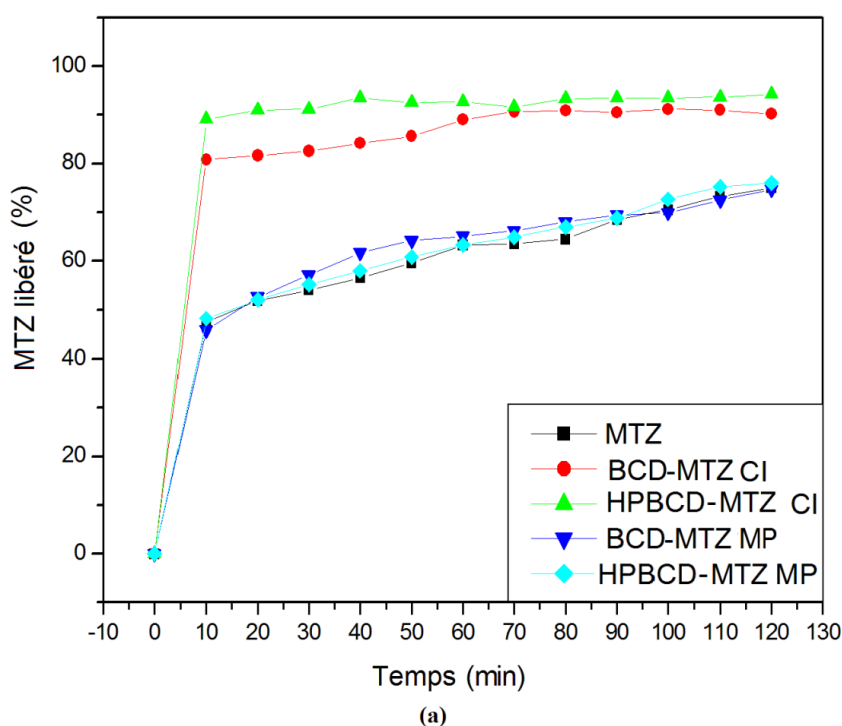
Les résultats démontrent que la complexation du MTZ avec les CDs étudiées permet d'accroître considérablement la vitesse de dissolution du MTZ vis-à-vis du principe actif pur ainsi que les mélanges physiques correspondants. Un récapitulatif du pourcentage du MTZ libéré à partir des formulations évaluées est représenté dans le Tableau 7.4.

Le complexe d'inclusion HPBCD-MTZ a libéré au bout de 10 min, 89,15 et 90,55% du MTZ respectivement dans l'eau distillée et PBS. D'autre part, le complexe d'inclusion avec la BCD montre des pourcentages de libération du MTZ de 80,83 et de 82,22% respectivement, dans l'eau distillée et dans le PBS. En dernier lieu, des proportions de 47,39% et 44,18% ont été respectivement observés dans l'eau distillée et PBS pour le MTZ libre.

L'augmentation de la vitesse de dissolution du MTZ est due principalement à l'incorporation du MTZ dans la cavité des CDs qui a amélioré les propriétés du PA.

L'absence de la maille cristalline du MTZ et sa transformation en état amorphe (prouvée par les analyses thermiques DSC/ATG et la MEB). Cet état conduit à une très grande mobilité moléculaire dû à la haute énergie de l'état amorphe. En effet, ce haut niveau d'énergie présente plusieurs propriétés intéressantes qui sont principalement une solubilité et un taux de dissolution élevé [214–216]. L'habileté des CDs est de solubiliser les agents actifs, agissant comme surfactant et de diminuer la tension superficielle entre le milieu de dissolution et le MTZ augmentant ainsi le taux de dissolution [217].

La quantité du MTZ libérée à partir du complexe HPBCD-MTZ était un peu plus grande que celle libérée à partir du complexe BCD-MTZ. Cela peut être dû à la valeur élevée du rapport optimal invité:CD formé dans le système HPBCD-MTZ (1:3) par rapport à celle obtenue dans le système BCD-MTZ (1:7) (obtenu dans la partie diagramme de solubilité)



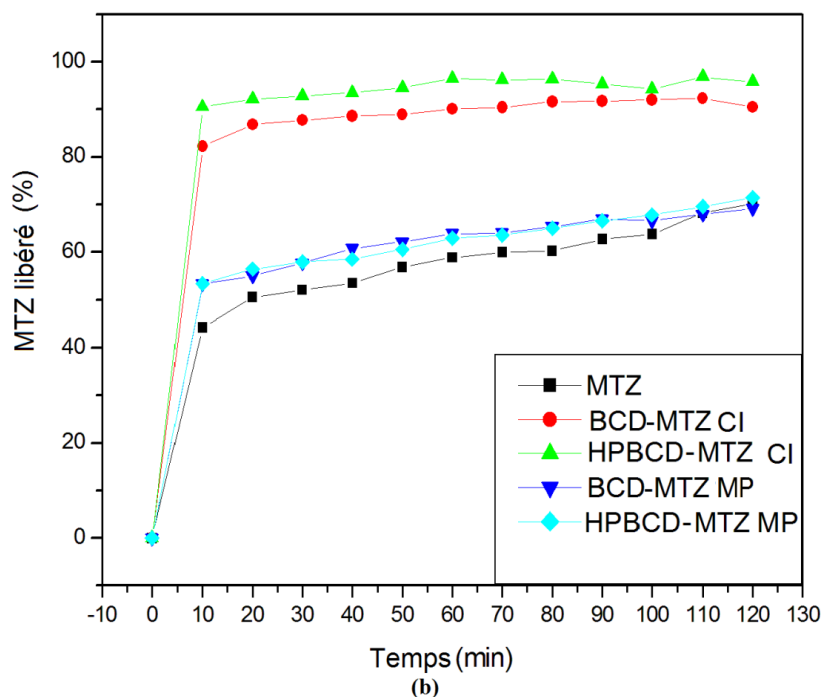


Figure 7. 13 : Profil de libération du MTZ à partir du : MTZ libre, BCD-MTZ CI, HPBCD-MTZ CI, BCD-MTZ MP et HPBCD-MTZ MP dans (a) Eau distillée (b) PBS pH=7,4.

Tableau 7. 4 : Le pourcentage du MTZ libéré à partir du MTZ libre, BCD-MTZ MP, HPBCD-MTZ MP, BCD-MTZ CI et HPBCD-MTZ CI.

Échantillon	MTZ libéré (%)					
	10 min		20 min		120 min	
	Eau distillée	PBS	Eau distillée	PBS	Eau distillée	PBS
MTZ libre	47,39	44,18	51,86	50,55	74,97	70,17
BCD-MTZ MP	45,85	53,28	52,63	55,00	74,66	71,18
HPBCD-MTZ MP	48,16	53,38	52,01	56,42	76,05	72,40
BCD-MTZ CI	80,83	82,22	81,60	86,83	90,23	90,55
HPBCD-MTZ CI	89,15	90,55	91,00	92,19	94,23	95,76

7.6 Activité antibactérienne

Le pourcentage de l'activité antibactérienne du MTZ et les complexes d'inclusion BCD-MTZ et HPBCD-MTZ à différentes concentration est illustré dans la Figure 7.14. Dans

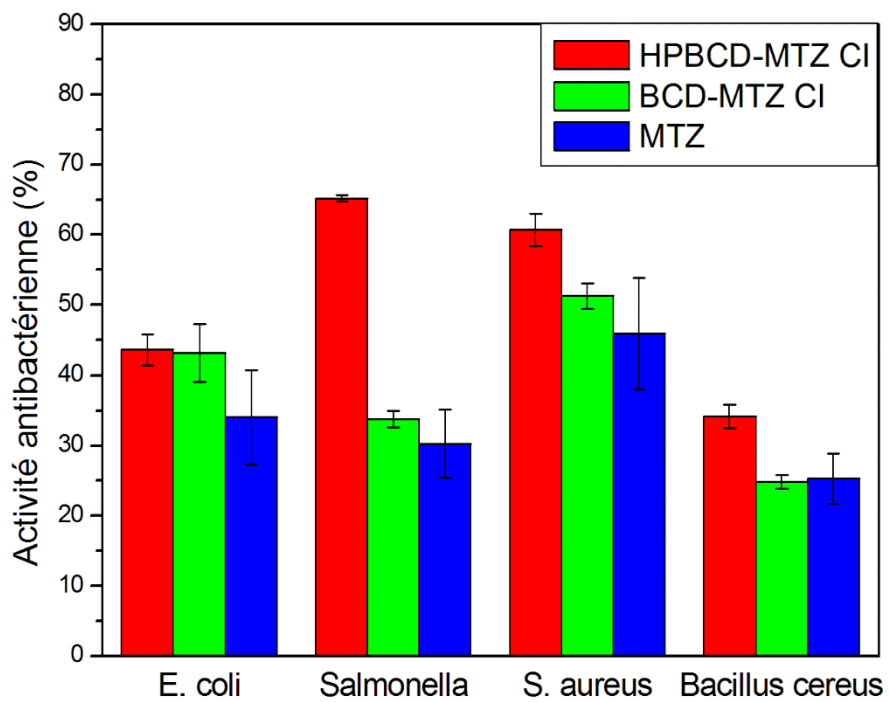
la gamme des concentrations étudiées, l'activité antibactérienne (AAB) du MTZ et de ses complexes d'inclusion était proportionnelle à la concentration du principe actif.

Dans le cas du complexe HPBCD-MTZ, l'incorporation du MTZ dans la cavité de l'HPBCD à un effet significatif sur son AAB, à $170 \mu\text{g mL}^{-1}$, elle a doublé son AAB vis-à-vis *Salmonella*. À la même concentration l'AAB du complexe HPBCD-MTZ était supérieure à 25 % contre *S.aureus*, de 9 % contre *E. coli* et de 8 % contre *Bacillus cereus* par rapport à celle du MTZ pur. Même à la plus faible concentration étudiée ($42,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), le complexe HPBCD-MTZ a présenté une activité importante par rapport à celle du MTZ pur. À cette faible concentration, *Salmonella* et *S.aureus* étaient les plus sensibles à ce complexe où le pouvoir antibactérien était respectivement 5 et 4 fois supérieur à celui du MTZ libre. Toutefois, à $42,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, l'AAB contre *Bacillus cereus* était quasiment identique à celle du MTZ pur.

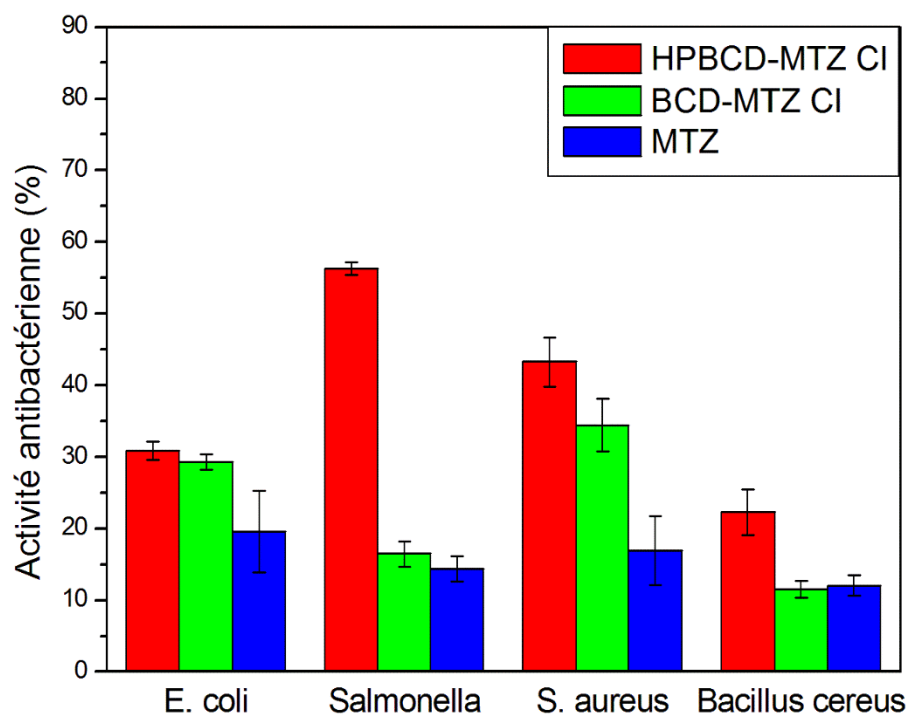
À $85 \mu\text{g mL}^{-1}$, l'AAB du complexe BCD-MTZ était le double vis-à-vis *S.aureus* et supérieure de 10 % contre *E.coli* par rapport à celle du MTZ pur. À $42,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, l'AAB du complexe était supérieur de 4 % contre *Salmonella* et de 3% contre *E.coli* par rapport à celle du MTZ pur. Cependant, l'inclusion du MTZ dans la cavité de la BCD n'a aucun effet sur son AAB contre *Bacillus cereus* à toutes les concentrations testées.

En comparant l'AAB du complexe HPBCD-MTZ avec celle du BCD-MTZ, nous constatons que la complexation par la BCD n'entraîne pas une augmentation considérable de l'AAB du MTZ.

En général, l'inclusion du MTZ dans l'HPBCD et la BCD a augmenté son AAB contre la majorité de bactéries étudiées avec des proportions différentes. En effet, *S. aureus* et *Salmonella* étaient les plus sensibles. Cela est dû principalement à l'augmentation de la solubilité du MTZ dans l'eau suite à son inclusion dans la cavité des CDs. Ce qui a permis à des quantités importantes du MTZ de traverser les cellules membranaires des bactéries.



(a)



(b)

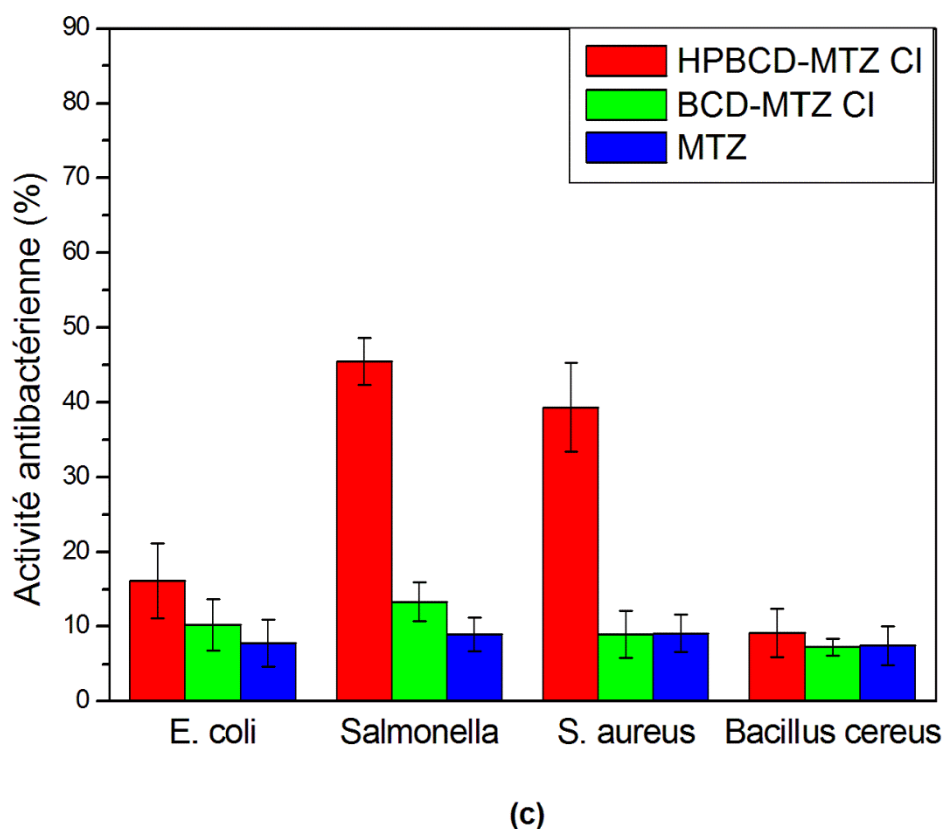


Figure 7. 14: Histogramme d'activité antibactérienne du métronidazole libre et encapsulés avec la BCD et l'HPBCD à (a) 170 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b) 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ et (c) 42,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

7.7 Caractérisation des nanoparticules de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ

7.7.1 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres FTIR du CS, TPP, complexe d'inclusion HPBCD-MTZ lyophilisé, NPs de CS-TPP vides lyophilisées et des NPs de CS-TPP chargées de complexe d'inclusion HPBCD-MTZ lyophilisées sont présentés dans la (Figure 7.15).

Le spectre du CS présente différentes bandes attribuées aux vibrations d'élongation de la liaison O–H (3357 cm^{-1}), vibrations d'élongation des fonctions N–H/ O–H (3284 cm^{-1}), vibrations d'élongation des liaisons C–H asymétrique (2916 cm^{-1}) et symétrique (2871 cm^{-1}), vibrations d'élongation des fonctions C=O (1656 cm^{-1}), vibrations d'élongation des liaisons N–H (1570 cm^{-1}), vibrations d'élongation des liaisons C–N (1308 cm^{-1}), vibrations d'élongation de la liaison C–O–C (1030 cm^{-1}) [188,190–192].

Le spectre du TPP montre plusieurs pics liés essentiellement aux vibrations d'élongation des fonctions P=O (1207 cm^{-1}), vibrations d'élongation symétrique et asymétrique des groupes PO_2 (1131 cm^{-1}), vibrations d'élongation symétrique et asymétrique des groupes PO_3 (1087 cm^{-1}), vibrations d'élongation asymétrique de la liaison P–O–P (879 cm^{-1}) [218].

En comparant le spectre des NPs du CS-TPP vides avec celui du CS libre, nous remarquons l'apparition des deux pics liés aux vibrations d'élongation de la liaison P=O (1263 et 1194 cm^{-1}) et le pic des vibrations d'élongation asymétrique des liaisons P–O–P (809 cm^{-1}). L'apparition du pic intense à 1542 cm^{-1} est générée par les vibrations d'élongation de la liaison N–O–P, suggérant l'interaction entre les groupes NH_3^+ du CS et les groupes phosphate du TPP [219] et la protonation des groupes amines du CS [220]. Le pic étroit apparu à 1650 cm^{-1} est le résultat du fusionnement des deux pics caractéristiques du CS correspondant aux CO–N amide I (1650 cm^{-1}) et N–H amide II (1586 cm^{-1}), indiquant la participation des groupes amines dans le processus de la réticulation [221]. Toutes ces altérations confirment l'interaction entre les groupes positifs (NH_3^+) du CS et les groupes négatifs (PO^-) du TPP, et par conséquent la formation des NPs. Le spectre des NPs du CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ était un peu similaire à celui du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ. Il a montré l'apparition des pics caractéristiques de la réaction de réticulation générés par les vibrations d'élongation P–O–P (891.79 cm^{-1}), P=O (1232.58 cm^{-1}) et N–O–P (1548 cm^{-1}). Cela indique le piégeage du complexe dans les NPs du CS-TPP. L'absorption de la liaison glycosidique a été observée avec un pic large et intense, suggérant que l'anneau des deux polysaccharides (CS et HPBCD) n'a pas été détruit durant l'encapsulation du complexe dans les NPs du CS-TPP.

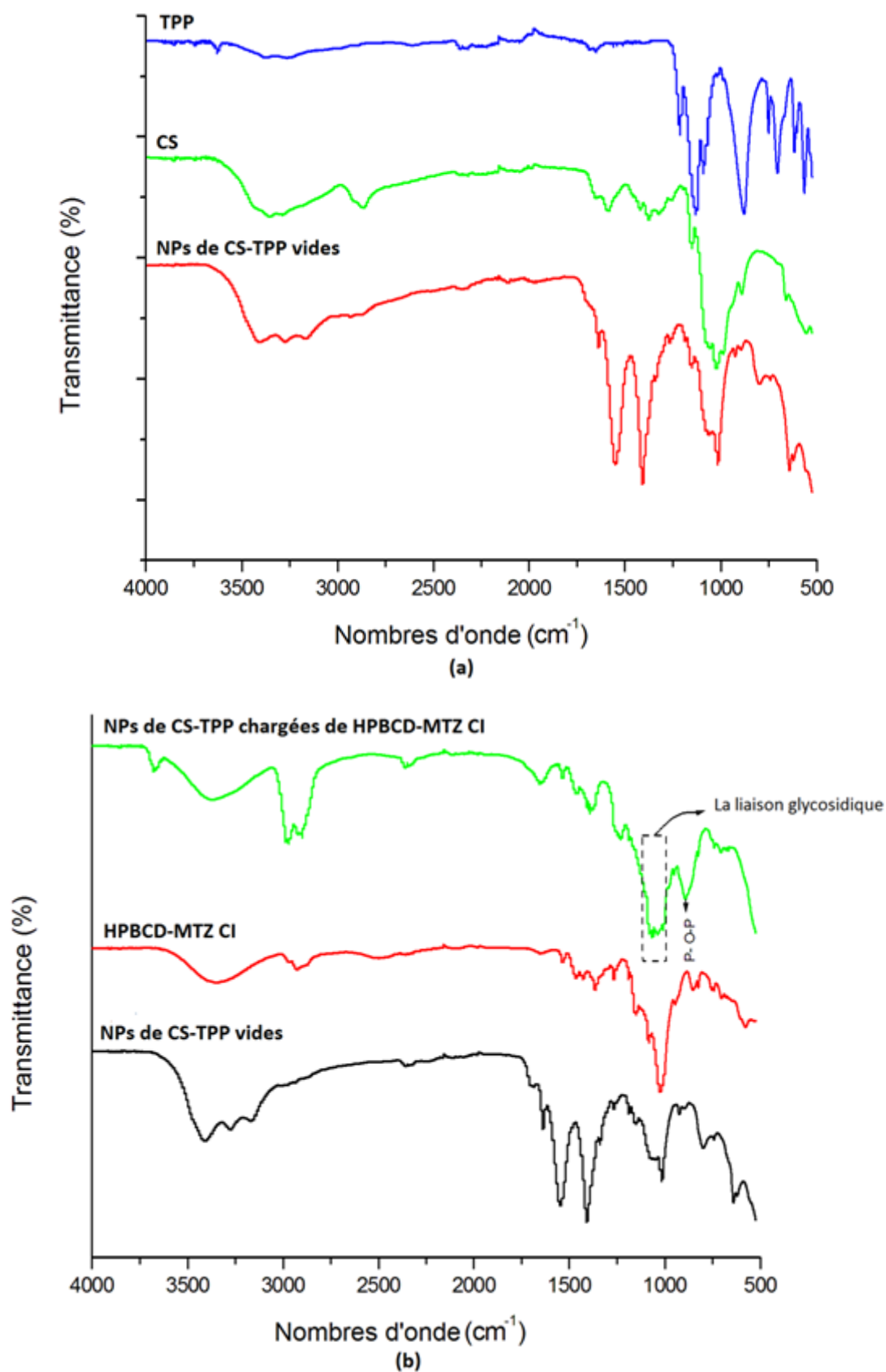
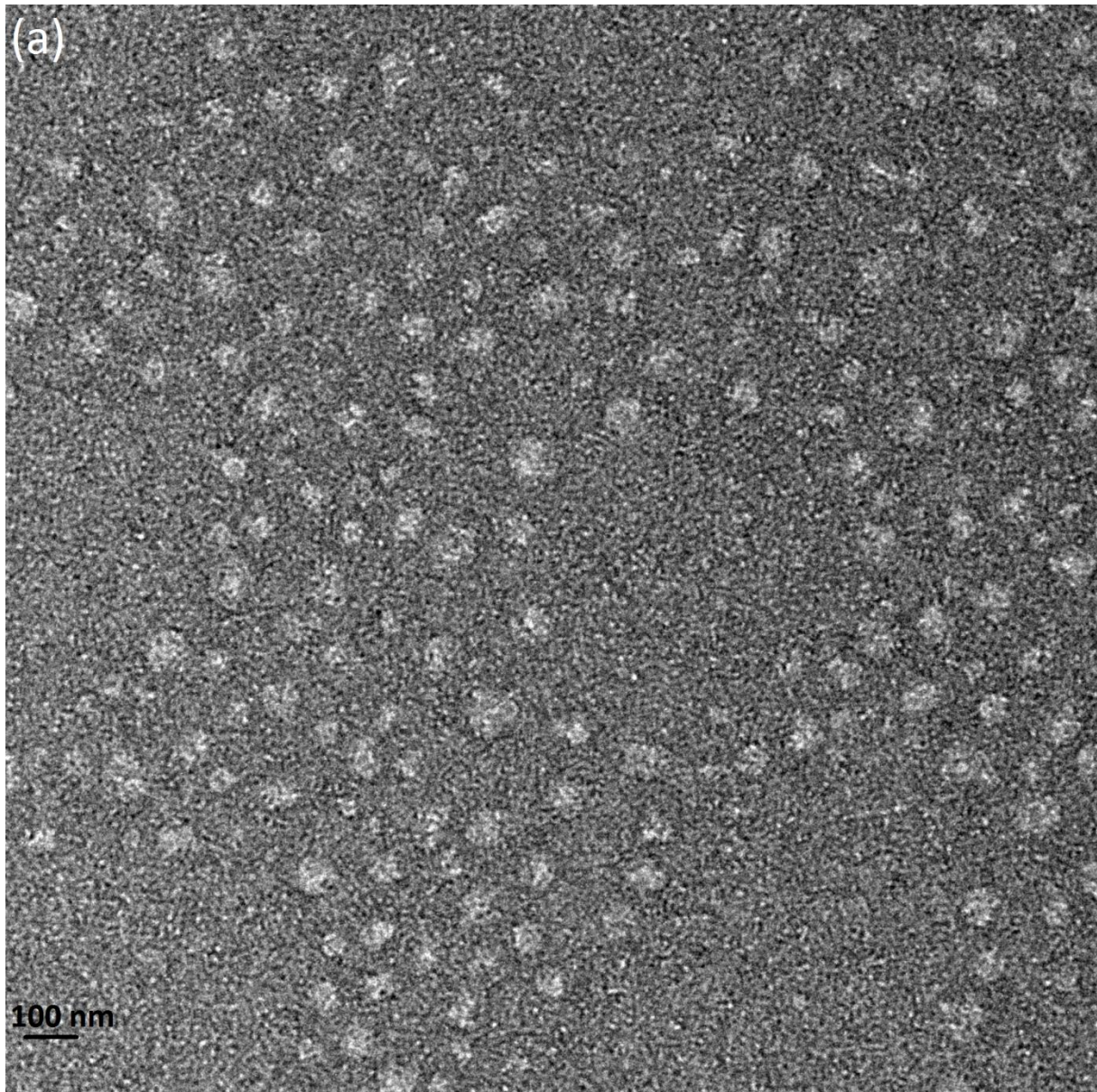


Figure 7. 15 : Spectres FTIR de (a) CS, TPP, et NPs de CS-TPP vides (b) HPBCD-MTZ CI, NPs de CS-TPP vides et NPs de CS chargées du complexe HPBCD-MTZ.

7.7.2 Morphologie et taille des NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ

Les images de NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ obtenues par MEB-FEG et MET sont représentées dans la (Figure 7.16). La distribution de taille des NPs est illustrée dans la (Figure 7.17).

La Figure 7.15 montre que les NPs se présentent sous une forme sphérique régulière bien dispersée, avec une taille autour de 100 nm. La Figure 7.16 dévoile que les NPs se présentent sous une seule population de diamètre autour de 229 nm. Le diamètre de NPs mesuré par la DLS est différent à celui mesuré par le MEB-FEG et MET, cela est dû au fait que, le MEB-FEG et MET mesurent la taille réelle, tandis que la DLS mesure le diamètre hydrodynamique [222].



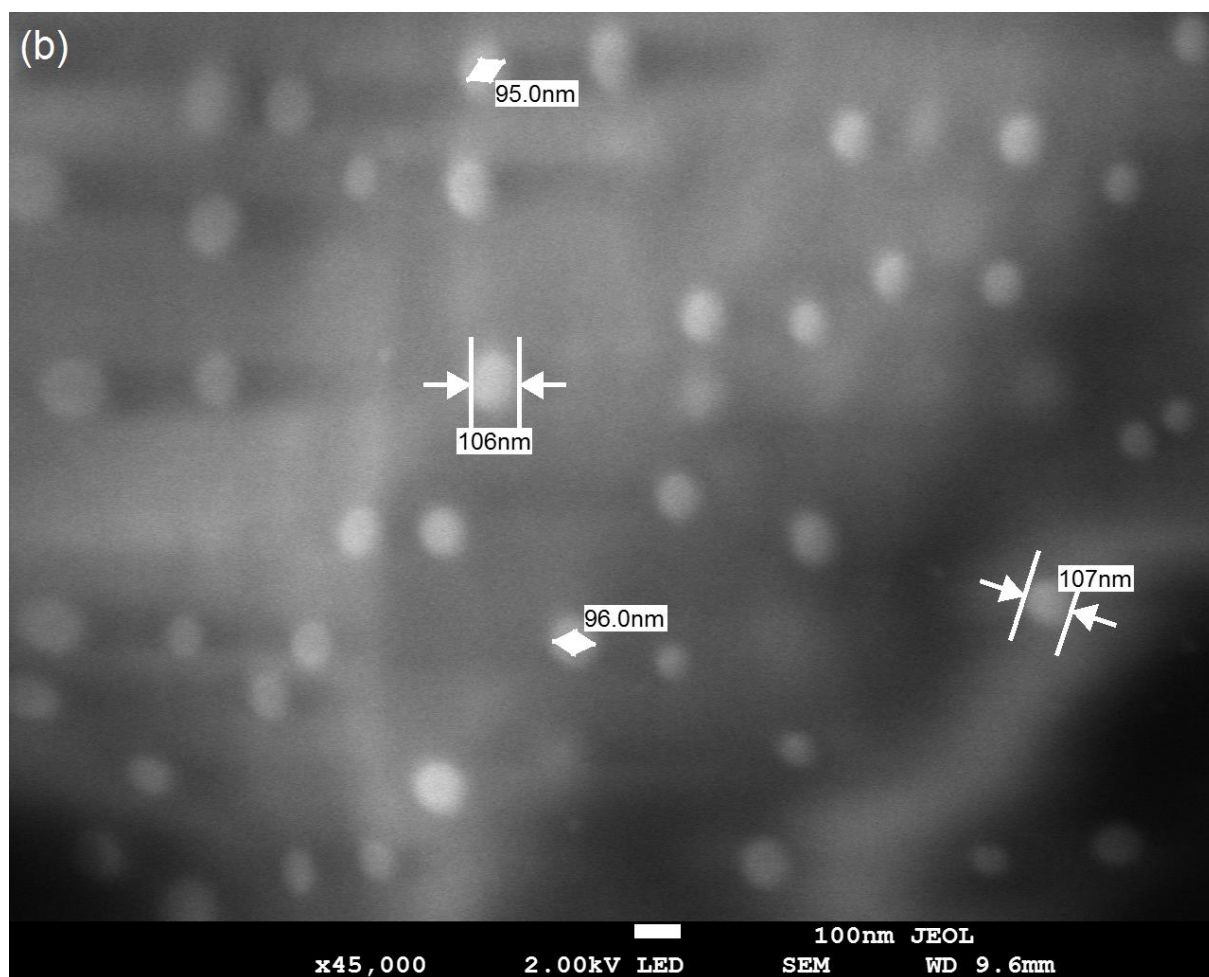


Figure 7. 16 : Images de NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ obtenues par (a) microscopie électronique en transmission (b) microscopie électronique à balayage à émission de champs.

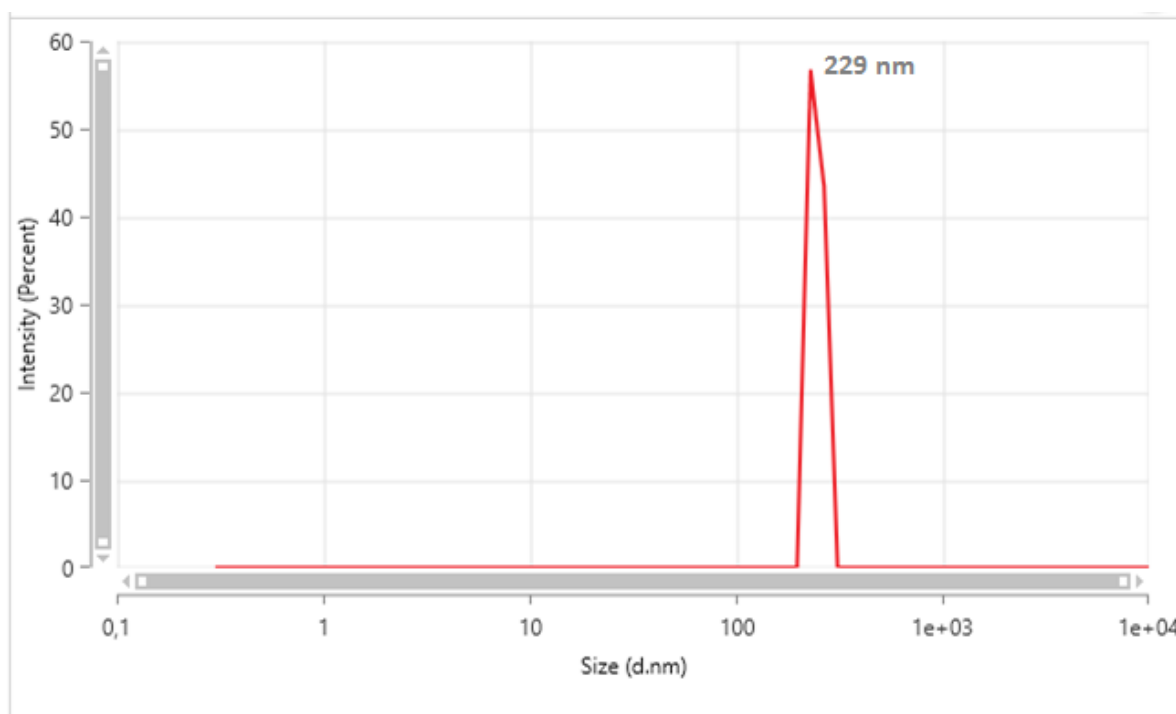


Figure 7. 17: Distribution de taille de NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ obtenue par DLS.

7.7.3 Étude de dissolution *in vitro*

Le profil de libération du MTZ à partir des NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ est illustré dans la Figure 7.18. Il est caractérisé par la présence d'un effet initial étant obtenu par dissolution rapide du PA. Près de 26 % du MTZ a été libéré dans les 30 premières minutes, cela est probablement dû à une certaine quantité du MTZ proche de la surface des NPs ou dû à l'amélioration de la solubilité du MTZ [223].

Nous pouvons supposer que le profil de dissolution du MTZ est un processus biphasique. Dans un premier temps, le MTZ se libère de la surface des NPs, ensuite, il se libère à partir du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ et les NPs [34].

En comparant le pourcentage de libération du MTZ à partir des NPs chargées du complexe à celui du MTZ à partir du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ, nous remarquons que les NPs chargées du complexe ont libéré 31,65% du MTZ durant 2h et 97,54% pendant 8h. Tandis que le pourcentage du MTZ libéré à partir du complexe d'inclusion était 95,76%. L'effet de l'inclusion du MTZ dans la cavité de l'HPBCD était l'amélioration de sa solubilité et sa stabilité thermique. Alors que, la nanoencapsulation permet de contrôler sa libération.

Généralement, les NPs à base du CS permettent la libération des molécules actives par gonflement (VPT, *volume phase transitions*). Le CS facilite la pénétration des milieux de

dissolution alcalins. À pH=7,4 les groupes $-\text{NH}_3^+$ du CS se convertissent en une forme non ionisée, conduisant à une réduction de la réticulation du CS par le TPP et une augmentation du gonflement du CS, et par conséquent la libération des molécules actives encapsulées. Un autre facteur qui favorise le gonflement du CS est la présence du NaCl (milieu externe : PBS) à des concentrations modérées qui peut affaiblir les interactions ioniques entre le CS et le TPP [224].

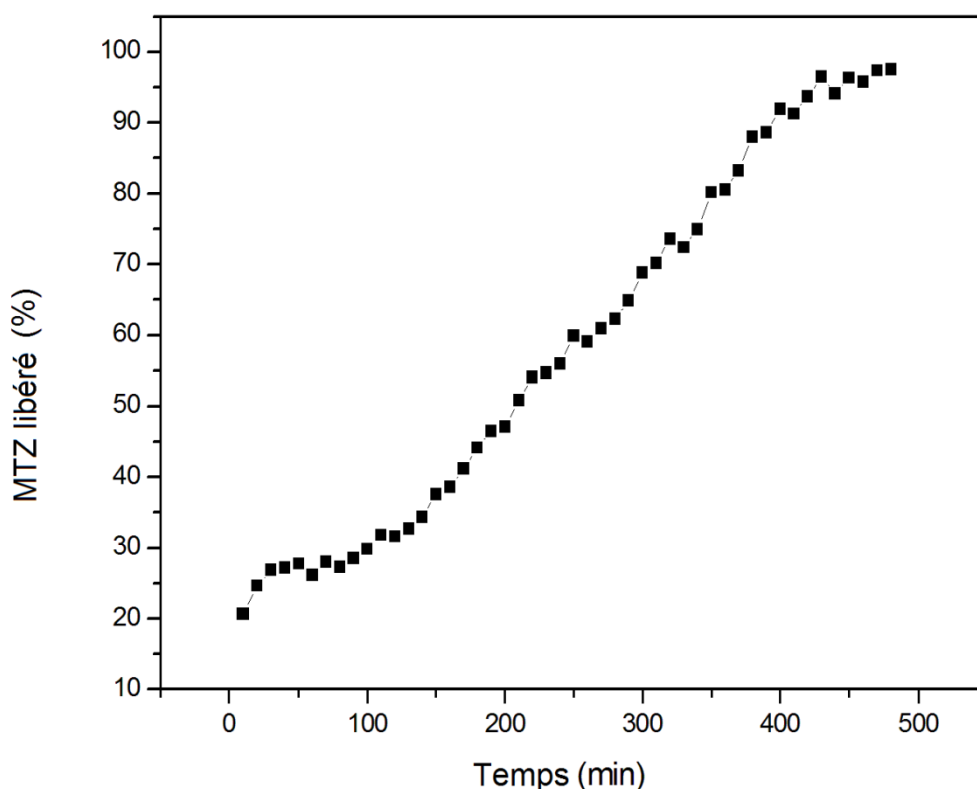


Figure 7. 18: Profil de libération du MTZ à partir de NPs de CS-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ dans PBS pH=7,4.

Pour mieux connaître le phénomène qui gère la libération du MTZ à partir de NPs, nous avons eu recours aux modèles mathématiques suivant : ordre zéro (Equation 3.5), premier ordre (Equation 3.6) et Korsmeyer-Pepass (Equation 3.7). Les coefficients de régression calculés sont présentés dans le Tableau 7.5. L'évaluation du coefficient de régression nous a permis de conclure que la cinétique de libération du MTZ à partir de NPs s'ajuste le mieux avec le modèle d'ordre zéro.

Tableau 7. 5: Les coefficients de corrélation (R^2) des différents modèles appliqués au profil de dissolution *in vitro* de NPs de CS-TPP chargées de complexe HPBCD-MTZ dans PBS (pH= 7,4).

Ordre zéro	Premier ordre	Korsmeyer-Peppas
$y = 0,1816x + 14,051$	$y = -0,0029x + 2,1826$	$y = 0,5019x + 0,5809$
$R^2 = 0,9836$	$R^2 = 0,8395$	$R^2 = 0,8558$ $n=0,5019$

Si la formation du complexe d'inclusion « substance active-CD » est faisable avant la nanoencapsulation, elle sera considérée comme un support pour les nanostructures pour libérer le PA, qui va être facilement solubilisé dans le milieu de dissolution d'une manière contrôlée, et donc une amélioration de la biodisponibilité dans les situations *in vivo*.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Cette étude s'intègre dans le contexte de la mise en valeur de nouveaux systèmes de délivrance des médicaments.

Nos travaux de thèse ont permis d'ouvrir la voie vers l'utilisation de deux types de système de délivrance des médicaments destinés à la voie orale : 1) Des nanoparticules polymères chargées d'ibuprofène à base de l'alginate de sodium et de chitosane pour former un complexe polyélectrolyte. 2) un système d'encapsulation mixte à base de complexe d'inclusion de CD et de nanoparticules de chitosane chargées de MTZ sous forme de complexe.

Les nanoparticules développées pour les deux PA étudiés ont été préparées par la méthode de gélification ionique vue sa simplicité, sa reproductibilité et pour éviter au maximum l'emploi de solvants organiques et par conséquent diminuer la toxicité.

Dans le but de résoudre le problème de courte durée de demi-vie et la faible solubilité aqueuse de l'ibuprofène, un système nanopolymérique à base de l'alginate de sodium et de chitosane a été développé. Ce système a assuré une efficacité d'encapsulation très élevée de 98,45 %. Les nanoparticules formées ont présenté une excellente distribution de taille avec une forme sphérique régulière de 100 nm de diamètre. La caractérisation physico-chimique par FTIR et DSC confirme la formation du complexe polyélectrolyte et l'encapsulation de l'IBP dans les nanoparticules. L'évaluation de la dissolution *in vitro* ainsi que l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'IBP dans différents milieux (FGS, FIS et PBS) a montré que les nanoparticules peuvent retenir la majorité de l'IBP en milieu gastrique et le libèrent d'une manière contrôlée dans FIS et PBS. Une augmentation considérable de l'activité biologique de l'IBP est notée dans FIS, PBS et l'eau distillée, due à l'augmentation de sa solubilité grâce à la nanoencapsulation à base de deux biopolymères qui ont présenté un comportement pH-sensibles.

Les modèles mathématiques appliqués aux trois profils de libération indiquent que la libération de l'IBP à partir des NPS dans les trois milieux (FGS, FIS et PBS) ne suit pas le même mécanisme, cela est lié aux différents facteurs comme l'interaction du PA au sein de la matrice polymérique, le comportement du polymère qui change selon la variation des paramètres du milieu de dissolution (pH, température). Le profil de libération de l'IBP a pu atteindre le profil quasi ordre zéro pendant une durée de 8h.

Les résultats obtenus dans l'étude de la biodégradation *in vitro* et de la cytotoxicité indiquent que ce système n'est pas nocif et il ne présente aucune toxicité pour les larves d'*Artémia*.

Cette partie présente un système efficace pour surmonter les limites rencontrées pour la forme conventionnelle de l'IBP. Ce système est facilement extrapolable à l'échelle industrielle pour une formulation destinée à la voie orale pour contrôler la libération de l'IBP, améliorer sa biodisponibilité et minimiser les doses répétitives et par conséquent diminuer les effets indésirables.

Concernant les nanoparticules chargées de MTZ sous forme de complexe d'inclusion une étude comparative a été réalisée pour évaluer les différentes interactions entre le MTZ et les deux CDs étudiées (BCD et HPBCD) pour choisir le meilleur candidat à encapsuler dans les nanoparticules de CS.

Dans la première phase de préparation et caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion BCD-MTZ et HPBCD-MTZ, nous avons démontré que la BCD et son dérivé sont capables d'incorporer le MTZ en solution et à l'état solide dans leur cavité. Les deux complexes d'inclusion ont été préparés dans une solution aqueuse à une stœchiométrie 1:1 selon la méthode de variation continue. Des études au niveau structural (^1H RMN, RMN 2D NOESY et RMN 2D ROESY) ont permis de démontrer la réalité de l'inclusion du métronidazole au sein de la cavité des deux CDs suivant une orientation bien précise et d'élucider également la structure tridimensionnelle des deux complexes d'inclusion. En outre, nous avons mis en évidence par les techniques de caractérisation usuelles (FTIR, DSC, ATG et MEB) la formation des complexes d'inclusion à l'état solide. Ces analyses ont montré que le MTZ sous forme de complexe présente des propriétés physico-chimiques meilleures que celles du MTZ libre.

La préparation des deux complexes d'inclusion du MTZ, en utilisant la BCD et l'HPBCD, a permis d'améliorer la solubilité et la vitesse de dissolution du MTZ et par conséquent son pouvoir antibactérien. En effet, l'HPBCD a démontré une meilleure capacité de solubilisation et une activité antibactérienne significative que la BCD native, ce qui est reliée principalement à la solubilité aqueuse élevée de l'HPBCD.

L'estimation des paramètres thermodynamiques indique la faisabilité de la formation des deux complexes. Les valeurs négatives du ΔG et ΔH ainsi que le gain d'entropie démontrent que les deux systèmes formés sont stables et thermodynamiquement favorables. Les forces dirigeant le processus de complexation sont essentiellement les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les forces électrostatiques.

Les datas obtenues dans les études de diagramme de solubilité et de paramètres thermodynamique pourront être essentiels pour choisir les conditions les plus favorables pour une formulation à l'échelle industrielle.

Les résultats présentés dans cette phase montrent que les CDs peuvent non seulement résoudre le problème de solubilité et de stabilité du MTZ mais également améliorer et moduler sa libération. Cela permet de mettre en œuvre des systèmes d'encapsulation assurant la solubilisation et la protection des PA ainsi qu'une modification de leur cinétique de libération.

Par la suite, le complexe d'inclusion HPBCD-MTZ a été incorporé dans les nanoparticules de CS réticulées avec du TPP. Ce rapport présente pour la première fois l'utilisation des nanoparticules de chitosane-TPP chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ comme un système de délivrance du métronidazole. La caractérisation physico-chimique des nanoparticules confirme l'incorporation du complexe au sein des nanoparticules de CS. Les nanoparticules formées ont présenté une forme sphérique et régulière et ont assuré une meilleure distribution de taille.

Le profil de libération a montré une faible libération initiale avec une libération contrôlée d'ordre zéro, un profil idéal pour la libération d'un PA, capable de fournir des taux de libération relativement constants de MTZ librement solubles dans le milieu aqueux.

Cette partie met en évidence l'utilisation de la nanoencapsulation des complexes d'inclusion (substance active:CD) qui constitue un potentiel système permettant le contrôle de la libération de la substance active qui va être librement solubilisée dans les milieux aqueux grâce à l'effet de solubilisation fourni par les CDs.

À travers ces résultats, nous pouvons conclure que les nanoparticules polymères et les complexes d'inclusion de CDs constituent des systèmes alternatifs potentiels pour surmonter les lacunes des formes conventionnelles. En plus, la nanoencapsulation des PA permet d'envisager des systèmes de libération contrôlée permettant d'améliorer leur biodisponibilité, moduler leur durée d'action, améliorer le rapport bénéfice/risque et une meilleure observance du traitement.

Comme perspectives de ce travail, des études complémentaires visant à confirmer et/ou approfondir les résultats obtenus dans la partie liée aux nanoparticules chargées d'ibuprofène peuvent être envisagées :

- Afin d'évaluer le potentiel des nanoparticules chargées d'IBP pour la vectorisation, la biodisponibilité et l'amélioration de leurs propriétés pharmacocinétiques, des études *in vivo* seront recommandées.
- Des études de stabilité à long terme seront intéressantes afin d'augmenter la durée de stockage et de conservation.
- Il serait intéressant de visualiser l'état des nanoparticules par microscopie électronique en transmission afin de suivre le mécanisme de libération de l'ibuprofène à partir de ces nanoparticules.

Concernant les nanoparticules contenant le MTZ sous forme d'un complexe nos perspectives seront les suivantes :

- Il serait intéressant de tester l'activité antimicrobienne des deux complexes d'inclusion du MTZ, des nanoparticules chargées de MTZ sous forme d'un complexe et des nanoparticules chargées de MTZ pur et de les comparer avec celle du MTZ libre *in vitro* et *in vivo* contre les microorganismes suivants : *Clostridium difficile*, *Clostridium*, *Clostridium perfringens* et autres.
- Afin d'augmenter la durée de vie des formulations, il serait nécessaire d'étudier la stabilité des complexes d'inclusion et les nanoparticules chargées de MTZ sous forme de complexe à long terme.
- Des études *in vivo* peuvent être envisagées afin d'évaluer la toxicité des complexes d'inclusion et les nanoparticules chargées de MTZ sous forme de complexe avant sa formulation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. Puisieux, M. Seiller, J.-P. Devissaguet, Les systèmes de délivrance des médicaments : un réel progress pour la thérapeutique, *Ann. Pharm. Françaises*. 64 (2006) 219–259. [https://doi.org/10.1016/s0003-4509\(06\)75318-4](https://doi.org/10.1016/s0003-4509(06)75318-4).
- [2] G. Tiwari, R. Tiwari, S. Bannerjee, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, B. Sriwastawa, Drug delivery systems: An updated review, *Int. J. Pharm. Investig.* 2 (2012) 2. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.96920>.
- [3] S. Sundar, J. Kundu, S.C. Kundu, Biopolymeric nanoparticles, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 11 (2010) 014104. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014104>.
- [4] P. Li, Y.N. Dai, J.P. Zhang, A.Q. Wang, Q. Wei, Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine, *Int. J. Biomed. Sci.* 4 (2008) 221–228. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675094>.
- [5] K.D. Rainsford, ed., *Ibuprofen*, 1st Editio, CRC Press, London, 1999. <https://doi.org/10.4324/9781482295382>.
- [6] B. Arica, S. Çaliş, P. Atilla, N.T. Durlu, N. Çakar, H.S. Kaş, A.A. Hincal, In vitro and in vivo studies of ibuprofen-loaded biodegradable alginate beads, *J. Microencapsul.* 22 (2005) 153–165. <https://doi.org/10.1080/02652040400026319>.
- [7] A. Celebioglu, T. Uyar, Metronidazole/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs as fast-dissolving oral drug delivery system, *Int. J. Pharm.* 572 (2019) 118828. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118828>.
- [8] C.D. Freeman, N.E. Klutman, K.C. Lamp, Metronidazole. A therapeutic review and update, *Drugs*. 54 (1997) 679–708. <https://doi.org/10.2165/00003495-199754050-00003>.
- [9] H.P. de Oliveira, G.F. Tavares, C. Nogueiras, J. Rieumont, Physico-chemical analysis of metronidazole encapsulation processes in Eudragit copolymers and their blending with amphiphilic block copolymers, *Int. J. Pharm.* 380 (2009) 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.06.028>.
- [10] M.P. Prabhakaran, M. Zamani, B. Felice, S. Ramakrishna, Electrospraying technique for the fabrication of metronidazole contained PLGA particles and their release profile, *Mater. Sci. Eng. C*. 56 (2015) 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.018>.
- [11] S. Malli, C. Bories, G. Ponchel, P.M. Loiseau, K. Bouchemal, Phase solubility studies and anti-*Trichomonas vaginalis* activity evaluations of metronidazole and methylated β -cyclodextrin complexes: Comparison of CRYSMEB and RAMEB, *Exp. Parasitol.* 189 (2018) 72–75. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.04.019>.
- [12] A. Bendesky, Is metronidazole carcinogenic?, *Mutat. Res.* 511 (2002) 133–144. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00007-8).
- [13] DEQM, ed., *PHARMACOPEE EUROPEENNE*, 6th ed., Conseil de l'Europe (Strasbourg), 2010.
- [14] I.J. Hardy, W.G. Cook, C.D. Melia, Compression and compaction properties of plasticised high molecular weight hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as a

- hydrophilic matrix carrier, *Int. J. Pharm.* 311 (2006) 26–32.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.025>.
- [15] J.E. Hogan, Hydroxypropylmethylcellulose sustained release technology, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15 (1989) 975–999. <https://doi.org/10.3109/03639048909043660>.
- [16] J.R. Vane, R.M. Botting, Mechanism of Action of Anti-Inflammatory Drugs, *Scand. J. Rheumatol.* 25 (1996) 9–21. <https://doi.org/10.3109/03009749609097226>.
- [17] C.P.R. V. Figueiredo, Ibuprofen Nanoparticles for Oral Delivery: Proof of Concept, *J. Nanomedicine. Biotherapeutic Discov.* 04 (2014). <https://doi.org/10.4172/2155-983x.1000119>.
- [18] J.A. Balleño, A.P. Mendizábal-Ruiz, H. Saade, R. Díaz De León-Gómez, E. Mendizábal, N. Rios-Donato, R.G. López, Ibuprofen Release from Poly(ethyl cyanoacrylate) Nanoparticles Prepared by Semicontinuous Heterophase Polymerization, *Int. J. Polym. Sci.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/4527203>.
- [19] B. Jiang, L. Hu, C. Gao, J. Shen, Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a coprecipitation method and their release properties, *Int. J. Pharm.* 304 (2005) 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.08.008>.
- [20] P. Goldman, The development of 5-nitroimidazoles for the treatment and prophylaxis of anaerobic bacterial infections, *J. Antimicrob. Chemother.* 10 (1982) 23–33. https://doi.org/10.1093/jac/10.suppl_A.23.
- [21] R.L. Koder, C.A. Haynes, M.E. Rodgers, D.W. Rodgers, A.-F. Miller, Flavin Thermodynamics Explain the Oxygen Insensitivity of Enteric Nitroreductases, *Biochemistry.* 41 (2002) 14197–14205. <https://doi.org/10.1021/bi025805t>.
- [22] D. Videau, G. Niel, A. Siboulet, F. Catalan, Secnidazole. A 5-nitroimidazole derivative with a long half-life, *Sex. Transm. Infect.* 54 (1978) 77–80. <https://doi.org/10.1136/sti.54.2.77>.
- [23] M. Skold, H. Gnarpe, L. Hillstrom, Ornidazole: a new antiprotozoal compound for treatment of *Trichomonas vaginalis* infection, *Sex. Transm. Infect.* 53 (1977) 44–48. <https://doi.org/10.1136/sti.53.1.44>.
- [24] H.B. Fung, T.-L. Doan, Tinidazole: A nitroimidazole antiprotozoal agent, *Clin. Ther.* 27 (2005) 1859–1884. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.12.012>.
- [25] B.A. Wood, A.M. Monro, Pharmacokinetics of tinidazole and metronidazole in women after single large oral doses, *Sex. Transm. Infect.* 51 (1975) 51–53. <https://doi.org/10.1136/sti.51.1.51>.
- [26] D.E. Schwartz, F. Jeunet, Comparative Pharmacokinetic Studies of Ornidazole and Metronidazole in Man, *Chemotherapy.* 22 (1976) 19–29. <https://doi.org/10.1159/000221906>.
- [27] K.C. Lamp, C.D. Freeman, N.E. Klutman, M.K. Lacy, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Nitroimidazole Antimicrobials, *Clin. Pharmacokinet.* 36 (1999) 353–373. <https://doi.org/10.2165/00003088-199936050-00004>.
- [28] L. Jokipii, A.M. Jokipii, Comparative evaluation of the 2-methyl-5-nitroimidazole

- compounds dimetridazole, metronidazole, secnidazole, ornidazole, tinidazole, carnidazole, and panidazole against *Bacteroides fragilis* and other bacteria of the *Bacteroides fragilis* group, *Antimicrob. Agents Chemother.* 28 (1985) 561–564. <https://doi.org/10.1128/AAC.28.4.561>.
- [29] H. Bundsaard, F.M. Andersen, Inclusion complexation of metronidazole benzoate with γ -cyclodextrin and its depression of anhydrate-hydrate transition in aqueous suspensions, *Int. J. Pharm.* 19 (1984) 189–197.
- [30] L. Stjern, S. Voittoinen, R. Weldemichel, S. Thuresson, M. Agnes, G. Benkovic, É. Fenyvesi, M. Malanga, K. Yannakopoulou, A. Feiler, S. Valetti, Cyclodextrin-mesoporous silica particle composites for controlled antibiotic release. A proof of concept toward colon targeting, *Int. J. Pharm.* 531 (2017) 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.062>.
- [31] U.A. Shinde, S.J. Parmar, S. Easwaran, Metronidazole-loaded nanostructured lipid carriers to improve skin deposition and retention in the treatment of rosacea, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 45 (2019) 1039–1051. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1569026>.
- [32] N. Sreeharsha, K. Rajpoot, M. Tekade, D. Kalyane, A.B. Nair, K.N. Venugopala, R.K. Tekade, Development of metronidazole loaded chitosan nanoparticles using QBD approach—a novel and potential antibacterial formulation, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1–22. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100920>.
- [33] M.F. Canbolat, A. Celebioglu, T. Uyar, Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 115 (2014) 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.11.021>.
- [34] S. Gao, J. Sun, D. Fu, H. Zhao, M. Lan, F. Gao, Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of tacrolimus-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex-loaded albumin nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 427 (2012) 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.054>.
- [35] U.A. Shinde, P.N. Joshi, D.D. Jain, K. Singh, Preparation and Evaluation of N-Trimethyl Chitosan Nanoparticles of Flurbiprofen for Ocular Delivery, *Curr. Eye Res.* 44 (2019) 575–582. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1567793>.
- [36] F. Kayaci, Y. Ertas, T. Uyar, Enhanced thermal stability of eugenol by cyclodextrin inclusion complex encapsulated in electrospun polymeric nanofibers, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 8156–8165. <https://doi.org/10.1021/jf402923c>.
- [37] F. Kayaci, O.C.O. Umu, T. Tekinay, T. Uyar, Antibacterial electrospun poly(lactic acid) (PLA) nanofibrous webs incorporating triclosan/cyclodextrin inclusion complexes, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 3901–3908. <https://doi.org/10.1021/jf400440b>.
- [38] F. Kayaci, T. Uyar, Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin, *Food Chem.* 133 (2012) 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.040>.
- [39] T. Uyar, Y. Nur, J. Hacaloglu, F. Besenbacher, Electrospinning of functional

- poly(methyl methacrylate) nanofibers containing cyclodextrin-menthol inclusion complexes, *Nanotechnology*. 20 (2009). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/12/125703>.
- [40] A. Villiers, Sur la fermentation de la fécula par l'action du ferment butyrique, *Compt. Rend. Acad. Sci.* 112 (1891) 536–538.
- [41] F. Schardinger, Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, *Zeitschrift Für Untersuchung Der Nahrungs-Und Genussmittel, Sowie Der Gebrauchsgegenstände*. 6 (1903) 865–880.
- [42] F. Schardinger, Bildung kristallisierter polysaccharide (dextrine) aus stärkekleister durch microben, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II*. 29 (1911) 188–197.
- [43] K. Freudenberg, E. Schaaf, G. Dumpert, T. Ploetz, Neue ansichten uber die starke, *Naturwiss.* 27 (1939) 850–853.
- [44] K. Freudenberg, R. Jacobi, Uber Schardinger Dextrine aus Starke, *Liebigs Ann. Chem.* 518 (1935) 102–108.
- [45] F. Cramer, *Einschlussverbindungen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1954. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-49192-4>.
- [46] D. French, A.O. Pulley, J.A. Effenberger, M.A. Rougvie, M. Abdullah, Studies on the Schardinger dextrans, *Arch. Biochem. Biophys.* 111 (1965) 153–160. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(65\)90334-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(65)90334-6).
- [47] K. Freudenberg, F. Cramer, H. Plieninger, Verfahren zur Herstellung von Einschlussverbindungen physiologisch wirksamer organischer Verbindungen, Pat 895,769, 1953.
- [48] J. Szejtli, Cyclodextrin Inclusion Complexes, in: *Cyclodext. Technol.*, 1988: pp. 79–185. https://doi.org/10.1007/978-94-015-7797-7_2.
- [49] M.E. Davis, M.E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 1023–1035. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>.
- [50] P. Michalska, A. Wojnicz, A. Ruiz-Nuño, S. Abril, I. Buendia, R. León, Inclusion complex of ITH12674 with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, physical characterization and pharmacological effect, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.072>.
- [51] E.M.M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: A review, *Process Biochem.* 39 (2004) 1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9).
- [52] M.E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 645–666. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.012>.
- [53] S.B. Carneiro, F.Í.C. Duarte, L. Heimfarth, J.D.S.S. Quintans, L.J. Quintans-Júnior, V.F.D.V. Júnior, Á.A.N. De Lima, Cyclodextrin-drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms20030642>.
- [54] W. Saenger, T. Steiner, *Cyclodextrin Inclusion Complexes: Host–Guest Interactions*

- and Hydrogen-Bonding Networks, *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* 54 (1998) 798–805. <https://doi.org/10.1107/S0108767398010733>.
- [55] J. Szejtli, Past, present and future of cyclodextrin research, *Pure Appl. Chem.* 76 (2004) 1825–1845. <https://doi.org/10.1351/pac200476101825>.
- [56] W. Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S.M. Smith, T. Takaha, Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1787–1802. <https://doi.org/10.1021/cr9700181>.
- [57] K. Harata, Structural Aspects of Stereodifferentiation in the Solid State, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1803–1828. <https://doi.org/10.1021/cr9700134>.
- [58] J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743–1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>.
- [59] J.C. de Miranda, T.E.A. Martins, F. Veiga, H.G. Ferraz, Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 47 (2011) 665–681. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000400003>.
- [60] K. Takahashi, K. Andou, S. Fujiwara, Characterization and structural determination of 3A-amino-3A-deoxy-(2AS, 3AS)-cyclodextrins by NMR spectroscopy, *Polym. J.* 44 (2012) 850–854. <https://doi.org/10.1038/pj.2012.122>.
- [61] P. Blach, S. Fourmentin, D. Landy, F. Cazier, G. Surpateanu, Cyclodextrins: A new efficient absorbent to treat waste gas streams, *Chemosphere.* 70 (2008) 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.07.018>.
- [62] L. Szente, J. Szejtli, Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 17–28. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00092-1).
- [63] H.M.C. Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, *Flavour Fragr. J.* 25 (2010) 313–326. <https://doi.org/10.1002/ffj.2019>.
- [64] R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R.K. Khar, Cyclodextrins in drug delivery: An updated review, *AAPS PharmSciTech.* 6 (2005) 329–357. <https://doi.org/10.1208/pt060243>.
- [65] N. Nasongkla, A.F. Wiedmann, A. Bruening, M. Beman, D. Ray, W.G. Bornmann, D.A. Boothman, J. Gao, Enhancement of Solubility and Bioavailability of β -Lapachone Using Cyclodextrin Inclusion Complexes, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1626–1633. <https://doi.org/10.1023/A:1026143519395>.
- [66] K.M.R. Srivalli, B. Mishra, Improved Aqueous Solubility and Antihypercholesterolemic Activity of Ezetimibe on Formulating with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin and Hydrophilic Auxiliary Substances, *AAPS PharmSciTech.* 17 (2016) 272–283. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0344-7>.
- [67] T. Zoeller, J.B. Dressman, S. Klein, Application of a ternary HP- β -CD-complex approach to improve the dissolution performance of a poorly soluble weak acid under biorelevant conditions, *Int. J. Pharm.* 430 (2012) 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.029>.

- [68] V.J. Stella, Q. He, Cyclodextrins, *Toxicol. Pathol.* 36 (2008) 30–42. <https://doi.org/10.1177/0192623307310945>.
- [69] M. Malanga, J. Szemán, É. Fenyvesi, I. Puskás, K. Csabai, G. Gyémánt, F. Fenyvesi, L. Szenté, “Back to the Future”: A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 2921–2931. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.034>.
- [70] J. Szejtli, Cyclodextrins and their inclusion complexes., *Akad. Kiado.* 25 (1982).
- [71] K.A. Connors, The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution, *Chem. Rev.* 97 (1997) 1325–1358. <https://doi.org/10.1021/cr960371r>.
- [72] F. Cramer, F.M. Henglein, Über Einschlußverbindungen, XII. Verbindungen von α -Cyclodextrin mit Gasen, *Chem. Ber.* 90 (1957) 2572–2575. <https://doi.org/10.1002/cber.19570901123>.
- [73] D. Landy, F. Tetart, E. Truant, P. Blach, S. Fourmentin, G. Surpateanu, Development of a competitive continuous variation plot for the determination of inclusion compounds stoichiometry, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 57 (2007) 409–413. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9226-7>.
- [74] M. Kikuchi, Y. Uemura, F. Hirayama, M. Otagiri, K. Uekama, Improvement of Some Pharmaceutical Properties of Carmoful by Cycrodextrin Complexation, in: *Clathrate Compd. Mol. Incl. Phenomena, Cyclodextrins*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1984: pp. 623–630. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5376-5_66.
- [75] R.L. Schiller, S.F. Lincoln, J.H. Coates, The inclusion of pyronine Y by β - and γ -cyclodextrin. A Kinetic and equilibrium study, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases.* 83 (1987) 3237. <https://doi.org/10.1039/f19878303237>.
- [76] F.M. Andersen, H. Bundgaard, Inclusion complexation of metronidazole benzoate with β -cyclodextrin and its depression of anhydrate-hydrate transition in aqueous suspensions, *Int. J. Pharm.* 19 (1984) 189–197. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(84\)90161-3](https://doi.org/10.1016/0378-5173(84)90161-3).
- [77] D.D. Chow, A.H. Karara, Characterization, dissolution and bioavailability in rats of ibuprofen- β -cyclodextrin complex system, *Int. J. Pharm.* 28 (1986) 95–101. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(86\)90232-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(86)90232-2).
- [78] A.R. Hedges, Industrial applications of cyclodextrins, *Chem. Rev.* 98 (1998) 2035–2044.
- [79] T. Loftsson, D. Duchene, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.* 329 (2007) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>.
- [80] B. Cheirsilp, J. Rakmai, Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications, *Biol. Eng. Med.* 2 (2017). <https://doi.org/10.15761/BEM.1000108>.
- [81] V.T. Karathanos, I. Mourtzinos, K. Yannakopoulou, N.K. Andrikopoulos, Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin, *Food Chem.* 101 (2007) 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.053>.
- [82] S. Bukata, Job’s method of continuous variations with ion exchange for the study of

- complexes in solution, *J. Phys. Chem.* 68 (1964) 258–260.
<https://doi.org/10.1021/j100784a007>.
- [83] P. Job, Job's method of continuous variation, *Ann. Chim.* 9 (1928).
- [84] J.S. Renny, L.L. Tomasevich, E.H. Tallmadge, D.B. Collum, Method of continuous variations: Applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52 (2013) 11998–12013.
<https://doi.org/10.1002/anie.201304157>.
- [85] X. Ge, Z. Huang, S. Tian, Y. Huang, C. Zeng, Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.072>.
- [86] S. Saha, A. Roy, K. Roy, M.N. Roy, Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–12.
<https://doi.org/10.1038/srep35764>.
- [87] H.A. Benesi, J.H. Hildebrand, A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons, *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 2703–2707.
<https://doi.org/10.1021/ja01176a030>.
- [88] M.N. Roy, S. Saha, M. Kundu, B.C. Saha, S. Barman, Exploration of inclusion complexes of neurotransmitters with β -cyclodextrin by physicochemical techniques, *Chem. Phys. Lett.* 655–656 (2016) 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2016.05.031>.
- [89] K.. C. T. Higuchi, Phase-solubility techniques, *Adv Anal Chem Instrum.* . 4 (1965) 117–212.
- [90] T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs, *Int. J. Pharm.* 302 (2005) 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.042>.
- [91] A. Lis-Cieplak, J. Sitkowski, W. Kolodziejwski, Comparative Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies of Amantadine Complexes Formed in Aqueous Solutions with Three Major Cyclodextrins, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 274–282.
<https://doi.org/10.1002/jps.23802>.
- [92] A.H. Karoyo, P. Sidhu, L.D. Wilson, P. Hazendonk, Characterization and Dynamic Properties for the Solid Inclusion Complexes of β -Cyclodextrin and Perfluorooctanoic Acid, *J. Phys. Chem. B.* 117 (2013) 8269–8282. <https://doi.org/10.1021/jp402559n>.
- [93] J.W. Keepers, T.L. James, A theoretical study of distance determinations from NMR. Two-dimensional nuclear overhauser effect spectra, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 404–426. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(84\)90257-9](https://doi.org/10.1016/0022-2364(84)90257-9).
- [94] H.J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda, NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1755–1785.
<https://doi.org/10.1021/cr970019t>.
- [95] J.A.A. Barbosa, A. Zoppi, M.A. Quevedo, P.N. de Melo, A.S.A. de Medeiros, L. Streck, A.R. de Oliveira, M.F. Fernandes-Pedrosa, M.R. Longhi, A.A. da Silva-Júnior, Triethanolamine stabilization of methotrexate- β -cyclodextrin interactions in ternary complexes, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 17077–17099.
<https://doi.org/10.3390/ijms150917077>.

- [96] C. Nicolescu, A. Aramă, C. O. R. I. N. A., Nedelcu, C.M. Monciu, Phase solubility studies of the inclusion complexes of repaglinide with β -cyclodextrin and β -cyclodextrin derivatives, *Farmacia*. 58 (2010) 620–628.
- [97] J.F. Ayala-Zavala, H. Soto-Valdez, A. González-León, E. Álvarez-Parrilla, O. Martín-Belloso, G.A. González-Aguilar, Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 60 (2008) 359–368. <https://doi.org/10.1007/s10847-007-9385-1>.
- [98] A.I. Takahashi, F.J.B. Veiga, H.G. Ferraz, A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization—Part II: X-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance, *Int J Pharm Sci Rev Res.* 12 (2012) 8.
- [99] A.I. Takahashi, F.J.B. Veiga, H.G. Ferraz, A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization—Part III: Differential scanning calorimetry and thermogravimetry, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 12 (2012) 16-20.
- [100] F. Giordano, C. Novak, J.R. Moyano, Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds, *Thermochim. Acta.* 380 (2001) 123–151. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00665-7](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00665-7).
- [101] A. Takahashi, F. Veiga, H. Ferraz, A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization—Part I: Phase solubility diagram, dissolution and scanning electron microscopy, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 12 (2012) 1–6.
- [102] S.W. Jun, M.-S. Kim, J.-S. Kim, H.J. Park, S. Lee, J.-S. Woo, S.-J. Hwang, Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66 (2007) 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.013>.
- [103] J. SZEJTLI, L. SZENTE, Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61 (2005) 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.05.006>.
- [104] D. Duchêne, D. Wouessidjewe, Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16 (1990) 2487–2499. <https://doi.org/10.3109/036390490009058543>.
- [105] D. Duchêne, C. Vaution, F. Glomot, Cyclodextrins, Their Value in Pharmaceutical Technology, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 12 (1986) 2193–2215. <https://doi.org/10.3109/03639048609042630>.
- [106] D. Duchêne, Cyclodextrins in targeting Application to nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 29–40. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00053-2).
- [107] G. Astray, C. Gonzalez-Barreiro, J.C. Mejuto, R. Rial-Otero, J. Simal-Gándara, A review on the use of cyclodextrins in foods, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 1631–1640. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.001>.
- [108] F.G. Hougeir, L. Kircik, A review of delivery systems in cosmetics, *Dermatol. Ther.* 25 (2012) 234–237. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01501.x>.
- [109] C. WU, J. FAN, Applications of cyclodextrin to water treatment, *Shuichuli Jishu.* 24 (1998) 67–70.

- [110] Sayo O. Fakayode, Mark Lowry, Kristin A. Fletcher, Xiaodong Huang, Aleeta M. Powe, Isiah M. Warner, Cyclodextrins host- guest chemistry in analytical and environmental chemistry, *Curr. Anal. Chem.* 3 (2007) 171–181.
<https://doi.org/10.2174/157341107781023811>.
- [111] H. Sui, F. Gao, X. Cao, X. Li, Remediation of PAHs and heavy metals in co-contaminated sites with cyclodextrin, *Fresenius Environ. Bull.* 22 (2013) 1452-1457.
- [112] M.-M. Sun, Y. Teng, Y.-M. Luo, Z.-G. Li, Z.-J. Jia, M.-Y. Zhang, Ex-situ remediation of PAHs contaminated site by successive methyl-beta-cyclodextrin enhanced soil washing, *Huan Jing Ke Xue= Huanjing Kexue.* 34 (2013) 2428–35.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23947066>.
- [113] Y. Wang, S. Zhou, J. Xia, J. Xue, J. Xu, J. Zhu, Trapping and degradation of volatile nitrosamines on cyclodextrin and zeolites, *Microporous Mesoporous Mater.* 75 (2004) 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2004.07.025>.
- [114] D. Churchill, J.C.F. Cheung, Y.S. Park, V.H. Smith, G. VanLoon, E. Buncel, Complexation of diazinon, an organophosphorus pesticide, with α -, β -, and γ -cyclodextrin - NMR and computational studies, *Can. J. Chem.* 84 (2006) 702–708.
<https://doi.org/10.1139/v06-053>.
- [115] C.J. Cheng, G.T. Tietjen, J.K. Saucier-Sawyer, W.M. Saltzman, Erratum: A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 365–365. <https://doi.org/10.1038/nrd4633>.
- [116] J.B. Christoforidis, S. Chang, A. Jiang, J. Wang, C.M. Cebulla, Intravitreal Devices for the Treatment of Vitreous Inflammation, *Mediators Inflamm.* 2012 (2012) 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2012/126463>.
- [117] B. Stella, A. Marengo, S. Arpicco, NANOPARTICLES: AN OVERVIEW OF THE PREPARATION METHODS FROM PREFORMED POLYMERS, *Ist. Lomb. - Accad. Di Sci. e Lett. - Incontr. Di Stud.* (2017).
<https://doi.org/10.4081/incontri.2017.266>.
- [118] R. Gurny, N.A. Peppas, D.D. Harrington, G.S. Banker, Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 7 (1981) 1–25. <https://doi.org/10.3109/03639048109055684>.
- [119] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J. Control. Release.* 70 (2001) 1–20.
[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4).
- [120] M. Zambaux, Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method, *J. Control. Release.* 50 (1998) 31–40. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00106-5).
- [121] É. Dellacherie, R. Gref, P. Quellec, Les nanosphères "furtives" comme nouvelles formes galéniques injectables : espoirs et réalités, *Médecine/Sciences.* 17 (2001) 619.
<https://doi.org/10.4267/10608/1975>.
- [122] M. Trotta, F. Debernardi, O. Caputo, Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique, *Int. J. Pharm.* 257 (2003) 153–160.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00135-2).

- [123] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, Pseudolatex preparation using a novel emulsion–diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation, *Int. J. Pharm.* 188 (1999) 155–164. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00216-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00216-1).
- [124] D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi, E. Allémann, E. Doelker, Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(d,l-lactic acid) nanoparticles by an emulsification–diffusion technique, *Int. J. Pharm.* 143 (1996) 133–141. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04697-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04697-2).
- [125] R. TIRUWA, A review on nanoparticles – preparation and evaluation parameters, *Indian J. Pharm. Biol. Res.* 4 (2016) 27–31. <https://doi.org/10.30750/ijpbr.4.2.4>.
- [126] P. Legrand, J. Benoit, S. Briançon, E. Fattal, H. Fessi, C. Passirani, P. Legrand, J. Benoit, S. Briançon, E. Fattal, H. Fessi, Sphéroïdes et formes vectorisées, (2009).
- [127] H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.* 55 (1989) 1–4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0).
- [128] E. Allémann, R. Gurny, E. Doelker, Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size, *Int. J. Pharm.* 87 (1992) 247–253. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90249-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90249-2).
- [129] M. Rajaonarivony, C. Vauthier, G. Couarraze, F. Puisieux, P. Couvreur, Development of a New Drug Carrier Made from Alginate, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 912–917. <https://doi.org/10.1002/jps.2600820909>.
- [130] C. Vauthier, K. Bouchemal, Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles, *Pharm. Res.* 26 (2009) 1025–1058. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>.
- [131] S. Naskar, S. Sharma, K. Kuotsu, Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 49 (2019) 66–81. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.022>.
- [132] M. Prabakaran, Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 1313–1322. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.052>.
- [133] G A F Roberts, Chitin chemistry, London, 1992.
- [134] K.M. Vårum, M.H. Ottøy, O. Smidsrød, Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation, *Carbohydr. Polym.* 25 (1994) 65–70. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90140-6](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90140-6).
- [135] C. Schatz, C. Viton, T. Delair, C. Pichot, A. Domard, Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 641–648. <https://doi.org/10.1021/bm025724c>.
- [136] Y.-W. Cho, Y.-N. Cho, S.-H. Chung, G. Yoo, S.-W. Ko, Water-soluble chitin as a wound healing accelerator, *Biomaterials.* 20 (1999) 2139–2145. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00116-7).
- [137] X. Jiang, L. Chen, W. Zhong, A new linear potentiometric titration method for the

- determination of deacetylation degree of chitosan, *Carbohydr. Polym.* 54 (2003) 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.05.004>.
- [138] A. Domard, M. Domard, Chitosan: Structure–Properties Relationship and Biomedical Applications, in: *Polym. Biomater.*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc, 2002: pp. 187–212.
- [139] J. Kumirska, M. Czerwicka, Z. Kaczyński, A. Bychowska, K. Brzozowski, J. Thöming, P. Stepnowski, Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan, *Mar. Drugs*. 8 (2010) 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>.
- [140] A. Baxter, M. Dillon, K.D. Anthony Taylor, G.A.F. Roberts, Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 14 (1992) 166–169. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(05\)80007-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(05)80007-8).
- [141] Z.M. dos Santos, A.L.P.F. Caroni, M.R. Pereira, D.R. da Silva, J.L.C. Fonseca, Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis, *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 2591–2595. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.030>.
- [142] R.A.A. Muzzarelli, R. Rocchetti, Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry, *Carbohydr. Polym.* 5 (1985) 461–472. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(85\)90005-0](https://doi.org/10.1016/0144-8617(85)90005-0).
- [143] D. Liu, Y. Wei, P. Yao, L. Jiang, Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 782–785. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.01.008>.
- [144] L. Pérez-Álvarez, L. Ruiz-Rubio, J.L. Vilas-Vilela, Determining the Deacetylation Degree of Chitosan: Opportunities To Learn Instrumental Techniques, *J. Chem. Educ.* 95 (2018) 1022–1028. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00902>.
- [145] L. Raymond, F.G. Morin, R.H. Marchessault, Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR, *Carbohydr. Res.* 246 (1993) 331–336. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)84044-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)84044-7).
- [146] A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima, Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy, *Polym. Bull.* 26 (1991) 87–94. <https://doi.org/10.1007/BF00299352>.
- [147] S. Kunjachan, S. Jose, Understanding the mechanism of ionic gelation for synthesis of chitosan nanoparticles using qualitative techniques, *Asian J. Pharm.* 4 (2010) 148. <https://doi.org/10.4103/0973-8398.68467>.
- [148] D.R. Bhumkar, V.B. Pokharkar, Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note, *AAPS PharmSciTech.* 7 (2006) E138–E143. <https://doi.org/10.1208/pt070250>.
- [149] D.J. McHugh, Production, properties and uses of alginates, in: *Prod. Util. Prod. from Commer. Seaweeds*, Food & Agriculture Org, ROME, 1987.
- [150] A. Haug, B. Larsen, O. Smidsrød, O. Smidsrød, G. Eriksson, R. Blinc, S. Paušak, L. Ehrenberg, J. Dumanović, Studies on the Sequence of Uronic Acid Residues in Alginic Acid., *Acta Chem. Scand.* 21 (1967) 691–704. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.21-0691>.

- [151] A. Haug, B. Larsen, O. Smidsrød, Uronic acid sequence in alginate from different sources, *Carbohydr. Res.* 32 (1974) 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82100-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82100-X).
- [152] K. CLARE, ALGIN, in: *Ind. Gums*, Elsevier, 1993: pp. 105–143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092654-4.50010-3>.
- [153] A. Haug, O. Smidsrød, B. Högdahl, H.A. Øye, S.E. Rasmussen, E. Sunde, N.A. Sørensen, Selectivity of Some Anionic Polymers for Divalent Metal Ions., *Acta Chem. Scand.* 24 (1970) 843–854. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.24-0843>.
- [154] I. Braccini, R.P. Grasso, S. Pérez, Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation, *Carbohydr. Res.* 317 (1999) 119–130. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00062-2).
- [155] G.T. Grant, E.R. Morris, D.A. Rees, P.J.C. Smith, D. Thom, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model, *FEBS Lett.* 32 (1973) 195–198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7).
- [156] E.R. Morris, D.A. Rees, D. Thom, J. Boyd, Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation, *Carbohydr. Res.* 66 (1978) 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83247-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83247-4).
- [157] Y. Fang, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, K. Nishinari, T. Funami, P.A. Williams, L. Li, Multiple Steps and Critical Behaviors of the Binding of Calcium to Alginate, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 2456–2462. <https://doi.org/10.1021/jp0689870>.
- [158] S. Boddohi, N. Moore, P.A. Johnson, M.J. Kipper, Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complex Nanoparticles from Chitosan, Heparin, and Hyaluronan, *Biomacromolecules.* 10 (2009) 1402–1409. <https://doi.org/10.1021/bm801513e>.
- [159] T. Nalini, S.K. Basha, A.M. Mohamed Sadiq, V.S. Kumari, K. Kaviyarasu, Development and characterization of alginate / chitosan nanoparticulate system for hydrophobic drug encapsulation, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 52 (2019) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.002>.
- [160] A. Zielińska, F. Carreiró, A.M. Oliveira, A. Neves, B. Pires, D.N. Venkatesh, A. Durazzo, M. Lucarini, P. Eder, A.M. Silva, A. Santini, E.B. Souto, Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology, *Molecules.* 25 (2020) 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>.
- [161] J.T. Orasugh, S.K. Ghosh, D. Chattopadhyay, Nanofiber-reinforced biocomposites, in: *Fiber-Reinforced Nanocomposites Fundam. Appl.*, Elsevier, 2020: pp. 199–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819904-6.00010-4>.
- [162] C. Défarge, O.M. Issa, J. Trichet, Apports du cryo-microscope électronique à balayage à émission de champ à l'étude des matières organiques et des relations organo-minérales naturelles. Application aux croûtes microbiotiques des sols, *Comptes Rendus l'Académie Des Sci. - Ser. IIA - Earth Planet. Sci.* 328 (1999) 591–597. [https://doi.org/10.1016/S1251-8050\(99\)80155-4](https://doi.org/10.1016/S1251-8050(99)80155-4).
- [163] R. Pecora, ed., *Dynamic Light Scattering*, Springer US, Boston, MA, 1985. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2389-1>.

- [164] S.L. Pal, U. Jana, P.K. Manna, G.P. Mohanta, R. Manavalan, Nanoparticle: An overview of preparation and characterization, *J. Appl. Pharm. Sci.* 1 (2011) 228–234.
- [165] S. Bhatia, Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications, in: *Nat. Polym. Drug Deliv. Syst.*, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 33–93. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3_2.
- [166] C.I.C. Crucho, M.T. Barros, Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods, *Mater. Sci. Eng. C.* 80 (2017) 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>.
- [167] H. Gharanjig, K. Gharanjig, M. Hosseinneshad, S.M. Jafari, Differential scanning calorimetry (DSC) of nanoencapsulated food ingredients, in: *Charact. Nanoencapsulated Food Ingredients*, Elsevier, 2020: pp. 295–346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815667-4.00010-9>.
- [168] B. Dekyndt, La libération modifiée de principes actifs , développement de deux approches, *Droit et Santé - Lille II*, 2016.
- [169] G. Yadav, M. Bansal, N. Thakur, Sargam, P. Khare, Multilayer tablets and their drug release kinetic models for oral controlled drug delivery system, *Middle East J. Sci. Res.* 16 (2013) 782–795. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.16.06.75176>.
- [170] N.A. Peppas, J.J. Sahlin, A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 169–172. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2).
- [171] M.. Kopcha, N.G.. Lordi, K.J. Tojo, Evaluation of release from selected thermosoftening vehicles, *J. Pharm. Pharmacol.* (1991).
- [172] C. Vauthier, G. Couarraze, Development of a New Drug Carrier Made from Alginate, (1993) 2–7.
- [173] B. Singh, R.A. Sharma, Anti-inflammatory and antimicrobial properties of pyrroloquinazoline alkaloids from *Adhatoda vasica* Nees, *Phytomedicine.* 20 (2013) 441–445. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.12.015>.
- [174] B. Kar, R.S. Kumar, I. Karmakar, N. Dola, A. Bala, U.K. Mazumder, P.K. Hadar, Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2 (2012) S976–S980. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60346-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60346-3).
- [175] K. Karthik, B.R.K. P, V.P. R, S.K. K, R.S.B. Rathore, EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *CANTHIUM PARVIFLORUM* BY IN-VITRO METHOD, 5674 (2013) 2320–2322.
- [176] T. Gomathi, P.N. Sudha, J.A.K. Florence, J. Venkatesan, A. Sukumaran, Fabrication of letrozole formulation using chitosan nanoparticles through ionic gelation method, *Int. J. Biol. Macromol.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.147>.
- [177] P. Vanhaecke, G. Persoone, C. Claus, P. Sorgeloos, Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 5 (1981) 382–387. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(81\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0147-6513(81)90012-9).

- [178] M. Pelka, C. Danzl, W. Distler, A. Petschelt, A new screening test for toxicity testing of dental materials, *J. Dent.* 28 (2000) 341–345. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(00\)00007-5](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(00)00007-5).
- [179] J.L. Carballo, Z.L. Hernández-Inda, P. Pérez, M.D. García-Grávalos, A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products, *BMC Biotechnol.* 2 (2002).
- [180] D. Solairaj, P. Rameshthangam, P. Muthukumar, J. Wilson, Studies on electrochemical glucose sensing, antimicrobial activity and cytotoxicity of fabricated copper nanoparticle immobilized chitin nanostructure, *Int. J. Biol. Macromol.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.147>.
- [181] M. MOUSSEUX, Test de toxicité sur larves d'Artemia salina: entretien d'un élevage de balanes, 1995.
- [182] M.J. Moshi, J.C. Cosam, Z.H. Mbwambo, M. Kapingu, M.H.H. Nkunya, Testing Beyond Ethnomedical Claims: Brine Shrimp Lethality of Some Tanzanian Plants, *Pharm. Biol.* 42 (2004) 547–551. <https://doi.org/10.3109/13880200490897920>.
- [183] M. Güllüce, A. Adigüzel, H. Ögütçü, M. Şengül, I. Karaman, F. Şahin, Antimicrobial Effects of *Quercus ilex* L. Extract, *Phyther. Res.* 18 (2004) 208–211. <https://doi.org/10.1002/ptr.1419>.
- [184] M. Güllüce, M. Sökmen, F. Şahin, A. Sökmen, A. Adigüzel, H. Özer, Biological activities of the essential oil and methanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L) Druce ssp *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey, *J. Sci. Food Agric.* 84 (2004) 735–741. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1728>.
- [185] P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Polym. Sci.* 63 (1997) 125–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4).
- [186] Y.J. Ye, Y. Wang, K.Y. Lou, Y.Z. Chen, R. Chen, F. Gao, The preparation, characterization, and pharmacokinetic studies of chitosan nanoparticles loaded with paclitaxel/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complexes, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 4309–4319. <https://doi.org/10.2147/IJN.S83508>.
- [187] M. Malhotra, A. Kulamarva, S. Sebak, A. Paul, J. Bhatena, M. Mirzaei, S. Prakash, Ultrafine chitosan nanoparticles as an efficient nucleic acid delivery system targeting neuronal cells ultrafine nanoparticles siRNA delivery system, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35 (2009) 719–726. <https://doi.org/10.1080/03639040802526789>.
- [188] B. Smitha, S. Sridhar, A.A. Khan, EUROPEAN POLYMER Chitosan – sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes, 41 (2005) 1859–1866. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.018>.
- [189] K. Baysal, A.Z. Aroguz, Z. Adiguzel, B.M. Baysal, Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes, *Int. J. Biol. Macromol.* 59 (2013) 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073>.
- [190] D. Prakash, U.T. Sivagnanam, S. Gupta, H.S. Rathore, T. Senthilvelan, R. Vasantharaja, L.S. Abraham, D. Prakash, U.T. Sivagnanam, S. Gupta, Fabrication and

- characterization of chitosan film impregnated ciprofloxacin drug: A comparative study, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18 (2019) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101078>.
- [191] F.S. Pereira, D.L. Da Silva Agostini, A.E. Job, E.R.P. González, Thermal studies of chitin-chitosan derivatives, *J. Therm. Anal. Calorim.* 114 (2013) 321–327. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2835-z>.
- [192] Y. Wang, A. Pitto-barry, A. Habtemariam, I. Romero-canelon, P.J. Sadler, N.P.E. Barry, Nanoparticles of chitosan conjugated to organo- ruthenium complexes, 3 (2016) 1058–1064. <https://doi.org/10.1039/c6qi00115g>.
- [193] S. Ramukutty, E. Ramachandran, Growth , spectral and thermal studies of ibuprofen crystals, 38 (2012) 31–38. <https://doi.org/10.1002/crat.201100394>.
- [194] B. Sarmento, Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies, 66 (2006) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.008>.
- [195] W. Voo, B. Lee, A. Idris, A. Islam, D.B. Tey, RSC Advances Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile †, *RSC Adv.* 5 (2015) 36687–36695. <https://doi.org/10.1039/C5RA03862F>.
- [196] K. Bihaskar, M.D. Dhanaraju, M. Saravanan, K. Bhaskar, G. Srinivasa Rao, M.D. Dhanaraju, Ibuprofen-loaded ethylcellulose/polystyrene microspheres: An approach to get prolonged drug release with reduced burst effect and low ethylcellulose content, *J. Microencapsul.* 20 (2003) 289–302. <https://doi.org/10.1080/0265204031000093087>.
- [197] S.K. Bajpai, S. Sharma, Investigation of swelling / degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions, *React. Funct. Polym.* 59 (2004) 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002>.
- [198] B. Meyer, N. Ferrigni, J. Putnam, L. Jacobsen, D. Nichols, J. McLaughlin, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta Med.* 45 (1982) 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.
- [199] H.M. Ameen, S. Kunsági-Máté, B. Bognár, L. Szente, M. Poór, B. Lemli, Thermodynamic characterization of the interaction between the antimicrobial drug sulfamethazine and two selected cyclodextrins, *Molecules.* 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24244565>.
- [200] M. Wszelaka-Rylik, Thermodynamics of β -cyclodextrin–ephedrine inclusion complex formation and covering of nanometric calcite with these substances, *J. Therm. Anal. Calorim.* 127 (2017) 1825–1834. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5467-x>.
- [201] M. Komiyama, M.L. Bender, Thermodynamic studies of the cyclodextrin-accelerated cleavage of phenyl esters, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 4576–4579. <https://doi.org/10.1021/ja00482a042>.
- [202] L. Liu, Q. Guo, The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins, *J. Incl. Phenom.* 42 (2002) 1–14.
- [203] J.R. Moyano, M.J. Arias-Blanco, J.M. Gines, A.M. Rabasco, J.I. Pérez-Martínez, M. Mor, F. Giordano, Nuclear Magnetic Resonance Investigations of the Inclusion

- Complexation of Gliclazide with β -Cyclodextrin, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 72–75.
<https://doi.org/10.1021/js960212n>.
- [204] D. Psimadas, P. Georgoulas, V. Valotassiou, G. Loudos, Molecular Nanomedicine Towards Cancer: 111In-Labeled Nanoparticles, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 2271–2280.
<https://doi.org/10.1002/jps.23146>.
- [205] M. Kfoury, Préparation , caractérisation physicochimique et évaluation des propriétés biologiques de complexes d' inclusion à base de cyclodextrines : applications à des principes actifs de type phénylpropanoïdes, Université du Littoral Côte d'Opale, 2016.
- [206] R. Singh, S. Maity, B. Sa, Effect of ionic crosslink on the release of metronidazole from partially carboxymethylated guar gum tablet, *Carbohydr. Polym.* 106 (2014) 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.033>.
- [207] R.D. Herculano, A.A. Alencar De Queiroz, A. Kinoshita, O.N. Oliveira, C.F.O. Graeff, On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes, *Mater. Sci. Eng. C.* 31 (2011) 272–275. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.09.007>.
- [208] R. Iacovino, F. Rapuano, J.V. Caso, A. Russo, M. Lavorgna, C. Russo, M. Isidori, L. Russo, G. Malgieri, C. Isernia, β -cyclodextrin inclusion complex to improve physicochemical properties of pipemidic acid: Characterization and bioactivity evaluation, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 13022–13041.
<https://doi.org/10.3390/ijms140713022>.
- [209] X. Ge, J. He, F. Qi, Y. Yang, Z. Huang, R. Lu, L. Huang, Inclusion complexation of chloropropham with β -cyclodextrin: Preparation, characterization and molecular modeling, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 81 (2011) 397–403.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.06.028>.
- [210] S. Mosivand, I. Kazeminezhad, Functionalization and characterization of electrocrystallized iron oxide nanoparticles in the presence of β -cyclodextrin, *CrystEngComm.* 18 (2016) 417–426. <https://doi.org/10.1039/c5ce01789k>.
- [211] B. Rajbanshi, S. Saha, K. Das, B.K. Barman, S. Sengupta, A. Bhattacharjee, M.N. Roy, Study to Probe Subsistence of Host-Guest Inclusion Complexes of α and β -Cyclodextrins with Biologically Potent Drugs for Safety Regulatory Discharge, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31373-x>.
- [212] C. Yuan, B. Liu, H. Liu, Characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrins with different substitution patterns via FTIR, GC-MS, and TG-DTA, *Carbohydr. Polym.* 118 (2015) 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.070>.
- [213] Q. Geng, T. Li, X. Wang, W. Chu, M. Cai, J. Xie, H. Ni, The mechanism of bensulfuron-methyl complexation with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and effect on soil adsorption and bio-activity, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-38234-7>.
- [214] C. Brough, R.O. Williams, Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 157–166.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.061>.
- [215] G. Van Den Mooter, The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate, *Drug Discov. Today Technol.* 9 (2012)

- e79–e85. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.10.002>.
- [216] F. Hirayama, K. Uekama, Cyclodextrin-based controlled drug release system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 125–141. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00058-1).
- [217] K. Dua, K. Pabreja, M. V. Ramana, V. Lather, Dissolution behavior of β -cyclodextrin molecular inclusion complexes of aceclofenac, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3 (2011) 417–425. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.84457>.
- [218] A.F. Martins, D.M. de Oliveira, A.G.B. Pereira, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.032>.
- [219] M.R. de Moura, F.A. Aouada, R.J. Avena-Bustillos, T.H. McHugh, J.M. Krochta, L.H.C. Mattoso, Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles, *J. Food Eng.* 92 (2009) 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.015>.
- [220] S. Rodrigues, A.M.R. Da Costa, A. Grenha, Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.010>.
- [221] J. Nie, Z. Wang, K. Zhang, Q. Hu, Biomimetic multi-layered hollow chitosan–tripolyphosphate rod with excellent mechanical performance, *RSC Adv.* 5 (2015) 37346–37352. <https://doi.org/10.1039/C5RA00936G>.
- [222] M. Sharma, S. Yadav, N. Ganesh, M. Mohan, S. Shalini, Biofabrication and characterization of flavonoid - loaded Ag , Au , Au – Ag bimetallic nanoparticles using seed extract of the plant *Madhuca longifolia* for the enhancement in wound healing bio - efficacy, *Prog. Biomater.* 8 (2019) 51–63. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-0110-0>.
- [223] S.U. Rawal, M.M. Patel, Lipid nanoparticulate systems, in: *Lipid Nanocarriers Drug Target.*, Elsevier, 2018: pp. 49–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813687-4.00002-5>.
- [224] E. Bahreini, K. Aghaiypour, R. Abbasalipourkabir, A.R. Mokarram, M.T. Goodarzi, M. Saidijam, Preparation and nanoencapsulation of l-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 1–13. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-340>.

Liste des annexes

ANNEXE A

Détermination du degré de désacétylation du CS par la spectroscopie ^1H RMN

Le spectre ^1H RMN a été enregistré par un appareil Bruker Avance spectrometer 400 MHz à 60 °C. Une masse de 5 mg du CS a été dissoute dans un mélange d'eau deutérée (D_2O) et de l'acide chlorhydrique deutéré (DCI) (volume de D_2O =1940 μL / volume de DCI=60 μL). La solution préparée est passée 30 min dans un bain à ultrason à température ambiante, filtrée (0,22 μm) et transférée dans un tube RMN de 5 mm.

Le DD % a été déterminé à partir de l'équation 3.1, en se basant sur l'intégrale du pic de résonance correspondant aux protons du groupe acétyle H-AC et l'intégrale correspondant aux protons H2-H6

$$\text{DD \%} = \left(1 - \left(\frac{1}{3} \text{HAC} / \frac{1}{6} \text{H}_{2-6} \right) \right) \times 100 \quad (3.1)$$

Le spectre ^1H RMN du CS est présenté dans la Figure A.1. Le DD % calculé est de 83,63% et il est dans l'intervalle mentionné par le producteur.

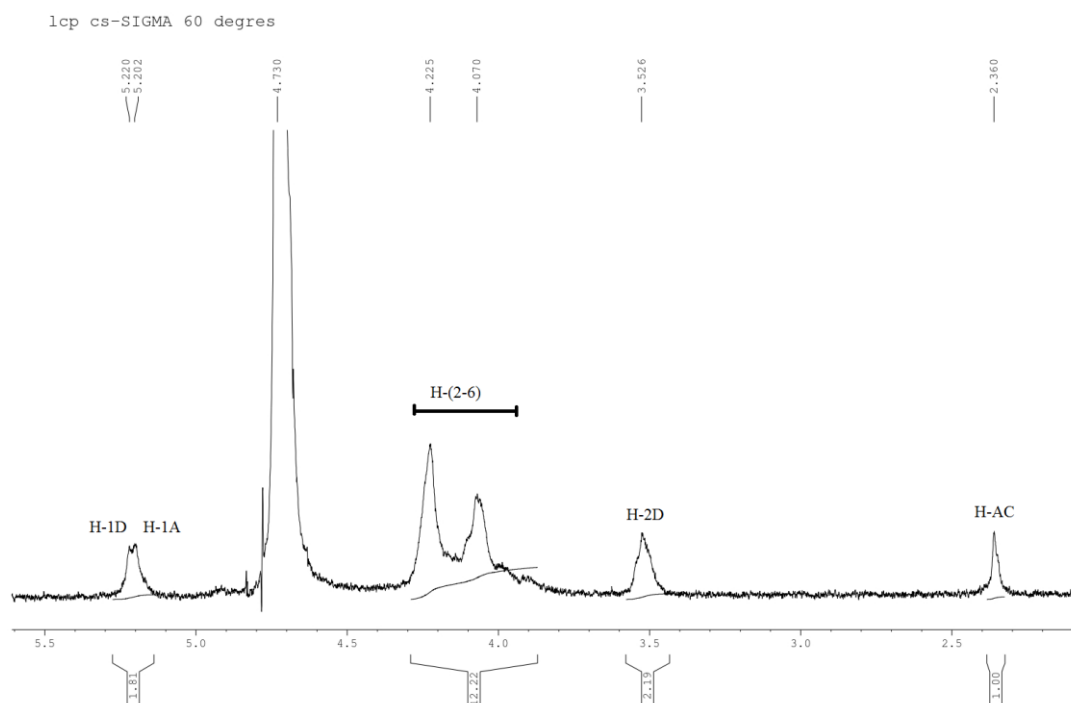


Figure A.1 : Spectre ^1H RMN du CS dans $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ à 60 °C.

ANNEXE B

Préparation des milieux de dissolution FGS, FIS et PBS

Les milieux de dissolution utilisés pour les études de dissolution in vitro ont été préparés selon le protocole suivant :

Fluide gastrique simulé sans enzyme (FGS) pH =1,2 : Dissoudre 2g de NaCl, ajouter 7 mL de HCl 37% et compléter à 1000 mL avec de l'eau ultra pure.

Fluide intestinal simulé sans enzyme (FIS) pH =6,8 : dans un volume de 1000 mL d'eau ultra pure ajouter 11,45 g de KH_2PO_4 et 28,2 de Na_2HPO_4 .

Phosphate-buffered saline (PBS) pH =7,4 : dans un volume de 800 mL d'eau ultra pure ajouter 8 g de NaCl, 1,4 g de Na_2HPO_4 , 200 mg de KH_2PO_4 et 245 mg de KCl.

ANNEXE C

Cycle de vie d'*Artémia salina*

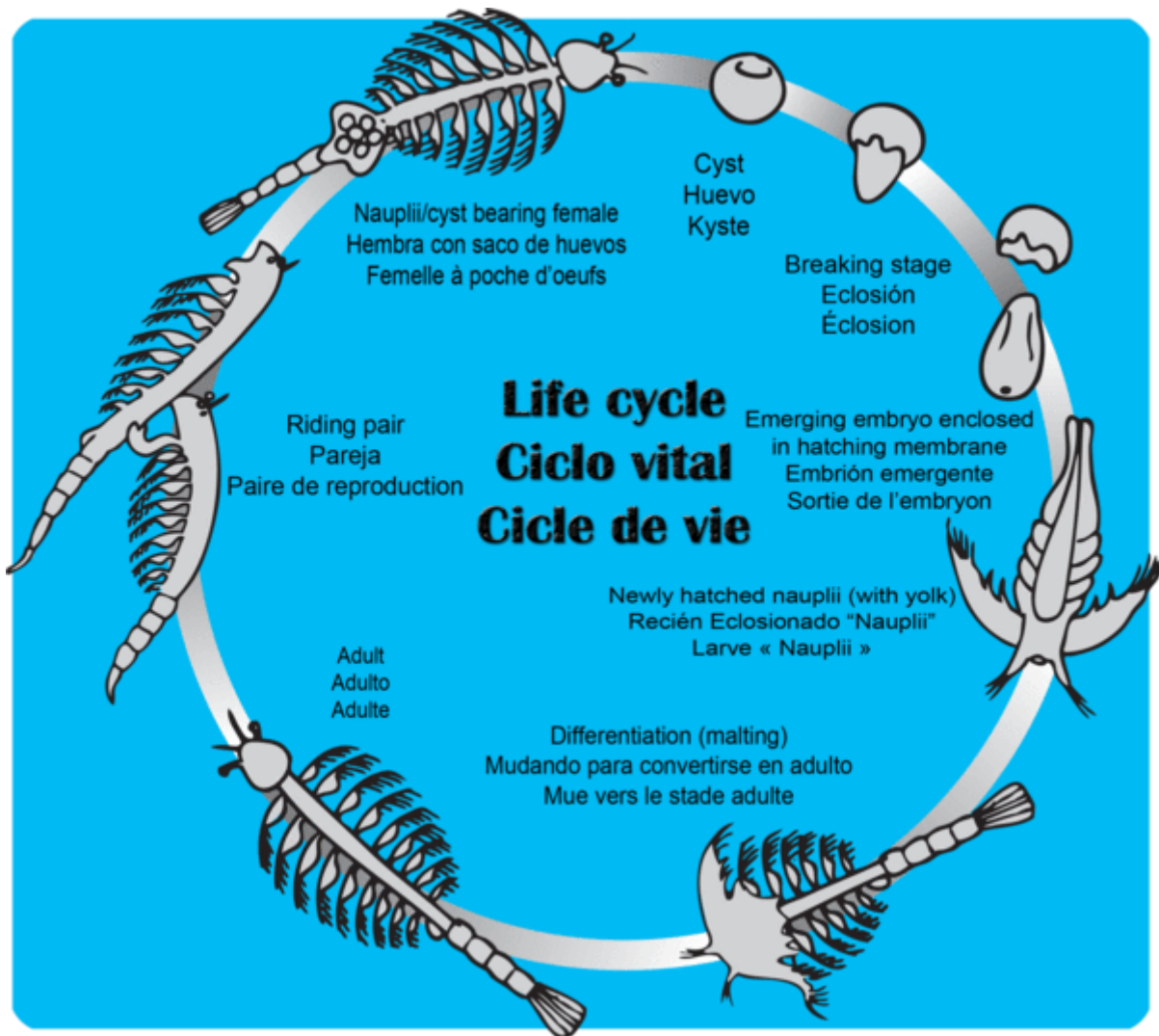


Figure C.1 : Cycle de vie d'*Artémia salina*.



Evaluation of Anti-inflammatory Activity and In Vitro Drug Release of Ibuprofen-Loaded Nanoparticles Based on Sodium Alginate and Chitosan

Sarra Bensouiki¹ · Fouzia Belaib¹ · Michèle Sindt² · Pierre Magri² · Sandrine Rup-Jacques² · Chawki Bensouici³ · Abdeslam-Hassen Meniai¹

Received: 31 January 2020 / Accepted: 14 June 2020
© King Fahd University of Petroleum & Minerals 2020

Abstract

Iontropic gelation followed by polyelectrolyte complexation was used for the synthesis of nanoparticles based on sodium alginate (NaAL) and chitosan (CS) for encapsulation of ibuprofen (IBP). Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, field-emission scanning electron microscopes, percentage of encapsulation efficiency and loading capacity have been used to confirm the synthesis and encapsulation of IBP. The results obtained show that they have a size of around 100 nm. In vitro drug release and evaluation of anti-inflammatory activity in different media indicate that the nanoparticles are pH-sensitive and permit the protection of the drug against total dissolution in the gastric medium, control its release, and it increases the solubility and biological activity of IBP. The analytical data of the in vitro drug release in the simulated gastric fluid (SGF), simulated interstitial fluid (SIF) and phosphate buffered saline (PBS) were fitted to the different kinetic models (zero-order, first-order, Higuchi, Korsmeyer–Peppas and Kopcha), and the results indicate that IBP is released by diffusion-controlled in SIF and PBS, and by erosion-controlled in the SGF. The toxicity of nanoparticles was tested against *Artemia salina* that displayed non-toxicity effects. In vitro biodegradation by lysozyme and all the results obtained indicated that a NaAL/CS nanoparticles are a promising system for IBP release that can achieve pseudo-zero-order kinetics.

Keywords Sodium alginate · Chitosan · Ibuprofen · Anti-inflammatory activity · Iontropic gelation

1 Introduction

Ibuprofen (IBP) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) classified in category II “highly permeable but poor water solubility” according to biopharmaceutics classification system (BCS) which classifies drugs according to solubility and permeability. This low solubility limits its dissolution rate and hence its oral bioavailability. Short half-life plasma (1–3 h) of IBP leads to multiple administrations that

can cause real problems such as gastric irritation, dyspepsia and even gastric bleeding [1]. To enhance the biological activity of IBP and increase its half-life time, its introduction into a nano-polymeric system is recommended. According to the Noyes–Whitney, the nanoencapsulation decreases the particle size and therefore increases the surface area which contributes to the enhancement of drug solubility [2]. Polymeric nanoparticles (PNPs) based on polysaccharide are considered as a relevant tool for the drug delivery system compared to the other nanoparticles due to their biocompatibility, biodegradability, non-toxicity and small size (in the range of 10–1000 nm) [3, 4]. PNPs can be synthesized by several techniques such as nanoprecipitation [5], solvent evaporation [6], salting out procedure [7] and ionic gelation [8].

Ionic gelation is a very simple technique without organic solvents compared to the other techniques, and nanoparticles can be formed from a very dilute solution of charged polysaccharides when ionically cross-linked with oppositely charged ions and permit the encapsulation of the drug [9],

✉ Fouzia Belaib
fouzia.belaib@univ-constantine3.dz

¹ Laboratory of Environmental Process Engineering, Faculty of Process Engineering, University Salah Boubnider – Constantine 3, 25000 Constantine, Algeria

² Laboratoire de Chimie et Physique: Approche Multi-échelles des Milieux Complexes, Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, Metz 57070, France

³ Biotechnology Research Center, P.B E73/UV N° 03 Ali Mendjeli New Town, 25000 Constantine, Algeria



among the most used biopolymer for this method is sodium alginate (NaAL).

NaAL is a mucoadhesive, biodegradable and biocompatible polymer with low immunogenicity, which has attracted the attention of researchers for its use in the synthesis of drug delivery systems and especially nanoparticles. NaAL is an anionic biopolymer with a linear chain composed of β -(1 \rightarrow 4)-linked D-Mannuronic acid (M) and α -(1 \rightarrow 4)-linked L-Guluronic (G) residues [10], due to the presence of the G residues arranged in side-by-side blocks which can be cross-linked with divalent cations such as Ca^{2+} leading to the pre-gel phase [11, 12]. The addition of a polycationic solution to pre-gel contributes to the stabilization of intermolecular complexes and the formation of nanoparticles by polyelectrolyte complexation technique. The most suitable polymer for this mission is chitosan (CS) because it is a naturally occurring polymer and it has almost the same properties as NaAL such as biodegradability, non-toxicity, mucoadhesive and biocompatibility, which has the consequence of not altering the system [13, 14].

CS is the product of partial acetylation under alkaline conditions of chitin, a biopolymer extracted from the shell of crustaceans and cell walls of fungi. CS is a linear hydrophilic copolymer composed of β -(1 \rightarrow 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose and 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose. It is widely used in several fields such as wastewater treatment, food processing, cosmetics, pharmaceutical industry and agriculture [15, 16].

The objective of this study is to develop an oral PNPs based on NaAL and CS by ionotropic gelation followed by polyelectrolyte complexation for the encapsulation of IBP, and this technique permits the synthesis of nanoparticles under gentle conditions without the use of organic solvents. The cross-linking of NaAL by Ca^{2+} coated with CS can entrap IBP, increase its solubility and prolonged drug release and therefore avoid the repeat administrations and minimize side effects, due to the smart behavior of both polymers and their mucoadhesive properties. The efficiency of synthesis, infrared spectrum, thermal behavior and the morphology of nanoparticles, in vitro drug release, biodegradability, cytotoxicity and evaluation of the anti-inflammatory activity of nanoparticles in different media were also studied.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

The sodium alginate (lot number: MKBZ5563V) and the chitosan medium molecular weight (190,000–310,000 Da) (lot number: MKBF1336V) were provided by (Sigma-Aldrich, USA). Ibuprofen was a kind gift from Biogalenic (L.I.C), calcium chloride (Sigma-Aldrich, USA), bovine

serum albumin (VWR, lot: 64-1219), trizma hydrochloride (Fluka, lot: BCBD1011V), lysozyme from chicken egg white (Sigma-Aldrich, lot number: BCBJ2814). All other chemicals were of analytical grade. All products were used without further purification.

2.2 Determination of Degree of Deacetylation (DD%) of CS by ^1H NMR Spectroscopy

The ^1H NMR spectrum of CS was obtained with Bruker Avance 400 MHz at 60 °C by dissolving 5 mg of CS in a mixture of $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ ($V_{\text{D}_2\text{O}} = 1940 \mu\text{L}/V_{\text{DCI}} = 60 \mu\text{L}$), the solution was sonicated for 30 min and filtered through a 0.2- μm syringe filter, and 800 μL of the solution was poured into a tube NMR of 5 mm.

2.3 Preparation of Ibuprofen Polymeric Nanoparticles (IBP-PNPs)

The IBP-PNPs were prepared by ionotropic gelation followed by polyelectrolyte complexation technique [8]. 0.08% (w/v) of CS was dissolved in 1% acetic acid; the pH of the obtained solution was modified to 5.5 using 0.2 M NaOH. 0.075 g of NaAL was dissolved in 20 mL of Milli-Q water, and the pH was modified to 5.3 using HCl 37%. 36 mM of CaCl_2 solution was also prepared by dissolving it in Milli-Q water. 100 mg of IBP was dissolved in a small volume of ethanol, and then, it was added to the NaAL solution and maintained under stirring until obtaining a homogeneous suspension; the CaCl_2 solution was added dropwise through a needle syringe into the NaAL containing IBP under a high-speed homogenization (11,000 rpm) to entrap the IBP in the matrix gel, and 10 mL of CS solution was added slowly into the alginate pre-gel and stirred for an additional 3 h under the same speed to form a polyelectrolyte complex. The nanoparticles were recovered by centrifugation at 15,000 rpm for 40 min at 4 °C by (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Fisher Scientific, Inc.); the obtained pellet was dispersed in Milli-Q water and freeze-dried using (Alpha 1–4 LD plus, Martin Christ) for 15 h. The lyophilized powder was stored for further study.

2.4 Encapsulation Efficiency (EE%) and Loading Capacity (LC%)

To determine the (EE%) and (LC%), 100 mg of IBP-PNPs was dispersed in 15 mL of distilled water, the solution was put in an ultrasonic bath for 10 min followed by centrifugation at 15,000 rpm for 40 min at 4 °C, the absorbance of the supernatant was measured at 265 nm using distilled water as a blank, and the concentration of free non-entrapped IBP was calculated from the calibration curve. Experiments are



done in triplicate, and the mean of EE% and LC% were calculated from Eqs. (1) and (2):

$$EE\% = \left(\frac{\text{Total drug added} - \text{Free non entrapped drug}}{\text{Total drug added}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$LC\% = (\text{Entrapped Drug} / \text{Nanoparticles weight}) \times 100 \quad (2)$$

2.5 Characterization of IBP-PNPs

2.5.1 Fourier Transform Infrared (FT-IR) Analysis

In order to study the different interactions between drug and polymers, the NaAL, CS, IBP and IBP-PNPs were scanned over a range of 500–4000 cm^{-1} by FT-IR spectrophotometer (FTIR-4100, Jasco).

2.5.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC) Analysis

The thermograms of NaAL, CS, IBP and IBP-PNPs were obtained by differential scanning calorimetry (DSC 131 Evo, Setaram instrumentation), and a quantity of each product was sealed in a hermetic aluminum pan. All samples were subjected to a heating rate of 10 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ in a temperature range from 20 to 300 $^{\circ}\text{C}$ under argon atmosphere. An empty aluminum pan sealed in the same manner as the sample was used as a reference.

2.5.3 Field-Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM)

A field-emission scanning electron microscope (JSM-7100F, Jeol Ltd., Japan) has been used to determine the morphology and size of IBP-PNPs at accelerating voltage 2 kV. A small amount of freeze-dried nanoparticles was deposited on leit adhesive carbon tabs.

2.6 In Vitro Drug Release

The in vitro drug release of IBP was carried out a simulated gastric fluid without enzyme (SGF pH = 1.2), simulated intestinal fluid without enzyme (SIF pH = 6.8) and phosphate buffer saline (PBS pH = 7.4), a dip probe of UV spectrophotometer (Cary 60 UV–Vis spectrophotometer, Agilent Technologies) was immersed into the medium, during a predetermined period of the in vitro release experiment the absorbance is measured at a wavelength of 265 nm in order to determinate the amount of IBP, and the temperature and stirring of the system were maintained at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 50 rpm. The volume of the medium and the mass of freeze-dried IBP-PNPs were fixed for the three

dissolution media ($v = 200$ mL, $m = 50$ mg). The results were presented in terms of percentage drug release as a function of time Eq (3):

$$\text{Drug release (\%)} = \left(\frac{C_t}{C_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

where C_t represented the amount of IBP released into the medium at time t and C_0 represented the initial amount of IBP loaded in the nanoparticles.

2.7 Kinetic and Mechanism of Release Analysis

In order to determine the kinetics and mechanism of IBP release from nanoparticles, the analytical data of the in vitro drug release study in the three dissolution media were plotted and fitted to the following kinetic models: zero-order, first-order, Higuchi, Korsmeyer–Peppas and Kopcha (Table 1) [17–19].

2.8 In Vitro Anti-inflammatory (AI) Activity

The (AI) activity of IBP-PNPs was assessed by using the inhibition of the bovine serum albumin (BSA) denaturation method [20] with slight modification, and the study of (AI) activity is divided into two parts: The first one is the evaluation in water and the second one in the different dissolution media (SGF, SIF and PBS).

2.8.1 Preparation of Samples for (AI) Activity Study in Water

Stock solution of 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of IBP-PNPs is prepared by using Milli-Q water as a solvent, and from this solution three different concentrations of 1000, 500 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared. On the other hand, a solution of pure IBP at 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was prepared using the same solvent.

Table 1 Mathematical equations of the models used to determine the kinetics and mechanism of IBP release from nanoparticles

Zero-order	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
First-order	$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t / 2.303$
Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$
Korsmeyer–Peppas	$Q_t = K_{KP} t^n$
Kopcha	$Q_t = A t^{1/2} + B t$



2.8.2 Preparation of Samples for (AI) Activity Study in SGF, SIF and PBS

The IBP-PNPs were dispersed in SGF for 2 h, SIF and PBS for 8 h.

All solutions prepared in both parts were centrifuged followed by filtration through a 0.2- μm syringe filter to eliminate the unreacted IBP.

2.8.3 Method of Evaluation of (AI) Activity

A solution of 0.2% w/v of BSA was prepared in a trizma hydrochloride (Tris-HCl) buffer (pH = 6.6, $C = 0.05$ M). 500 μl of each sample prepared in Sects. 2.8.1 and 2.8.2 was transferred to a glass test tube, and 500 μl of 0.2% w/v of BSA was added to the entire above tubes. The control tube consists of 500 μl of 0.2% w/v BSA solution with 500 μl of solvent used. The blank tubes contain 500 μl of each sample and 500 μl Tris-HCl buffer. All the tubes were incubated at 37 °C for 15 min and then heated at 72 °C for 5 min in a water bath and then cooled for 10 min. Each experiment was carried out in triplicate, and the mean absorbance was recorded. The absorbance of these solutions was determined at a wavelength of 660 nm using Tris-HCl buffer as blank. The percentage of inhibition was determined using Eq (4):

$$\% \text{ of inhibition} = \frac{\text{absorbance of control} - (\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of blanc})}{\text{absorbance of control}} \times 100 \quad (4)$$

2.9 In Vitro Biodegradation

The rate of degradation of the IBP-PNPs was measured according to the method [21]. Equal initial masses of NaAL, CS and IBP-PNPS noted as m_0 were immersed in a solution of PBS containing 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of lysozyme and incubated at 37 °C. At different intervals (24, 48, 72, 96 and 120 h) samples are removed, washed with Milli-Q water to remove all residues and then oven-dried at 40 °C and weighed, and the weight of each product at different point is noted m_t . The percentage of degradation was calculated from Eq (5):

$$\text{Degradation \%} = \left((m_0 - m_t) / m_0 \right) \times 100 \quad (5)$$

2.10 Cytotoxicity by Brine Shrimp Lethality Assay

The brine shrimp lethality test suggested by Michael et al. [22] is a simple, cheap and available tool for testing the toxicity of different materials such as nanoparticles, plant extracts, pharmaceuticals and food products [23]. The eggs of *Artemia salina* are put in artificial seawater (with 38 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ salinity) [24] and placed in an incubator under the following conditions ($T = 28$ °C, constant flow of oxygen, light and

ventilation) for 48 h for hatching. The mature nauplii are selected in Petri dishes using a micropipette under an optical microscope. To undergo the cytotoxicity test, six concentrations were prepared (4000, 2000, 1000, 500, 250 and 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) using dimethyl sulfoxide (DMSO) as a solvent, each tube contains ten mature nauplii, 500 μL DMSO, 100 μL of sample and 5000 μL of artificial seawater, and on the other hand, a control tube without sample has been prepared. Each concentration was done in triplicate. All the tubes were placed in the incubator under the same conditions mentioned above. After 24 h, the number of surviving larvae was counted in each tube and the mortality was calculated from Eq (6):

$$\text{Mortality \%} = \left((\text{Test mortality} - \text{Control mortality}) / (100 - \text{Control mortality}) \right) \times 100 \quad (6)$$

3 Results and Discussion

3.1 DD% of CS by ^1H NMR Spectroscopy

DD% is among the characteristic parameters of CS because it indicates the mole fraction of N-acetyl glucosamine units

present in the polymeric chain. There are several techniques for the determination of DD%, among them the most accurate is NMR spectrometer. The NMR spectrum of CS is shown in (Fig. 1). DD% was calculated from Eq (7) [25] using the integral of methyl group signal residue of an acetyl group (H-AC) and the sum of integral intensities of H-(2-6).

$$\text{DD \%} = \left(1 - \left(\frac{1}{3} \text{H}_{\text{AC}} / \frac{1}{6} \text{H}_{(2-6)} \right) \right) \times 100 \quad (7)$$

The DD% obtained from the NMR spectrum is 83.63%, and it is in the range mentioned by the supplier.

3.2 Encapsulation Efficiency (EE%) and Loading Capacity (LC%)

The (EE%) of IBP-PNPs was calculated (Table 2), and the result shows a very high encapsulation of 98.45% with $\text{LC} = 32.81\%$.

3.3 FT-IR Analysis

To confirm the success of the synthesis of IBP-PNPs by polyelectrolyte complexation, two points are taken into



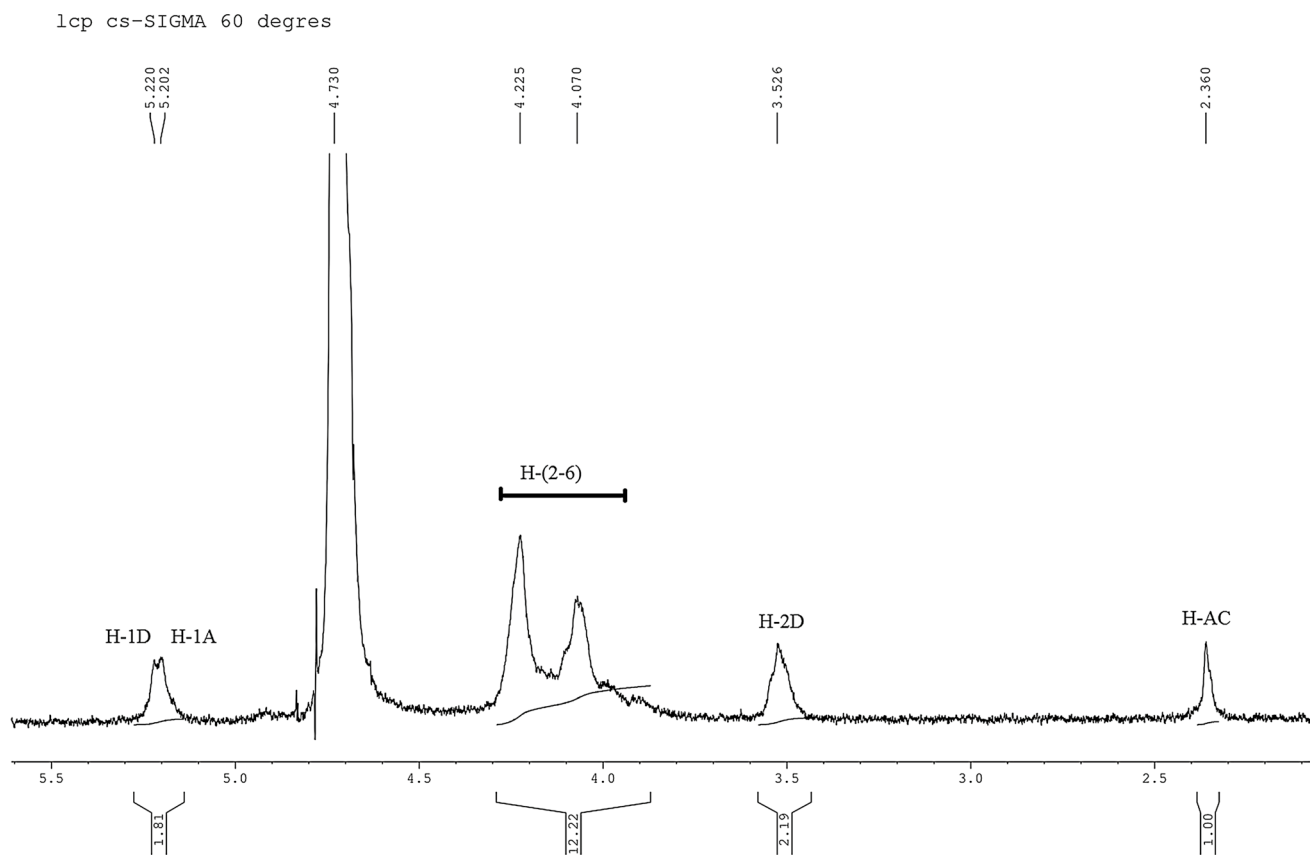


Fig. 1 ^1H NMR spectrum of chitosan (CS) in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ at $60\text{ }^\circ\text{C}$

Table 2 Encapsulation efficiency (EE%) and loading capacity (LC%) of IBP loaded nanoparticles

	EE%	LC%
Experiment 1	98.4557	32.8185
Experiment 2	98.5503	32.8501
Experiment 3	98.0436	32.6812
Mean \pm SD	98.3498 \pm 0.2041	32.7832 \pm 0.06804

our consideration: the interactions between two polyelectrolytes and IBP entrapment. The FT-IR spectra of CS, NaAL, IBP and IBP-PNPs are shown in (Fig. 2). CS spectrum presents a peak to 3357.14 cm^{-1} assigned to $-\text{OH}$ stretching vibrations, a large band at 3284.64 cm^{-1} represents the extension vibration of $\text{N}-\text{H}$ and intermolecular $\text{O}-\text{H}$ bands, and the three peaks to 1656 , 1570 and 1308.72 cm^{-1} indicate, respectively, $\text{C}=\text{O}$ stretching, $\text{N}-\text{H}$ stretching and $\text{C}-\text{N}$ stretching, 2916.48 and 2871.89 cm^{-1} corresponding, respectively, to $\text{C}-\text{H}$ asymmetric and symmetric vibration, 1030 cm^{-1} indicate $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ stretching vibration, at 1376.68 cm^{-1} a CH_3 bending of amid group [26–29]. In the case of NaAL, there are two characteristic peaks at 1601.25 , 1419.05 cm^{-1} which are attributed

to the stretching vibrations of asymmetric and symmetric bands of carboxylate anions (COO^-), respectively, a large band at 3263.63 cm^{-1} correspond to $-\text{OH}$ stretching vibrations, and the peak at 1300 cm^{-1} is due to the $\text{C}-\text{O}$ stretching and the intense peak at 1030 cm^{-1} corresponding to $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ stretching [26]. For IBP, the peak at 3728 cm^{-1} corresponds to $-\text{OH}$ stretching vibrations, the very intensive peak at 1702 cm^{-1} due to the $\text{C}=\text{O}$ (COOH) stretching, to 1223 cm^{-1} a peak correspondent to $\text{C}-\text{C}$ stretching, and the second intense peak at 775 cm^{-1} represents CH_2 rocking vibration, another intense peak at 929 cm^{-1} due to CH_3 rocking vibration [30]. The spectrum of IBP-PNPs shows a shift in the characteristic peak of the COO^- group from 1419.05 to 1400 cm^{-1} , and this change was due to the ion exchange between Na^+ present in the G residues and Ca^{2+} . The band due to $\text{O}-\text{H}$ stretching vibration in CS and NaAL was a large band, but in the IBP-PNPs spectrum became narrower and this due to the increase in intermolecular $\text{O}-\text{H}$ bending between CS and NaAL, the appearance of a new peak at 1637.17 cm^{-1} confirms the formation of $-\text{NH}_3\text{C}$ group through the polyelectrolyte complexation, and the peak responsible for the protonated amino group in CS also shifted to 1546.19 cm^{-1} [26]. It can be confirmed that the

Fig. 2 FT-IR spectra of sodium Alginate (NaAL), chitosan (CS), ibuprofen (IBP) and ibuprofen polymeric nanoparticles (IBP-PNPs)

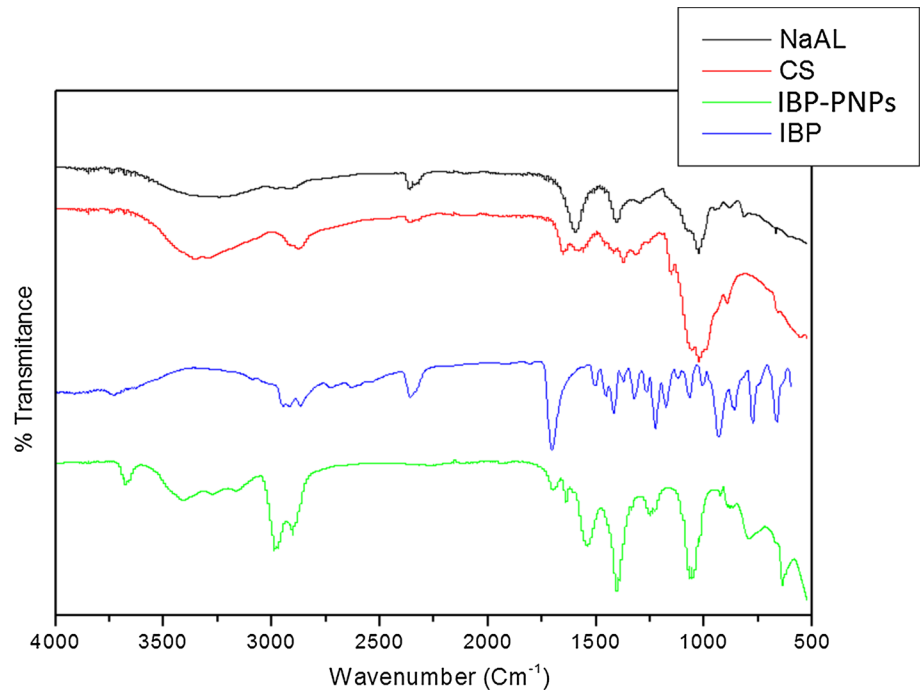
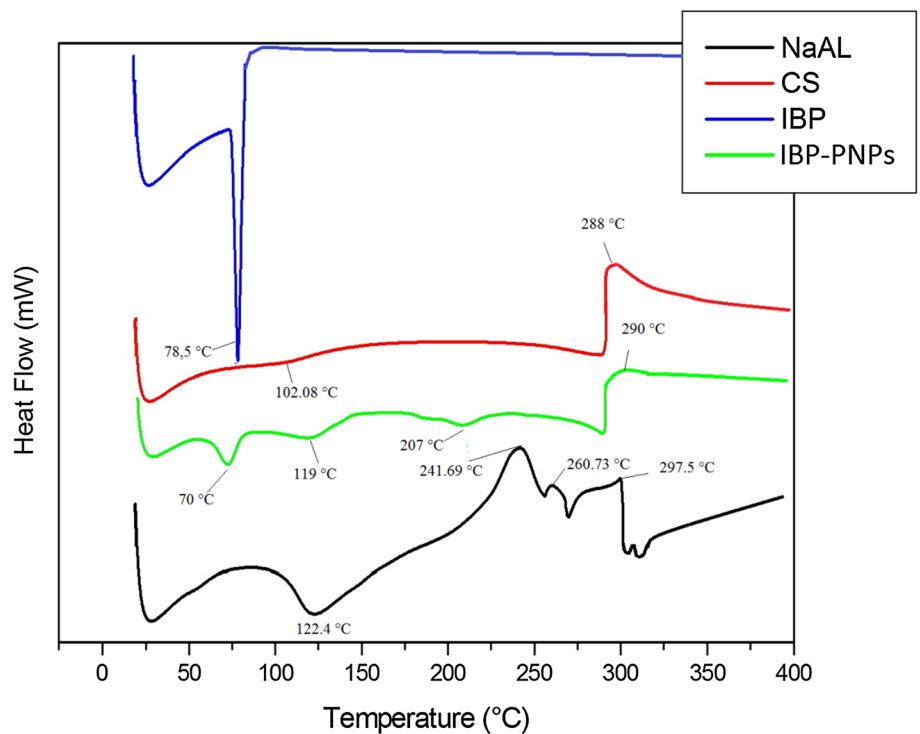


Fig. 3 Thermograms of sodium alginate (NaAL), chitosan (CS), ibuprofen (IBP) and ibuprofen polymeric nanoparticles (IBP-PNPs)



COO⁻ group of NaAL is multifunctional and has a role in cross-linking with Ca²⁺ and the formation of polyelectrolyte by reacting with the amino group (-NH₃⁺) of CS. The responsible peak of the C-O-C stretching vibration of the polysaccharide structure has not undergone any change, and it has also appeared at 1030 cm⁻¹ in the IBP-PNPs

spectrum; it suggests that glycosidic linkage does not play any role, neither in ionic gelation or in polyelectrolyte formation [31, 32]. The characteristic peak of IBP at 1702 cm⁻¹ appeared, but with very low intensity, the peak due to CH₂ rocking vibration was shifted to 794 cm⁻¹,

and all other peaks of IBP disappeared, of these changes confirmed the encapsulation of IBP [33].

3.4 DSC Analysis

The physical state of NaAL, CS, IBP and IBP-PNPs was examined by DSC, and their thermograms are shown in Fig. 3. The IBP showed an endothermic peak corresponding to its melting point at 78.5 °C. In the case of NaAL, the dehydration of the polymer was at 122.4 °C with an endothermic peak. At 241.69, 260.73 and 297.5 °C, the exothermic peaks correspond to the decomposition of polymer and the decarboxylation of COO⁻ groups [31]. The thermogram of CS showed a large endothermic peak at 102.08 °C which corresponds to the evaporation of water, and the exothermic peak at 288 °C is the result of the decomposition of the amine groups present in CS [28]. The IBP-PNPs thermogram showed an endothermic peak at 119 °C, this one is the result of the dehydration of the nanoparticles, the endothermic peak at 207 °C and exothermic peak at 290 °C corresponding to the degradation of the polyelectrolyte complex by dehydration of the hydrophilic groups are present in the polymers as well as the depolymerization by oxidation and decarboxylation [31]. The endothermic peak corresponding to the melting point of IBP was shifted to 70 °C with a very low intensity; this change is reflected in a decrease in IBP crystallinity [33]. The DSC confirmed the encapsulation of the drug and polyelectrolyte complexation.

3.5 FE-SEM

The IBP-PNPs have a regular spherical shape with a size of approximately 100 nm (Fig. 4), an optimal size for the drug delivery system to enhance permeability, retention, cross

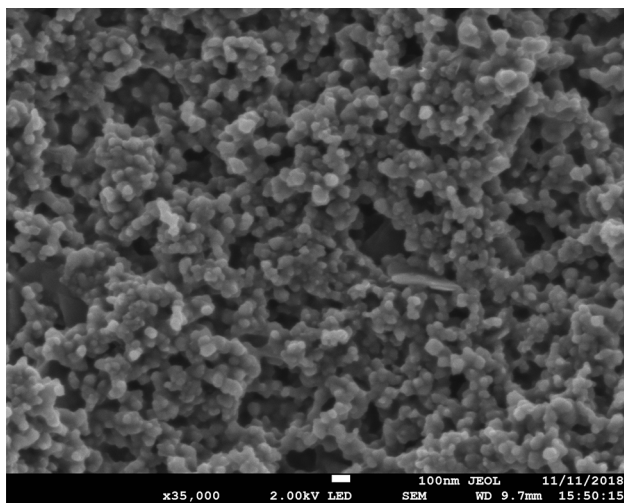


Fig. 4 FE-SEM of ibuprofen polymeric nanoparticles (IBP-PNPs)

the blood–brain barrier and facilitate the clearance by the body [34, 35].

3.6 In Vitro Drug Release

The drug release profile of the IBP in different dissolution media from the nanoparticles is shown in Fig. 5, as observed 8.47% of IBP was released at pH 1.2 after 2 h, the nanoparticles can still retain a large amount of IBP, and they have minimized the total loss of the drug in the gastric medium due to the coating of the nanoparticles by the positive charge of CS and its low swelling in the acidic medium and consequently the imprisonment of the drug in the narrow 3D network of nanoparticles. In the SIF and PBS, 88.74 and 81.52% of IBP, respectively, were released in 8 h, the release in alkaline media (SIF and PBS) was faster, respectively, 31.04 and 41.66% of IBP released for 2 h compared to the gastric medium which released 8.47% only during the same period, and this suggests that the nanoparticles are pH-sensitive. A medium with a higher pH was more responsive to the positive charge of CS, and this facilitates the penetration of the medium into the nanoparticles and consequently the release of IBP [36]. The second factor that contributes to the release of IBP is the swelling of NaAL cross-linking by CaCl₂ due to the ion exchange between the Ca²⁺ which are binding with COO⁻ groups with Na⁺ ions present in the external solution, as a result of the electrostatic repulsion among –COO⁻ groups increases which ultimately causes the chain relaxation and enhances the release of drug [37].

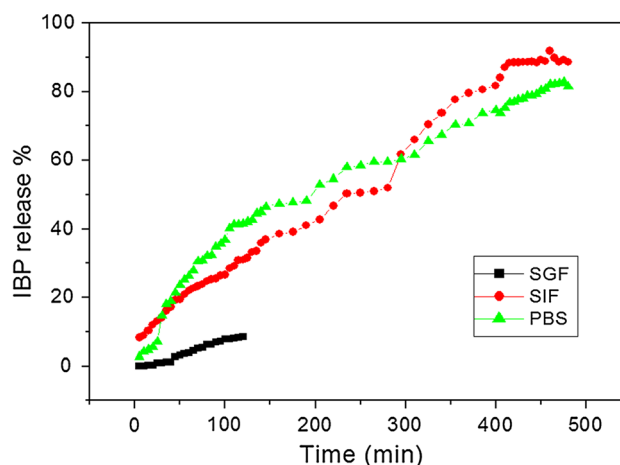


Fig. 5 In vitro drug release of ibuprofen (IBP) in simulated gastric fluid without enzyme (SGF pH=1.2), simulated intestinal fluid without enzyme (SIF pH=6.8) and phosphate buffer saline (PBS pH=7.4)

Table 3 Regression coefficients (R^2) and the release rate constants (K) of each model

	Zero-order		First-order		Higuchi		Korsmeyer–Peppas		
	R^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K	n
SGF	0.9808	0.0852	0.8059	0.0377	0.9375	1.1706	0.9836	2.28×10^{-4}	1.7762
SIF	0.9919	0.1792	0.9176	0.0041	0.9634	4.8035	0.9795	2.6521	0.5185
PBS	0.942	0.1452	0.6365	0.0039	0.9908	4.0533	0.9424	1.1948	0.7056

Table 4 Values for the exponent n of the Korsmeyer–Peppas equation and the drug release mechanism from spherical nanoparticles [18]

n	Mechanism
$0.43 \leq n$	Fickian diffusion
$0.43 < n < 0.85$	Non-Fickian transport (anomalous diffusion)
$n = 0.85$	Case II transport
$n > 0.85$	Super case II transport

Table 5 Diffusion and erosion constants of Kopcha model for each medium

pH	A	B
1.2	-0.2532	0.0949
6.8	2.9413	0.0191
7.4	1.0897	0.1872

3.7 Kinetic and Mechanism of Release Analysis

Table 3 presents the different parameters obtained for each model. In all three dissolution media studied, the coefficient of correlation R^2 in the zeroth order is higher than the first order, which means that the drug release is independent of its concentration. Zero-order release with which the drug is released with a constant speed is the ideal goal in the drug release because the plasma concentration is well-controlled while avoiding repeated administrations [17]. To evaluate the mechanisms of IBP release a combination of three models was used. Higuchi model is based on Fick's law where the quantity of the drug released is proportional to the square root of time [17], in some cases, the mechanism may deviate from Fickian diffusion and following another mechanism, in this case, another complementary model was developed by Korsmeyer–Peppas employed [18], and this model uses the exponent release (n) (Table 4) to determinate by which mechanism the drug is released. In SIF and PBS, the value of n is, respectively, 0.5185 and 0.7056 so the mechanism that controls the release of IBP in these two dissolution media is non-Fickian transport. (The mechanisms of IBP release can be diffusion controlled or erosion controlled.) The value of n in SGF is 1.7762; it indicates super case II transport (or drug release that is erosion-controlled). The

Table 6 Anti-inflammatory activity of IBP-loaded nanoparticles in Milli-Q water

Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Inhibition \pm SD
2000	101.7311907 ± 1.9220
1000	101.3659606 ± 4.9122
500	92.64207451 ± 2.4324
250	76.01899196 ± 2.4978
Pure IBP ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$)	56.135026 ± 3.6657

results of the Kopcha model (Table 5) indicate that the release mechanism in SIF and PBS is diffusion-controlled (A diffusional constant $>$ B erosion constant) and confirms that IBP is released by erosion controlled (B erosion constant $>$ A diffusional constant) [19].

3.8 In Vitro Anti-inflammatory Activity

To confirm the effectiveness of nanoencapsulation and its influence on the solubility of IBP, the in vitro drug release study is not enough, and it is necessary to evaluate the (AI) activity of IBP-PNPs. Among the pharmacological actions of (NSAID), it is the inhibition of protein denaturation [20]; this point has been exploited to calculate the ability of IBP-PNPs to inhibit inflammation in water and in the different dissolution media.

3.8.1 Evaluation of (AI) Activity in Water

The (AI) activity of pure IBP and IBP-PNPs at different concentrations is illustrated in Table 6. The results indicate that the IBP-PNPs reached a percentage inhibition of 76.01% for the lowest concentration mentioned in the table ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) compared to 56.13% for $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ of pure IBP. The low solubility of IBP in water is the main cause of the low percentage inhibition, the nanoencapsulation increased the biological activity, and this is due to the increase in the solubility of the drug.

3.8.2 Evaluation of (AI) Activity in SGF, SIF and PBS

The results of the comparative study of the (AI) activity of the IBP-PNPs in the three dissolution media are illustrated in Fig. 6. The histogram indicates a low activity of 26.45%

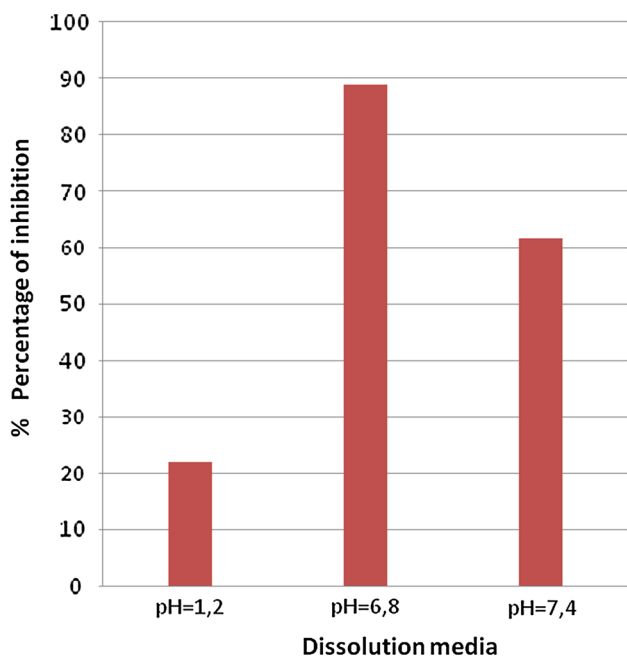


Fig. 6 In vitro anti-inflammatory (AI) activity of ibuprofen polymeric nanoparticles (IBP-PNPs) in simulated gastric fluid without enzyme (SGF pH=1.2), simulated intestinal fluid without enzyme (SIF pH=6.8) and phosphate buffer saline (PBS pH=7.4)

in the SGF and a good activity in the SIF and PBS, respectively, (88.81 and 61.63%) which confirms once again that the IBP-PNPs are pH-sensitive. In the SIF and PBS, there is a large amount of IBP that has spread compared to the SGF where the IBP-PNPs have retained a large amount of the drug due to the stimuli-responsive behavior of smart polymers (NaAL/CS).

Nanoencapsulation decreases the particle size and therefore increases the surface area, and the particle size of IBP-PNPs is around of 100 nm which means the greater surface area that contributes to the enhancement of drug solubility according to the Noyes–Whitney equation (Eq 8) relates the rate of dissolution to the proprieties of the solid [2].

$$\frac{dx}{dt} = A \frac{D}{h_D} (C_S - C_t) \tag{8}$$

$\frac{dx}{dt}$: Dissolution rate (mol s^{-1}), A : Surface area (m^2), D : Diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), h_D : Diffusional distance (m), C_S : Saturation solubility (mol L^{-1}), C_t : Concentration of drug dissolved at t (mol L^{-1}), which $\frac{dx}{dt}$ is proportional to the surface area (A) and the difference between the saturation solubility and instantaneous concentration.

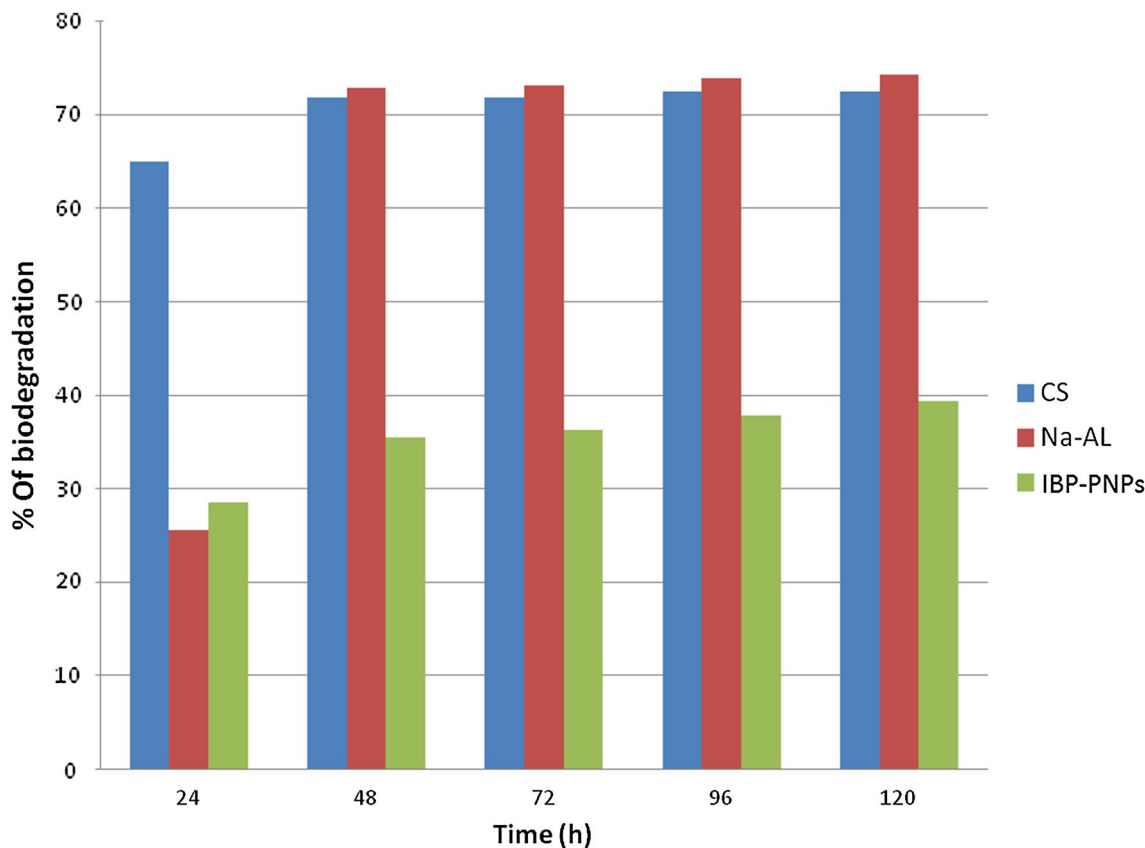
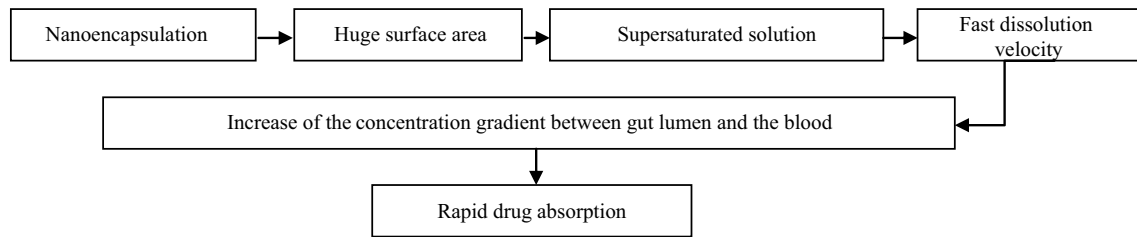


Fig. 7 In vitro biodegradation of chitosan (CS), sodium alginate (NaAL) and ibuprofen polymeric nanoparticles (IBP-PNPs) by lysozyme



3.9 In Vitro Biodegradation

The IBP-PNPs showed biodegradation of 40% (Fig. 7), and this is due to the incorporation of the active ingredient which is non-biodegradable in NaAL and CS two macromolecules which are known for their biodegradability.

3.10 Brine Shrimp Lethality Assay

The cytotoxicity study of the IBP-PNPs gives us information to determine the effect of the toxicity on the targeted cells. The cytotoxicity of IBP-PNPs was studied on the *Artemia salina*. The percentage of mortality was calculated, and the results are listed in Table 7. The IBP-PNPs have no risk of toxicity even at very high concentrations; the highest percentage of mortality was 1.33% which is almost negligible. The encapsulation of IBP in a non-toxic polymeric system has a remarkable effect on the cytotoxicity of IBP-PNPs.

4 Conclusion

In order to solve the problem of the short plasma half-life and poor solubility of IBP, the (NSAID) most prescribed and used, a nano-polymeric system based on NaAL and CS, two mucoadhesive polymers have been developed by a simple technique which offered the higher encapsulation efficiency of 98.45% with an adequate size for the drug delivery

Table 7 Percentage mortality of *Artemia salina* after exposed to various concentrations of IBP-PNPs

Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Test 1	Test 1	Test 1	% Mortality
4000	1	1	0	1.33
2000	0	0	1	0.66
1000	0	1	0	0.33
500	0	1	1	0.66
250	1	0	0	0.33
125	1	0	0	0.33

system. FT-IR, DSC and FE-SEM confirm the polyelectrolyte formation and nanoencapsulation of the drug. The study of the (AI) activity shows that the incorporation of IBP in NaAL and CS increases its solubility and consequently its biological activity. Mathematical models indicate that the release of the drug is not done with only one mechanism in the different media, one can have several at a time, and this is related to several factors such as the interactions of the drug with the polymeric system in which it is encapsulated; the behavior of polymers that changes with the properties of each medium that will cross them (pH, temperature). IBP-PNPs can achieve pseudo-zero-order release for a period of 8 h. In vitro biodegradation and brine shrimp lethality tests and all the tests cited above confirm that NaAL nanoparticles coated with CS are a highly effective system for IBP delivery with no toxic effects.

Acknowledgements The authors would like to thank the biotechnology research centre (CRBt) for their supporting.

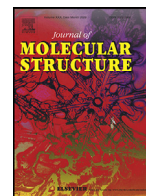
References

1. Arica, B.; Çaliş, S.; Atilla, P.; Durlu, N.T.; Çakar, N.; Kaş, H.S.; Hincal, A.A.: In vitro and in vivo studies of ibuprofen-loaded biodegradable alginate beads. *J. Microencapsul.* (2005). <https://doi.org/10.1080/02652040400026319>
2. Hattori, Y.; Haruna, Y.; Otsuka, M.: Dissolution process analysis using model-free Noyes–Whitney integral equation. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.017>
3. Liu, J.; Xiao, J.; Li, F.; Shi, Y.; Li, D.; Huang, Q.: Chitosan-sodium alginate Nanoparticle as a delivery system for ϵ -polylysine: preparation, characterization and antimicrobial activity. *Food Control* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.020>
4. Kumari, A.; Yadav, K.S.; Yadav, S.C.: Biodegradable polymeric Nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
5. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, JPh; Ammoury, N.; Benita, S.: Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* (1989). [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
6. Niwa, T.; Takeuchi, H.; Hino, T.; Kunou, N.; Kawashima, Y.: Preparations of biodegradable Nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D, L-lactide/glycolide copolymer by a



- novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J. Control. Release* (1993). [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(93\)90097-0](https://doi.org/10.1016/0168-3659(93)90097-0)
7. Allémann, E.; Leroux, J.; Gurny, R.: In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm. Res.* (1993). <https://doi.org/10.1023/A:1018970030327>
 8. Rajaonarivony, M.; Vauthier, C.; Couarraze, G.; Puisieux, F.; Couvreur, P.: Development of a new drug carrier made from alginate. *J. Pharm. Sci.* (1993). <https://doi.org/10.1002/jps.2600820909>
 9. Vauthier, C.; Bouchemal, K.: Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm. Res.* (2009). <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>
 10. Thakur, S.; Sharma, B.; Verma, A.; Chaudhary, J.; Tamulevicius, S.; Thakur, V.K.: Recent progress in sodium alginate based sustainable hydrogels for environmental applications. *J. Clean. Prod.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.259>
 11. Sarmiento, B.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F.; Ferreira, D.C.; Neufeld, R.J.: Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* (2007). <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.609>
 12. Henao, E.; Delgado, E.; Contreras, H.; Quintana, G.: Polyelectrolyte complexation versus ionotropic gelation for chitosan-based hydrogels with carboxymethylcellulose, carboxymethyl starch, and alginate acid. *Int. J. Chem. Eng.* (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/3137167>
 13. Boddohi, S.; Moore, N.; Johnson, P.A.; Kipper, M.J.: Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan. *Biomacromolecules* (2009). <https://doi.org/10.1021/bm801513e>
 14. Nalini, T.; Khaleel Basha, S.; Majeeth, A.M.S.; Sugantha Kumari, V.; Kaviyarasu, K.: Development and characterization of alginate/chitosan nanoparticulate system for hydrophobic drug encapsulation. *J Drug Deliv Sci Technol* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.002>
 15. Naskar, S.; Sharma, S.; Kuotsu, K.: Chitosan-based nanoparticles: an overview of biomedical applications and its preparation. *J Drug Deliv Sci Technol* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.022>
 16. Prabakaran, M.: Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.052>
 17. Yadav, G.; Bansal, M.; Thakur, N.; Sargam Khare, P.: Multilayer tablets and their drug release kinetic models for oral controlled drug delivery system. *Middle-East J. Sci. Res.* (2013). <https://doi.org/10.5829/idosi.mejstr.2013.16.06.75176>
 18. Peppas, N.A.; Sahlin, J.J.: A simple equation for the description of solute release. II. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm., Int* (1989). [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2)
 19. Kopcha, M.; Lordi, N.G.; Tojo, K.J.: Evaluation of release from selected thermosoftening vehicles. *J. Pharm. Pharmacol.* (1991). <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03>
 20. Karthik, K.; Ravi, M.; BharathRathnaKumar, P.: Evaluation of anti-inflammatory activity of canthium parviflorum by in vitro method. *Biotech. Pharm. Res, Indian J* (2013). <https://doi.org/10.21276/ajptr>
 21. Gomathi, T.; Sudha, P.N.; Florence, J.A.K.; Venkatesan, J.; Sukumaran, A.: Fabrication of letrozole formulation using chitosan nanoparticles through ionic gelation method. *Int. J. Biol. Macromol.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.147>
 22. Michael, A.S.; Thompson, C.G.; Abramovitz, M.: Artemia salina as a test organism for bioassay. *Science* (1956). <https://doi.org/10.1126/science.123.3194.464>
 23. Solairaj, D.; Rameshthangam, P.; Muthukumar, P.; Wilson, J.: Studies on electrochemical glucose sensing, antimicrobial activity and cytotoxicity of fabricated copper nanoparticle immobilized chitin nanostructure. *Int. J. Biol. Macromol.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.147>
 24. Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L.: Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* (1982). <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
 25. Hirai, A.; Odani, H.; Nakajima, A.: Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. *Polym. Bull.* (1991). <https://doi.org/10.1007/BF00299352>
 26. Smitha, B.; Sridhar, S.; Khan, A.A.: Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *Eur. Polym J.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.018>
 27. Rathore, H.S.; Senthilvelan, T.; Vasantharaja, R.; Abraham, L.S.; Prakash, D.; Sivagnanam, U.T.; Gupta, S.: Fabrication and characterization of chitosan film impregnated ciprofloxacin drug: a comparative study. *ISBAB* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101078>
 28. Pereira, F.S.; da Silva Agostini, D.L.; Job, A.E.: Thermal studies of chitin–chitosan derivatives. *J. Therm. Anal. Calorim.* (2013). <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2835-z>
 29. Wang, Y.; Pitto-barry, A.; Habtemariam, A.; Romero-canelon, I.; Sadler, P.J.; Barry, N.P.E.: Nanoparticles of chitosan conjugated to organo-ruthenium complexes. *Inorg. Chem. Front.* (2016). <https://doi.org/10.1039/c6qi00115g>
 30. Ramukutty, S.; Ramachandran, E.: Growth, spectral and thermal studies of ibuprofen crystals. *Cryst. Res. Technol.* (2012). <https://doi.org/10.1002/crat.201100394>
 31. Sarmiento, B.; Ferreira, D.; Veiga, F.; Ribeiro, A.: Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydr. Polym.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.008>
 32. Voo, W.P.; Lee, B.B.; Idris, A.; Islam, A.; Tey, B.; Chan, E.S.: Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile. *RSC Adv.* (2015). <https://doi.org/10.1039/C5RA03862F>
 33. Saravanan, M.; Bhaskar, K.; Srinivasa, R.G.; Dhanaraju, M.D.: Ibuprofen-loaded ethylcellulose/polystyrene microspheres: an approach to get prolonged drug release with reduced burst effect and low ethylcellulose content. *J. Microencapsul.* (2003). <https://doi.org/10.1080/0265204031000093087>
 34. Singh, R.; Lillard, J.W.: Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>
 35. Longmire, M.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H.: Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (London)* (2012). <https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703>
 36. Li, P.; Dai, Y.; Zhang, J.; Wang, A.; Wei, Q.: Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *Int. J. Biomed. Sci.* **4**, 221–228 (2008)
 37. Bajpai, S.K.; Sharma, S.: Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *React. Funct. Polym.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002>





Synthesis of cyclodextrins-metronidazole inclusion complexes and incorporation of metronidazole - 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in chitosan nanoparticles

Sarra Bensouiki^a, Fouzia Belaib^{b,*}, Michèle Sindt^c, Sandrine Rup-Jacques^c, Pierre Magri^c, Assia Ikhlef^d, Abdeslam-Hassen Meniai^a

^aLaboratory of Environmental Process Engineering, Faculty of Process Engineering, University Salah Boubnider – Constantine 3, Ali Mendjeli New Town 25000, Constantine, Algeria

^bLaboratoire de Médicament et Développement Durable, Faculty of Process Engineering, University Salah Boubnider – Constantine 3, Ali Mendjeli New Town, 25000 Constantine, Algeria

^cLaboratoire de Chimie et Physique: Approche Multi-échelles des Milieux Complexes, Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, Metz, 57070, France

^dBiotechnology Research Center, P.B E73/UV N° 03 Ali Mendjeli New Town, 25000, Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2021

Revised 26 July 2021

Accepted 12 August 2021

Available online 16 August 2021

Keywords:

Metronidazole

Cyclodextrins

Inclusion complex

Antibacterial activity

Chitosan nanoparticles

Controlled-release

ABSTRACT

Inclusion complexes (ICs) of metronidazole (MTZ) with β -cyclodextrin (BCD) and its derivative 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) were prepared to improve its apparent solubility. A 1:1 stoichiometry has been proposed for both ICs according to the Job's plots. The estimation of association constants and thermodynamic parameters demonstrated that the incorporation of MTZ in both cavities of cyclodextrins (CDs) is a spontaneous exothermic process. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), two-dimensional (2D) NMR, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM) investigations were used to ascertain the structure of ICs and that prove their formation. Thermal analysis showed that the thermal stability of MTZ was improved in the presence of both CDs. The *in vitro* drug release of ICs showed a considerable increase in the dissolution rate in comparison with the pure MTZ. An improvement of antibacterial activity was observed after encapsulation, especially for MTZ-HPBCD IC. Then chitosan (CS) nanoparticles (NPs) were prepared from the preformed MTZ-HPBCD IC by ionic gelation method. FTIR confirmed that MTZ-HPBCD IC has successfully entrapped in CS NPs. Transmission electron microscopy (TEM), field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) images and dynamic light scattering (DLS) show that the NPs have a spherical shape with a uniform diameter. The *in vitro* release profile of NPs showed a controlled-release of MTZ suggesting that such MTZ-HPBCD IC-loaded CS NPs can be an efficient alternative to modify the MTZ release and increase its solubility.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Drug delivery systems (DDS) have been proposed to overcome conventional drug constraints such as limited aqueous solubility and lack of targeting, improve therapeutic indices in humans or animals, enhance the bioavailability and bioactivity of the drug, and protect drugs from degradation [1–5]. In the literature different DDS have been proposed in different formulations such as liposomes, hydrogels, cyclodextrins, films, nanoparticles, microspheres, and some others [1]. However, there is no ideal structure or formu-

lation for DDS, but it is recommended that the materials used for their synthesis have certain properties such as being biocompatible, nontoxic, non-immunogenic, non-carcinogenic, have an acceptable biodegradation time, easily cleared from the body, and can protect the drug until the target site [1,5]. Polymeric nanoparticles (NPs) and cyclodextrins (CDs) are considered relevant systems in DDS due to their unique and promising behaviors. NPs can enhance the bioavailability and stability of the drug, modify drug release profile, and facilitate uptake of the drug by the cells. On the other hand, CDs can improve certain properties of the drug such as solubility, thermal stability, taste, chemical reactivity, and protect photosensitive drugs from degradation [1].

NPs are colloidal systems smaller than 1 μm in diameter size which facilitates their passage through cell barriers to reach the target site [6]. NPs based on chitosan (CS) are considered among

* Corresponding author at: Laboratoire de Médicament et Développement Durable, Faculty of Process Engineering, University Salah Boubnider – Constantine 3, Ali Mendjeli New Town, 25000 Constantine, Algeria.

E-mail address: fouzia.belaib@univ-constantine3.dz (F. Belaib).

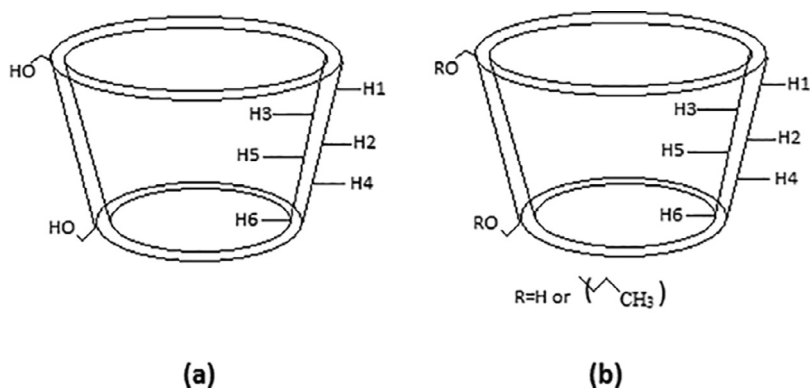


Fig. 1. Chemical structure of (a) β -cyclodextrin and (b) 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

promising DDS due to the mucoadhesive, biocompatibility, non-toxicity, and biodegradability of CS [7]. They can be synthesized by various techniques such as ionic gelation [8], emulsification crosslinking, coacervation, and solvent evaporation [7].

CDs are nontoxic cyclic oligomers of glucose family composed of α -D-glucopyranose units linked by α -(1,4) bonds, obtained in 1903 by bacterial digest (*Bacillus amylobacter* and *Bacillus macerans*) of potato starch digestion by Franz Schardinger. CDs are produced by a relatively simple enzymatic degradation of starch by cyclodextrin glycosyl transferase (CGT-ase) [9–11]. CDs have a structure that looks like a truncated cone or donut with two open ends due to their chair conformation of glucopyranose units. They are containing six units (α -cyclodextrin), seven (β -cyclodextrin), eight (γ -cyclodextrin) or more α -(1, 4)-linked α -D-glucopyranose units [12,13]. Due to their high biocompatibility and lack of biotoxicity, they were exploited in several areas such as the chemical industry, cosmetics, food [14], nucleic acids delivery [9,15], and as protein stabilizers to protect them against denaturation [16]. In the pharmaceutical field, they have been used to develop potential drugs [13] where they can be found in commercially available drugs including eye drops, tablets, and ointments, or more [14]. CDs display a hydrophilic outer surface and a hydrophobic environment inside the cavity. This unique property is due to the presence of the primary hydroxyl groups located at the narrow edge of the exterior cone and the secondary hydroxyl groups at the wider edge, whereas the lipophilic cavity is due to the presence of the oxygen atoms and skeletal carbons of the glycosidic bonds [10,13,14]. This unique behavior allows CDs to incorporate hydrophobic molecules or hydrophobic moieties and the formation of host-guest inclusion complexes (ICs) in solution or solid-state [9,14]. The inclusion complexation brings several changes to the physicochemical properties of the guest molecule entrapped within the CD cavity which explains their widespread applications in various areas [17].

β -cyclodextrin (BCD) (Fig. 1a) is one of the most used native CDs in the formation of ICs (solubility in water at 25 °C = 18.5 mg.mL⁻¹) [18]. Several derivatives of the BCD have been synthesized, the most used in the pharmaceutical field are the heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin (DIMEB), (2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin (TRIMEB), randomly methylated- β -cyclodextrins (RAMEB), low methylated- β -cyclodextrin (CRYSMEB), sulfobutylether β -cyclodextrin (SBE-BCD) and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD). HPBCD (Fig. 1b) is one of the hydrophilic derivatives of BCD [10,19] obtained by chemical modification of alkaline solution of BCD with propylene oxide (solubility in water at 25 °C = 500 mg.mL⁻¹) [20].

Metronidazole [1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl 5-nitroimidazole] (MTZ) (Fig. 2) is one of the most important antibiotics in the group of 5-nitroimidazoles. It was discovered in 1950 at Poulenc research laboratories. At first, it proved its effectiveness against infections

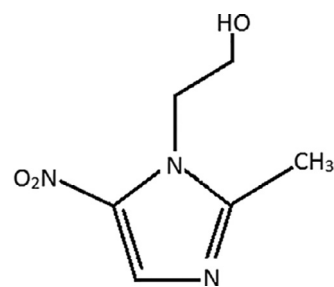


Fig. 2. Chemical structure of metronidazole.

caused by *Trichomonas vaginalis*. Currently, it is prescribed to treat several infections caused by various microorganisms [21–23]. MTZ is widely used in oral administration but other forms exist such as gels, ointments, suppositories, and also for periodontal diseases [23,24]. The weak apparent solubility of MTZ in water limits its use for aqueous formulations [21,25]. Repetitive oral administration of MTZ causes real problems in patients such as vomiting and nausea, and provokes concerns about its carcinogenicity [23,24]. Therefore, the introduction of MTZ into a DDS is recommended to reduce its side effects, extend or control its release for good compliance, improve its solubility, and reach the required bioactivity. Many research studies used MTZ as a model drug to develop a DDS for oral administration, among them; we have those who have formed ICs with CDs to enhance its water solubility and stability [25–27]. Apart from CDs, others used NPs as an incorporating matrix to control and sustain the release behavior of MTZ [28,29].

Very limited studies have been worked on the introduction of (active compounds -CDs) IC in nanostructures such for drug delivery [1,15,21,30], essential oils [31], food chemistry [32], flavors and fragrances such as vanillin [33] and menthol [34]. That showed a prolonged shelf life and stability at high temperatures when they have been incorporated into the CDs cavity before being encapsulated in nanosystems.

In this study, MTZ was complexed with BCD and HPBCD to form ICs using an aqueous solution-stirring method followed by lyophilization. The study focused firstly on assessing the potential of the two CDs to improve MTZ's apparent solubility and investigate their ability to enhance its antibacterial activity against various bacteria. Association constants and thermodynamic parameters have been estimated to deliver quantitative data concerning the incorporation of MTZ while complexed with the two CDs. The structure and physicochemical properties of both ICs were evaluated by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) studies, 2D NMR, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), thermal analysis, and *in vitro* drug release studies. The second part of this study was the development

of the first time carried out of MTZ-HPBCD inclusion complex - loaded chitosan nanoparticles by ionic gelation to control its release. The obtained nanoparticles were characterized by FTIR, and *in vitro* dissolution study was carried out. The morphology and size distribution were determined using transmission electron microscopy (TEM), field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), and dynamic light scattering (DLS).

2. Experimental

2.1. Materials

Metronidazole (MTZ) was supplied by AAHP Co.Ltd. (Constantine, Algeria). β -cyclodextrin (BCD), 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) (molecular weight, 1460 Da/ degree of substitution, 0.8), and chitosan (CS) medium molecular weight (190,000–310,000 Da) were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium tripolyphosphate (TPP) was purchased from Acros Organics. Mueller–Hinton broth (MHB) was purchased from Scharlau Microbiology. All other reagents are of analytical grade. All products were used without further purification.

2.2. Stoichiometry by Job's plot (continuous variation method)

The stoichiometry of MTZ-BCD and MTZ-HPBCD ICs was determined by the continuous variation method (Job's plot) [35]. Using this method we vary the concentrations of the guest and host molecule and we examine the physical property (P), which could be either a chemical shift ($\Delta \delta$) for NMR [36], an intensity for fluorescence spectroscopy (I) [37], or absorbance (ABS) for UV–VIS spectroscopy [35]; the latter which was used in this work. A solution series was prepared at 293.1 K for each CD and MTZ in various concentrations provided that the sum of the concentrations ([MTZ] + [CDs]) was kept constant. ABS was measured at λ_{\max} for each solution with a UV–Vis spectrophotometer (Varian Cary 60, Agilent Technologies). The stoichiometry of the ICs was obtained by plotting $\Delta \text{ABS} \times R$ against R , where $R = [\text{MTZ}] / ([\text{MTZ}] + [\text{CDs}])$ and ΔABS is the difference in absorbance of MTZ with and without CDs. The value of R corresponds to the maximum deviation giving us the stoichiometry (*i.e.*, the MTZ:CDs ratio is 1:1 if $R = 0.5$, 1:2 if $R = 0.33$, and 2:1 if $R = 0.66$) [38].

2.3. The association constants (K_a) and thermodynamic parameters

The association constants (K_a) of MTZ-BCD and MTZ-HPBCD ICs have been calculated by UV–VIS spectroscopy. As the MTZ molecule goes from the polar aqueous solution to the apolar cavity of CDs to form ICs, a change in the molar extinction coefficient ($\Delta \epsilon$) of the chromophore of MTZ occurs. The changes in absorbance (ΔA) of MTZ were studied against increasing concentrations of CDs at different temperatures [38,39]. The double reciprocal plots have been obtained using (Eq. (1)), according to the reliable Benesi–Hildebrand method for 1:1 host-guest IC.

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon [\text{MTZ}] K_a} \times \frac{1}{[\text{CD}]} + \frac{1}{\Delta \epsilon [\text{MTZ}]} \quad (1)$$

Where ΔA is the difference in absorbance of MTZ with and without BCD or HPBCD.

The enthalpy and entropy changes (ΔH and ΔS) of MTZ-BCD and MTZ-HPBCD ICs have been calculated using the van't Hoff equation (Eq. (2)). The free Gibbs energy change (ΔG) was obtained from the Gibbs–Helmholtz equation (Eq. (3))

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (3)$$

Where, R stands for the gas constant [$\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$] and T denotes the absolute temperature [K].

2.4. Phase-solubility study

A phase-solubility study was carried out to compare the solubilization effect between BCD and HPBCD on the solubility of MTZ according to Higuchi and Connors [40]. An excess amount of MTZ (70 mM) was mixed with increasing amounts of CDs (14–70 mM) in amber glass vials using distilled water as a solvent. Vials were sealed and shaken at 25 °C under mild agitation (120 rpm) for five days until reaching equilibrium. After the indicated period, all samples were filtered through a 0.22 μm syringe filter and appropriately diluted. Then, the concentration of MTZ for each sample was spectrophotometrically determined at 320 nm (Varian Cary 60, Agilent Technologies). The complexation efficiency (CE) and the molar ratio to form a water-soluble complex (MTZ:CDs) have been calculated from the straight line of phase solubility diagrams using the following equations.

$$\text{CE} = \frac{\text{Slope}}{1 - \text{Slope}} \quad (4)$$

$$\text{MTZ} : \text{CDs} = 1 : \left(\frac{\text{CE} + 1}{\text{CE}} \right) \quad (5)$$

2.5. Preparation of physical mixtures (PMs) and inclusion complexes (ICs)

The syntheses of physical mixtures (PMs) and inclusion complexes (ICs) were based on the results obtained in the Job's plot, phase solubility studies, and Benesi–Hildebrand with a molar ratio of 1:1.

Physical mixture (PM): Physical mixtures were prepared by mixing the masses of MTZ and CDs at a 1:1 molecular ratio in a mortar until a mixture of homogeneous appearance was obtained.

Inclusion complexes by the freeze-drying method: Freeze-dried inclusion complexes (ICs) were prepared by mixing the required stoichiometric amount of MTZ (1 mmol) with CDs (1 ml) using distilled water (30 mL) as a solvent under mild stirring (120 rpm) for 24 h at 25 °C. The resulting solution was lyophilized with a freeze dryer (Alpha 1–4 LD plus, Martin Christ) for 18 h. The lyophilized products were used for all characterization analyse.

2.6. Characterization of ICs

2.6.1. ^1H NMR and two-dimensional (2D) NMR spectra analysis

To confirm the inclusion of MTZ within CDs and examine the spatial disposition of MTZ into the CDs cavity, ^1H NMR spectra as well 2D nuclear overhauser effect spectroscopy (NOESY) and rotating frame overhauser effect spectroscopy (ROESY) were recorded at 25 °C in D_2O solvent with Bruker Avance 400 MHz spectrometer.

2.6.2. FTIR analysis

FTIR spectra of MTZ, HPBCD, MTZ-BCD IC, and MTZ-HPBCD IC were obtained between 500 and 4000 cm^{-1} by a spectrometer (iD7 ATR Nicolet iS5, Thermo Fischer Scientific Inc, USA).

2.6.3. Thermogravimetric analysis (TGA) and differential thermogravimetric analysis (DTG)

The thermal decomposition of the samples was studied in terms of percentage of weight loss using a thermogravimetric analyzer (Q50, TA Instruments) at a heating rate of 10 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ from 25 °C to 500 °C under a nitrogen gas flow.

2.6.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC (Q2000, TA Instruments) was used to study the thermal behavior of MTZ, BCD, and HPBCD, as well as their PMs and ICs between 25 and 300 °C at a heating rate of 10 °C.min⁻¹ under nitrogen gas.

2.6.5. Scanning electron microscopy (SEM)

To study the various changes brought about by the inclusion of MTZ in CDs on the morphology of complexes. MTZ, BCD, HPBCD, MTZ-BCD PM, MTZ-BCD IC, MTZ-HPBCD PM, and MTZ-HPBCD IC were visualized by scanning electron microscope (TESCAN, VEGA3). The samples were deposited on copper adhesive tape with an accelerating voltage of 30.0 kV.

2.6.6. In vitro release studies of ICs

In vitro drug release of MTZ from pure MTZ, MTZ-BCD PM, MTZ-BCD IC, MTZ-HPBCD PM, and MTZ-HPBCD IC was carried for about 2 h time in 300 mL of PBS (pH = 7.4) and distilled water (Temperature = 37 °C ± 0.5 °C, shaking rate = 70 rpm). Every 5 min, 5 mL of dissolution medium was taken and replaced by 5 mL of fresh dissolution medium. The samples taken were filtered through a 0.22 µm syringe filter to measure the amount of MTZ released with a spectrophotometer (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) at 320 nm.

2.7. Antibacterial activity (ABA)

To highlight the antibacterial capacity of both ICs, a comparative study between the antibacterial activity (ABA) of pure MTZ and their corresponding ICs was carried out by micro-well dilution assay [41,42] against four ATCC (American type culture collection) bacterial strains: Gram-negative (*Escherichia coli* (*E.coli*) 25922, *Salmonella* 13076) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 25923, *Bacillus cereus* 10876). The MTZ concentration was the same in all three samples. Bacterial strains were cultivated at 37 °C in Mueller-Hinton broth (MHB) for 18 h of incubation. Microbial suspensions were made in sterile saline (0.9% NaCl) and their turbidity was standardized to 0.5 McFarland (corresponding 10⁶ CFU.mL⁻¹). The stock solutions (170 µg.mL⁻¹) of the samples were prepared in sterile distilled water and two serial dilutions were performed (85 and 42.5 µg.mL⁻¹). The 96-well plates were prepared by dispensing into each well a 100 µL of MHB inoculated with 10⁶ CFU.mL⁻¹ and 100 µL aliquot from the stock or the serial dilutions solution. The negative control consists of 200 µL of MHB inoculated with 10⁶ CFU.mL⁻¹. The plates were mixed on a microplate shaker at 200 rpm for 15 s and then incubated at 37 °C for 24 h. Microbial growth was determined by reading optical density at 630 nm using a microplate reader (ELx800, BioTek Instruments, USA).

2.8. Entrapment of MTZ-HPBCD IC into CS-TPP NPs

2.8.1. Synthesis of NPs

Synthesis of CS-TPP blank NPs: blank NPs were synthesized by ionic gelation technique with TPP crosslinking as described in previous reports [43–45]. CS was dissolved in 3% acetic acid solution at 0.1% (w/v). Then, the pH of the CS solution was adjusted to 4.5 using 0.1 N NaOH. TPP was dissolved in deionized water to yield a concentration of 1 mg.mL⁻¹ at pH = 4.1 (pH was adjusted by hydrochloric acid). NPs were spontaneously formed by pouring (dropwise) TPP solution (1 mL) into CS solution (5 mL) under a high-speed stirring (8000 rpm). To ensure the crosslinking process the mixture was stirred for an additional 30 min. The obtained suspension was subsequently centrifuged at 15,000 rpm for 40 min at 4 °C by (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Fisher Scientific). The pellet was dispersed in Milli-Q water and sonicated for 5 min, then

freeze-dried with (Alpha 1–4 LD plus, Martin Christ) for 16 h. The freeze-dried NPs were either re-dispersed in Milli-Q water or, used directly for characterization and other experiments.

Synthesis of MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs: MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs were prepared and recovered using the similar procedure as described above for preparing the CS-TPP blank NPs. The MTZ-HPBCD IC (1 mL) was mixed with TPP solution (1 mL) before the nanoparticles formation. This mixture was then added dropwise into the CS solution (5 mL) which leads to the spontaneous formation of NPs and the encapsulation of the IC into NPs.

2.8.2. Characterization of MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs

2.8.2.1. FTIR analysis. The FTIR spectra of CS, TPP, MTZ-HPBCD IC, CS-TPP blank NPs, and MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs were recorded using a Nicolet iS5 Spectrometer equipped with an iD7 ATR accessory (Thermo Fischer Scientific Inc, USA), over a scan range of 500–4000 cm⁻¹.

2.8.2.2. Morphology and size. The particle size and morphology of NPs were evaluated by transmission electron microscopy (TEM) and field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). Diluted suspension of MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs was ultrasonicated for 5 min to avoid aggregation and then dropped onto the carbon-coated copper grid. The grid was examined under 200 kV accelerating voltage with a transmission electron microscope (G2, Tecnai). Freeze-dried MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs was deposited on carbon adhesive tape. FE-SEM images were recorded with a field emission scanning electron microscope (JEOL JSM-7100F JEOL Ltd, Japan) at an acceleration voltage of 2 kV. Hydrodynamic size and distribution of NPs were examined by dynamic light scattering (Zetasizer Ultra, Malvern Panalytical).

2.8.3. In vitro drug release and kinetic analysis of dissolution data of NPs

The *in vitro* drug release from MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs was investigated in phosphate buffer saline (PBS) pH = 7.4 (Temperature = 37 °C ± 0.5 °C, shaking rate = 70 rpm). At regular time intervals, 5 mL were withdrawn from the suspension and replaced by an equal volume of fresh PBS. Samples were filtered through a 0.22 µm syringe filter. The amount of MTZ released was determined spectrophotometrically at λ = 320 nm (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies). To describe the release kinetics and mechanism of NPs, the release data were fitted to the following models: zero-order (Eq. (6)), first-order (Eq. (7)), and Korsmeyer-Peppas (Eq. (8)) [46].

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (6)$$

$$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t / 2.303 \quad (7)$$

$$Q_t = K_{KP} t^n \quad (8)$$

Where Q_t is the quantity of drug released in time t and Q_0 is the initial quantity of the drug. K_0 , K_1 , and K_{KP} are the speed constants of each model. n is the release exponent.

3. Results and discussion

3.1. Stoichiometry by Job's plot (continuous variation method)

For both curves (Fig. 3), the maximum value of R was 0.5 which indicates a stoichiometry of 1:1 between MTZ and both CDs.

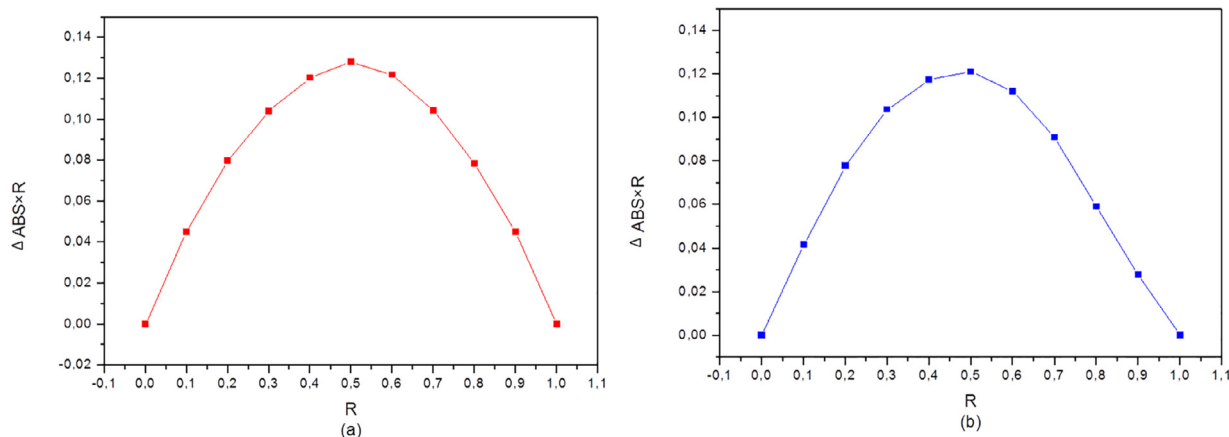


Fig. 3. Job's plots at 293.1 K and $\lambda_{\max} = 320$ nm of (a) MTZ-BCD system and (b) MTZ-HPBCD system. Where $R = [\text{MTZ}] / ([\text{MTZ}] + [\text{CDs}])$ and ΔABS = difference between absorbance of MTZ without and with CDs.

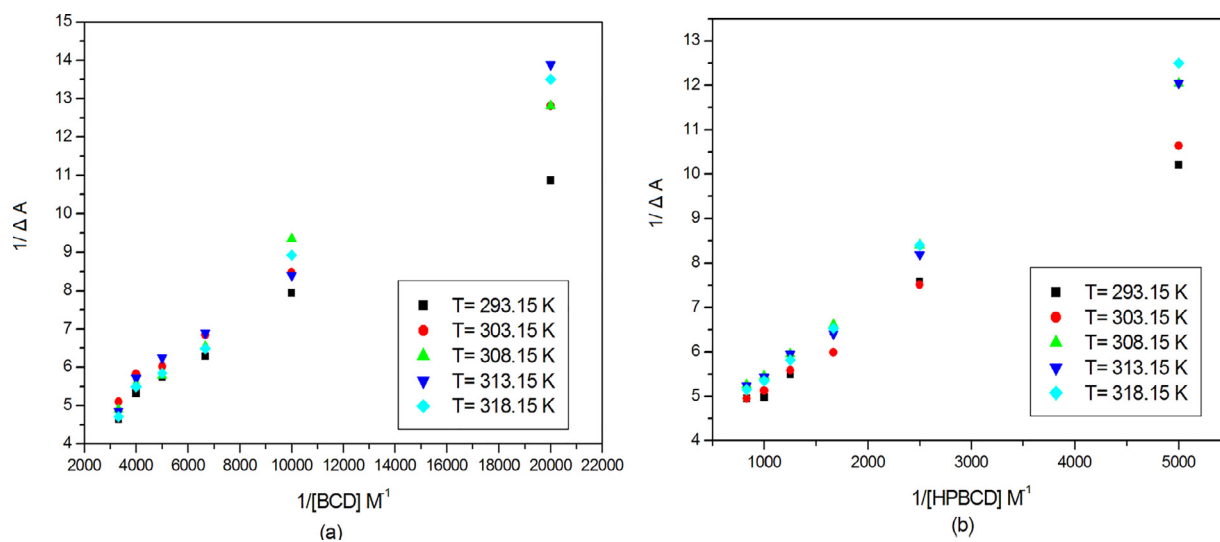


Fig. 4. Benesi-Hildebrand plots of (a) MTZ-BCD system and (b) MTZ-HPBCD system.

Table 1

Association constant (K_a) and thermodynamic parameters during the association of MTZ with BCD and HPBCD.

Temperature (K)	BCD				HPBCD			
	$K_a \times 10^3$ [M^{-1}]	ΔG [$kJ.mol^{-1}$]	ΔH [$kJ.mol^{-1}$]	ΔS [$J.K^{-1}.mol^{-1}$]	$K_a \times 10^3$ [M^{-1}]	ΔG [$kJ.mol^{-1}$]	ΔH [$kJ.mol^{-1}$]	ΔS [$J.K^{-1}.mol^{-1}$]
293.15	9.635	-22.357			3.071	-19.629		
303.15	7.625	-22.530			2.728	-19.857		
308.15	7.171	-22.744	-12.159	34.53	2.452	-19.971	12.943	22.807
313.15	6.823	-22.984			2.257	-20.085		
318.15	6.488	-23.217			2.020	-20.199		

3.2. The association constants (K_a) and thermodynamic parameters

The association constant values of each system have been determined from Benesi-Hildebrand plots over the temperature range from 293.15 K to 318.15 K (Fig. 4) by dividing the intercept by the slope of the straight line of $1/\Delta A = f([\text{CDs}])$ plots [38,39]. The linearity of the plots (Fig. 4) suggests 1:1 stoichiometry for both ICs. The van't Hoff graphs (Fig. 5) plotted over a short range of temperature (293.15–318.15 K) show a linear function for both systems between $\ln(K_a)$ and $(1/T)$. The K_a values decreased with increasing temperature, with negative values of ΔH for MTZ-BCD and MTZ-HPBCD ICs (Table 1), suggesting that the inclusion process is

exothermic. The values of ΔG (Table 1) were found negative, indicating that the inclusion of MTZ in BCD and HPBCD takes place spontaneously [39]. For both systems, entropy gain was observed (Table 1) which is favorable for spontaneity and stability of complex formation and making the overall process thermodynamically favorable. Usually, an increase in entropy value is considered as a sign of the presence of hydrophobic interactions between host and guest. A combination of a positive value of ΔS and a negative value of ΔH means that the hydrophobic interactions, hydrogen bonding, and van der Waals forces take places in ICs formation. In the same respect, a positive value of ΔS with a higher negative value of ΔH suggests that the driving forces for the formation of com-

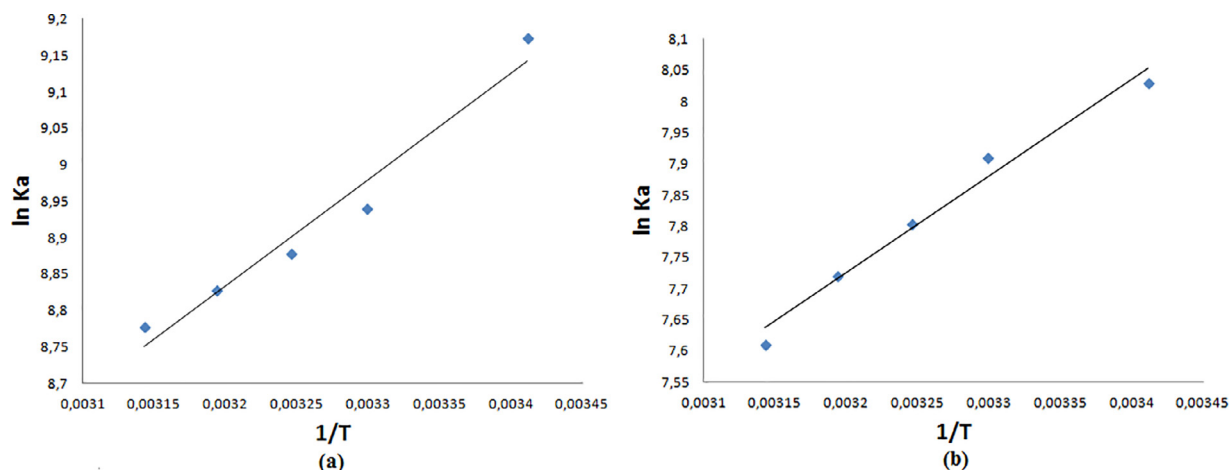


Fig. 5. Van't Hoff plots of the formation of (a) MTZ-BCD IC and (b) MTZ-HPBCD IC.

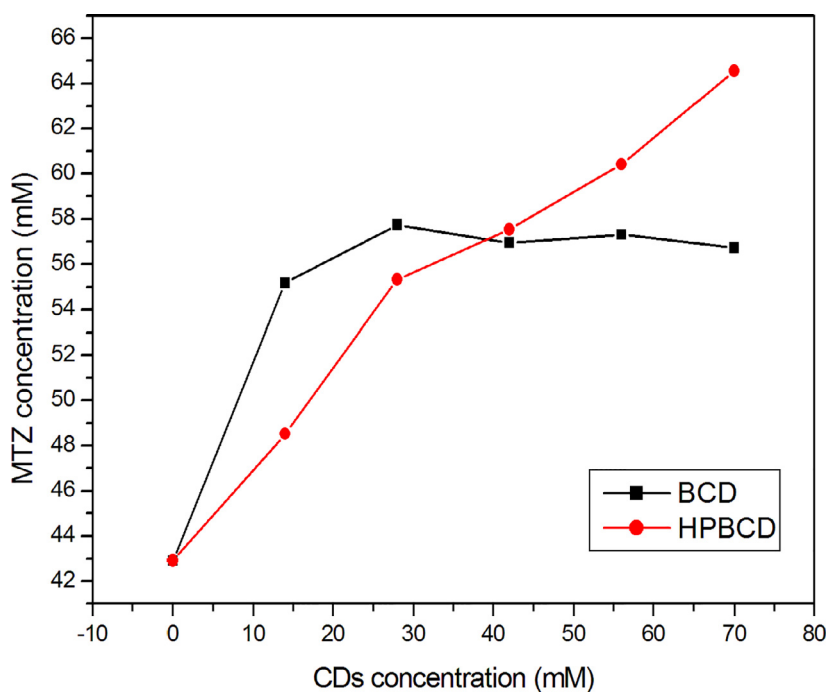


Fig. 6. Phase solubility diagrams of MTZ with BCD and HPBCD at 25 °C.

plexes are essentially hydrogen bonds and electrostatic forces [47]. Thus, it's very likely that the hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and electrostatic forces are present in the MTZ-BCD and MTZ-HPBCD complexes formation. The positive value of entropy is also probably due to the incorporation of MTZ in the CDs cavity and the release of water molecules [47,48].

3.3. Phase solubility study

The phase solubility diagrams for MTZ-BCD and MTZ-HPBCD complex formation were illustrated in Fig. 6. The first portion of the MTZ-BCD solubility curve shows an increase in the apparent solubility of MTZ as a function of BCD before the plateau region is reached, while the MTZ solubility increased linearly with the concentrations of the HPBCD. This might be due to the low solubility of BCD in the water at 25 °C compared with HPBCD, which is soluble in water due to the hydroxyl groups present in the molecule. The solubility curve of MTZ in the presence of HPBCD is classified as AL-type and the solubility diagram of MTZ-BCD belongs to

Table 2

The complexation efficiency (CE) and molar ratio to form a water-soluble complex (MTZ:CD₅).

	BCD	HPBCD
CE	0.17	0.42
Molar ratio to form a water-soluble complex (MTZ:CD ₅)	1:7	1:3

a B-type according to the classification introduced by Higuchi and Connors [40]. The ascending linear portion of MTZ-BCD and MTZ-HPBCD curves had a slope of less than one, suggesting that 1:1 stoichiometry was formed between MTZ and the two CDs [49]. The complexation efficiency (CE) and the molar ratio to form a water-soluble complex (MTZ:CD₅) have been calculated and listed in (Table 2). The (MTZ:CD₅) was 1:7 for BCD and 1:3 for HPBCD, which means that one in seven BCD molecules in an aqueous medium was able to form a soluble complex with MTZ, while only one out of three HPBCD molecules was able to form it [50].

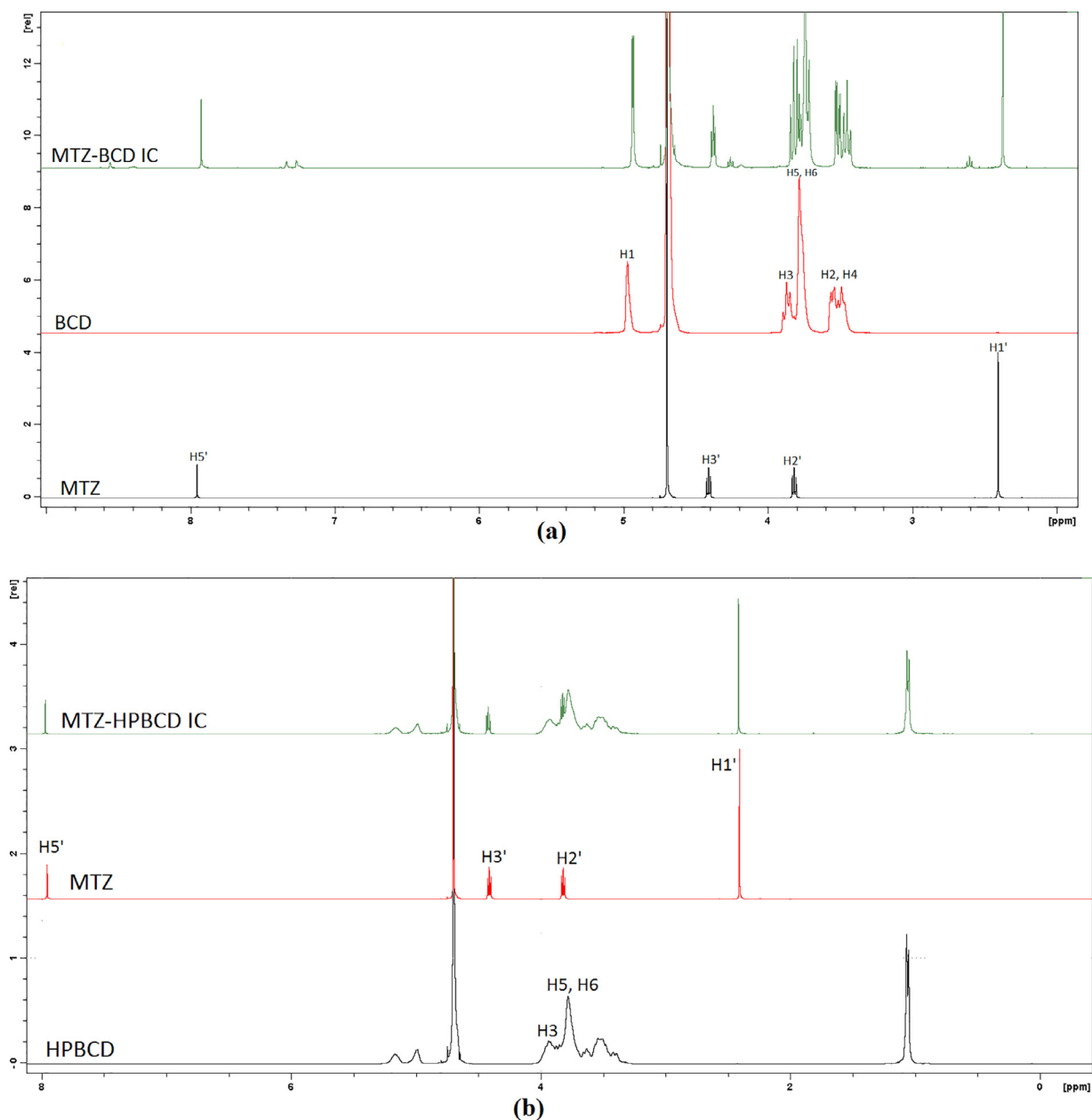


Fig. 7. Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra of (a) metronidazole (MTZ), β -cyclodextrine (BCD), and their corresponding inclusion complexes (MTZ-BCD IC) in D₂O. (b) metronidazole (MTZ), 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD), and their corresponding inclusion complexes (MTZ-HPBCD IC) in D₂O.

3.4. Characterization of ICs

3.4.1. ¹H NMR and 2D NMR spectra analysis

3.4.1.1. ¹H Chemical shifts. The ¹H NMR spectra of the MTZ, BCD, HPBCD, and their corresponding inclusion complexes are shown in Fig. 7. The chemical shifts (δ) data in parts per million (ppm) of BCD and HPBCD before and after the inclusion complexation were listed in Table 3. In the presence of MTZ, all CDs protons resonances were modified compared to those of raw CDs. A marked upfield displacement for the internal protons of CDs (H3, H5, and H6) was observed, this shielding effect might be due to the incorporation of the aromatic rings of MTZ that are rich in π electrons [51]. As expected, weak chemical shifts for protons of the external cavity (H1, H2, and H4) were observed, which could be due to the rearrangement of CDs after inclusion. For MTZ-HPBCD IC the displacement order of the inner protons was as follows $\Delta \delta H3 < \Delta \delta$

$H5 < \Delta \delta H6$. In this situation, there are two assumptions: either the MTZ was well included up to the narrow rim or it was incorporated into the HPBCD cavity via the narrow rim. On the other hand, the order for MTZ-BCD IC was as follows $\Delta \delta H3 > \Delta \delta H5 > \Delta \delta H6$, which means that MTZ was introduced through the wider rim.

3.4.1.2. 2D NOESY and ROESY experiments. 2D NMR spectroscopy is a relevant technique to determine the spatial closeness between the guest protons and the inner CDs protons based on the nuclear overhauser effect (NOE) [38,52,53]. NOE cross-peaks may appear between the inner CDs protons and the protons of the guest if they are close to each other in a less than 3–4 Å internuclear distance [51]. 2D ¹H NOESY and ROESY spectra of MTZ-CDs ICs were investigated to provide decisive evidence about the spatial proximity of MTZ to the inner protons of the CDs cavity. The inspection of the NOESY and ROESY maps (Fig. 8a and c) of the MTZ-BCD IC

Table 3
¹H RMN Chemical shifts (δ) data in ppm of BCD and HPBCD.

BCD				HPBCD			
H assignment	δ (Free)	δ (Complex)	$\Delta \delta^{(a)}$	H assignment	δ (Free)	δ (Complex)	$\Delta \delta^{(a)}$
H1	4.974	4.942	-0.032	H1	5.1616	5.1594	-0.0022
H2	3.565	3.534	-0.031	H2	3.5387	3.5345	-0.0042
H3	3.85	3.786	-0.064	H3	3.938	3.927	-0.011
H4	3.493	3.453	-0.04	H4	3.4198	3.4156	-0.0042
H5	3.782	3.726	-0.056	H5	3.8505	3.8366	-0.0139
H6	3.785	3.744	-0.041	H6	3.8732	3.8581	-0.0151

(a) : $\Delta \delta = \delta_{(\text{complex})} - \delta_{(\text{free})}$.

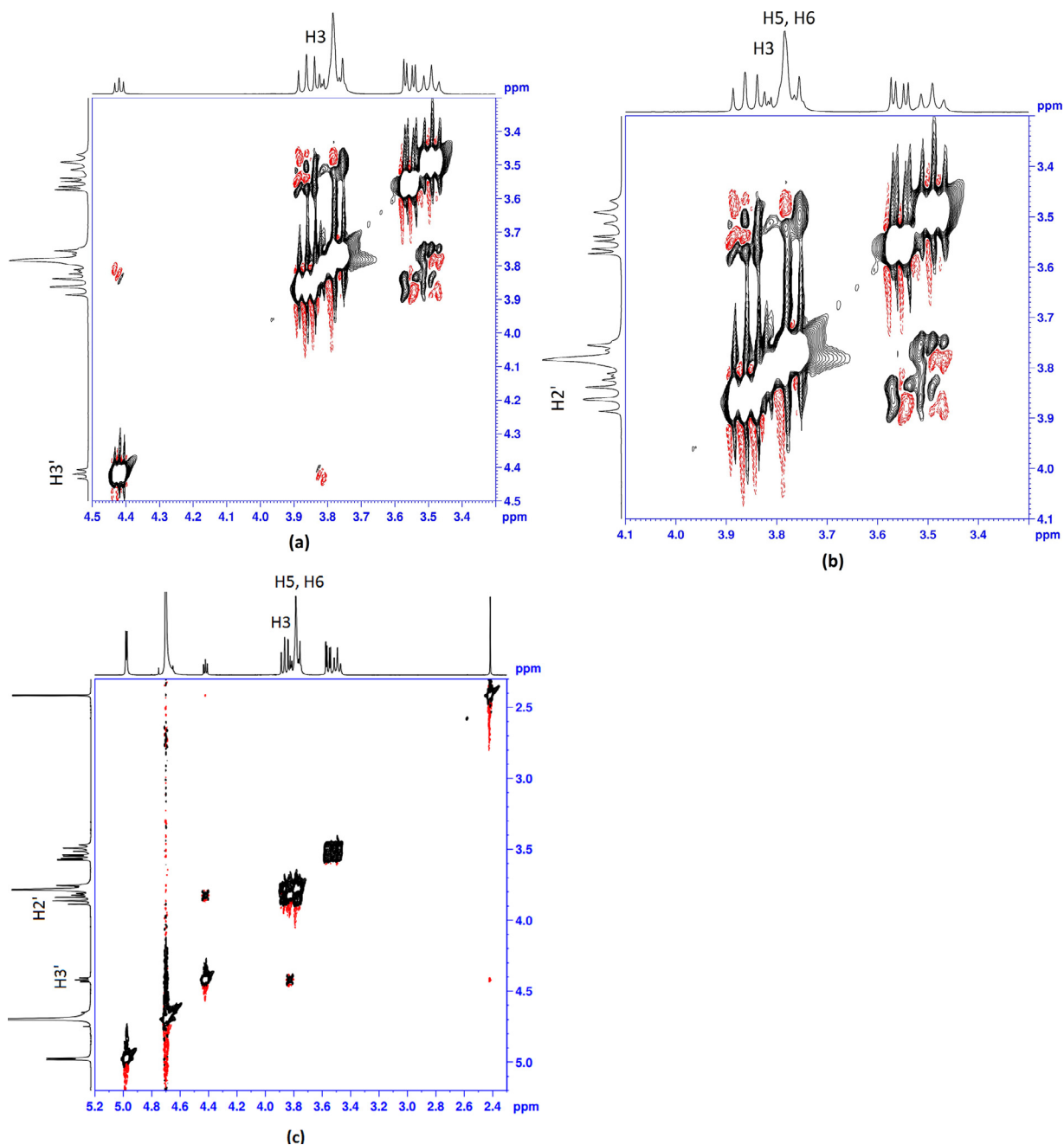


Fig. 8. Expanded region of two-dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy of MTZ-BCD IC in D₂O (a) NOESY (b) NOESY for 5 h (c) ROESY for 9 h.

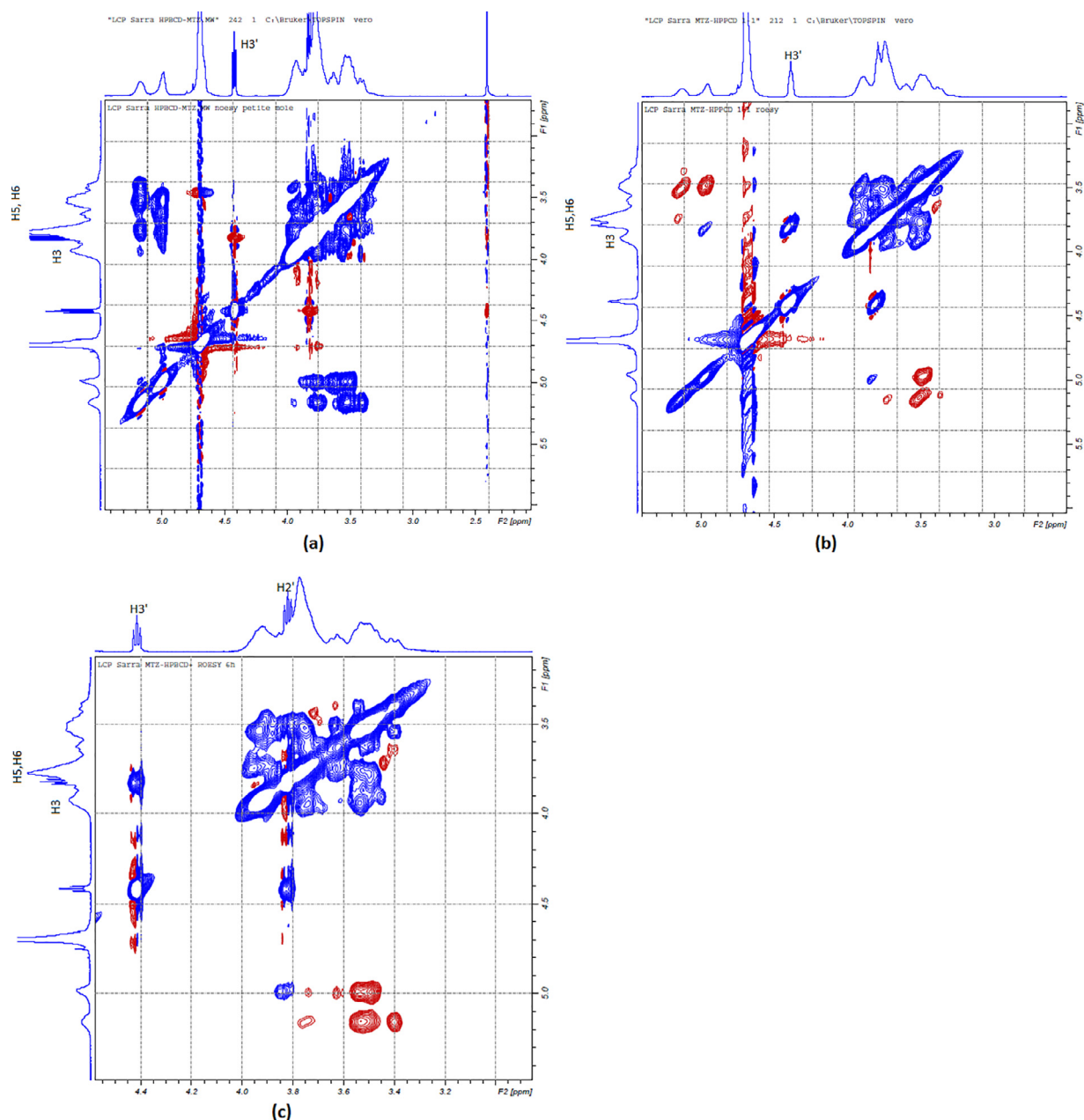


Fig. 9. Expanded region of two-dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy of MTZ-HPBCD IC in D_2O (a) NOESY (b) ROESY (c) ROESY for 6 h.

indicates that the $H3'$ of MTZ was in correlation with the $H3$ of BCD. The expansion of the NOESY spectra for 5 h (Fig. 8b) shows intermolecular cross-peaks between $H2'$ of MTZ and the inner protons ($H3$, $H5$, and $H6$) of BCD. The expansions of the NOESY and ROESY spectra (Fig. 9a-c) show a set of cross-peaks between $H3'$ of MTZ and the inner protons ($H3$, $H5$, and $H6$) of HPBCD. ROE signals (Fig. 9c) were observed between $H2'$ of MTZ protons and the inner protons of HPBCD.

The weak chemical shifts of the external protons, the upfield displacement of the inner protons of both CDs, and their interaction with MTZ protons demonstrate that the MTZ is deeply internalized in both CDs cavity.

3.4.2. FTIR analysis

The MTZ, HPBCD, MTZ-BCD IC, and MTZ-HPBCD IC FTIR spectra are shown in Fig. 10. The MTZ spectrum shows peaks at 3210.20, 3102.22, 1533.74, 1366.10, 1187.64, 1072.99, and 863.16 cm^{-1} indi-

cating respectively, OH stretching vibration, sp^2 CH/C=CH stretching, NO₂/NO stretching vibration, N = O stretching vibration, stretching vibration of a tertiary amine group, CO/C-OH stretching vibration, and C-NO₂ stretching vibration [54,55]. The BCD spectrum (Fig. 10a) shows a band of OH stretching at 3284.43 cm^{-1} and other peaks at 2924.46, 1647.12, 1152.01, 1076.07, and 1020.52 cm^{-1} are due respectively to asymmetrical CH stretching vibration, H-O-H bending vibration, C-O-C glucosidic stretching vibration, C-C stretching vibration, and C-O stretching link [56-58]. The HPBCD spectrum (Fig. 10b) shows peaks at 3343.72, 2968.68, 1080.31, and 1022.00 cm^{-1} corresponding respectively to O-H stretching vibration, anti-symmetric vibration of methyl groups in hydroxypropyl, C-O- vibration of the hydroxyl group, and stretching link C-O-C. Peaks between 950 and 530 cm^{-1} show the ring of both CDs (Fig. 10a and b) [57]. The spectra of MTZ-BCD IC (Fig. 10a) and MTZ-HPBCD IC (Fig. 10b) are similar to the spectra of pure CDs, the narrow peak corresponding to the O-H stretching vibration of MTZ

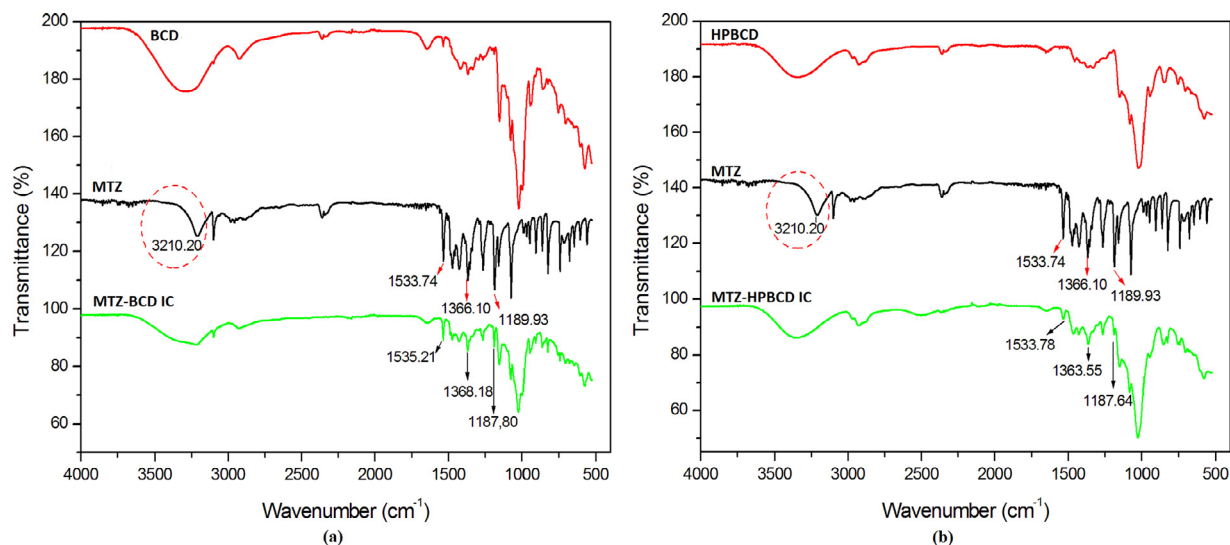


Fig. 10. FTIR spectra of (a) metronidazole (MTZ), β -cyclodextrine (BCD) and their corresponding inclusion complexes (MTZ-BCD IC), (b) metronidazole (MTZ), 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD), and their corresponding inclusion complexes (MTZ-HPBCD IC).

has disappeared in both ICs and a large band of O–H stretching vibration with less intensity appeared in the two complexes. This suggests the formation of intermolecular hydrogen bonds between the MTZ and the CDs. The characteristic peaks of MTZ at 1533.74, 1366.10, and 1187.64 cm^{-1} appeared, but with a very low intensity due to its incorporation in the cavity of the CDs and the participation of the aromatic cycle in the formation of H-bonding with CDs for the formation of MTZ-CDs ICs [59]. All other MTZ peaks disappeared. Disappearance and reduction in the MTZ peak intensity indicate the restriction of the stretching vibrations. This is the result of MTZ insertion into the CDs cavity, which consequently limits the movement of the incorporated molecule. The intense peak corresponding to the C–O–C stretching link of CDs was observed with the same intensity, which confirms the inclusion of MTZ in the CDs cavities through their axial line [55]. No new peaks appeared in both ICs spectra (Fig. 10a and b) which means that no chemical reaction between MTZ and CDs took place and all changes in the characteristic peaks of pure products are due to the formation of ICs [60].

3.4.3. TGA/DTG analysis

The thermal decomposition of pure products was illustrated in Figs. 11 and 12. The MTZ presented a single decomposition process where it lost 72.64% of its initial weight. BCD and HPBCD had two processes corresponding to the dehydration of water molecules located in the cavity and the decomposition of macrocycles. BCD lost 13.03% to 110.12 $^{\circ}\text{C}$ due to the evaporation of water molecules and 76.79% to 310 $^{\circ}\text{C}$ related to its decomposition. HPBCD dehydration was at 71 $^{\circ}\text{C}$ with a mass loss of 4.82%, and it lost 85.64% of its weight attributed to its degradation at 296 $^{\circ}\text{C}$. The thermograms of the two PMs (Fig. 11b, c) and (Fig. 12) are an overlap of the thermograms of pure products, where we have three mass loss processes corresponding respectively to the dehydration of CDs, degradation of MTZ, and decomposition of CDs, while the thermograms of ICs (Figs. 11b, c and 12) look much more like the thermograms of pure CDs with only two processes (dehydration and decomposition of CDs). The water loss was about 5.4% for MTZ-BCD IC and 2.4% for MTZ-HPBCD IC; the decrease in water loss of ICs compared to the pure CDs might be attributable to the existence of MTZ instead of water in the CDs cavities. The absence of the peak corresponding to the degradation of MTZ in ICs suggests that the inclusion complexation increases the thermal stability of MTZ and proves the successful formation of both ICs.

3.4.4. Differential scanning calorimetry

MTZ (Fig. 13) shows a narrow endothermic peak at 160.27 $^{\circ}\text{C}$ which corresponds to its melting point. BCD and HPBCD have two endothermic peaks corresponding to the dehydration of water molecules located in the cavity and the decomposition of the CDs macrocycles. The thermograms of PMs were overlay thermograms of pure products, meaning that there was no interaction between the MTZ and CDs. While the peak corresponds to the melting point of MTZ disappeared in ICs thermograms, which means that its crystallinity has been reduced and it has been well included in the cavity of the CDs [61]. MTZ-CDs ICs show crystalline structure resulting from the crystalline nature of CDs, different from that of the pure MTZ, further confirming the formation of the ICs.

3.4.5. Scanning electron microscopy (SEM)

The SEM is not a conclusive analysis but it remains a complementary qualitative analysis that gives important information on the morphological aspect of the complexes [62]. The SEM images Fig. 14 show a difference between the morphology of the pure MTZ compared to its two ICs and PMs with BCD and HPBCD. Fig. 14a shows that the MTZ was in the form of crystals that have a prismatic shape with a smooth surface. BCD (Fig. 14b) was of a crystals form of different shapes and sizes. HPBCD (Fig. 14c) appeared as broken hollow spheres. The two PMs (Fig. 14d, e) were an overlay of MTZ and CDs which components can be easily differentiated. The MTZ-BCD IC (Fig. 14f) and MTZ-HPBCD IC (Fig. 14g) show the disappearance of the crystalline form of MTZ and the appearance of a new product that has an amorphous structure. This might be due to the interaction between MTZ and CDs.

3.5. In vitro drug release studies

Fig. 15 shows the percentage of MTZ released over 2 h in distilled water and PBS. The MTZ release profile indicates both ICs' faster rates and bigger quantities in comparison to those of the pure MTZ and PMs. Table 4 indicates that after 10 min the dissolved amount of MTZ from MTZ-HPBCD IC was 89.15% in distilled water and 90.55% in PBS, and from MTZ-BCD IC was 80.83% in distilled water and 82.22% in PBS compared to 47.39% in distilled water and 44.18% in PBS from pure MTZ. The increase in the dissolution rate is mainly due to the inclusion of MTZ in CDs which brought about changes in physicochemical properties such as the transformation of MTZ from the crystalline to the amorphous state

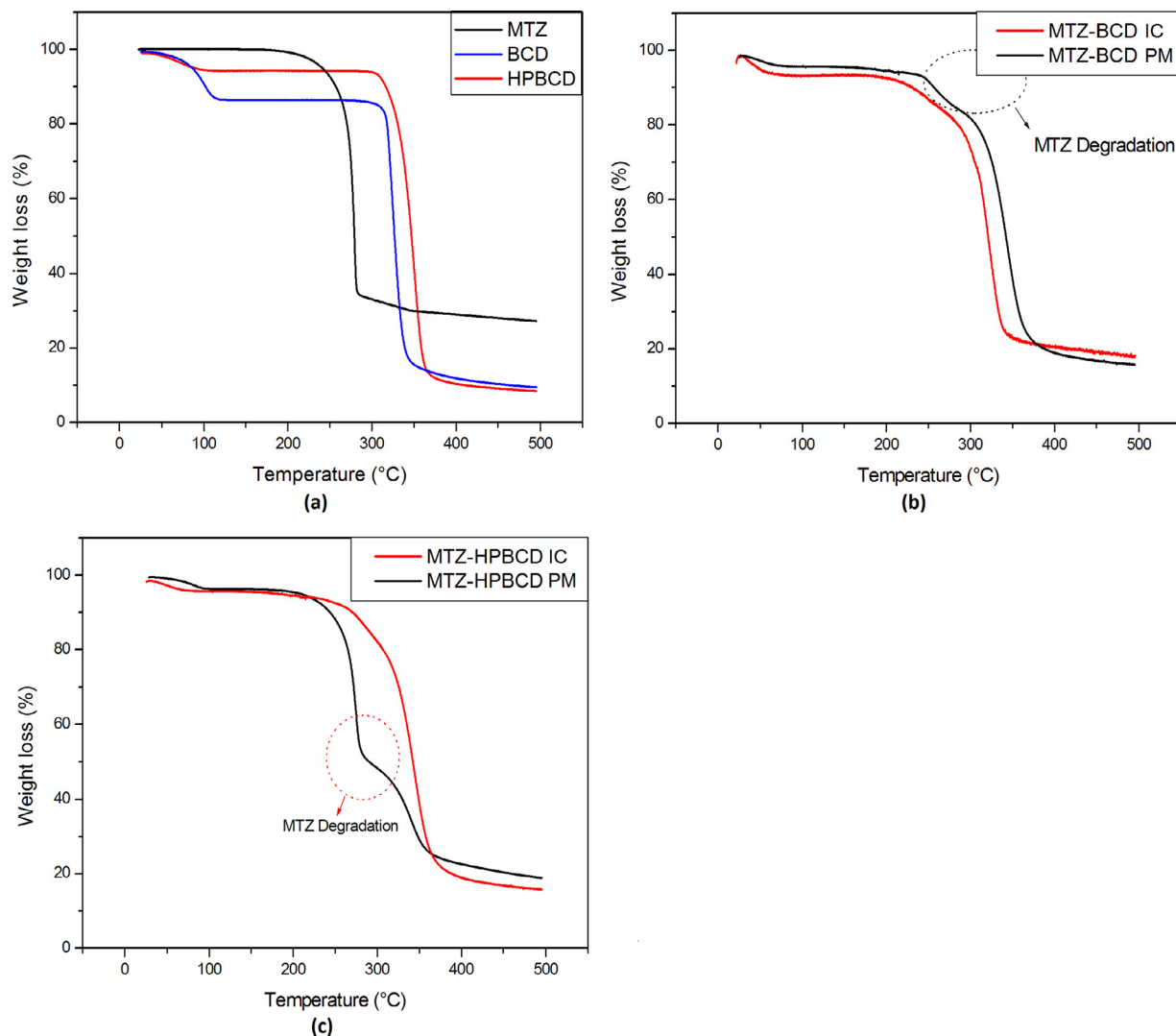


Fig. 11. Thermogravimetric analysis (TGA) of (a) metronidazole (MTZ), β -cyclodextrine (BCD), 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) and their corresponding physical mixtures and inclusion complexes (b) with BCD, and (c) HPBCD.

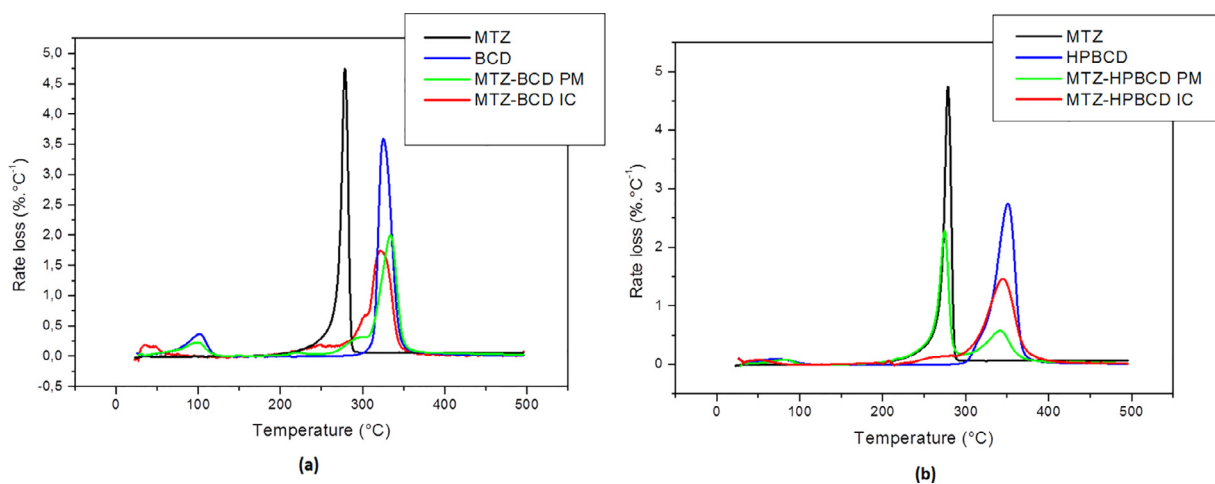


Fig. 12. Differential thermogravimetric analysis (DTG) curves of (a) metronidazole (MTZ), β -cyclodextrine (BCD), and their physical mixtures and inclusion complexes (b) MTZ, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD), and their physical mixtures and inclusion complexes.

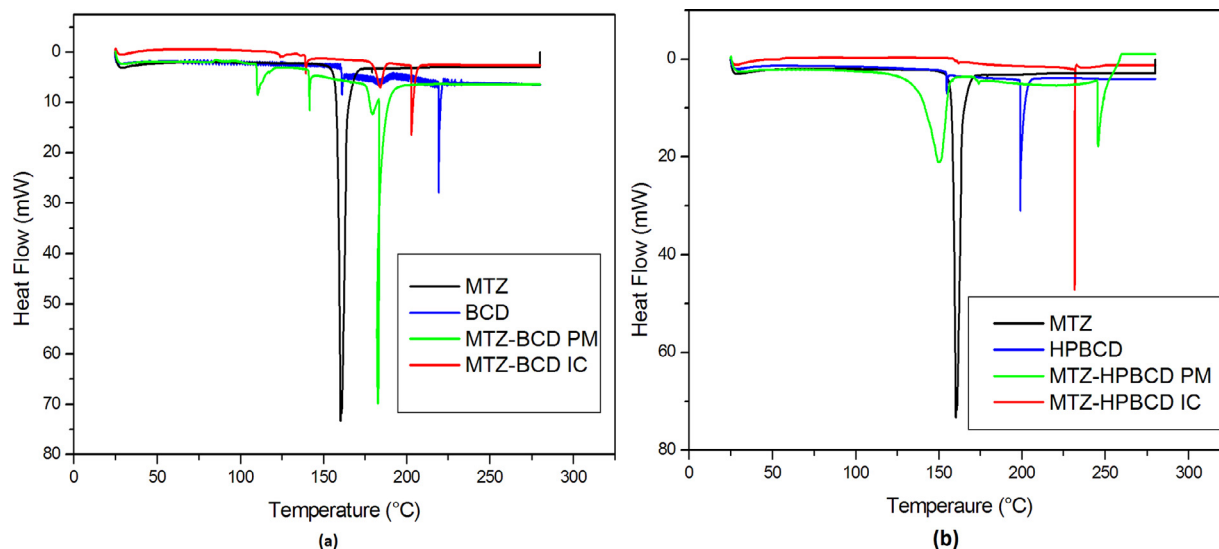


Fig. 13. Differential scanning calorimetric (DSC) thermograms of (a) metronidazole (MTZ), β -cyclodextrin (BCD), and their physical mixtures and inclusion complexes (b) MTZ, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD), and their physical mixtures and inclusion complexes.

approved in sections 3.4.4 and 3.4.5 (SEM and DSC analysis). The high energy of the amorphous state leads to greater molecular mobility; therefore, an increase in the apparent solubility and the rate of dissolution [63–65]. The presence of both CDs, which have surfactant-like properties decreases the interfacial tension between MTZ and the dissolution media and therefore, increases the dis-

solution rate [66]. The formation of hydrogen bridges during the MTZ-CDs ICs formation assumes dehydration of the guest molecule [67] by an increase in entropy (obtained in thermodynamics parameters section), and therefore, improving the affinity towards water [47,67]. During the drug-CD IC formation, no-covalent bonds are formed or broken. The main driving forces directing the for-

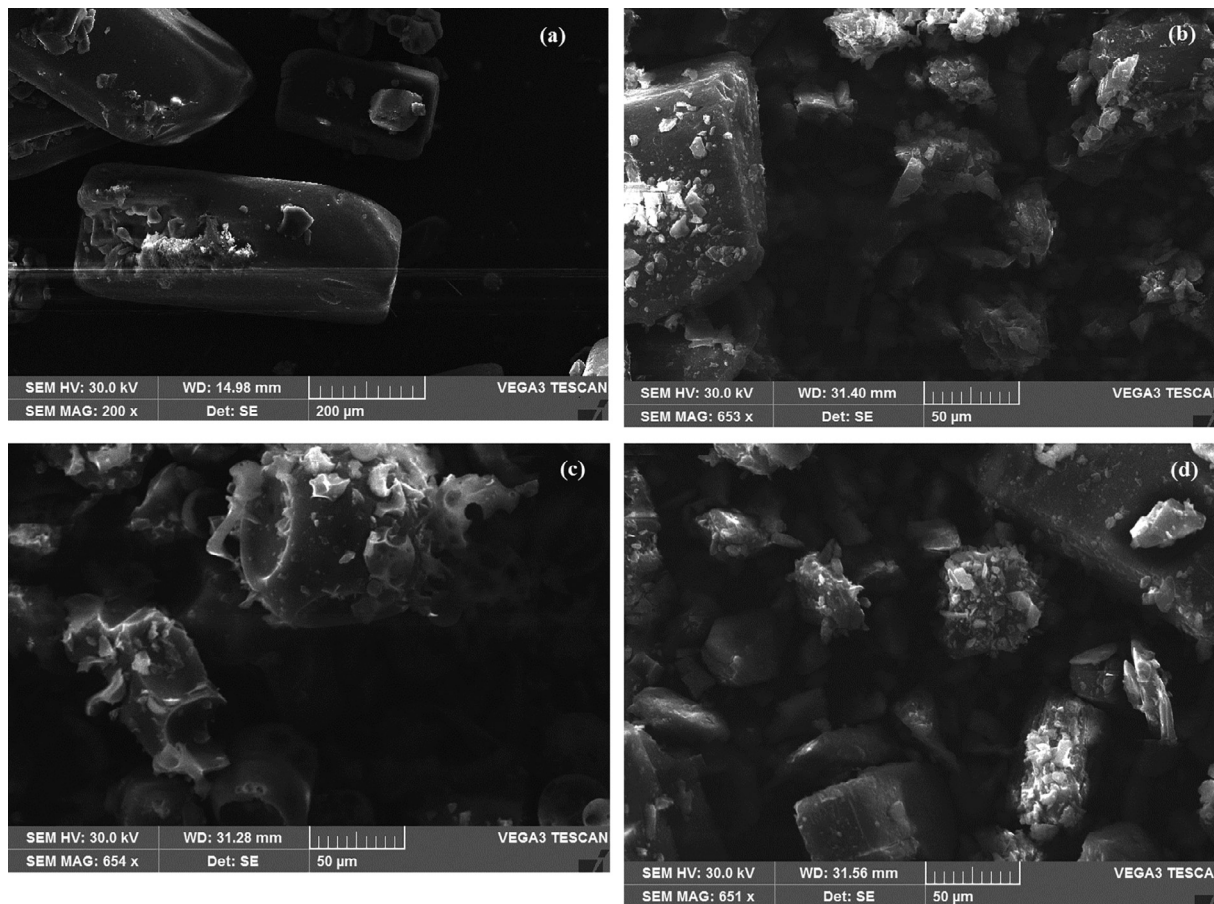


Fig. 14. Scanning electron microphotographs of (a) metronidazole (MTZ), (b) β -cyclodextrin (BCD), (c) 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD), (d) MTZ-BCD PM, (e) MTZ-HPBCD PM, (f) MTZ-BCD IC, and (g) MTZ-HPBCD IC.

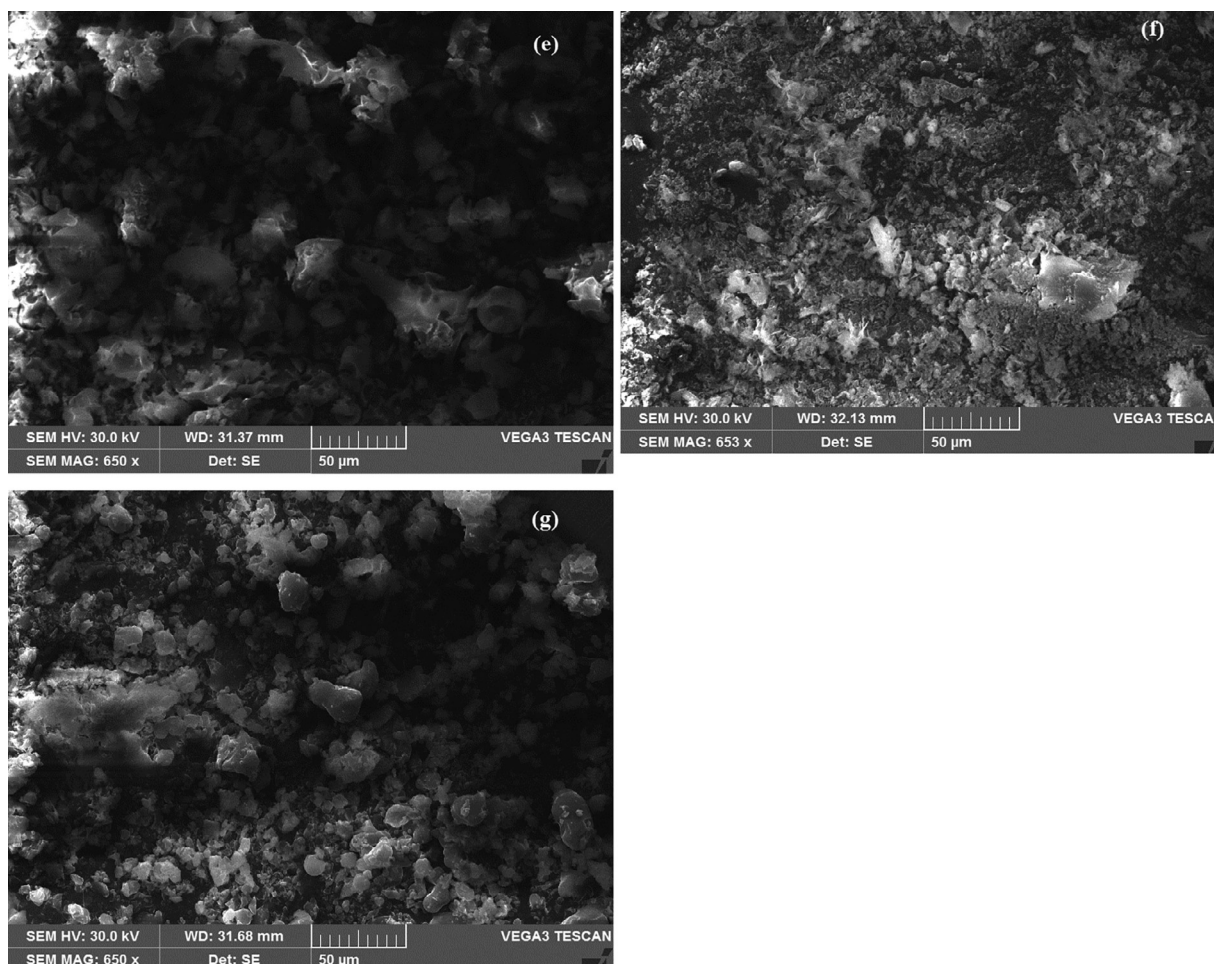


Fig. 14. Continued

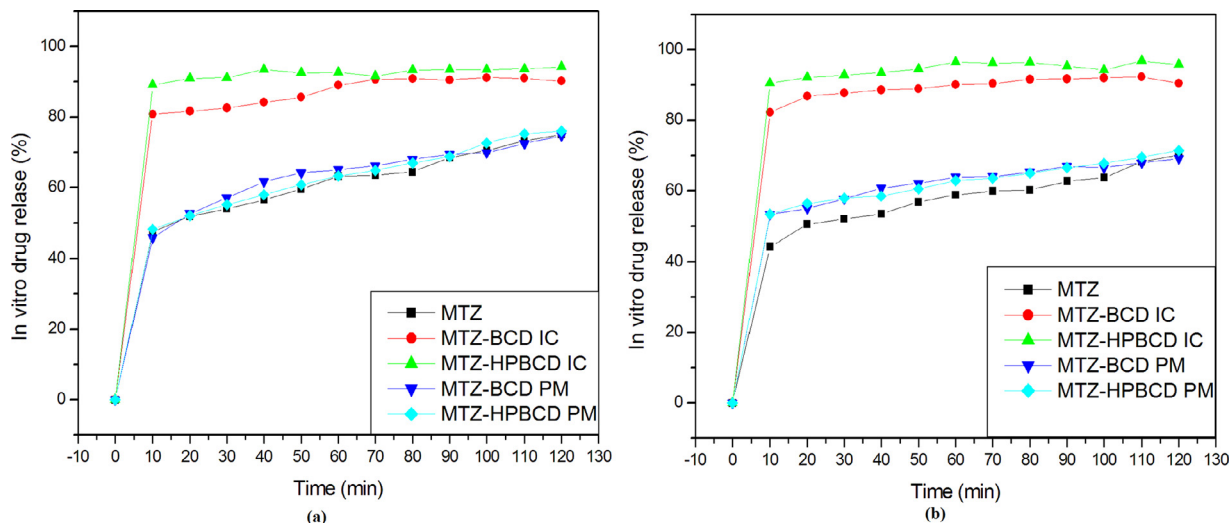
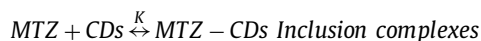


Fig. 15. *In vitro* dissolution of MTZ from: pure MTZ, MTZ-BCD PM, MTZ-HPBCD PM, MTZ-BCD IC and MTZ-HPBCD IC in (a) distilled water and (b) phosphate-buffered saline (PBS) pH = 7.4.

mation of IC are the relief of the conformational strain, the release of enthalpy-rich water molecules from the cavity, van der Waals-London dispersion force, hydrophobic interaction, electrostatic interaction, hydrogen bonding, and changes in solvent-surface tension [68–70]. All the forces and interactions listed above are relatively weak, allowing free MTZ to be in rapid equilibrium with

MTZ incorporated within the CDs cavity.



The quantity of MTZ released from MTZ-HPBCD IC was slightly higher than MTZ-BCD IC, which could be due to the water-soluble

Table 4

The percentage of released MTZ from: pure MTZ, MTZ-BCD PM, MTZ-HPBCD PM, MTZ-BCD IC, and MTZ-HPBCD IC at 10, 20, and 120 min.

Product	The percentage of released MTZ (%)					
	10 min		20 min		120 min	
	Distilled water	PBS	Distilled water	PBS	Distilled water	PBS
Pure MTZ	47.39	44.18	51.86	50.55	74.97	70.17
MTZ-BCD PM	45.85	53.28	52.63	55.00	74.66	71.18
MTZ-HPBCD PM	48.16	53.38	52.01	56.42	76.05	72.40
MTZ-BCD IC	80.83	82.22	81.60	86.83	90.23	90.55
MTZ-HPBCD IC	89.15	90.55	91.00	92.19	94.23	95.76

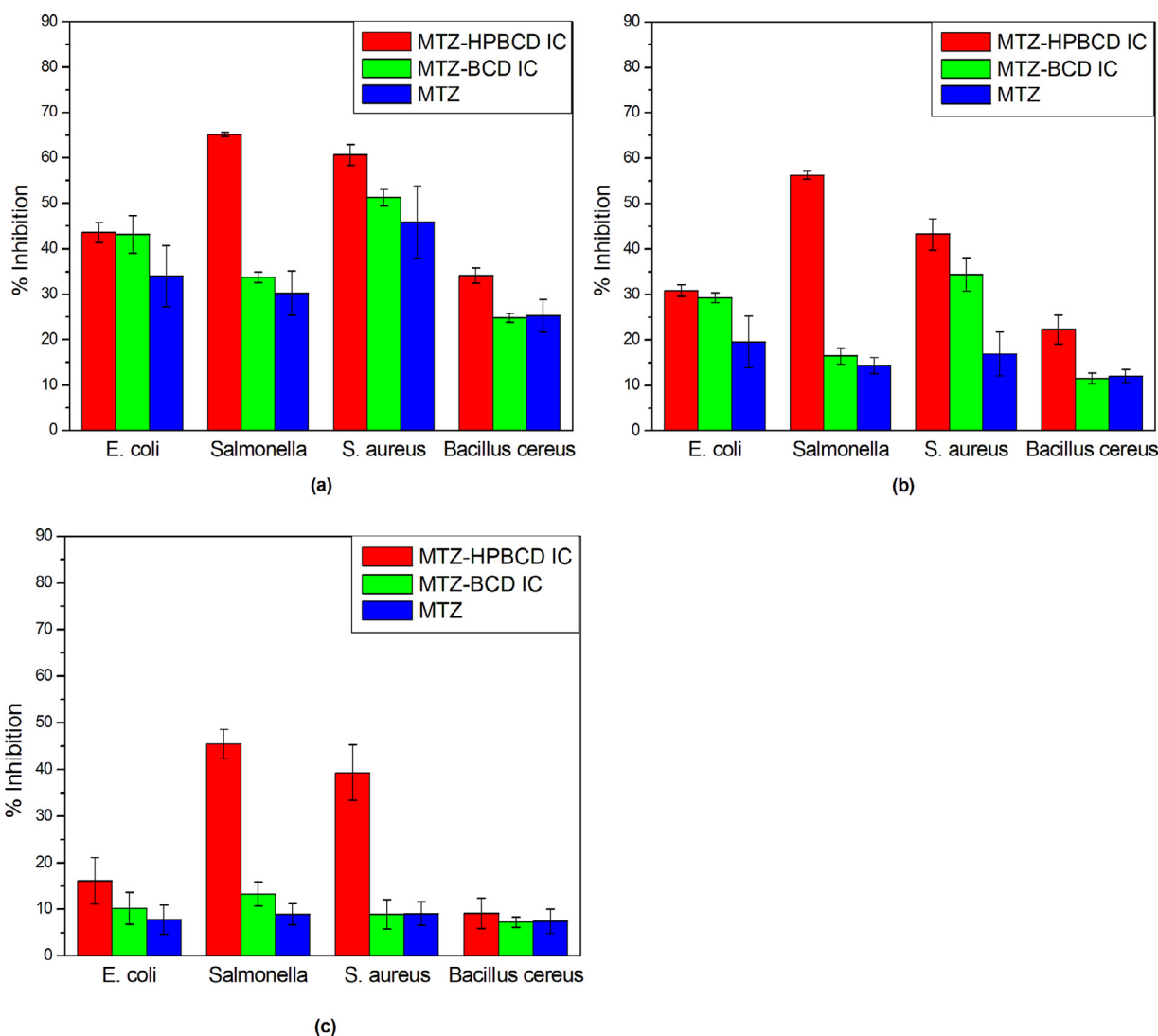


Fig. 16. Antibacterial activity expressed as percentage of inhibition of pure MTZ, MTZ-BCD IC, and MTZ-HPBCD IC at (a) $C_{MTZ} = 170 \mu\text{g.mL}^{-1}$, (b) $C_{MTZ} = 85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and (c) $C_{MTZ} = 42.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. (*E. coli*: *Escherichia coli*, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*).

complex formed in MTZ-HPBCD IC; higher than that of MTZ-BCD IC (Table 2).

3.6. Antibacterial activity

The antibacterial activity (ABA) of MTZ was increased after its encapsulation in the CDs cavity due to a better diffusion of MTZ to the target site. ABA of all samples was proportional to the drug concentration. In the case of MTZ-HPBCD IC (at $170 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Fig. 16a), the incorporation of MTZ doubled its activity against *Salmonella*, and it was higher than the ABA of pure MTZ with 25%

against *S. aureus*, 9% against *E. coli*, and 8% against *Bacillus cereus*. At ($42.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Fig. 16c). ABA has greatly increased by 5 times and 4 times against *Salmonella* and *S. aureus*, respectively. However, it was almost identical to that of pure MTZ against *Bacillus cereus*. On the other hand, the encapsulation of MTZ within BCD increased its ABA against *E. coli*, *Salmonella*, and *S. aureus* (Fig. 16a), while, it had no effect on its ABA against *Bacillus cereus* at all concentrations. At $85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 16b), the ABA of MTZ-BCD IC against *S. aureus* was twice more than that of pure MTZ, but it has become similar to that of pure MTZ at ($42.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Fig. 16c). The inclusion of MTZ within CDs cavity improved its ABA against the

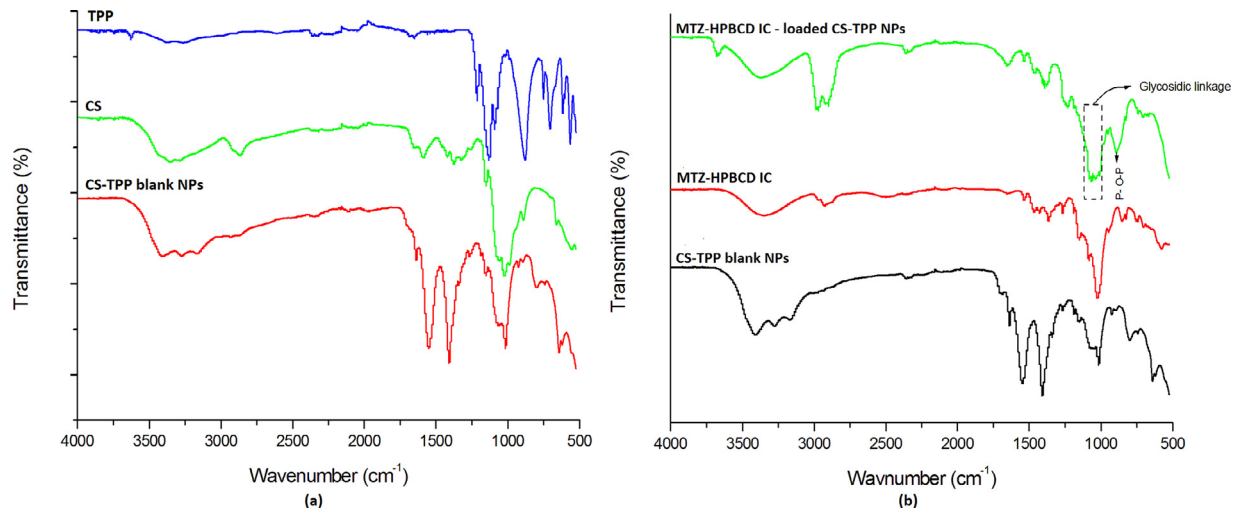


Fig. 17. FTIR spectra of (a) chitosan (CS), triphosphate (TPP), and CS-TPP blank NPs and (b) MTZ-HPBCD IC, CS-TPP blank NPs, and MTZ-HPBCD IC-loaded CS-TPP NPs.

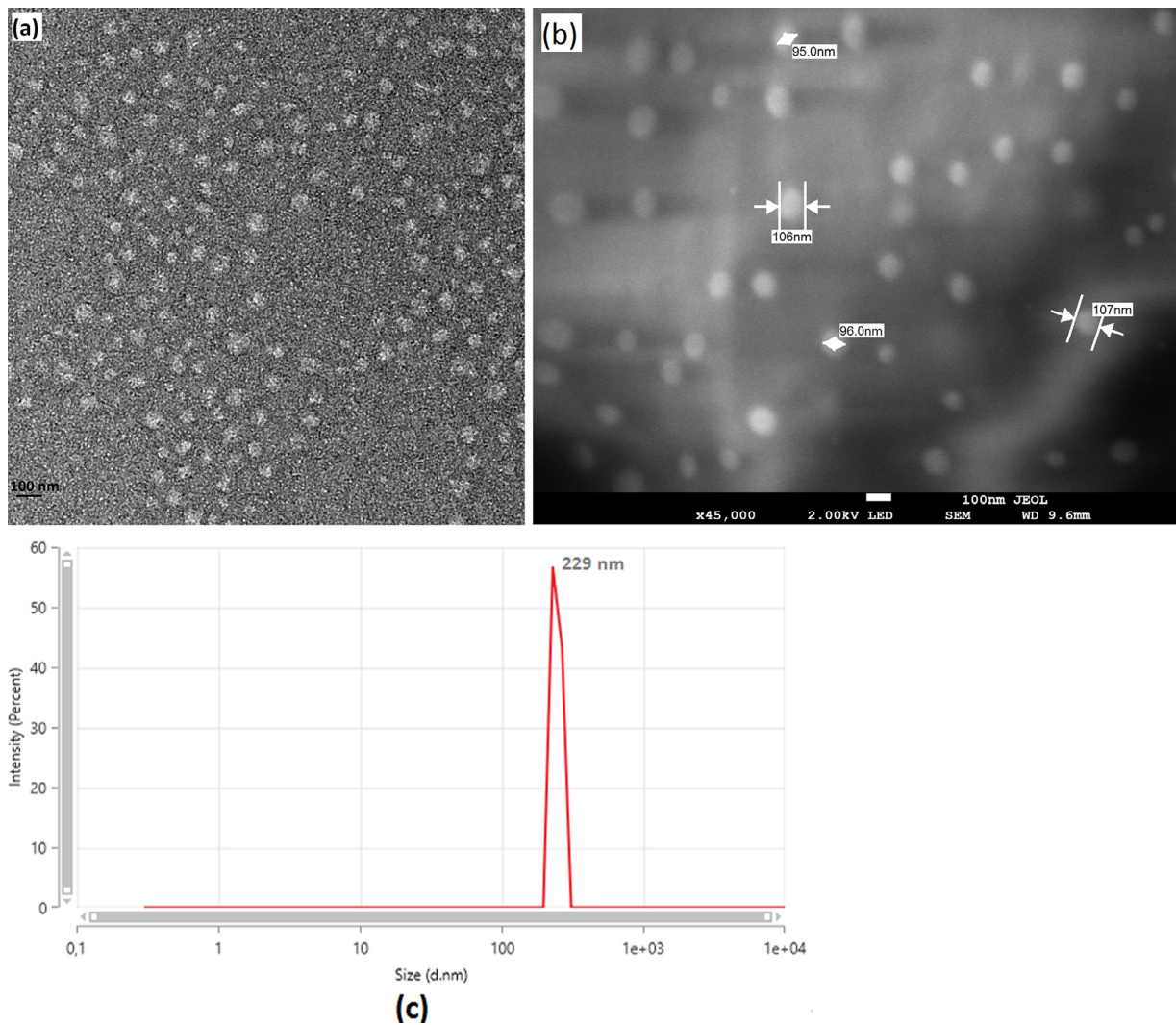


Fig. 18. The morphology of nanoparticles observed by (a) TEM and (b) FE-SEM and (c) the size distribution measured by DLS.

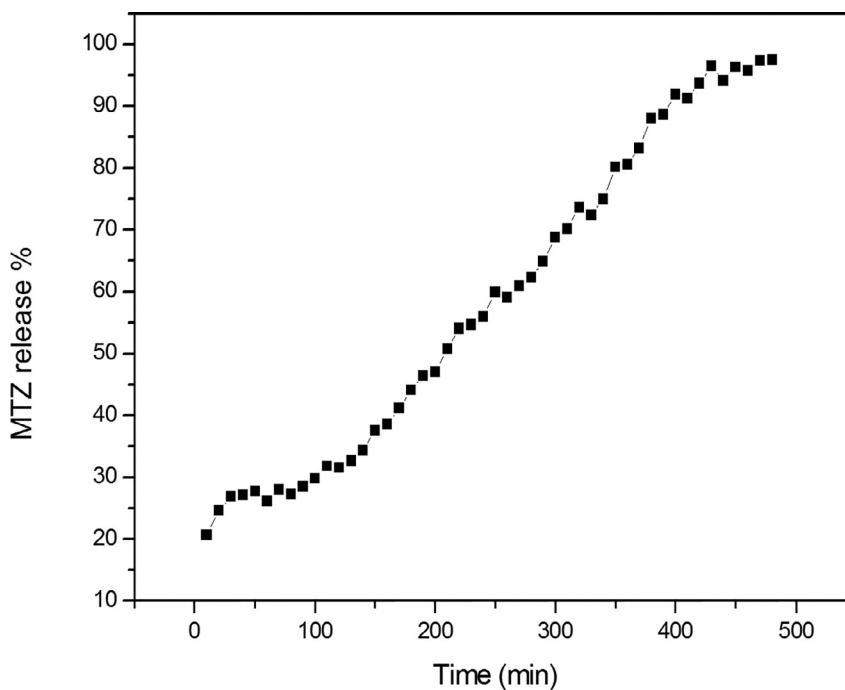


Fig. 19. *In vitro* dissolution of MTZ from MTZ-HPBCD IC-loaded CS-TPP NPs in phosphate-buffered saline (PBS) pH = 7.4.

majority of bacteria studied with different proportions. Besides, *S. aureus* and *Salmonella* were more sensitive to MTZ-HPBCD IC even at the lowest concentration (Fig. 16c). The mechanism of action of MTZ is as follows: the drug diffuses into the organism of bacteria through a cell membrane. The reduction of MTZ stimulates nitro anion radicals formation that is very cytotoxic and can cause damage/ fragmentation of microbial DNA and inhibits the nucleic acid synthesis; thus, cell death [71–73]. CDs may enhance the accession of MTZ to the cell membrane by increasing its water solubility.

Based on the results obtained in the studies of phase solubility and antibacterial activity, the MTZ-HPBCD IC was elected to be encapsulated in CS NPs.

3.7. Characterization of NPs

3.7.1. FTIR analysis

Spectra of CS, TPP, MTZ-HPBCD IC, CS-TPP blank NPs, and MTZ-HPBCD IC-loaded CS-TPP NPs are illustrated in (Fig. 17). The spectrum of CS (Fig. 17a) presents characteristic bands of OH stretching vibrations (3357.14 cm^{-1}), N-H/ intermolecular O-H (3284.64 cm^{-1}), C-H asymmetric (2916.48 cm^{-1}) and symmetric (2871.89 cm^{-1}), C=O stretching (1656 cm^{-1}), N-H stretching (1570 cm^{-1}), C-N stretching (1308.72 cm^{-1}), C-O-C stretching vibrations (1030 cm^{-1}) [74–77]. TPP spectrum (Fig. 17a) shows P=O stretching vibrations (1207.71 cm^{-1}), symmetrical and asymmetric stretching vibrations of the PO_2 groups (1131.84 cm^{-1}), symmetric and asymmetric stretching vibrations of the PO_3 groups (1087.06 cm^{-1}), P-O-P asymmetric stretching vibrations (879.35 cm^{-1}) [78]. In the spectrum of CS-TPP blank NPs (Fig. 17a) the first change noted in comparison with the CS spectrum was the presence of phosphate group of TPP confirmed by the appearance of the two peaks attributed to the P=O stretching vibrations (1263.68 and 1194.02 cm^{-1}) and the peak due to P-O-P asymmetric stretching vibrations (809.70 cm^{-1}) [78]. The appearance of an intense peak at 1542.28 cm^{-1} attributable to the stretching vibration of N-O-P suggests the interaction between NH_3^+ and phosphate group [79] and the amino group's protonation [80]. The narrow peak at 1643.30 cm^{-1} is the result of merging two peaks of CS corresponding to CO-N

amide I (1650.24 cm^{-1}) and N-H amide II (1586.83 cm^{-1}), indicating that the amino groups are participating in the crosslinking reaction [81]. All these changes confirm the interaction between positive groups of CS (NH_3^+) and negative groups of TPP (P-O-), and therefore the formation of nanoparticles. The MTZ-HPBCD IC-loaded CS-TPP NPs spectrum (Fig. 17b) was similar to the MTZ-HPBCD IC spectrum (Fig. 17b) with the appearance of crosslinking characteristic peaks (interaction between (NH_3^+) groups and (P-O-) groups). The P-O-P and P=O stretching vibrations peaks have been shifted to 891.79 cm^{-1} and 1232.58 cm^{-1} , respectively, due to the entrapment of IC into a three-dimensional network of CS-TPP NPs. The absorption of glycosidic linkage was shown in MTZ-HPBCD IC-loaded CS-TPP NPs spectrum (Fig. 17b) with a large and intense peak due to the presence of both polysaccharides (HPBCD and CS), suggesting that the main rings of HPBCD and CS were not destroyed, upon the incorporation of MTZ-HPBCD IC within CS-TPP NPs.

3.7.2. Morphology and size of NPs

A representative TEM and FE-SEM images of NPs and DLS size distribution curve are depicted in (Fig. 18). The results suggest that the NPs correspond to the polydispersed spherical shape with a diameter of 100 nm (Fig. 18a and b) with a uniform particle distribution (Fig. 18c) suggesting the successful formation of NPs. The NPs size differed from TEM and FE-SEM to DLS, because TEM and FE-SEM measure the physical size (the accurate size of NPs) while DLS provides the hydrodynamic size and the size distribution of particles [82].

3.8. *In vitro* drug release and kinetic analysis of dissolution data of NPs

The plot (Fig. 19) shows an initial burst effect followed by a very slow drug release. Almost 26% of MTZ was released within the first 30 min due to a certain amount of MTZ that has not been encapsulated and remained on the surface of NPs. As indicated by the higher coefficient of correlation (R^2) (Table 5), the MTZ release follows zero-order kinetics.

Table 5

Comparison of correlation coefficients (R^2) of different kinetic models applied on the *in vitro* dissolution profile of the MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs in PBS (pH = 7.4).

Zero-order	First-order	Korsmeyer-Peppas
$y = 0.1816x + 14.051$ $R^2 = 0.9836$	$y = -0.0029x + 2.1826$ $R^2 = 0.8395$	$y = 0.5019x + 0.5809$ $R^2 = 0.8558$ $n = 0.5019$

The drug release of MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs was 31.65% at 2 h and 97.54% at 8 h (Fig. 19), while 95.76% of MTZ was released from MTZ-HPBCD IC at 2 h (Fig. 15b). Compared with MTZ-HPBCD IC, the MTZ-HPBCD IC-loaded CS-TPP NPs had a slow drug release with a smaller burst effect. The plausible hypothesis was that the process of MTZ released from MTZ-HPBCD IC -loaded CS-TPP NPs follows a biphasic release process. Briefly, in the initial stage, MTZ released from NPs surface and then released from MTZ-HPBCD IC and CS NPs [15]. CS NPs allow the release of drugs by swelling (volume phase transitions). CS facilitates penetration of alkaline dissolution medium inside the NPs. At pH = 7.4 the $-NH_3^+$ groups of CS convert into the non-ionized, which leads to the reduction of CS crosslinking by TPP and increasing NPs swelling, and therefore the diffusion and release of the entrapped molecules. Another factor that promotes the swelling of NPs is the presence of NaCl (PBS) at low and moderate concentrations which can weaken CS-TPP ionic interactions [83]. The effect of the inclusion of MTZ within the HPBCD cavity was an increase in its solubility and thermal stability; meanwhile, the nanoencapsulation controlled its release.

The formation of drug-CDs IC, if it is feasible before nanoencapsulation, is very important, that can be considered as a support for the nanostructures to release the drug, which will be easily solubilized in the dissolution medium in a controlled or extended manner, and therefore improving the bioavailability of drugs in an *in vivo* situation.

4. Conclusion

The formations of 1:1 host-guest inclusion complexes of MTZ with BCD and HPBCD have been successfully prepared. The results of FTIR, NMR spectroscopy, thermal analysis, and SEM investigations demonstrated that MTZ has different physicochemical characteristics after complexation. The thermodynamic parameters estimation proves the feasibility of their formation. The obtained inclusion complexes displayed better antibacterial activity (ABA) compared to pure MTZ. HPBCD increased the solubility of MTZ linearly compared with BCD which has a limited solubilization effect, that's making the antibacterial activity of MTZ-HPBCD IC more significant than MTZ-BCD IC. The MTZ-HPBCD IC -loaded CS nanoparticles have been successfully prepared via the ionic gelation method. This report represented the first example using MTZ-HPBCD IC to be encapsulate in CS nanoparticles as a carrier for the MTZ delivery. This system possesses a uniform particle size, a lower burst release rate, and is able to release the totality of the MTZ in a controlled manner, which can be a promising novel nano-drug system. Our study presents the idea of promoting the use of nanoencapsulation of (active compounds-CDs) inclusion complex nanostructures for controlling or extending purposes while, still maintaining the enhanced solubility provided by CDs.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Sarra Bensouiki: Conceptualization, Investigation, Writing – review & editing. **Fouzia Belaib:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing. **Michèle Sindt:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing. **Sandrine Rup-Jacques:** Investigation, Writing – review & editing. **Pierre Magri:** Investigation. **Assia Ikhlef:** Investigation. **Abdeslam-Hassen Meniai:** Supervision, Resources.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the financial support from the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria.

References

- [1] M.F. Canbolat, A. Celebioglu, T. Uyar, Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers, *Colloids Surf. B*. 115 (2014) 15–21, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.11.021.
- [2] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S.K. Bannerjee, Drug delivery systems: an updated review, *Int. J. Pharm. Investig.* 2 (2012) 2–11, doi:10.4103/2230-973X.96920.
- [3] J.L. Frandsen, H. Ghandehari, Recombinant protein-based polymers for advanced drug delivery, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2696–2706, doi:10.1039/C2CS15303C.
- [4] C. Moorthi, R. Manavalan, K. Kathiresan, Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 14 (2011) 67–77, doi:10.18433/j30C7D.
- [5] R. Song, M. Murphy, C. Li, K. Ting, C. Soo, Z. Zheng, Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications, *Drug. Des. Devel. Ther.* 12 (2018) 3117–3145, doi:10.2147/DDDT.S165440.
- [6] C.J. Cheng, G.T. Tietjen, J.K. Saucier-Sawyer, W.M. Saltzman, A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 14 (2015) 239–247, doi:10.1038/nrd4503.
- [7] K. Ravishankar, R. Dhamodharan, Advances in chitosan-based hydrogels: evolution from covalently crosslinked systems to ionotropically crosslinked superabsorbents, *React. Funct. Polym.* 149 (2020) 104517, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104517.
- [8] P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Polym. Sci.* 63 (1997) 125–132, doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4.
- [9] M.E. Davis, M.E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 1023–1035, doi:10.1038/nrd1576.
- [10] P. Michalska, A. Wojnicz, A. Ruiz-Nuño, S. Abril, I. Buendia, R. León, Inclusion complex of ITH12674 with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation, physical characterization and pharmacological effect, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 94–104, doi:10.1016/j.carbpol.2016.09.072.
- [11] E.M.M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochem.* 39 (2004) 1033–1046, doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9.
- [12] V. Parmar, G. Patel, N.Y. Abu-Thabit, Responsive cyclodextrins as polymeric carriers for drug delivery applications, in: A.S.H. Makhlof, N.Y. Abu-Thabit (1st ed.), *Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications*. Woodhead Publishing, Cambridge, 2018, pp. 555–580.
- [13] M.E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 645–666, doi:10.1016/j.addr.2007.05.012.
- [14] S.B. Carneiro, F.Á. Costa Duarte, L. Heimfarth, Cyclodextrin-drug inclusion complexes: *in vivo* and *in vitro* approaches, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–23, doi:10.3390/ijms20030642.
- [15] S. Gao, J. Sun, D. Fu, H. Zhao, M. Lan, F. Gao, Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of tacrolimus-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex-loaded albumin nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 427 (2012) 410–416, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.01.054.
- [16] A. Vyas, S. Saraf, S. Saraf, Cyclodextrin based novel drug delivery systems, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 62 (2008) 23–42, doi:10.1007/s10847-008-9456-y.
- [17] M. Singh, R. Sharma, U.C. Banerjee, Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 341–359, doi:10.1016/S0734-9750(02)00020-4.
- [18] P. Blach, S. Fourmentin, D. Landy, F. Cazier, G. Surpateanu, Cyclodextrins: a new efficient adsorbent to treat waste gas streams, *Chemosphere* 70 (2008) 374–380, doi:10.1016/j.chemosphere.2007.07.018.
- [19] R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R.K. Khar, Cyclodextrins in drug delivery: an updated review, *AAPS. PharmSciTech.* 6 (2005) E329–E357, doi:10.1208/pt060243.
- [20] N. Nasongkla, A.F. Wiedmann, A. Bruening, Enhancement of solubility and bioavailability of β -lapachone using cyclodextrin inclusion complexes, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1626–1633, doi:10.1023/A:1026143519395.
- [21] A. Celebioglu, T. Uyar, Metronidazole/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs as fast-dissolving oral drug delivery system, *Int. J. Pharm.* 572 (2019) 118828, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118828.

- [22] C.D. Freeman, N.E. Klutman, K.C. Lamp, Metronidazole, A therapeutic review and update, *Drugs* 54 (1997) 679–708, doi:10.2165/00003495-199754050-00003.
- [23] H.P. de Oliveira, G.F. Tavares, C. Nogueiras, J. Rieumont, Physico-chemical analysis of metronidazole encapsulation processes in Eudragit copolymers and their blending with amphiphilic block copolymers, *Int. J. Pharm.* 380 (2009) 55–61, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.06.028.
- [24] M.P. Prabhakaran, M. Zamani, B. Felice, S. Ramakrishna, Electrospinning technique for the fabrication of metronidazole contained PLGA particles and their release profile, *Mater. Sci. Eng. C* 56 (2015) 66–73, doi:10.1016/j.msec.2015.06.018.
- [25] S. Malli, C. Bories, G. Ponchel, P.M. Loiseau, K. Bouchemal, Phase solubility studies and anti-Trichomonas vaginalis activity evaluations of metronidazole and methylated β -cyclodextrin complexes: comparison of CRYSMEB and RAMEB, *Exp. Parasitol.* 189 (2018) 72–75, doi:10.1016/j.exppara.2018.04.019.
- [26] F.M. Andersen, H. Bundgaard, Inclusion complexation of metronidazole benzoate with β -cyclodextrin and its depression of anhydrate-hydrate transition in aqueous suspensions, *Int. J. Pharm.* 19 (1984) 189–197, doi:10.1016/0378-5173(84)90161-3.
- [27] L. Stjern, S. Voittonen, R. Weldemichel, Cyclodextrin-mesoporous silica particle composites for controlled antibiotic release. A proof of concept toward colon targeting, *Int. J. Pharm.* 531 (2017) 595–605, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.062.
- [28] U.A. Shinde, S.J. Parmar, S. Easwaran, Metronidazole-loaded nanostructured lipid carriers to improve skin deposition and retention in the treatment of rosacea, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 45 (2019) 1039–1051, doi:10.1080/03639045.2019.1569026.
- [29] N. Sreeharsha, K. Rajpoot, M. Tekade, D. Kalyane, Development of metronidazole loaded chitosan nanoparticles using QBD approach—a novel and potential antibacterial formulation, *Pharmaceutics* 12 (2020) 1–22, doi:10.3390/pharmaceutics12100920.
- [30] U.A. Shinde, P.N. Joshi, D.D. Jain, K. Singh, Preparation and evaluation of N-trimethyl chitosan nanoparticles of flurbiprofen for ocular delivery, *Curr. Eye Res.* 44 (2019) 575–582, doi:10.1080/02713683.2019.1567793.
- [31] F. Kayaci, Y. Ertaş, T. Uyar, Enhanced thermal stability of eugenol by cyclodextrin inclusion complex encapsulated in electrospun polymeric nanofibers, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 8156–8165, doi:10.1021/jf402923c.
- [32] F. Kayaci, O.C.O. Umu, T. Tekinay, T. Uyar, Antibacterial electrospun poly(lactic acid) (PLA) nanofibrous webs incorporating triclosan/cyclodextrin inclusion complexes, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 3901–3908, doi:10.1021/jf400440b.
- [33] F. Kayaci, T. Uyar, Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin, *Food Chem.* 133 (2012) 641–649, doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.040.
- [34] T. Uyar, Y. Nur, J. Hacaloglu, F. Besenbacher, Electrospinning of functional poly(methyl methacrylate) nanofibers containing cyclodextrin-menthol inclusion complexes, *Nanotechnology* 20 (2009) 125703, doi:10.1088/0957-4484/20/12/125703.
- [35] S. Bukataf, J.A. Marinsky, Job's method of continuous variations with ion exchange for the study of complexes in solution, *J. Phys. Chem.* 395 (1948) 258–260, doi:10.1021/j100784a007.
- [36] J.S. Renny, L.L. Tomasevich, E.H. Tallmadge, D.B. Collum, Method of continuous variations: applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry, *Angew. Chemie. Int. Ed.* 52 (2013) 11998–12013, doi:10.1002/anie.201304157.
- [37] X. Ge, Z. Huang, S. Tian, Y. Huang, C. Zeng, Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 208–212, doi:10.1016/j.carbpol.2012.02.072.
- [38] S. Saha, A. Roy, K. Roy, M.N. Roy, Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–12, doi:10.1038/srep35764.
- [39] M.N. Roy, S. Saha, M. Kundu, B.C. Saha, S. Barman, Exploration of inclusion complexes of neurotransmitters with β -cyclodextrin by physicochemical techniques, *Chem. Phys. Lett.* 655–656 (2016) 43–50, doi:10.1016/j.cplett.2016.05.031.
- [40] T. Higuchi, K.A. Connors, Phase-solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4 (1965) 117–121.
- [41] M. Güllüce, A. Adigüzel, H. Ögütçü, M. Şengül, I. Karaman, F. Şahin, Antimicrobial Effects of Quercus ilex L. Extract, *Phyther. Res.* 18 (2004) 208–211, doi:10.1002/ptr.1419.
- [42] M. Güllüce, M. Sökmen, F. Şahin, A. Sökmen, A. Adigüzel, H. Özer, Biological activities of the essential oil and methanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce ssp *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey, *J. Sci. Food Agric.* 84 (2004) 735–741, doi:10.1002/jsfa.1728.
- [43] P. Calvo, C. Remuñan-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1431–1436, doi:10.1023/A:1012128907225.
- [44] Y.J. Ye, Y. Wang, K.Y. Lou, Y.Z. Chen, R. Chen, F. Gao, The preparation, characterization, and pharmacokinetic studies of chitosan nanoparticles loaded with paclitaxel/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complexes, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 4309–4319, doi:10.2147/IJN.S83508.
- [45] M. Malhotra, A. Kularmarva, S. Sebak, Ultrafine chitosan nanoparticles as an efficient nucleic acid delivery system targeting neuronal cells ultrafine nanoparticles siRNA delivery system, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35 (2009) 719–726, doi:10.1080/03639040802526789.
- [46] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol. Pharm.* 67 (2010) 217–223.
- [47] H.M. Ameen, S. Kunsági-Máté, B. Bognár, L. Szenté, M. Poór, B. Lemli, Thermodynamic characterization of the interaction between the antimicrobial drug sulfamethazine and two selected cyclodextrins, *Molecules* 24 (2019) 4565, doi:10.3390/molecules24244565.
- [48] M. Wszelaka-Ryliak, Thermodynamics of β -cyclodextrin-ephedrine inclusion complex formation and covering of nanometric calcite with these substances, *J. Therm. Anal. Calorim.* 127 (2017) 1825–1834, doi:10.1007/s10973-016-5467-x.
- [49] J.R. Moyano, M.J. Arias-Blanco, J.M. Gines, Nuclear magnetic resonance investigations of the inclusion complexation of Gliclazide with β -Cyclodextrin, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 72–75, doi:10.1021/js960212n.
- [50] D. Psimadas, P. Georgoulas, V. Valotassiou, G. Loudos, Molecular nanomedicine towards cancer : 111In-labeled nanoparticles, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 2271–2280, doi:10.1002/jps.23146.
- [51] J.A.A. Barbosa, A. Zoppi, M.A. Quevedo, Triethanolamine stabilization of methotrexate- β -cyclodextrin interactions in ternary complexes, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 17077–17099, doi:10.3390/ijms150917077.
- [52] J.W. Keepers, T.L. James, A theoretical study of distance determinations from NMR. Two-dimensional nuclear overhauser effect spectra, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 404–426, doi:10.1016/0022-2364(84)90257-9.
- [53] H.J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda, NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1755–1785, doi:10.1021/cr970019t.
- [54] R. Singh, S. Maity, B. Sa, Effect of ionic crosslink on the release of metronidazole from partially carboxymethylated guar gum tablet, *Carbohydr. Polym.* 106 (2014) 414–421, doi:10.1016/j.carbpol.2014.01.033.
- [55] R.D. Herculanu, A.A. Alencar De Queiroz, A. Kinoshita, O.N. Oliveira, C.F.O. Graeff, On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes, *Mater. Sci. Eng. C* 31 (2011) 272–275, doi:10.1016/j.msec.2010.09.007.
- [56] R. Iacovino, F. Rapuano, J.V. Caso, A. Russo, β -cyclodextrin inclusion complex to improve physicochemical properties of pipemidic acid: characterization and bioactivity evaluation, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 13022–13041, doi:10.3390/ijms140713022.
- [57] X. Ge, J. He, F. Qi, Y. Yang, Z. Huang, R. Lu, L. Huang, Inclusion complexation of chlorophyllin with β -cyclodextrin: preparation, characterization and molecular modeling, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 81 (2011) 397–403, doi:10.1016/j.saa.2011.06.028.
- [58] S. Mosivand, I. Kazeminezhad, Functionalization and characterization of electrocrystallized iron oxide nanoparticles in the presence of β -cyclodextrin, *CrystEngComm* 18 (2016) 417–426, doi:10.1039/C5CE01789K.
- [59] B. Rajbanshi, S. Saha, K. Das, B.K. Barman, S. Sengupta, Study to probe subsistence of host-guest inclusion complexes of α and β -cyclodextrins with biologically potent drugs for safety regulatory discharge, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–20, doi:10.1038/s41598-018-31373-x.
- [60] C. Yuan, B. Liu, H. Liu, Characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrins with different substitution patterns via FTIR, GC-MS, and TG-DTA, *Carbohydr. Polym.* 118 (2015) 36–40, doi:10.1016/j.carbpol.2014.10.070.
- [61] Q. Geng, T. Li, X. Wang, W. Chu, M. Cai, J. Xie, The mechanism of bensulfuron-methyl complexation with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and effect on soil adsorption and bio-activity, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–11, doi:10.1038/s41598-018-38234-7.
- [62] P. Bomzan, N. Roy, A. Sharma, V. Rai, S. Ghosh, A. Kumar, M.N. Roy, Molecular encapsulation study of indole-3-methanol in cyclodextrins: effect on antimicrobial activity and cytotoxicity, *J. Mol. Struct.* 1225 (2021) 129093, doi:10.1016/j.molstruc.2020.129093.
- [63] C. Brough, R.O. Williams, Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 157–166, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.061.
- [64] G. Van Den Mooter, The use of amorphous solid dispersions: a formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate, *Drug Discov. Today Technol.* 9 (2012) e79–e85, doi:10.1016/j.ddtec.2011.10.002.
- [65] F. Hirayama, K. Uekama, Cyclodextrin-based controlled drug release system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 125–141, doi:10.1016/S0169-409X(98)00058-1.
- [66] M. Guyot, F. Fawaz, J. Bildet, F. Bonini, A.M. Laguény, Physicochemical characterization and dissolution of norfloxacin/cyclodextrin inclusion compounds and PEG solid dispersions, *Int. J. Pharm.* 123 (1995) 53–63, doi:10.1016/0378-5173(95)00039-L.
- [67] K. Dua, K. Pabreja, M.V. Ramana, V. Lather, Dissolution behavior of β -cyclodextrin molecular inclusion complexes of aceclofenac, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3 (2011) 417–425, doi:10.4103/0975-7406.84457.
- [68] J. Nishijo, M. Nagai, Inclusion complex of 8-anilinoanthralene-1-sulfonate with β -cyclodextrin, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 58–62, doi:10.1002/jps.2600800115.
- [69] T. Loftsson, M.E. Brewster, M. Másson, Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery, *Am. J. Drug Deliv.* 2 (2004) 261–275, doi:10.2165/00137696-200402040-00006.
- [70] M.J. Huang, J.D. Watts, N. Bodor, Theoretical studies of inclusion complexes of α - and β -cyclodextrin with benzoic acid and phenol, *Int. J. Quantum Chem.* 65 (1997) 1135–1152, doi:10.1002/(SICI)1097-461X(1997)65:6<1135::AID-QUA12>3.0.CO;2-4.
- [71] M. Dan, A.L. Wang, C.C. Wang, Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme, *Mol. Microbiol.* 36 (2000) 447–456, doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01863.x.

- [72] S. Löfmark, C. Edlund, C.E. Nord, Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections, *Clin. Infect. Dis.* 50 (2010) S16–S23, doi:[10.1086/647939](https://doi.org/10.1086/647939).
- [73] D. Leitsch, B.D. Janssen, D. Kolarich, P.J. Johnson, M. Duchêne, Trichomonas vaginalis flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance, *Mol. Microbiol.* 91 (2014) 198–208, doi:[10.1111/mmi.12455](https://doi.org/10.1111/mmi.12455).
- [74] B. Smitha, S. Sridhar, A.A. Khan, Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes, *Eur. Polym. J.* 41 (2005) 1859–1866, doi:[10.1016/j.eurpolymj.2005.02.018](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.018).
- [75] H.S. Rathore, T. Senthilvelan, R. Vasantharaja, Fabrication and characterization of chitosan film impregnated ciprofloxacin drug: a comparative study, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18 (2019) 101078, doi:[10.1016/j.bcab.2019.101078](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101078).
- [76] F.S. Pereira, D.L. da Silva Agostini, A.E. Job, Thermal studies of chitin–chitosan derivatives, *J. Therm. Anal. Calorim.* 114 (2013) 321–327, doi:[10.1007/s10973-012-2835-z](https://doi.org/10.1007/s10973-012-2835-z).
- [77] Y. Wang, A. Pitto-Barry, A. Habtemariam, I. Romero-Canelon, P.J. Sadler, N.P.E. Barry, Nanoparticles of chitosan conjugated to organo-ruthenium complexes, *Inorg. Chem. Front.* 3 (2016) 1058–1064, doi:[10.1039/C6QI00115G](https://doi.org/10.1039/C6QI00115G).
- [78] A.F. Martins, D.M. de Oliveira, A.G.B. Pereira, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 1127–1133, doi:[10.1016/j.ijbiomac.2012.08.032](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.032).
- [79] M.R. de Moura, F.A. Aouada, R.J. Avena-Bustillos, T.H. McHugh, J.M. Krochta, L.H.C. Mattoso, Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles, *J. Food Eng.* 92 (2009) 448–453, doi:[10.1016/j.jfoodeng.2008.12.015](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.015).
- [80] S. Rodrigues, A.M. Rosa Da Costa, A. Grenha, Chitosan/carrageenan nanoparticles: effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 282–289, doi:[10.1016/j.carbpol.2012.03.010](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.010).
- [81] J. Nie, Z. Wang, K. Zhang, Q. Hu, Biomimetic multi-layered hollow chitosan-tripolyphosphate rod with excellent mechanical performance, *RSC Adv.* 5 (2015) 37346–37352, doi:[10.1039/C5RA00936G](https://doi.org/10.1039/C5RA00936G).
- [82] M. Sharma, S. Yadav, N. Ganesh, M. Mohan, S. Shalini, Biofabrication and characterization of flavonoid-loaded Ag, Au, Au–Ag bimetallic nanoparticles using seed extract of the plant Madhuca longifolia for the enhancement in wound healing bio-efficacy, *Prog. Biomater.* 8 (2019) 51–63, doi:[10.1007/s40204-019-0110-0](https://doi.org/10.1007/s40204-019-0110-0).
- [83] E. Bahreini, K. Aghaiypour, R. Abbasalipourkabir, A.R. Mokarram, M.T. Goodarzi, M. Saidijam, Preparation and nanoencapsulation of l-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 1–13, doi:[10.1186/1556-276X-9-340](https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-340).



Nom et Prénom : BENSOUKI Sarra

Titre : Développement des Systèmes de Délivrances des Médicaments
en Vue D'application à la Libération Prolongée d'un Principe Actif
Thèse en vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat en Génie des Procédés
Option : Génie pharmaceutique

Résumé

Certains principes actifs (PA) présentent des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques pénalisantes, du fait qu'elles réduisent considérablement la biodisponibilité des PA, ce qui implique des prises répétitives. L'objectif de cette étude est de concevoir des systèmes de délivrance de médicament (SDM) destinés à la voie orale à base de biopolymères préparés par des méthodes qui n'impliquent pas l'utilisation de solvants organiques toxiques ce qui permet d'améliorer la biodisponibilité des PA, contrôler leur libération, améliorer leur rapport bénéfice/risque et une meilleure observance du traitement.

Dans notre étude, deux PA ont été choisis comme modèle pour les introduire dans des SDM : l'ibuprofène (IBP) et le métronidazole (MTZ) qui présentent des activités biologiques intéressantes mais des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques problématiques.

Deux axes ont été abordés. Le premier a porté sur la préparation et la caractérisation des nanoparticules polymères (NPs) chargées d'ibuprofène. Les NPs ont été préparées par la méthode de « gélification ionique » à base de l'alginate de sodium (NaAL) en utilisant le chlorure de calcium comme agent de réticulation suivie par la formation du complexe de polyélectrolyte en utilisant le chitosane (CS). Les analyses de FTIR, DSC, MEB-FEG et l'efficacité d'encapsulation (EE%) ont été employées pour vérifier la formation des NPs. Des études de l'activité anti-inflammatoire in vitro, biodégradation in vitro et de cytotoxicité testée par la méthode de Brine shrimp ont été également réalisées. Les résultats montrent que les NPs ont une taille autour de 100 nm et une EE% satisfaisante. La DSC a montré que l'encapsulation de l'IBP a diminué sa cristallinité. L'étude de dissolution in vitro ainsi que l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire ont montré que les nanoparticules ont un comportement pH-sensibles et peuvent atteindre le profil d'ordre cinétique pseudo-zéro. Les NPs chargées d'IBP ont présenté une activité anti-inflammatoire supérieure à celle de l'IBP libre. L'administration de NPs à différentes concentrations n'entraîne aucun effet toxique chez les larves d'Artémia traités. Cela indique que les NPs de NaAL/CS est un système prometteur pour la libération de l'IBP qui peut atteindre un profil d'ordre cinétique pseudo-zéro.

Le deuxième axe a porté sur la préparation et la caractérisation des NPs chargées de MTZ sous forme de complexe d'inclusion (CI) de cyclodextrine (CD). En premier lieu, une étude comparative entre le complexe d'inclusion du MTZ formé avec la β -cyclodextrine (BCD) et celui formé avec la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPBCD) a été effectuée pour choisir le meilleur complexe à encapsuler dans les NPs de CS. Les techniques de spectroscopie UV-visible, résonance magnétique nucléaire du proton (^1H RMN), 2D ROESY/NOESY RMN, FTIR, DSC, ATG et MEB ont été utilisées comme outils pour la caractérisation des complexes obtenus. Des études de phase de solubilité, de dissolution in vitro et l'évaluation de l'activité antibactérienne ont été également réalisées. Les résultats montrent que les deux CDs sont capables d'inclure le MTZ et d'augmenter sa solubilité, sa stabilité, sa vitesse de dissolution et son activité antibactérienne. Les grandeurs thermodynamiques déterminées montrent que les deux complexes formés sont thermodynamiquement stables. Les analyses thermiques et la MEB ont révélé une amorphisation du MTZ après son insertion dans la cavité des deux CDs. Le complexe d'inclusion du HPBCD-MTZ a présenté une solubilité et une activité antibactérienne meilleures que celles du complexe BCD-MTZ. Par la suite le complexe d'inclusion HPBCD-MTZ a été incorporé dans les nanoparticules de chitosane par la méthode de « gélification ionique » en utilisant comme agent de réticulation le tripolyphosphate de sodium. La structure, la morphologie ainsi que le mécanisme de libération des NPs ont été étudiés par différentes techniques. Les résultats montrent que le complexe de HPBCD-MTZ s'est incorporé dans les nanoparticules de chitosane qui ont présenté une taille autour de 100 nm et une excellente distribution de taille. L'étude de dissolution montre que les NPs sont capables de libérer la totalité du MTZ d'une manière contrôlée, suggérant que les NPs de CS chargées du complexe d'inclusion HPBCD-MTZ peuvent être un système alternatif efficace pour modifier la libération de MTZ et augmenter sa solubilité.

Les résultats de cette thèse mettent en évidence le potentiel prometteur des SDM « complexes d'inclusion des cyclodextrines et nanoparticules polymères » pour l'optimisation des formulations pharmaceutiques.

Mots clés : Nanoparticules polymères, Complexe d'inclusion, Ibuprofène, Métronidazole, Chitosane, Alginate de sodium, β -cyclodextrine, 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrine.

Directrice de thèse : Fouzia BELAIB

Année Universitaire : 2021-2022