République Algérienne Démocratique Et Populaire

Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université Yahia Fares De Médéa

Faculté de technologie

Département de Génie des Précédés et l'environnement

Filière : Génie des Procédés Pharmaceutiques

Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème:

Microencapsulation d'un antihypertenseur (Hydrochlorothiazide) par des polymères biodégradables (PLA/PVPK30), caractérisation physico-chimique et pharmacocinétique

Présenté par:
-BENSABER Abdenour

Proposé et dirigé par :
-Promoteur Dr BELAISSA .Y
-Co Promoteur Dr CHABANE. A

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

Nos profonds remerciements au bon dieu qui nous a donné la force, lecourage, la patience et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier en premier lieu, notre promoteur Mr BELAISSA.Y qui a veillé sur la réalisation de ce travail du début jusqu'à la fin et l'aide qu'elle nous a apporté et pour son encouragement à finir notre travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre Co-promoteur MrCHABANE.A d'avoir encadré ce travail et pour son exigence intellectuelle, ses encouragements et surtout sa patience et sa disponibilité.

Nos vifs remerciements s'adressent àDr FERGANI.D'avoir bien accepté de présider le jury.

Nos vifs remerciements s'adressent également à Dr IBRIR.A et Dr LATRECHE.H d'avoir bien accepté d'examiner notre travail.

Un grand remerciement à tous les membres du laboratoire de contrôlequalité du groupe Saidal particulièrement à Mme FAIZA et Mr HENTABLI.M quinous ont beaucoup encouragé et aidé à finir notre travail.

Nos remerciements vont également a la directrice d'Antibiotical Saidal Médéa qui nous a Permis d'effectuer notre stage.

Nous exprimons aussi notre remerciement au chef du département Mme FERHAT.S, ainsi qu'à tous les membres du département de génie des procédés.

Nous ne pouvons pas oublier de remercier tous les membres de nosfamillespour leurs soutiens et leurs encouragements.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à laréalisation de ce travail

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère l'être le plus cher pour moi pour laquelle je doismon existence qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui seraiéternellement reconnaissante, merci maman.

A mon très cher père qui m'a donné un magnifique modèle de volonté, età qui j'exprime ma sincère et éternelle gratitude pour son attention, son soutienet son amour. merci papa.

A ma très chère sœur: Wafaa.

A toute mes amis (es) ;Oussama ,Adel ,Soumia,Mohamed Amine, Aymen, Mohamed amine, Noureldine, Mohamed Ali

Et à toute personne qui me sont chères.

ملخص

هيدروكلوروثيازيد هو مضاد لارتفاع ضغط الدم مدر للبول من الثيازيد يعمل عن طريق تثبيط إعادة امتصاص الصوديوم بواسطة النبيب عند مستوى جزء التخفيف القشري

بسبب التوافر البيولوجي المنخفض ، يجب إعطاؤهم بشكل متكرر. من أجل تقليل الآثار الجانبية الناتجة عن الاستخدام المتكرر للدواء ولتحسين التوافر البيولوجي تم إنتاج كريات مجهرية مستدامة الإطلاق على أساس هيدروكلوروثيازيد وحمض(بولي لاكتيك) و(بولي فينيل بيروليدون) ، تم تحضيرها بواسطة تبخر المذيب

طريقة. تزداد كفاءة التغليف للكرات المجهرية مع زيادة تركيز بسبب تقاربها بين المبدأ النشط والبوليمر. كشف المجهر الضوئي أن الكرات المجهرية كروية. لم تظهر الأشعة تحت الحمراء للمكون النشط النقي والمغلف في جميع التركيبات أي اختلاف كبير في القمم المميزة ، مما يشير إلى ثبات هيدروكلوروثيازيد أثناء عملية التغليف لوحظ إطلاق سريع للمكون النشط في الكرات المجهرية بتركيز أعلى من بولي (فينيل بيروليدون) يعمل كعامل توجيه

الكلمات المفتاحية: تغليف ، هيدروكلوروثيازيد ، بولي فينيل بيروليدون. حمض بولي لاكتيك.

Résume

L'hydrochlorothiazide est un antihypertenseur de la famille diurétique thiazidique qui agit en inhibant la réabsorption du sodium par le tubule au niveau du segment cortical de dilution.

En raison de leur faible biodisponibilité, ils doivent être administrés fréquemment. Afin de diminuer les effets secondaires due à l'administration fréquente du médicament et d'améliorer la biodisponibilité, des microsphères à libération prolongée àété réalisée à base d'hydrochlorothiazide, l'acide polylactique (PLA) et de la Polyvinylpyrrolidone (PVP K30), ont été préparées par la méthode d'évaporation du solvant. L'efficacité d'encapsulation des microsphères augmente avec augmentation de la concentration de PLA en raison de leur l'affinité entre le principe actif et le polymère. Le microscope optique à balayage électronique révélé que les microparticules sont sphériques avec une taille entre 12 µm et 26 µm.

IR du principe actif pur et encapsulé dans toutes les formulations n'a montré aucune différence significative dans les pics caractéristiques, ce qui suggère la stabilité de l'hydrochlorothiazide pendant le processus d'encapsulation. Une libération rapide du principe actif a été observée dans les microsphères avec une concentration plus élevée de PVP K30 (Polyvinylpyrrolidone), le PVP K30 agit comme un agent de canalisation.

Mots clés : Encapsulation, Hydrochlorothiazide, polyvinylpyrrolidone (PVP K30), acide poly lactique (PLA).

Abstract

Hydrochlorothiazide is a thiazide diuretic antihypertensive that acts by inhibiting the reabsorption of sodium by the tubule at the level of the cortical dilution segment.

Due to their low bioavailability, they should be administered Hydrochlorothiazide is an antihypertensive thiazide diuretic that polyvinylpyrrolidone (PVP K30), was prepared by a solvent evaporation method.

The encapsulation efficiency of the microspheres increases with the concentration of PLA due to the affinity between the active principle and the polymer.

The scanning electron microscope revealed that the microparticles are spherical with a size between 12 μm and 26 μm. IR of neat and encapsulated active ingredients in all formulations showed no significant difference in characteristic peaks, suggesting the stability of hydrochlorothiazide during the encapsulation process.

A rapid release of the active ingredient was observed in the microspheres with a higher concentration of PVP K30 (polyvinylpyrrolidone), PVP K30 acts as a channeling agent.
Keywords: Encapsulation, Hydrochlorothiazide, polyvinylpyrrolidone (PVP K30), polylactic acid (PLA).

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des illustrations

Liste des tableaux

Introduction **1**

CHAPITRE I : Les antihypertenseurs

I.1. Les médicaments : 3

I.2. Formes pharmaceutiques 3

I.2.1. Le comprimé 4

I.3. Les antihypertenseurs 4

I.4. . Les familles des antihypertenseurs 5

I.4.1. Les diurétiques 5

I.4.2. Les bêta-bloquants. 5

I.4.3. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) 5

I.4.4. Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II 5

I.4.5. Les inhibiteurs calciques 6

I.5. L'hydrochlorothiazide 6

I.5.1. Caractères 6

I.5.2. Pharmacocinétique d'Hydrochlorothiazide 6

a) Absorption 6

b) Distribution 6

c) Métabolisme 6

d) Elimination 6

I.5.3. Indication du médicament 7

I.5.4. Mécanisme d'action d'hydrochlorothiazide 7

CHAPITRE II : Encapsulation ET LES POLYMERES BIODEGRADABLE.

II.1. Historique 10
II.2. Définition 10
II.3. Techniques d'encapsulation 10
II.4. Différent type d'encapsulation : 10
II.4.1. La micro encapsulation : 10
II.4.1.1. Types de microparticules : 11
II.4.2. La nano-encapsulation : 11
II.4.3. Les procédés d'encapsulation 12
II.4.4. But de l'encapsulation : L'encapsulation permet de 13
II.4.5. Application dans le domaine pharmaceutique 13
II.5. Les polymères biodégradables 14
II.6. Biodégradation 15
II.7. Classification des polymères biodégradables 16
II.8. L'acide polylactique : 17
II.8.1. L'acide polylactique (PLA) : 17
II.8.1.1. Solubilité dans les solvants 18
II.8.1.2. Dégradation 18

CHAPITRE III : Matériel et méthode

III.1. Matières premières et matériel utilisés : 20
3.1.1. Matières premières : 20
3.1.1.1. Principe actif : 20
3.1.1.2. Polymères : 21
3.1.2. Appareillage : 23
3.1.3. Verreries et matériels de laboratoire : 23
III.2. Préparation des microparticules : 23
III.3. Caractérisation des microparticules : 26
III.3.1. Microscopie optique : 26
III.3.2. Microscopie à balayage électronique (MEB) : 26
III.3.3. Spectrophotométrie par Infra-Rouge : 26

III.4. Détermination du taux d'encapsulation des microparticules par HPLC : 27
III.4.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) : 27
III.4.1.2. Détermination de la longueur d'onde maximale d'hydrochlorothiazide : 29
III.4.1.3. Préparation de la courbe d'étalonnage : 29
III.4.1.4. Préparation des échantillons : 30
III.5. Test de dissolution : 30
III.5.1. Dissolutest : 31
III.5.2. Mode opératoire du test de dissolution : 31

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

IV.1. Photos microscope de la formulation optimale et principe actif pur 34
IV.2. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB) 35
IV.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge 35
IV.4. Taux d'encapsulation 39
IV.5. Effet PLA sur le taux d'encapsulation: 41
Conclusion générale 43
Références bibliographiques

Liste des tableaux

CHAPITRE III : Matériel et méthode

Tableau III 1 Proprietes de Hydrochlorothiazide..... 21

Tableau III 2 Propriétés du PLA. 21

Tableau III 3 Proprietes de Polyvinylpyrrolidone (PVP K30)..... 22

Tableau III 4 Les propriétés de Poly alcool vinylique (PVA). 22

Tableau III 5 Matrice des essais de formulation. 26

Tableau III 6 Préparation des solutions standards de la courbe d'étalonnage. 29

Tableau III 7 Référence USP pour les solutions tampon phosphate. 31

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

Tableau IV 1 Formulation optimale (H03) et l'hydrochlorothiazide par microscopie. 33

Tableau IV 2 Principales bandes caractéristiques du Hydrochlorothiazide..... 35

Tableau IV 3 Principales bandes caractéristiques du PVP 36

Tableau IV 4 Les principales bandes caractéristiques du PLA..... 37

Tableau IV 5 Résultats des taux d'encapsulation. 39

Listes des figures

CHAPITRE I : Les antihypertenseurs

Figure I. 1Formule chimique d'Hydrochlorothiazide. 7

CHAPITRE II : Encapsulation ET LES POLYMERES BIODEGRADABLE.

Figure II. 1Différent système de microparticule. 11
Figure II. 2Différentes formes de nanoparticules. 12
Figure II. 3Les différents procédés d'encapsulation. 13
Figure II. 4Le cycle de vie des polymères biodégradables synthétisés dérivés de ressources renouvelablesest illustré [20].. 15
Figure II. 6Classification des polymères biodégradables [20] 17

CHAPITRE III : Matériel et méthode

Figure III. 1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) 28
Figure III. 2. Courbe de détermination de λ max 29

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

Figure IV. 11PA pur.. 35
Figure IV. 2 Formulation de H03. 35
Figure IV. 3Spectre IR de l'Hydrochlorothiazide 36
Figure IV. 4Spectre IR-TF PVP K30 37
Figure IV. 5Spectre IR du PLA 38
Figure IV. 6Spectre IR formulation optimale de H03. 39
Figure IV. 7Courbe d'étalonnage de l'Hydrochlorothiazide. 40
Figure IV.8Profil de libération des microparticules dans le milieu intestinal (pH=6.8)des formulations sans PVP K30. 41
Figure IV. 9Profil de libération dans le milieu intestinal avec pvp (pH=6.8). 42

Liste des abréviations

C : Concentration

cm : Centimètre

d : Densité

DCM : Dichlorométhane

HCl : Acide chlorhydrique

HCT : Hydrochlorothiazide

HPLC : High Performance Liquide Chromatographie

HTA : L'hypertension artérielle

IR : Infrarouge

LP : Libération prolongée

M : Masse molaire

mg : milligramme

Ml : millilitre

Mm : Millimètre

PA : Principe actif

PLA : Poly acide lactique

PVA : Polyalcool vinylique

PVP : Poly vinyle pyrrolidone

STDm : Standards mère

TE (%) : Taux d'encapsulation

TE : Taux d'encapsulation

tr/min : Tours/minute

V : Volume

λ : Longueur d'onde

µm : Micromètre

ρ : Masse volumique

INTRODUCTION

L'hypertension artérielle est une pathologie fréquente (estimée à 1,13 milliard d'hypertendus dans le monde) [1].dans la majorité des cas, il s'agit essentiellement d'hypertension artérielle, le mécanisme physiopathologique exact restant incertain[2],On parle d'hypertension artérielle lorsque les valeurs de la pression artérielle systolique sont supérieures ou égales à 140 mm Hg et/ou la pression artérielle diastolique sont supérieure ou égales à 90 mm Hg, cette définition étant valable pour une mesure de la pression artérielle chez le médecin.

La pression artérielle est maintenue par la régulation du débit cardiaque et des résistances vasculaires périphériques, sous le contrôle rénal du volume de liquide intravasculaire.Les médicaments antihypertenseurs agissent en modifiant un ou plusieurs de ces paramètres physiologiques. Il existe de nombreux médicaments antihypertenseurs.

Parmi les médicaments prescrits en première intention, on peut citerles diurétiques thiazidiques comme l'hydrochlorothiazide,

L'hydrochlorothiazide est un diurétique thiazidique qui agit en inhibant la réabsorption du sodium par le tubule au niveau du segment cortical de dilution. Il augmente l'excrétion urinaire du sodium et des chlorures et, à un moindre degré, l'excrétion du potassium et du magnésium, accroissant de la sorte la diurèse et exerçant une action antihypertensive.

L'effet thérapeutique des diurétiques thiazidiques reste en plateau au-delà d'une certaine dose, tandis que les effets indésirables continuent d'augmenter : en cas d'inefficacité du traitement, il n'est pas utile et souvent mal toléré d'augmenter les doses au-delà des posologies recommandées.

Une approche majeure pour améliorer la biodisponibilité orale des médicaments est leur microencapsulation dans des matériaux polymères biodégradables[3]Cette technique permet de protéger la substance active, d'ajuster sa libération dans l'organisme, de réduire les effets secondaires associés à une libération trop massive et instantanée du médicament et en réduisant le nombre de doses tout en prolongeant les périodes thérapeutiques. Le PLA et le PVP K30 sont largement utilisés dans la microencapsulation pharmaceutique comme supports dans la libération contrôlée de médicaments car ils sont non toxiques et bien tolérés par l'homme[4][5] [11-14].

Comme ils sont biodégradables et biocompatibles, ils sont hydrolysés pour former des produits qui sont facilement absorbés ou éliminés[6]

Dans ce travail, nous avons essayé de développer un système de support micro-polymérique efficace comprenant du PVP K30, qui est un bon améliorateur de biodisponibilité et de solubilité [7][8] et du PLA, un polymère couramment utilisé comme support protégeant et contrôlant la libération de l'API. La méthode utilisée pour la préparation des microparticules est émulsion et l'évaporation de solvant, largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique.

Les microparticules obtenues caractérisés par différentes méthodes d'analyses physicochimiques et biopharmaceutiques à savoir ; Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), spectrophotométrie UV-visible, spectrophotométrie Infra-rouge, microscopique optique, microscope à balayage électronique et l'étude la cinétique de libération du principe actif.

CHAPITRE I : LES ANTIHYPERTENSEURS

I.1. Les médicaments :

Les médicaments sont des éléments incontournables du système de soin : en effet ilspeuvent être utilisés pour soigner les malades mais aussi en prévention de certaines pathologies. Ils peuvent également être administrés afin de permettre un diagnostic, leur administration ne constituant alors qu'une partie de l'examen, comme par exemple l'administration de produits de contraste iodé en vue d'un examen radiologique.

Le Code de la Santé Publique donne du médicament la définition suivante (article L5111-1)[9]: « On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique »[9]

I.2. Formes pharmaceutiques

La forme pharmaceutique du médicament (également appelée forme galénique) doit permettre à la substance active d'atteindre l'organe visé le plus vite et le mieux possible. C'est un élément important du médicament, car un mode d'administration adapté est gage de meilleure efficacité et de moindre risque.

La forme pharmaceutique est choisie par le médecin en fonction du site d'action, de la durée d'action (instantanée, retardée) et du malade (adulte, enfant).[10]

Il existe un très grand nombre de formes pharmaceutiques. Les plus usuelles sont :

- **Orales** administrées par la bouche,
- **Injectables** administrées par injection,
- **Dermiques** appliquées sur la peau,
- **Inhalées** administrées par aérosols,
- **rectales** introduites par le rectum.[11]

I.2.1. Le comprimé

Il est obtenu par compression de poudre. Pour contribuer à sa bonne conservation, et éventuellement masquer un goût, le comprimé est le plus souvent entouré d'une pellicule ou d'un enrobage (comprimé pelliculé ou enrobé).

Il existe plusieurs formes des comprimés parmi ces formes, la libération prolongée :

La libération prolongée signifie que le principe actif est libéré de sa forme galénique sur une période de temps plus ou moins étendue, dans certains cas à vitesse constante. Le but étant d'obtenir des taux plasmatiques constants ou de réduire la fréquence d'administration pour les principes actifs de durée d'action brève dont on souhaite une action prolongée.[12]et aussi de modifier la vitesse ou le lieu de libération du ou des principes actifs. Un essai approprié doit être mis au point pour apprécier les modifications de libération du principe actif.

Dans le cas des comprimés, la libération prolongée peut être obtenue par :

- Par inclusion des particules de principe actif dans un excipient insoluble dans les liquides de l'organisme et formant une espèce de matrice à partir de laquelle le principe actif diffuse lentement, à moins que la libération se fasse par érosion progressive.
- En enrobant chaque particule d'un film plus ou moins perméable à base de macromolécules insolubles. La libération se fait alors par dialyse du principe actif travers le film (cf. sphères).
- Des particules différemment enrobées peuvent être séparées dans des comprimés couches multiples.[13]

I.3. Les antihypertenseurs

Les médicaments qui sont utilisés pour le traitement des maladies hypertonique ainsi que les hypertensions symptomatiques sont appelés médicaments antihypertenseurs. L'hypertension artérielle est un syndrome caractérisé par l'élévation de la tension artérielle qui dépend d'un certain nombre de facteurs. La plage normale de la pression artérielle varie selon le sexe et l'âge. En outre, diverses études de médecine ne peuvent dire ce qu'est une valeur acceptable.[14]

Le principal objectif du traitement de l'hypertension artérielle est de prévenir les complications cardiovasculaires et améliorer l'espérance de vie des sujets atteints.

I.4. . Les familles des antihypertenseurs

Le traitement de l'hypertension artérielle fait appel à plusieurs familles de médicaments et dont quelques classes d'antihypertenseurs ont montré leur efficacité dans la prévention contre les accidents cardiovasculaires, on distingue[15]**:**

I.4.1. Les diurétiques

Les diurétiques ou les thiazidiques sont considérés comme les plus anciens médicaments contre l'hypertension sont des médicaments natriurétiques, c'est-à-dire qui accélèrent l'élimination rénale du sodium (généralement en inhibant la réabsorption de cet ion) et entraînent à sa suite celle de l'eau par un mécanisme osmotique. Considérés comme le traitement idéal pour les personnes sans diabète et sans atteinte cardiovasculaire, il existe différents types de diurétiques**,[7]**

I.4.2. Les bêta-bloquants.

Ces médicaments s'opposent à la stimulation du système sympathique en bloquant les récepteurs bêta-adrénergiques **[7].**

Au niveau cardiaque, le blocage des récepteurs ß entraîne une baisse de la fréquence cardiaque, Donc de la pression artérielle. Au niveau rénal, le blocage des récepteurs ß de l'appareil juxta glomérulaire entraîne une diminution de la sécrétion de rénine ; il s'ensuit une baisse du taux D'angiotensine II et d'aldostérone, ce qui amène une baisse de la pression artérielle.**[7]**

I.4.3. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC)

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion bloquent la production d'une hormone produite par les reins désignés par le terme d'angiotensine, qui favorise la contraction des vaisseaux. **[7]**

I.4.4. Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II

Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II sont une nouvelle classe de substances qui inhibent le système rénine-angiotensine mais par un mécanisme différent de celui dès l'inhibiteur de l'enzyme de conversion d'angiotensine. Ils agissent par antagonisme au niveau des récepteurs de l'angiotensine II. Ils inhibent donc l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine II exogène et préviennent la sécrétion d'aldostérone induit par ce peptide **[7].**

I.4.5. Les inhibiteurs calciques

Les inhibiteurs calciques bloquent les canaux calciques lents et empêchent donc l'entrée de calcium dans les cellules. Ce blocage s'exerce aux deux niveaux vasculaires et myocardique.**[7]**

I.5. L'Hydrochlorothiazide

L'Hydrochlorothiazide est un diurétique thiazidique à action brève, il est largement utilisé pour traiter l'hypertension et les œdèmes[16]

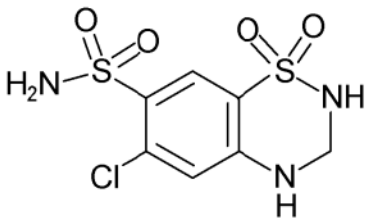


Figure I. 1Formule chimique d'Hydrochlorothiazide.

$C_7H_8C_lN_30_4S_2$

I.5.1. Caractères

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'acétone, assez soluble dans l'alcool. Ilse dissout dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins**.**[17]

I.5.2. Pharmacocinétique d'Hydrochlorothiazide

a) Absorption

Une dose orale d'hydrochlorothiazide est bio disponible à 65-75 %, avec un Tmax de 1 à 5 heures et une Cmax de 70 à 490ng/ml après des doses de 12,5 à 100mg. Lorsqu'il est pris avec un repas, la biodisponibilité est inférieure de 10%, la Cmax est inférieure de 20% et le Tmax passe de 1,6 à 2,9 heures**.[9]**

b) Distribution

Le volume de distribution varie fortement d'une étude à l'autre avec des valeurs de 0,83-4,19L/kg**.[9]**

c) Métabolisme

L'hydrochlorothiazide n'est pas métabolisée**.[9]**

d) Elimination

L'hydrochlorothiazide est éliminée dans l'urine sous forme d'hydrochlorothiazide inchangé**. [9]**

I.5.3. Indication du médicament

L'hydrochlorothiazide est indiquée, seul ou en association, pour le traitement de l'œdème associé à l'insuffisance cardiaque congestive, à la cirrhose hépatique, au syndrome néphrotique, à la glomérulonéphrite aiguë, à l'insuffisance rénale chronique et à la corticothérapie et l'œstrogénothérapie. L'hydrochlorothiazide est également indiquée, seul ou en association, pour le traitement de l'hypertension**.[9]**

I.5.4. Mécanisme d'action d'hydrochlorothiazide

L'hydrochlorothiazide est transportée de la circulation aux cellules épithéliales du tubule contourné distal par les transporteurs d'anions organiques OAT1, OAT3 et OAT4. À partir de ces cellules, l'hydrochlorothiazide est transportée vers la lumière du tubule par la protéine 4 associée à la multi résistance aux médicaments (MRP4). Normalement, le sodium est réabsorbé dans les cellules épithéliales du tubule contourné distal et pompé dans l'interstitiel bas latéral par une ATPase sodium-potassium, créant un gradient de concentration entre la cellule épithéliale et le tubule contourné distal qui favorise la réabsorption d'eau. L'hydrochlorothiazide agit sur la région proximale du tubule contourné distal, inhibant la réabsorption par le symporteur sodium-chlorure, également connu sous le nom de Soulte Carrier Family 12 Membre 3 (SLC12A3). L'inhibition de SLC12A3 réduit l'ampleur du gradient de concentration entre la cellule épithéliale et le tubule contourné distal, ce qui réduit la réabsorption de l'eau.**[9]**

CHAPITRE II : ENCAPSULATION ET LES POLYMERES BIODEGRADABLE.

II.1. Historique

La première application industrielle de microparticules date des années 1950 quand Green et Schleicher ont encapsulé des particules de pigments dans des polymères naturels (protéine/gélatine et polysaccharide/gomme arabique) par coacervation complexe. Cette stratégie, utilisée pour la production de papier "carbone", permet la duplication d'un texte ou d'une figure sous l'effet d'une faible pression en encapsulant des colorants[18]**.**

II.2. Définition

L'encapsulation est une technique qui consiste à piéger ou enrober une substance ou un mélange de substances spécifiques à l'aide de matériaux adaptés[19]**.**Les substances à encapsuler peuvent être liquides, solides ou gazeuses[20]**,**[21] ce sont souvent des principes actifs sensibles ou instables à certains facteurs environnementaux ayant une action ciblée (vectorisation).[22]

II.3. Techniques d'encapsulation

Il existe plusieurs manières de classer les procédés industriels d'encapsulation suivant différents critères[23] :

- Les procédés peuvent être classés selon l'emploi ou non de solvant organique, certaines techniques telles que la coacervation complexe utilisant des fluides supercritiques.

- La nature du milieu dispersant peut également servir de base à une classification : il peut être liquide (polycondensation interfaciale) gazeux (enrobage en lit fluidisé, ...), ou encore à l'état supercritique (séparation de phase, ...).

- La famille à laquelle appartient le composé employé pour obtenir la capsule peut également permettre de classifier les modes d'encapsulation : peuvent être utilisés des polymères préformés (coacervation, ...), des lipides (spray-congelant, ...), ou encore des monomères(polycondensation interfaciale, polymérisation en milieu dispersé, ...).[23]

II.4. Différent type d'encapsulation :

II.4.1. La micro encapsulation :

La micro encapsulation est une des techniques de conservation de la qualité des substances sensibles et une méthode pour la production des matériaux avec de nouvelle propriétés intéressantes constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. La micro encapsulation est un procédé qui consiste à enfermer des particules micrométriques dans une coquille de polymère, qui à son tour les isole et les protège de l'environnement extérieur. Le

produit obtenu par ce procédé est appelé les microparticules qui sont différenciéspar leur morphologie et leur structure [24].

II.4.1.1. Types de microparticules :

Les procédés de micro encapsulation permettent de préparer des microparticules de deux types :

a) Les systèmes réservoirs (microcapsules) :

Les microcapsules sont des structures réservoirs et sphériques, elles sont constituées d'un cœur généralement huileux entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur n'excède pas quelques nanomètres, le taux d'encapsulation peuvent être particulièrement élevées : entre 85% et 90% de masse de matière active par rapport à la masse de microparticules[25]

b) Les systèmes matriciels (microsphères) :

Les microsphères sont des structures matricielles, de forme sphérique, constituées de polymères de référence (bio) dégradable. Dans le cas de microsphères, le principe actif est soit incorporé à l'intérieur d'un réseau polymères durant la formation des microsphères. Dans ce cas, les teneurs en matière active sont moindres : de l'ordre de 20% à 35% mais parfois ce taux atteindre 50% [25]

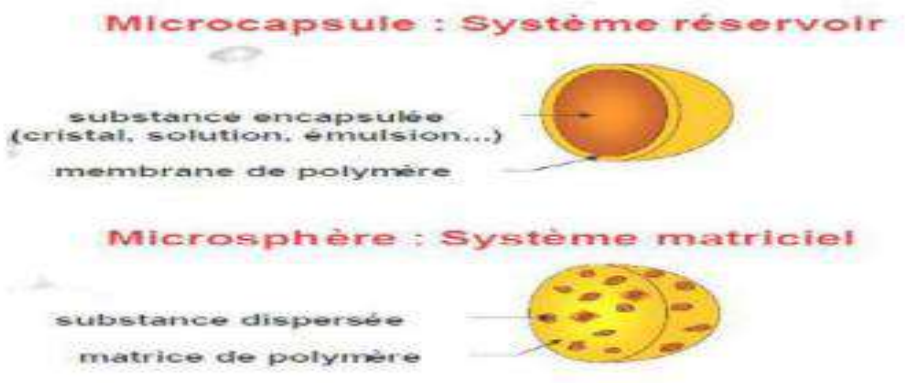


Figure II. 1 Différent système de microparticules.

II.4.2. La nano-encapsulation :

La nano-encapsulation est définie comme une technologie permettant d'encapsuler des substances à l'échelle nanométrique. La distribution de tout composé bioactif à divers sites dans le corps est directement affectée par la taille des particules. Ainsi, la nano-encapsulation a un potentiel plus élevé que la micro-encapsulation d'augmenter la biodisponibilité, d'améliorer la libération contrôlée et de permettre un ciblage précis des composés bioactifs. Les nanoparticules

sont des particules de taille colloïdale ayant des diamètres allant de 10 à 1000 nm et sont exprimées à la fois sous forme de nano capsules et de nano sphères. Les nano capsules sont des systèmes vésiculaires dans lesquels le composé bioactif est confiné dans une cavité entourée d'une membrane polymère unique, alors que les nano sphères sont des systèmes matriciels où le composé bioactif est uniformément dispersé (Figure II.2).

La nano-encapsulation d'agents thérapeutiques augmente leur efficacité, leur spécificité et leur capacité de ciblage[26]**.**

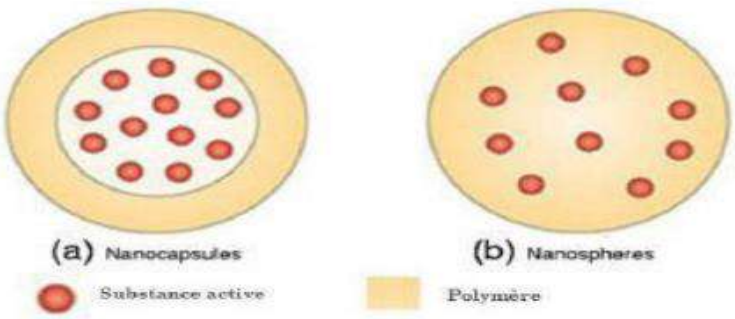


Figure II. 2 Différentes formes de nanoparticules.

II.4.3. Les procédés d'encapsulation

a) Les procédés physico-chimiques :

Ils sont basés sur la maîtrise de paramètres tels que la solubilité et la précipitation des polymères en fonction de l'ajout d'un non-solvant, du pH ou de la température mais aussi sur la maîtrise des changements d'état (fusion, solidification) des polymères.

Au cours de ce procédé, la substance active est dispersée sous forme de gouttes ou de particules, l'encapsulation va alors dépendre des conditions d'étalement des phases en présence[27]**.**

b) Les procédés chimiques :

Basés sur la formation in situ du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation radicalaire, ou polymérisation anionique d'unités monomères. De ce fait, ils se distinguent des méthodes physico-chimiques et mécaniques qui utilisent des matériaux enrobant préformés (polymères, lipides).

c) Les procédésmécaniques :

Qui mettent en œuvre des techniques de pulvérisation, déformation de gouttes ou de gouttelettes et d'extrusion.

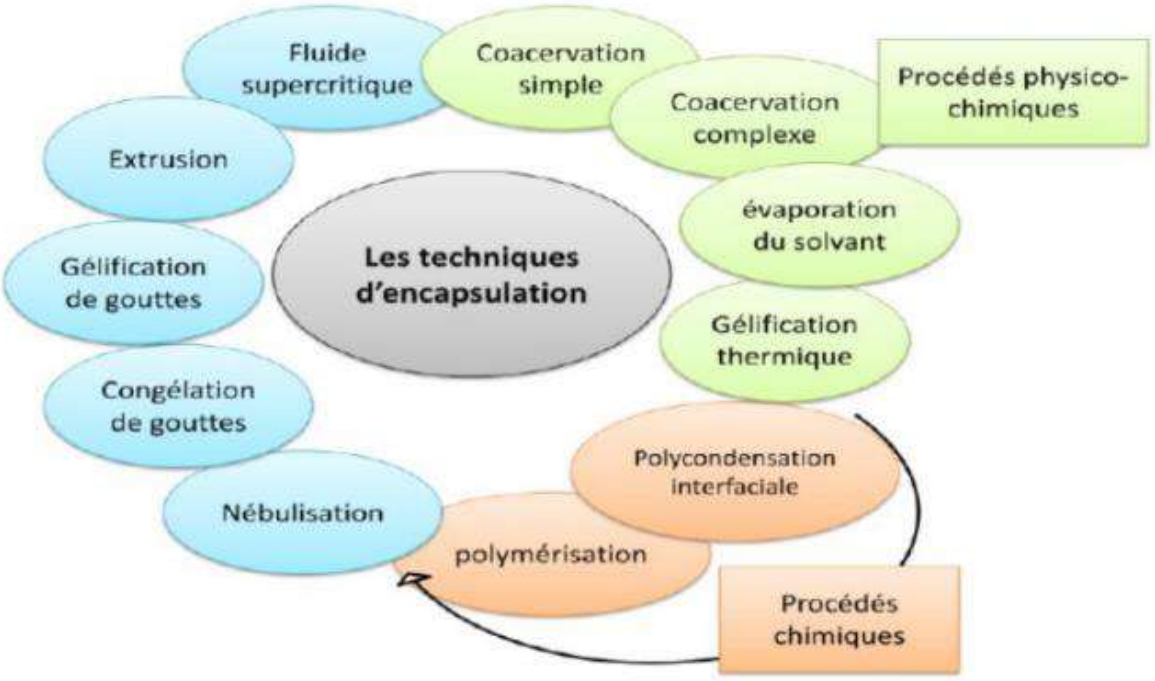


Figure II. 3Les différents procédés d'encapsulation.

II.4.4. But de l'encapsulation : L'encapsulation permet de

- Transformer un liquide en solide.
- Masquer une odeur ou un goût désagréable.
- Protéger des substances sensibles des effets délétères de l'environnement extérieur.
- Protection et stabilisation d'une matière active dans une formulation
- Obtenir une libération contrôlée et ciblée des principes actifs[28].

II.4.5. Application dans le domaine pharmaceutique

Dans le domaine pharmaceutique, l'encapsulation peut avoir pour objectif immobiliser ou isoler le principe actif.[28]

- **Protéger**

De nombreux composés actifs sont fragiles et doivent être protégés du milieu extérieur

L'encapsulation permet leur protection vis-à-vis des contraintes appliquées. Les vitamines E et C sont très souvent encapsulées car elles sont sensibles à la dégradation par contact avec la lumière, la chaleur ou encore l'oxygène.

- **Vectorisé**

La vectorisation par l'encapsulation permet de cibler l'action du principe actif. Parexemple, l'amélioration de la pénétration cutanée au travers du derme ou de l'épiderme peutêtre atteinte grâce à l'encapsulation.

- **Contrôler la libération**

Dans la majorité des cas, le but de l'encapsulation est d'établir un profil de libération spécifique Par exemple le médicament LupronDepot, traitant le cancer de la prostate, permet d'obtenir une libération contrôlée à un taux journalier de 2,8% pendant un mois après une administration sous-cutanée ou intramusculaire.

- **Structurer**

L'encapsulation d'un composé liquide dans des microparticules solides permet d'obtenir une modification de l'état physique de l'actif qui passe de la forme liquide à la forme solide Cela permet par exemple une homogénéisation simplifiée du mélange de l'actif initialement liquide au sein d'une poudre.

II.5. Les polymères biodégradables

Les polymères biodégradables peuvent être divisés en deux groupes en fonction de leur origine : ceux qui sont dérivés de ressources pétrolières et ceux qui sont issus de ressources renouvelables. Les polymères biodégradables dérivés de ressources pétrolières sont principalement des plastiques synthétiques avec des fonctions hydrolysables, comme l'uréthane, l'amide et l'ester. Comparés à ceux issus de ressources renouvelables, ces polymères présentent de meilleures performances et un coût plus faible, mais leur biodégradabilité est moins bonne. Le deuxième groupe, en particulier les agro-polymères, qui comprennent des protéines et des polysaccharides, présente normalement des propriétés mécaniques médiocres et un coût élevé, mais une meilleure biodégradabilité que les polymères dérivés du pétrole [29]**.** Le cycle de vie des polymères biodégradables synthétisés dérivés de ressources renouvelables est illustré à la (Figure II.4).

Dans des conditions de bactéries, d'eau et d'oxygène, les produits polymères se biodégraderont progressivement en biomasse, dioxyde de carbone et eau, qui deviendront finalement une partie des stocks d'alimentation agricole sous le mécanisme de la photosynthèse, complétant ainsi le cycle [20]**.**

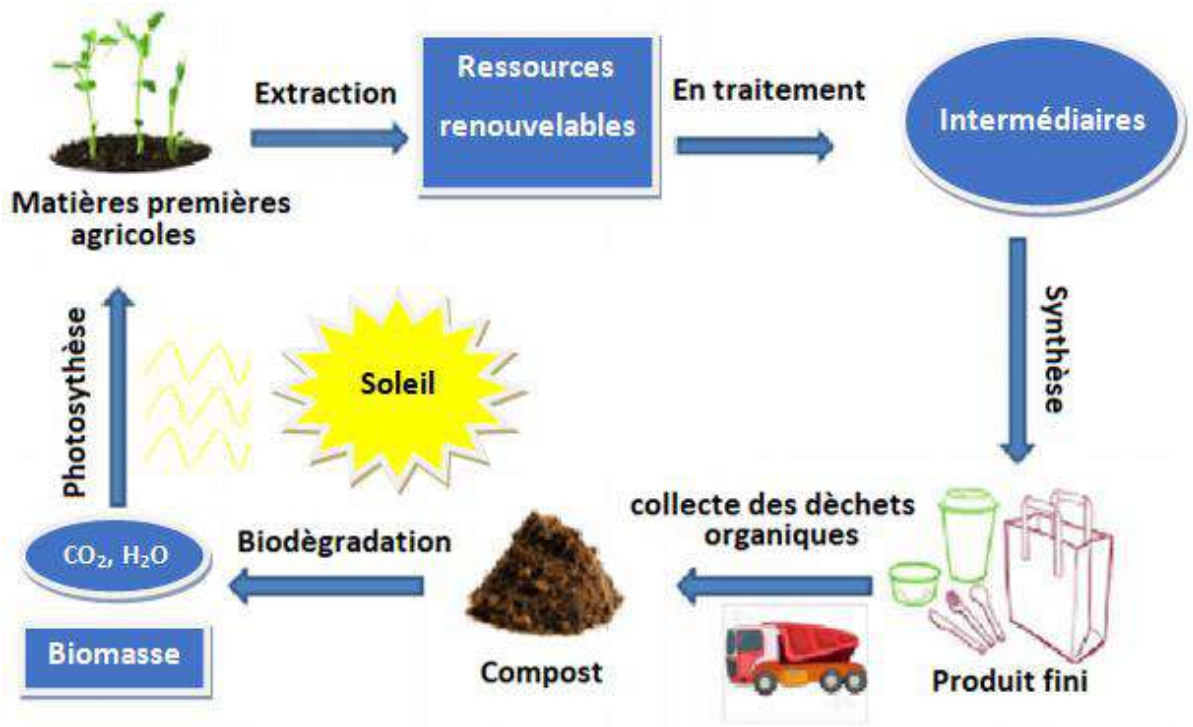


Figure II. 4 Cycle de vie des polymères biodégradables synthétisés dérivés de ressources renouvelables est illustré [20].

II.6. Biodégradation

La biodégradation est un processus de dégradation causé par une activité biologique, en particulier par une action enzymatique, entraînant une modification de la structure chimique de la matière. En fonction de l'environnement de dégradation, la biodégradation peut être divisée en deux catégories : la biodégradation aérobie et la biodégradation anaérobie. Où CPolymère représente soit un polymère, soit un fragment issu de l'un des processus de dégradation définis précédemment. Les processus de réaction sont les suivants :

a) Les micro-organismes :

En tant qu'élément principal du processus de biodégradation, sont le premier facteur important qui doit assurer la décomposition de la structure moléculaire des plastiques, et ensuite le plastique pourrait être entièrement assimilé par l'environnement. À cet égard, les autres facteurs, comme la température, l'humidité et l'oxygène, sont essentiels pour soutenir la bio-activité des microorganismes. En général, une température plus élevée peut accélérer le processus de réaction. Cependant, des températures supérieures à 60°C peuvent tuer certaines bactéries et réduire l'humidité, ce qui affecte le taux de biodégradation. Il est recommandé qu'une température comprise entre 54 ~ 60°C est un bon moyen de stimuler le processus de biodégradation[30].

b) L'humidité :

Est un autre facteur essentiel pour le processus de biodégradation car elle est l'un des éléments de base de la vie des microorganismes. Un pourcentage adéquat d'humidité (50 ~ 60%) aide au développement microbien et à l'activité métabolique et renforce la biodégradation ultérieure des plastiques. En même temps, l'excès d'eau doit être évité dans un processus de biodégradation aérobie car il peut influencer la circulation de l'air et réduire la disponibilité de l'oxygène[30]**.**

c) L'oxygène :

Pour la biodégradation aérobie, la quantité adéquate d'oxygène est utile pour l'action respiratoire des microorganismes. Il est donc important de contrôler le débit d'air. Un faible débit d'air peut entraver la respiration microbienne et affecter leur activité biologique. A l'inverse, un débit d'air trop important peut diminuer l'humidité et la température du milieu de dégradation et ralentir la dégradation, ce qui ralentit la vitesse de dégradation[30]**.**

II.7. Classification des polymères biodégradables

Comme le montre la figure II. 1, les polymères biodégradables peuvent être classés en deux catégories principales en fonction de leur origine (naturelle et synthétique). Les polymères biodégradables naturels peuvent être sous-classes en polymères naturels et polymères naturels modifiés. Les polymères biodégradables synthétiques peuvent être synthétisés à partir de monomères obtenus à partir de produits pétroliers ou de monomères d'origine naturelle [31,32, 33]**.**

(a) les polymères issus de la biomasse tels que les agro-polymères provenant d'agro-ressources, également connus sous le nom de polymères naturels, par exemple l'amidon, la cellulose, les protéines comme la gélatine, la caséine et la soie, la chitine et le chitosan, etc ;

(b) les polymères obtenus par production microbienne, par exemple, les polyhydroxyalcanoates (PHA), le polyhydroxybutyrate (PHB), le polyhydroxyvalérate (PHV) et la cellulose bactérienne, etc ;

(c) les polymères synthétisés chimiquement à l'aide de monomères obtenus à partir d'agro-ressources, par exemple, l’acide polylactique (PLA).

(d) les polymères dont les monomères et les polymères sont tous deux obtenus par synthèse chimique à partir de ressources fossiles, comme les polyesters aliphatiques (polybutylènesuccincte (PBS) et les copolyesterspoly (succinate de butylène-co-adipate) (PBSA),

le polycaprolactone (PCL) et les polyesters aromatiques, les polyesters (poly (alcool vinylique) (PVA) et copolyester (poly (butylènes adipate-co-téréphtalate) (PBAT)).

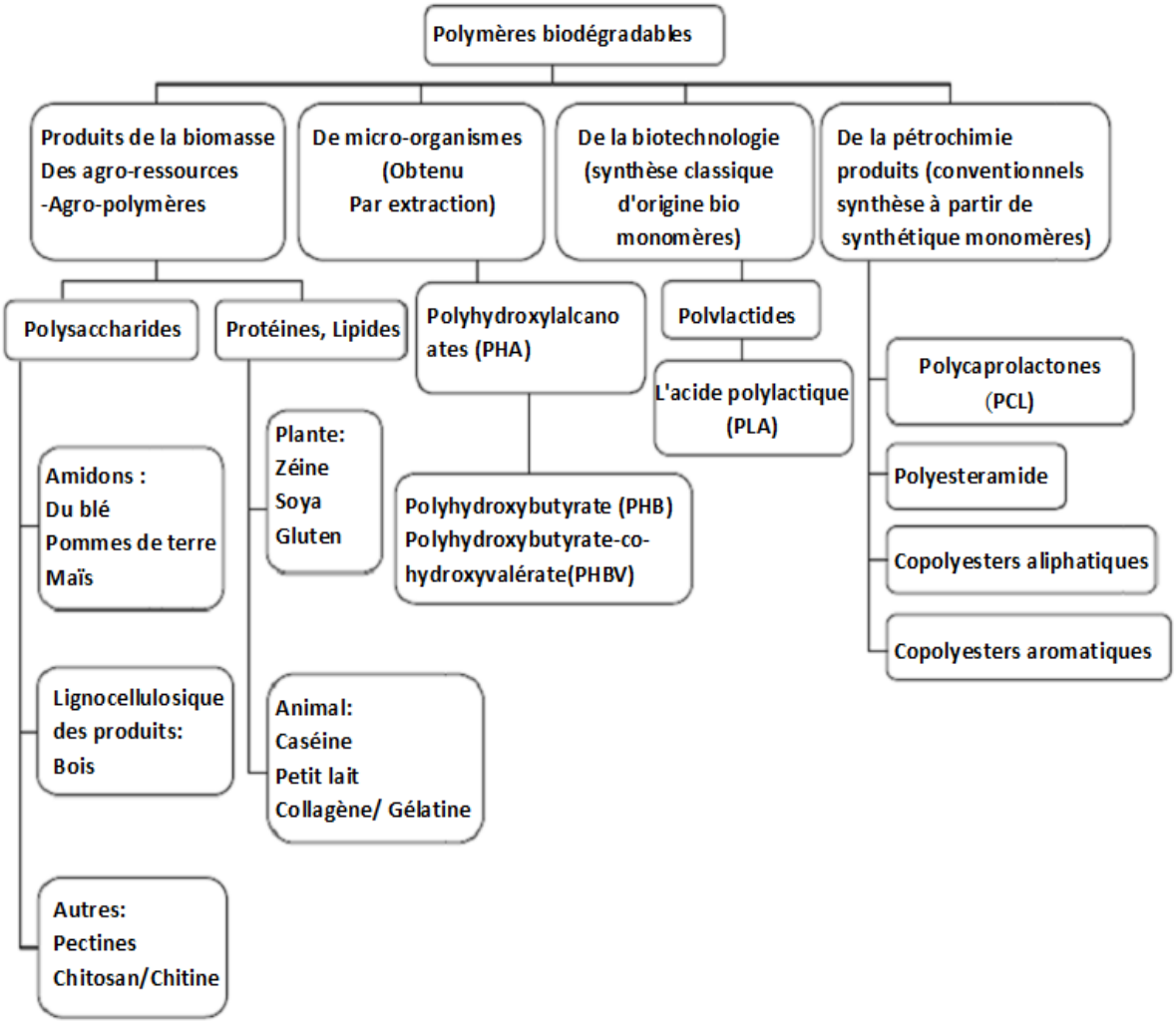


Figure II. 5Classification des polymères biodégradables [34]

II.8. L'acide polylactique :

II.8.1. L'acide polylactique (PLA) :

L'acide polylactique ou polylactide (PLA) est extrait de ressources renouvelables telles que l'amidon, le maïs, les sucres, la pomme de terre et d'autres produits naturels. Il s'agit d'un polymère hydrophobe qui peut être dégradé en présence d'enzymes et par un processus de dégradation hydrolytique du squelette ester [35]**.** Le PLA est l'un des polymères biosourcés et biodégradables les plus étudiés en raison de sa résistance mécanique intéressante, de sa température de fusion élevée, de sa durabilité et de son coût relativement faible. Par conséquent,

la biodégradabilité combinée aux excellentes propriétés du PLA, en font un matériau prometteur pour les applications à cycle de vie court telles que l'emballage et l'électronique [36,37]**.**

II.8.1.1. Solubilité dans les solvants

Les polylactides sont solubles dans le dioxane, l'acétonitrile, le chlorure de méthylène, le 1,1,2-trichloroéthane et l'acide dichloroacétique, mais le chloroforme est le bon solvant du PLA et de la plupart des copolymères correspondants. L'éthylbenzène, le toluène, l'acétone, et le tétrahydrofurane ne dissolvent que partiellement les polylactides à froid, bien qu'ils soient facilement solubles dans ces solvants lorsqu'ils sont chauffés à des températures d'ébullition. Le PLA amorphe est soluble dans les solvants organiques, alors que le PLA cristallin est soluble dans les solvants chlorés et le benzène à des températures élevées et non soluble dans l'acétone, l'acétate d'éthyle ou le tétrahydrofurane. Le poly(rac-lactide) et le poly (méso- lactide) sont solubles dans de nombreux autres solvants organiques comme l'acétone, la pyridine, le lactate d'éthyle, tétrahydrofurane, xylène, acétate d'éthyle, diméthylformamide, méthyléthylcétone. Tous les polylactides sont insolubles dans l'eau, certains alcools et alcanes[34,38,39,40]**.**

II.8.1.2. Dégradation

Le principal mécanisme de dégradation du PLA est l'hydrolyse de la liaison ester, suivie d'une attaque bactérienne sur les résidus fragmentés. Ce processus peut être affecté par différents paramètres tels que la structure du PLA, son poids moléculaire et sa distribution, sa morphologie (cristallisation) et sa composition chimique, ainsi que, bien sûr, les conditions d'hydrolyse [41]. Dans l'environnement, le PLA se dégrade en quelques mois après un mois d'exposition à l'humidité, tandis que dans le compost, dans des conditions de température et d'humidité élevées, il peut se dégrader en quelques semaines[35,42,43]. La dégradation environnementale du PLA est un processus en deux étapes. Premièrement, les molécules de poids moléculaire élevé sont réduites en espèces de poids moléculaire plus faible par la scission aléatoire de la chaîne des liaisons ester. Dans la deuxième étape, les réductions du poids moléculaire se poursuivent jusqu'à obtention de l'acide lactique et des oligomères de faible poids moléculaire qui sont ensuite métabolisés par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone et de l'eau.[42].

La dégradation s'est avérée être un processus autocatalyse en raison de l'augmentation de la quantité de composés contenant des groupes terminaux carboxyliques[42,43].

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODE

Objectif :

L'objectif principal de notre travail de recherche est de réaliser des formulations à libération prolongée à base d'hydrochlorothiazide en utilisant la technique d'encapsulation par évaporation de solvant à l'aide d'un polymère biodégradable.

Pour réaliser notre travail de recherche, nous avons bénéficié d'un stage pratique au niveau de site de production des antibiotiques du groupe Saidal Médéa qui nous a permis de réaliser et caractérisé les essais des formulations.

Les échantillons préparés ont été caractérisés par différentes méthodes d'analyses physicochimiques et biopharmaceutiques à savoir ; Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), spectrophotométrie UV-visible, spectrophotométrie Infra-rouge, microscope à balayage électronique et le test de dissolution.

III.1. Matières premières et matériel utilises :

3.1.1. Matières premières :

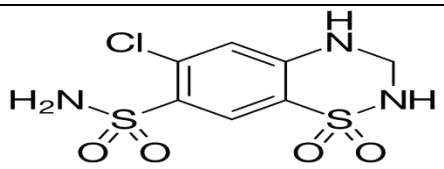
Les matières premières utilisées sont comme suit :

- Hydrochlorothiazide
- Poly acide lactique (PLA) ;
- Poly vinyl pyrrolidone (PVP k30);
- Poly Alcool vinylique (PVA) ;
- Dichlorométhane (DCM) ;
- Méthanol.

3.1.1.1. Principe actif :

Les principales caractéristiques du PA sont résumées dans le tableau suivant

Tableau III 1propriétés d'Hydrochlorothiazide.

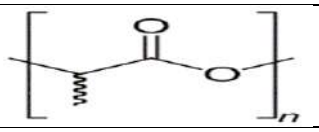
Caractérisations	Spécifications
Nom UICPA	6-chloro-1,1-dioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide
Formule chimique	
Formule brute	$C_7H_8C_lN_3O_4S_2$
Masse molaire	297,741 g/mol
Biodisponibilité	70%
Métabolisme	Hépatique, rénale.
Demi-vie D'élimination	6 à 15 h
Aspect	Poudre blanche
Solubilité	Solvants organiques : Méthanol, Acétone, peu soluble dans l'eau 722 $g \cdot l^{-1}$

3.1.1.2. Polymères :

Poly acide lactique (PLA) :

Le PLA est un polymère biodégradable synthétisé à partir de ressources renouvelables. Les Caractéristiques principales de cet excipient sont résumées dans le Tableau III. 1[44].

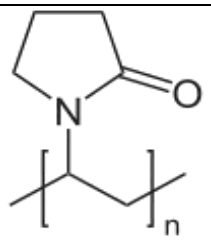
Tableau III 2Propriétés du PLA.

Caractérisations	Spécifications
Nom	Poly acide lactique
Formule chimique	
Formule brute	$(C_3H_4O_2)$ n
Masse molaire	72,0627 g/mol
Densité	1,21 g/cm^3
Solubilité	Tétrahydrofurane, chloroforme, dichlorométhane
Point de fusion	160°C
Température de transition vitreuse	60°C

Poly vinylpyrrolidone (PVP K30):

Les caractéristiques principales de PVP K30 sont résumées dans le **TableauIII 3**[44].

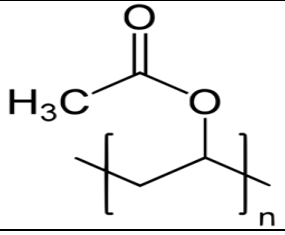
Tableau III 3propriétés de Polyvinylpyrrolidone (PVP K30).

Caractérisations	Spécifications
Formule brute	(C_6H_9NO) n
Formule chimique	
Masse molaire	2 500 - 2 500 000 g/mol
Solubilité	Dans l'eau, l'acide acétique, l'acide formique, l'éthanol, le chloroforme, le dichlorométhane, le glycérol
Masse volumique	1,2 g/cm³
Aspect	Poudre blanche

Poly alcool vinylique (PVA) :

C'est un polymère obtenu par hydrolyse alcaline d'alcool vinylique, dans notre cas il est utilisé comme tensioactif, son taux d'hydrolyse est 87,90%.[45]

Tableau III 4les propriétés de Poly vinylique alcool (PVA).

Caractérisations	Spécifications
Formule brute	(C_2H_4O) n
Formule chimique	
Masse molaire	44,0526 g/mol
Solubilité	Dans l'eau
Masse volumique	1,19–1,31 g/cm³
Aspect	Sous forme de petits cristaux

3.1.2. Appareillage :

- Balance analytique
- Agitateur VORTEX
- Plaque chauffante agitatrice
- Dispositif de filtration sous vide
- Centrifugeuse
- Appareil dissout test
- Microscope optique
- Spectroscope à balayage électronique
- Spectrophotomètre UV visible
- HPLC

3.1.3. Verreries et matériels de laboratoire :

- Bécher 20ml 25ml 50 ml
- Eprouvettes 50 ml 100ml 1000ml
- Burette graduée 25ml
- Tubes à essais
- Spatules ; pissettes
- Fioles jaugées de 10ml ,20ml
- Pipettes 1ml 2ml 5ml
- Seringue de 5ml, papier filtre, papier absorbant, spatules, para film, barreaux magnétiques, pissette.

III.2. Préparation des microparticules :

Afin de préparer des microparticules à base d'Hydrochlorothiazide a utilisé la technique d'encapsulation par émulsion et l'évaporation de solvant quiest largement utilisée dans les applications pharmaceutiques pour la libération contrôlée.

Cette technique consiste à préparer deux (2) phases : une phase aqueuse et une phase organique

Phase aqueuse :

Préparation de PVA (1%) (polyvinylalcool : Tension actif)

- Dissoudre 5g de PVA dans 500ml de l'eau distillé à 80°C.
- Agiter jusqu'à la dissolution complète.

- Laisser la solution à refroidir



Phase organique :

- **Solution 1 :** dissoudre une masse de PLA dans 20 ml de Dichlorométhane (CH_2Cl_2) et laissé sous agitation magnétique jusqu'à la dissolution complète, puis on ajoute une masse de PVP K30 toujours sous agitation (les quantités des PLA et PVP K30 varient selon le tableau III.5)
- **Solution 2 :** dissoudre 75mg d'hydrochlorothiazide dans 3ml du méthanol par vortex.
- **Phase organique :** mélanger les deux solutions (1 et 2) et laissé sous l'agitation pendant 5min.

Production des microparticules :

Versé la phase organique goutte à goutte en utilisant une burette graduée dans 50ml de la phase aqueuse (PVA 1%) avec une vitesse d'agitation de 700tr/min.



Laissez la solution sous agitation jusqu'à l'évaporation totale de DCM, filtré la solution obtenue à travers d'un papier filtre par diapositive de filtration sous vide, sécher les microparticules à température ambiante et collecté.



La composition qualitative et quantitative des essais de formulation réalisés est donnée dans le tableau ci-dessous

Tableau III Matrice des essais de formulation.

Formulation	Principe Actif (mg)	PLA (Mg)	PVP K30	PVA 1%	Vitesse (tr/min)
H 1	75	150	0	50	700
H 2		150	50		
H 3		300	0		
H 4		100	0		
H 5		200	0		
H 6		75	0		
H7		300	50		
H8		100	50		
H9		250	0		
H10		75	25		
H11		250	25		
H 12		200	25		

III.3. Caractérisation des microparticules :

III.3.1. Microscopie optique :

Cette technique permet d'évaluer la taille des microparticules et d'observer leur forme. Des observations au microscope binoculaire au grossissement (x 10) ont été réalisées pour l'ensemble des essais préparés.

III.3.2. Microscopie à balayage électronique (MEB) :

La morphologie des microparticules préparées a été déterminée par microscopie électronique à balayage (MEB) afin d'estimer la taille et d'apprécier l'aspect et la forme des microsphères obtenues. L'appareil utilisé pour réaliser cette analyse est de marque « QUANTA 650 MODE DE TRAITEMENT HUV « high vaccum ».

III.3.3. Spectrophotométrie par Infra-Rouge :

La Spectroscopie Infrarouge (IR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise est enregistrée. Le domaine infrarouge entre 4000 cm-1 et 400 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée, les modes de vibration actifs en infrarouge peuvent être déterminés grâce à la théorie des groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent, à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

III.4. Détermination du taux d'encapsulation des microparticules par HPLC :

Le taux d'encapsulation a été déterminé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

III.4.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange même très complexe est constitué de :

a) Auto-injecteur :

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage est généralement pilotée par une vanne généralement électronique (électrovanne) qui permet de changer la circulation des fluides dans le système d'injection pour pouvoir tour à tour remplir la boucle d'injection et injecter son contenu dans la colonne, le choix du volume d'injection se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser.

b) La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 mm.Au-delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

c) La phase mobile :

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse.

d) Détecteurs

Détecteur UV-visible (celui que nous utilisons) : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. Opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'utilisateur. La lampe Deutérium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisée à la longueur d'onde non variable de 254 nm. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption ε soit suffisamment grand ; la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie.



Figure III. 1Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .

III.4.1.2. Détermination de la longueur d'onde maximale d'absorption d'hydrochlorothiazide :

Pour déterminer la bande caractéristique d'hydrochlorothiazide (λmax), un balayage de longueur d'onde entre 220 nm et 400 nmest effectué sur une solution contenant

L'hydrochlorothiazide de concentration de 0.02mg/ml dans le méthanol.

L'hydrochlorothiazide présente une absorbance maximale a une longueur d'onde λmax =273 nm, comme c'est présenté dans la Figure III.2

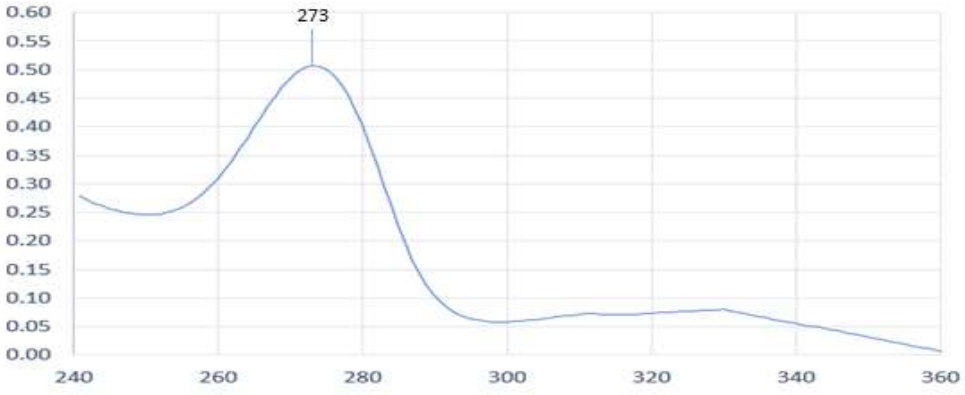


Figure III. 2. Courbe de détermination de λ max

Afin de déterminer le taux du principe actif encapsulé, on suit le protocole suivant :

III.4.1.3. Préparation de la courbe d'étalonnage :

- **Préparation de la solution mère :**

STDm : dissoudre 10mg d'hydrochlorothiazide dans 50ml de méthanol.

- **Préparation des solutions standards :**

➢ Faire des prélèvements à partir de la solution mère selon le tableau III.8 ci-dessous ;

➢ Mettre le volume indiqué dans le tableau dans 20 ml NaOH 0.02N

➢ Réaliser l'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Tableau III 5Préparation des solutions standards de la courbe d'étalonnage.

Solution fille	Volume de la solution STDm (ml)
Std1	1.8
Std2	1.4
Std3	1.0
Std4	0.6
Std5	0.2

III.4.1.4. Préparation des échantillons :

- Dissoudre 10mg des microparticules dans 1ml de DCM
- Agiter avec vortex pendant 5min (l'éclatement des microparticules)
- Ajouter 10ml de NaOH (0.02N) et continuer l'agitation pendant 5min

- Centrifugée la solution pendant 15min à 5000 tr/min
- Prélevé 1ml de surnagent dans 20ml de NaOH (0.02N) et analyser par HPLC

Conditions chromatographiques :

- Volume injection : 20µl ;
- Longueur d'onde (λ) : 273nm ;
- Débit : 2ml/min ;
- Colonne ; C_{18} (10cm, 0.46µm, 5µm) ;
- **Phase mobile :**150ml d'eau distillé ajuster à pH a 2,8 par l'acide ortho-phosphorique et 350ml d'acétonitrile, Filtrer la solution avec un filtre de 0,22µm

Le taux du PA encapsulé est calculé comme suit :

$$\mathbf{TE}(\%) = \frac{\mathbf{Q\ (mg)}}{\mathbf{Qi(mg)}}\mathbf{x100}$$

- TE (%) : Taux d'encapsulation
- Q : Quantité du principe actif encapsulé (mg)
- Q_i : Quantité initiale du principe actif à encapsuler (mg)

III.5. Test de dissolution :

Le test de dissolution a été réalisé par un dissolutest dans un milieu biologique intestinal (tampon pH=6,8), Le milieu a été préparé selon la méthode USP 40 décrite comme suit :

- **Milieu intestinal : tampon phosphate PH =6.8**

Préparation de la solution de phosphate de potassium monobasique 0.2 M : dissolvez 27.22 g du phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) dans l'eau distillée, et diluée à 1000 ml avec le même solvant.

Placez 50 ml de la solution de phosphate de potassium monobasique 0.2 M dans une fiole de 200ml, ajoutez le volume de NaOH0.2M spécifie dans le tableau 8 (d'après le tableau le volume de NaOH 0.2M est 22.4 ml pour atteindre un PH de 6.8), puis complété au volume avec l'eau distillé.

Tableau III 6 Référence USP pour les solutions tampon phosphate.

Solution tampon phosphate												
PH	5.8	6	6.2	6.4	6.6	6.8	7	7.2	7.4	7.6	7.8	8
Volume de NaOH 0.2 M (ml)	3.6	5.6	8.1	11.6	16.4	22.4	29.1	34.7	39.1	42.4	44.5	46.1

III.5.1. Dissolutest :

Toutes les parties de l'appareil qui peuvent entrer en contact avec l'échantillon ou avec le milieu de dissolution sont chimiquement inertes et n'adsorbent pas la substance à examiner, ne réagissent pas en sa présence et n'influencent pas son comportement.

Dans notre essai, on utilise un appareil à palette, il est constitué par :

- Un récipient cylindrique à fond hémisphérique, d'une capacité nominale de 1000 ml, en verre borosilicaté ou en un autre matériau transparent, approprié. Le récipient est muni d'un couvercle évitant l'évaporation et comportant un orifice central destiné au passage de la tige de l'agitateur ainsi que plusieurs autres orifices permettant l'introduction d'un thermomètre et celle des dispositifs de prélèvement du liquide ;
- Un agitateur constitué par une tige verticale à la partie inférieure de laquelle est fixée une palette. La palette est située à une distance de 25 ± 2 mm du fond intérieur du récipient. La partie supérieure de la tige de l'agitateur est reliée à un moteur muni d'un régulateur de vitesse. La rotation de l'agitateur est uniforme, sans oscillation importante ;

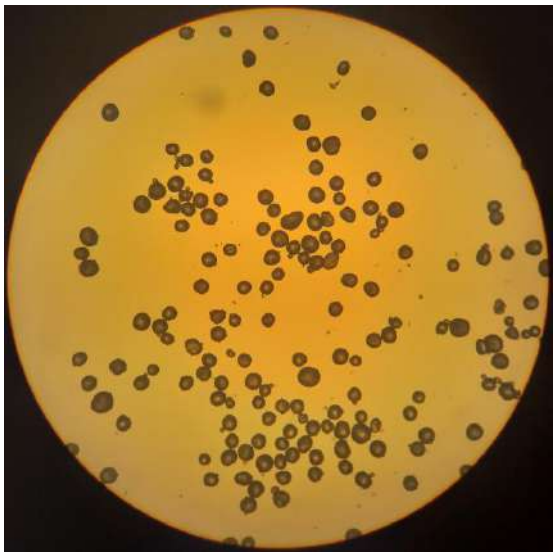
III.5.2. Mode opératoire du test de dissolution :

- ✓ Allumer le dissolu test et régler la vitesse d'agitation à 50tr/min et la température à 37°C
- ✓ Remplir les Gaudet de dissolutest par 300 ml de milieu des dissolutions préparées
- ✓ A T=37°C, introduire dans chaque Gaudet 25mg des microparticules démarrer l'agitation
- ✓ Effectuer des prélèvements de 5ml chaque 30 min pendant 4H à l'aide d'une seringue.
- ✓ Remplacera près chaque prélèvement le volume prélève par le même volume de milieu dissolution
- ✓ A l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à 273nm lire les absorbances des solutions prélevées et utilisé le milieu de dissolution comme blanc.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Les photos des microscopes de la formulation optimale et principe actif pur

Tableau IV 1formulation optimale (H03) et l'hydrochlorothiazide par microscopie.

essai	Essai Aspect microscopique x10 Observations	Observations
principe actif pur		Poudre amorphe
H03		Présence de Microparticules Sousforme sphérique

IV.2. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

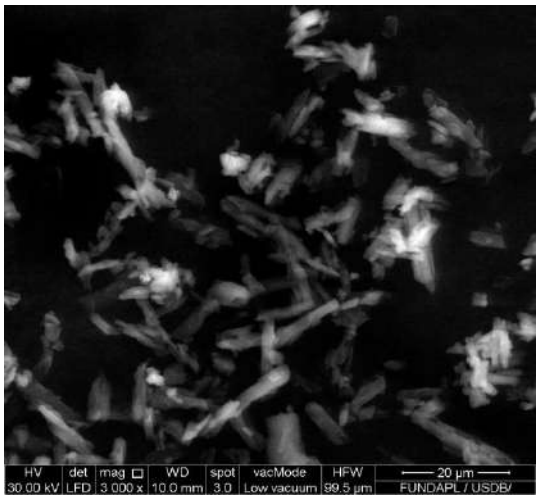


Figure IV. 1PA pur.

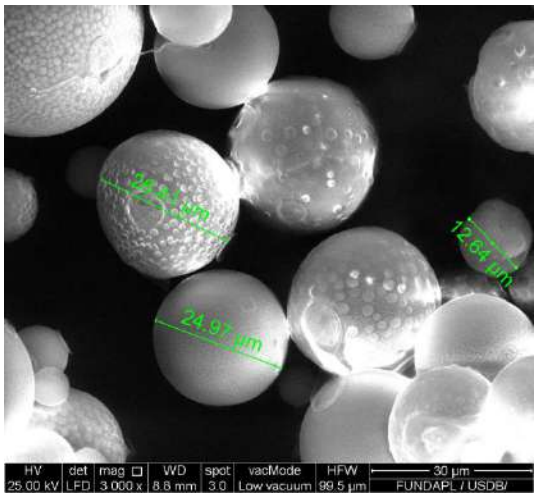


Figure IV. 2 Formulation de H03.

Image de MEB montre des microparticules sphériques de taille varie entre 12 et 26 µm.

IV.3. Caractérisation par spectroPHOTOMETRE infrarouge

L'analyse IR-TF est utilisée pour confirmer la présence des bandes caractéristiques d'hydrochlorothiazide dans les microsphères ainsi que d'étudier d'éventuelles interactions entre le PA, PLA et PVP K30. Les spectres IR-TF d'hydrochlorothiazide, PLA, PVP K30 et les formulations ont été enregistrés entre 400 et 4000 cm

a) Spectre IR-TF de Hydrochlorothiazide

Le spectre IR d'hydrochlorothiazide est représenté sur la **FigureVI.3** ci-dessous.

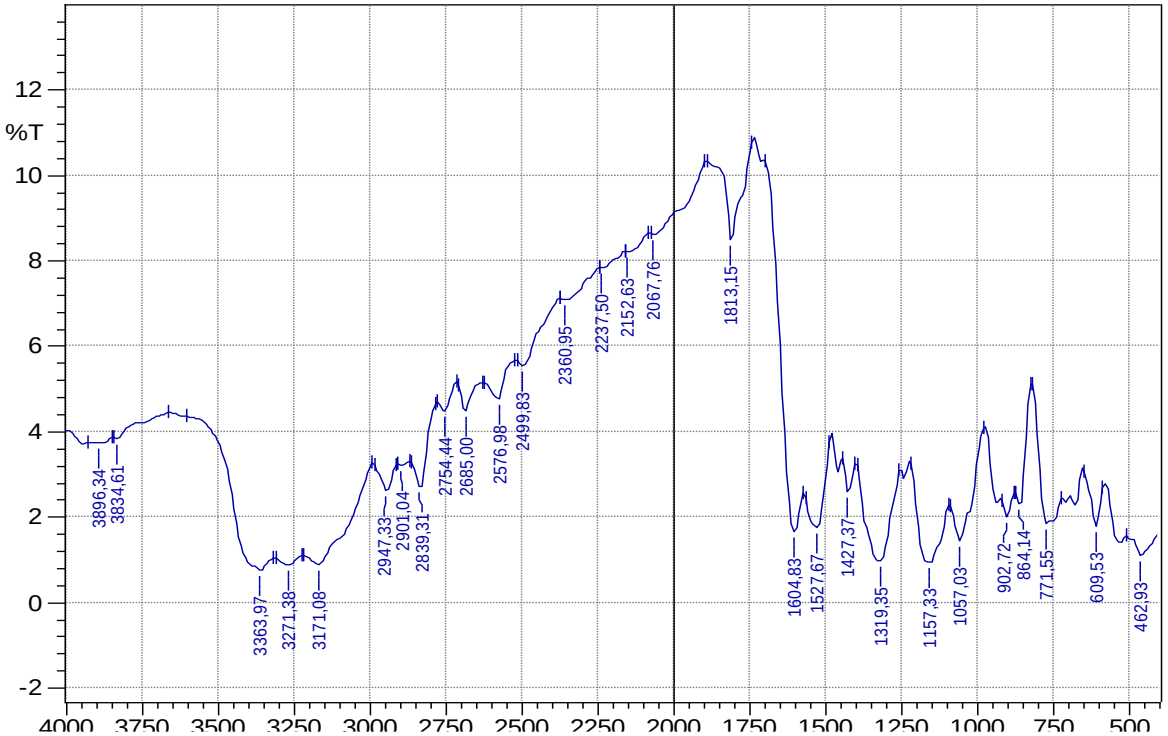


Figure IV. 3 Spectre IR de l'Hydrochlorothiazide

Tableau IV 2 Principales bandes caractéristiques de l'Hydrochlorothiazide

Nombre d'onde cm^{-1}	**Attribution**
3363	N─H
3171	C─H
2947	-CH2
1527-1604	C=C (aromatique)
1319	Asy S=O
1057	SyS=O
1026	C−N
771	C− Cl
676	C─H

Sy=symétrique, Asy= asymétrique.

b) Spectre IR-TF du PVP K30:

Le spectre IR du PVP K30 est représenté sur la **FigureVI.4**ci-dessous. Le **TableauVI.3**donne les principales bandes caractéristiques du PVP K30 .

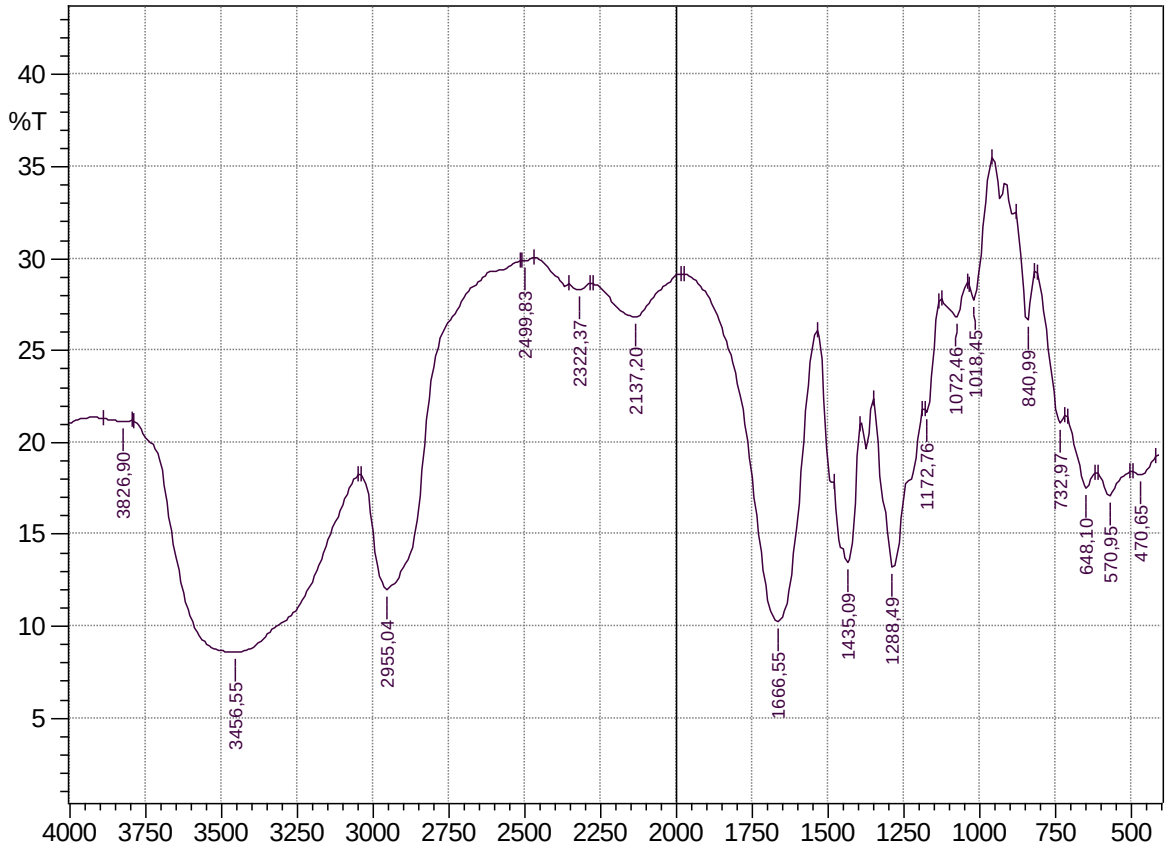


Figure IV. 4 Spectre IR-TF PVP K30

Tableau IV 3 : Principales bandes caractéristiques du PVP

Nombre d'onde cm^{-1}	**Attribution**
3456,55	υ OH
2955,04	υ CH3
1666,55	υ C=O Forte
1435.09	δ CH3
1172.76	υ C-O-C (ester)
1072.46	υ C-O-C
840.99	υ C-COO

c) Spectre IR du PLA :

Le spectre IR du PLA est représenté sur la **FigureVI.5. LeTableauVI.4**donne les principales bandes caractéristiques du PLA.

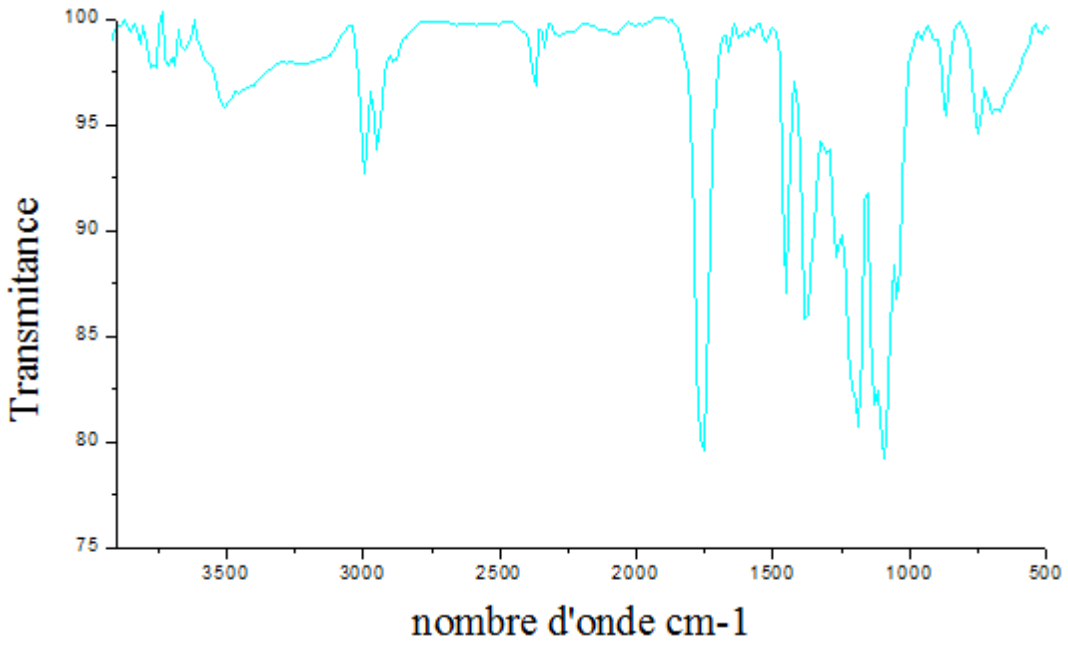


Figure IV. 5 Spectre IR du PLA

Tableau IV 4 Les principales bandes caractéristiques du PLA.

Nombre d'onde (cm^{-1})	**Attribution**
3000	υas OH
2994.45	υas CH3
1755	υ C=O Forte
1454	CH2
1089,94	υs C-O

d) Spectre IR des microsphères H 03 :

Le spectre IR des formulation optimale H03 sont représentés sur la**Figure VI.6**

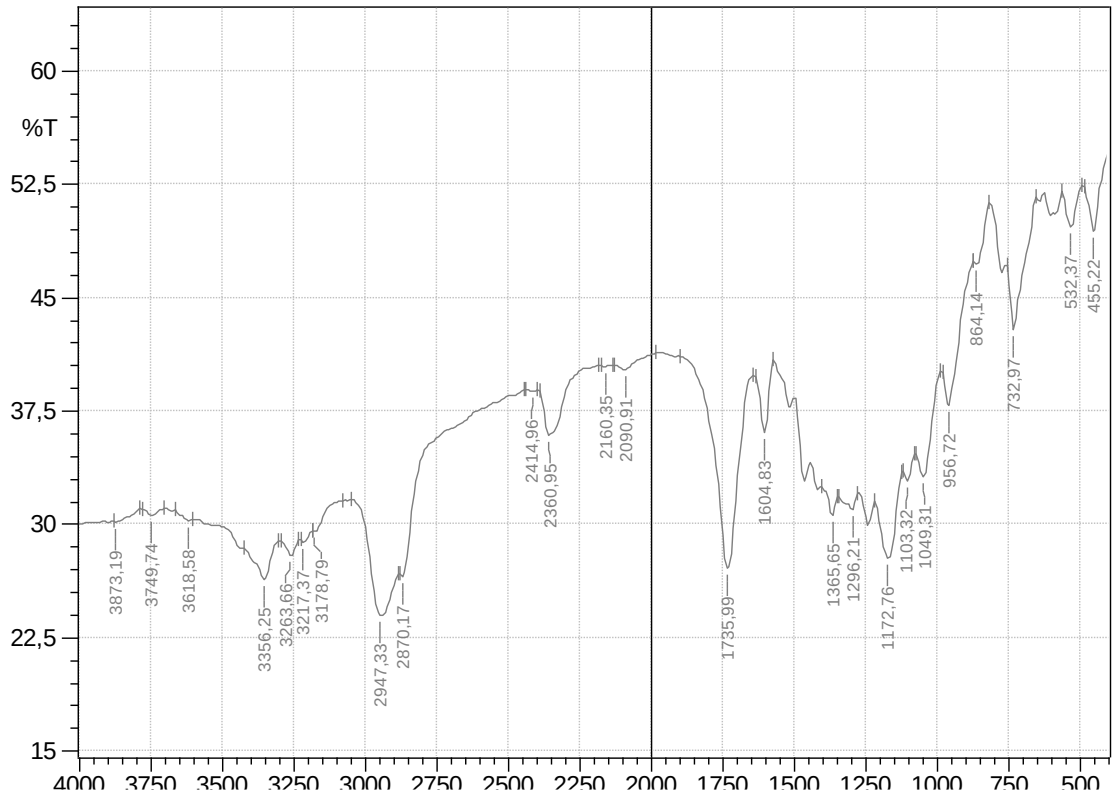


Figure IV. 6Spectre IR formulation optimale de H03.

d.1 Interprétation des résultats :

D'après le spectre IR des microsphères de la formulation H03, nous remarquons l'apparition des bandes caractéristiques d'Hydrochlorothiazide (3356 cm^{-1}(N-H) ; 3178 cm^{-1}(C-H) ; 2947 cm^{-1}(=CH2) ; 1604 cm^{-1} (C=C) ; 1365 cm^{-1}(S=O) ; 1049 cm^{-1}(C-N) ; 732cm^{-1}(C-Cl)) révélant leur présence dans les microsphères.

Nous remarquons également que les principalesbandes des polymères apparaissent dans le spectre de la formulation H03 (3000-3600OH (COOH) ; 2994.45 cm^{-1}(CH3), 1755 cm^{-1} (C=O) Forte-1, 1454 cm^{-1} (CH3), 1089,94 cm^{-1}C-O-C).absence des formations et des nouveaux pics, Ceci indique l'absence probable d'interactions chimiques entreles polymères et le principe actif.

IV.4. Taux d'encapsulation

La détermination du taux d'encapsulation d'hydrochlorothiazide est été réalisée à l'aide de l'équation de la courbe d'étalonnage des solutions standards dosées par Chromatographie liquide à haute performance (Figure VI.7)

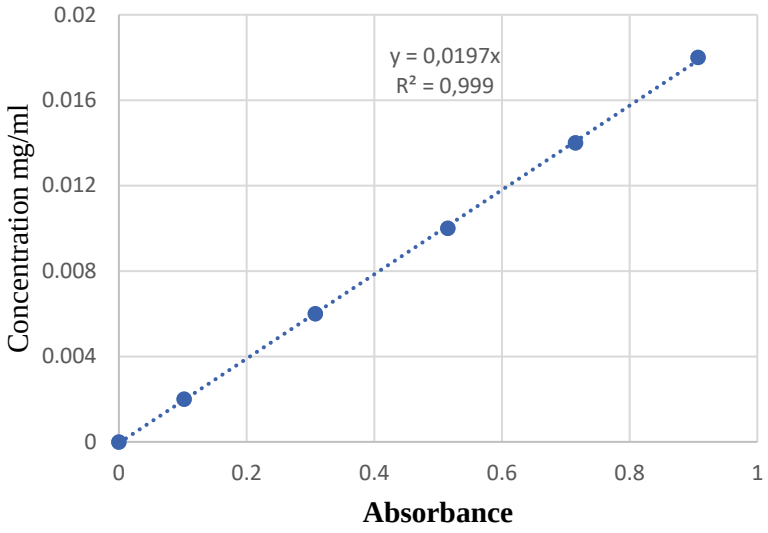


Figure IV. 7 Courbe d'étalonnage du Hydrochlorothiazide.

Les résultats expérimentaux du taux d'encapsulation des différentes formulations sont donnés dans le **Tableau VI.5**

Tableau IV 5Résultats des taux d'encapsulation.

Formulation	Principe Actif (mg)	PLA (mg)	PVP K30	TE % HCT
H 1	**75**	150	0	50%
H 2		150	50	46.94%
H 3		300	0	85.22%
H 4		100	0	42.22%
H 5		200	0	60.67%
H 6		75	0	38.02%
H 7		300	50	81.35%
H 8		100	50	40.14%
H9		250	0	71.06%
H10		75	25	35.26%
H11		250	25	69.25%
H 12		200	25	59.17%

IV.5. Effet PLA sur le taux d'encapsulation:

D'après les résultats regroupés dans le **Tableau VI.5**, nous remarquons que le taux d'encapsulation du principe actif est proportionnel à la quantité du PLA. Autrement dit, plus la masse du PLA augmente, plus le taux d'encapsulation augmente. Le polymère PLA influe positivement sur le taux d'encapsulation. Un taux d'encapsulation maximal est obtenu est 85,22% de la formulation H03 qui contient la quantité la plus élevée de PLA (300 mg) et l'absence de PVP K30.

IV.6. Etude de la cinétique de libération *in vitro* des microparticules :

Les profils de libération *in vitro* des microparticules obtenues par les différentes formulations sont présentés graphiquement sur les figures:

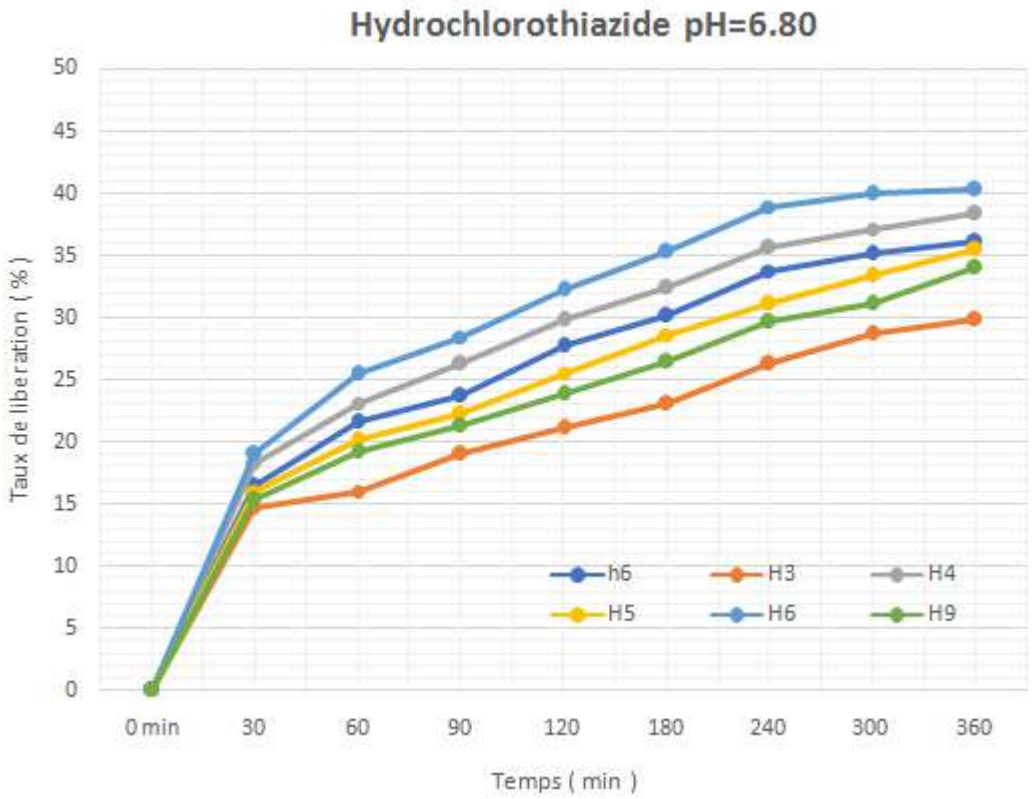


Figure IV. 8Profil de libération des microparticules dans le milieu intestinal (pH=6.8) des formulations sans PVP K30.

D'après les résultats du **Figure IV.8**, une libération lente a été observé pour les formulations H1 ,H3 ,H4 ,H5 ,H6,H9 près 40 %, cela est dû à la faible biodisponibilité l'hydrochlorothiazide et l'absence de PVP K30 qui possédé une nature hydrophile

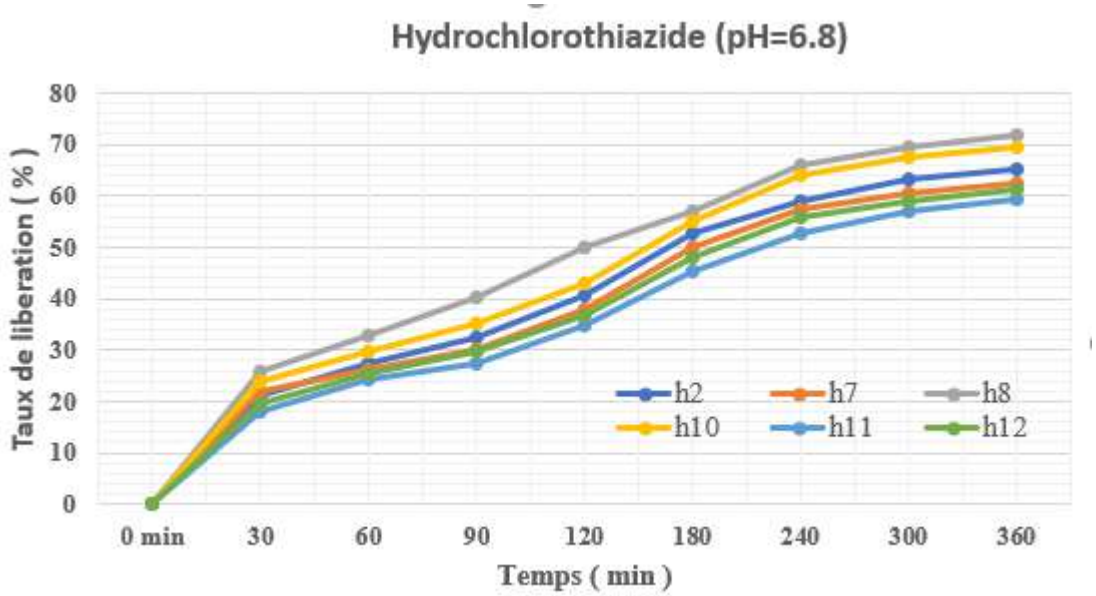


Figure IV. 9Profil de libération dans le milieu intestinal avec pvp (pH=6.8).

D'après la **Figure IV.9** une libération rapide du principe actif par rapport la libération des formulations sans PVP K30 était de près de71%, Cet amélioration de libération de principe actif due à la présence de PVP K30 ; Le PVP K30 aide à l'hydratation des microparticules en créant des canaux. Ainsi, en raison de la nature poreuse des microparticules, il y a une pénétration améliorée du milieu de dissolution dans la matrice polymère.

CONCLUSION GENERALE

Dans la présente étude, une formulation à libération prolongée d'hydrochlorothiazide a été préparée àl'aide des polymères biodégradables le Poly acide lactique (PLA) et le Polyvinylpyrrolidone (PVP K30) par la technique d'émulsion et d'évaporation du solvant.

L'analyse microscopiqueà balayage électronique (MEB) de cette formulation révèle que les microparticules sont sphériques avec une taille entre 12 µm et 26 µm. Les études IR ont indiqué qu'il n'y a pas d'interaction entre les polymères et le principe actif utilisé.

L'efficacité d'encapsulation déterminer par HPLC montre que le taux d'encapsulation du principe actif est proportionnel à la quantité du PLA. Par contre, la quantité du PVP K30 a un effet inverse sur le taux d'encapsulation. Autrement dit ; plus la quantité du PVP augmente, plus le taux d'encapsulation du principe actif diminue.

Le PVP a un effet remarquable sur la libération d'hydrochlorothiazide. La libération de médicament augmente avec l'augmentation de la concentration de PVP. Cela est dû à la formation de pores et donc à l'amélioration de la pénétration du milieu de dissolution.

D'après les études ci-dessus, H03 est sélectionné comme la meilleure formulation car il a une efficacité de piégeage plus élevée 85.22%.

Ainsi, les microsphères obtenues offrent une approche appropriée et pratique pour obtenir une libération prolongée d'hydrochlorothiazide avec une biodisponibilité améliorée et une fréquence de dosage réduite pour la gestion d'hypertension.

Références bibliographiques

[1] A. Figueroa-Campos et al., “Hydrochlorothiazide in vitro–in vivo correlation: predictive dissolution as a development tool,” Pharmaceutics, vol. 12, no. 7, p. 633, 2020.

[2] M. B. Zewail, S. A. El-Gizawy, M. A. Osman, and Y. A. Haggag, “Preparation and In vitro characterization of a novel self-nano emulsifying drug delivery system for a fixed-dose combination of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide,” J. Drug Deliv. Sci. Technol., vol. 61, p. 102320, 2021.

[3] Y. A. Haggag, M. Yasser, M. M. Tambuwala, S. S. El Tokhy, M. Isreb, and A. A. Donia, “Repurposing of Guanabenz acetate by encapsulation into long-circulating nanopolymersomes for treatment of triple-negative breast cancer,” Int. J. Pharm., vol. 600, p. 120532, 2021.

[4] O. Sadoun, F. Rezgui, and C. G’Sell, “Optimization of valsartan encapsulation in biodegradables polyesters using Box-Behnken design,” Mater. Sci. Eng. C, vol. 90, pp. 189–197, 2018.

[5] T. Baouz, F. Rezgui, and U. Yilmazer, “Ethylene-methyl acrylate-glycidyl methacrylate toughened poly (lactic acid) nanocomposites,” J. Appl. Polym. Sci., vol. 128, no. 5, pp. 3193–3204, 2013.

[6] T. Baouz, E. Acik, F. Rezgui, and U. Yilmazer, “Effects of mixing protocols on impact modified poly (lactic acid) layered silicate nanocomposites,” J. Appl. Polym. Sci., vol. 132, no. 8, 2015.

[7] A. Dahdouh, D. E. Kati, M. Bachir-bey, A. Aksas, and F. Rezgui, “Deployment of response surface methodology to optimize microencapsulation of peroxidases from turnip roots (Brassica rapa L.) by double emulsion in PLA polymer,” J. Food Sci., vol. 86, no. 5, pp. 1893–1906, 2021.

[8] S. D. Purohit, R. Bhaskar, H. Singh, I. Yadav, M. K. Gupta, and N. C. Mishra, “Development of a nanocomposite scaffold of gelatin–alginate–graphene oxide for bone tissue engineering,” Int. J. Biol. Macromol., vol. 133, pp. 592–602, 2019.

[9] M. Cécile, “Opinion vis à vis des médicaments génériques: enquête auprès de 300 patients de pharmacies seinomarines,” 2014.

[10] P. J. F. Deschênes, G. Leguelinel-Blache, P. Bonnabry, G. Philippe, and J. F. Bussières, “Analyse comparative du cadre juridique et normatif encadrant la pratique de la pharmacie au Canada (Québec), en France, en Suisse (Genève) et en Belgique,” Le Pharm. Hosp. Clin., vol. 54, no. 4, pp. 356–375, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.PHCLIN.2019.09.006.

[11] F. Lafarga, “Bibliografía de estudios sobre historia de la traducción en España.” Alicante: Biblioteca Virtual Miguel de Cervantes. Available at: http://www …, 2017.

[12] RI, “Home - Pharmacie à Genève aux HUG,” pharmacie a genève aux HUG, 2005. https://pharmacie.hug.ch/ (accessed Jun. 17, 2022).

[13] L. Hir, Abreges de Pharmacie. 2009.

[14] M. D. E. L. SUPÉRIEUR, “Elaboration d’une forme comprimé à libération prolongée d’hydrochlorothiazide.” UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS SETIF, 2019.

[15] M. Lambert, “Les associations d’antihypertenseurs.” UHP-Université Henri Poincaré, 2006.

[16] “NCI Thesaurus,” 2022. https://ncithesaurus.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C29098 (accessed Jun. 17, 2022).

[17] G. Gamba, “The thiazide-sensitive Na+-Cl- cotransporter: Molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs,” Am. J. Physiol. - Ren. Physiol., vol. 297, no. 4, Oct. 2009, doi: 10.1152/AJPRENAL.00159.2009.

[18] F. H. H. Leenen, E. Coletta, R. White, and Young, “Sympatho-excitatory responses to once-daily dihydropyridines in young versus older hypertensive patients: Amlodipine versus felodipine extended release,” J. Hypertens., vol. 24, no. 1, pp. 177–184, 2006, doi: 10.1097/01.HJH.0000198032.07224.C3.

[19] K. N. P. Humblet-Hua, G. Scheltens, E. van der Linden, L. M. C. Sagis, and madene, “Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin,” Food Hydrocoll., vol. 25, no. 4, pp. 569–576, Jun. 2011, doi: 10.1016/J.FOODHYD.2011.01.003.

[20] L. Deladino, P. S. Anbinder, A. S. Navarro, and M. N. Martino, “Encapsulation of natural antioxidants extracted from Ilex paraguariensis,” Carbohydr. Polym., vol. 71, no. 1, pp. 126–134, 2008.

[21] P. S. Anbinder, L. Deladino, A. S. del R. Navarro, J. Amalvy, and M. N. Martino, “Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers,” Encapsulation, 2011.

[22] G. T. Vladisavljevic, “Encapsulation application,” Encapsulation Membr., 2012.

[23] F. Lagarce et al., “Baclofen-loaded microspheres: preparation and efficacy testing in a new rabbit model,” Eur. J. Pharm. Biopharm., vol. 59, no. 3, pp. 449–459, 2005.

[24] S. Rabeau, “Étude d’un procédé continu de microencapsulation,” Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009. [Online]. Available: https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748744

[25] S. Rabeau, “Étude d’un procédé continu de microencapsulation basé sur un micromélangeur - Université de Lorraine,” Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009. Accessed: Jun. 17, 2022. [Online]. Available: https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748744

[26] P. D. VANDAMME Thierry, Microencapsulation. 2007. Accessed: Jun. 17, 2022. [Online]. Available: https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/microencapsulation/vandamme/descriptif-9782743009762

[27] A. Laurenzana et al., "uPA/uPAR system activation drives a glycolytic phenotype in melanoma cells," Int. J. cancer, vol. 141, no. 6, pp. 1190–1200, 2017.

[28] J. Rodríguez, M. J. Martín, M. A. Ruiz, and B. Clares, "Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives," Food Res. Int., vol. 83, pp. 41–59, May 2016, doi: 10.1016/J.FOODRES.2016.01.032.

[29] Y. Deng, "Optimising properties of poly (lactic acid) blends through co-continuous phase morphology." Loughborough University, 2017.

[30] E. Castro-Aguirre, R. Auras, S. Selke, M. Rubino, and T. Marsh, "Insights on the aerobic biodegradation of polymers by analysis of evolved carbon dioxide in simulated composting conditions," Polym. Degrad. Stab., vol. 137, pp. 251–271, 2017.

[31] M. Jamshidian, E. A. Tehrany, M. Imran, M. Jacquot, and S. Desobry, "Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies," Compr. Rev. food Sci. food Saf., vol. 9, no. 5, pp. 552–571, 2010.

[32] P. Bordes, E. Pollet, and L. Avérous, "Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems," Prog. Polym. Sci., vol. 34, no. 2, pp. 125–155, 2009.

[33] S. S. Ray and M. Bousmina, "Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in greening the 21st century materials world," Prog. Mater. Sci., vol. 50, no. 8, pp. 962–1079, 2005.

[34] L. Avérous, "Polylactic acid: synthesis, properties and applications," in Monomers, polymers and composites from renewable resources, Elsevier, 2008, pp. 433–450.

[35] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," Prog. Polym. Sci., vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, 2007.

[36] D. W. Farrington, J. Lunt, S. Davies, and R. S. Blackburn, "Poly (lactic acid) fibers," Biodegrad. Sustain. fibres, vol. 6, pp. 191–218, 2005.

[37] J.-B. Zeng, K.-A. Li, and A.-K. Du, "Compatibilization strategies in poly (lactic acid)-based blends," Rsc Adv., vol. 5, no. 41, pp. 32546–32565, 2015.

[38] S. Ebnesajjad, Handbook of biopolymers and biodegradable plastics: properties, processing and applications. William Andrew, 2012.

[39] K. M. Nampoothiri, N. R. Nair, and R. P. John, "An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research," Bioresour. Technol., vol. 101, no. 22, pp. 8493–8501, 2010.

[40] R. A. Auras, L.-T. Lim, S. E. M. Selke, and H. Tsuji, Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications. John Wiley & Sons, 2011.

[41] S. R. Winn, H. Uludag, and J. O. Hollinger, “Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2,” Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 31, no. 3, pp. 303–318, 1998.

[42] H. Liu and J. Zhang, “Research progress in toughening modification of poly(lactic acid),” J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys., vol. 49, no. 15, pp. 1051–1083, Aug. 2011, doi: 10.1002/polb.22283.

[43] D. B. Dittenber and H. V. S. Gangarao, “Critical review of recent publications on use of natural composites in infrastructure,” Compos. Part A Appl. Sci. Manuf., vol. 43, no. 8, pp. 1419–1429, Aug. 2012, doi: 10.1016/J.COMPOSITESA.2011.11.019.

[44] C. de l’Europe, Pharmacopée européenne. Conseil de l’Europe, 1996.

[45] USP, united state pharmacopoeia 40 NF 38. 2017.